

SARASVATE HOSTALÁCIO

**ESTUDO DE ALGUNS ASPECTOS FÍSICOS, BIOQUÍMICOS E ANATÔMICOS
NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DO FEIJÃO EM
DIFERENTES REGIMES DE IRRIGAÇÃO.**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do
título de Doutor em Biologia Vegetal.

Orientador: I.F.M. VÁLIO

CAMPINAS, SÃO PAULO

1983

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade proporcionada para realizar o Curso de Doutorado em Biologia.

À Escola Superior de Agricultura de Lavras na pessoa do professor João Márcio de Carvalho Rios, ilustre diretor, que promoveu os meios para a realização deste curso de pós-graduação.

Ao professor Ivany F.M. Válio, pelas idéias valiosas, sugestões, esclarecimentos e segura orientação.

Ao professor Ladaslav Sodek pelo apoio e ajuda no desenvolvimento dos aspectos bioquímicos.

Ao professor Antônio C. Gabrielli e a laboratorista Ana Odete dos Santos Vieira, pela valiosa ajuda no desenvolvimento dos aspectos anatômicos.

À professora Rosely R. Sharif, orientadora de programa pela sua orientação, compreensão e amizade.

Aos professores do curso de pós-graduação e ao pessoal do Departamento de Fisiologia Vegetal que de um ou de outro modo, contribuíram com sugestões, orientação e ajuda durante a realização deste estudo.

Aos colegas do Departamento de Estatística e Computação da Escola Superior de Agricultura de Lavras, em especial os pro-

fessores José Vitor Silveira e Paulo César Lima.

À CAPES, pelo suporte financeiro oferecido.

À minha família por seu encorajamento e em especial minha querida esposa Maria J. L. Hostalácio, por sua paciência, ajuda e sacrifício durante o período deste estudo.

ÍNDICE

	Página
1. RESUMO	1.
2. INTRODUÇÃO	4.
3. REVISÃO DE LITERATURA	8.
3.1. A água e o crescimento de plantas de feijão.....	8.
3.2. Efeito da desidratação do solo e o teor de prolina livre	13.
3.3. Desenvolvimento de frutos	16.
3.4. Conteúdo de macro e microelementos minerais em frutos	19.
3.5. Conteúdo de proteína total nas sementes de feijão.	21.
3.6. Enzimas alantoinase e asparaginase	24.
3.7. Anatomia do fruto de feijão	33.
4. MATERIAL E MÉTODOS	36.
4.1. Cultivo de plantas	36.
4.2. Avaliação dos parâmetros de rendimento	38.
4.3. Determinação do conteúdo de macro e microelementos minerais	39.
4.4. Estimativa da percentagem de proteína total	40.
4.5. Determinação do teor de prolina livre em folhas destacadas de feijão	40.
4.5.1. Coleta do material vegetal	40.
4.5.2. Dosagem do teor de prolina	41.

4.6. Determinação da atividade das enzimas alantoinase e asparaginase nas diferentes partes de semente de feijão	42.
4.6.1. Extração para dosagem de enzimas	43.
4.6.2. Determinação da atividade de alantoinase.....	43.
4.6.3. Determinação da atividade de asparaginase.....	44.
4.6.4. Preparo das placas cromotográficas	45.
4.7. Análise estatística	46.
4.8. Estudo das estruturas anatômicas do fruto e semente de feijão	46.
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48.
5.1. Resultados dos efeitos dos regimes de irrigação no crescimento e desenvolvimento das plantas....	48.
5.1.1. Comprimento da haste principal	48.
5.1.2. Peso da parte aérea	49.
5.1.3. Peso seco da parte subterrânea	50.
5.1.4. Área foliar por planta	50.
5.1.5. Rendimento e seus componentes	51.
5.2. Discussão dos efeitos dos regimes de irrigação no crescimento e desenvolvimento das plantas....	58.
5.3. Resultados do efeito da desidratação do solo e o teor de prolina livre nas folhas destacadas de plantas de feijão	61.
5.4. Discussão do efeito da desidratação do solo e o teor de prolina livre nas folhas destacadas de plantas de feijão	63.
5.5. Resultados do desenvolvimento do fruto de feijão	65.
5.5.1. Volume	65.

5.5.2. Peso seco	66.
5.6. Discussão do desenvolvimento do fruto de feijão	71.
5.7. Resultados da avaliação do conteúdo de macro e microelementos minerais em diferentes fases do desenvolvimento do fruto de feijão	72.
5.8. Discussão da avaliação do conteúdo de macro e microelementos minerais em diferentes fases do desenvolvimento do fruto de feijão.....	80.
5.9. Resultados da avaliação do conteúdo de proteína total nas sementes de feijão	83.
5.10 Discussão da avaliação do conteúdo de proteína total nas sementes de feijão	88.
5.11 Resultados das mudanças na atividade das enzi - mas alantoinase e asparaginase, durante o desen volvimento da semente de feijão	90.
5.12 Discussão das mudanças nasatividades das enzimas alantoinase e asparaginase , durante o desenvol vimento da semente de feijão	95.
5.13 Resultados e discussão das estruturas anatômicas do fruto e semente de feijão	100.
5.13.1. Estrutura do fruto de feijão	100.
5.13.2. Estrutura da semente de feijão	102.
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116.
7. ANEXOS	142.

1. RESUMO

Este estudo teve por objetivo estudar alguns aspectos físicos, bioquímicos e anatômicos no crescimento e desenvolvimento do feijão, em diferentes regimes de irrigação e mais a suspensão de água por um período de 7 a 11 dias, nas fases de pré-floração, plena floração e frutificação.

O estudo permitiu acompanhar o desenvolvimento das plantas com especial interesse nas fases de pré-floração, floração e frutificação; avaliar a influência das quantidades e frequência de água que se aplicou; constatar que as plantas que receberam suprimento de água duas vezes por semana até a capacidade de campo, apresentaram melhor desenvolvimento vegetativo (com taxa de crescimento relativo em torno de $0,048 \text{ g.g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ e uma taxa de assimilação aparente em torno de $0,2435 \text{ mg.cm}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$) em relação aos outros regimes estudados.

Quanto ao potencial reprodutivo, foi verificado que grande parte de sua redução se relaciona bem com a frequência de irrigação aplicada, como também com a condição de estresse hídrico aplicado (ausência de irrigação por um período que foi de 7 - 11 dias) dentro de cada regime estudado. A queda de botões florais influenciada pela falta de água foi da ordem de 31,7% nas plan -

tas sob regime de irrigação diária e de 7,2% em plantas irrigadas uma vez por semana, embora não houvesse queda nas plantas que recebiam irrigação duas vezes por semana. A queda de flores estabelecidas foi da ordem de 35%, mostrando claramente a influência de frequência de irrigação. Entretanto, a condição de estresse hídrico, aplicado dentro dos regimes estudados, elevou ainda mais o percentual de queda (36-50%). A queda de frutos estabelecidos, atribuídos ao fator água nas nossas condições de estudo foi em torno de 25%.

O desenvolvimento do fruto foi acompanhado a intervalos regulares através de avaliação do volume e peso seco, sendo representado por polinômios de 2º grau. Verificou-se que os frutos originados de plantas que sofreram frequência de irrigação duas vezes por semana, apresentaram melhor desenvolvimento do volume e ganho de peso.

O conteúdo de macro e microelementos minerais em diferentes estádios do desenvolvimento foi também avaliado tanto na vagem como na semente.

Verificou-se o teor de prolina livre nas folhas destacadas relacionado com o efeito de desidratação do solo nos diferentes regimes estudados, mostrando que à medida que o potencial hídrico do solo diminui (-0,0 a -5,0 atm.), há um aumento do teor de prolina livre nas folhas destacadas.

O trabalho também mostra o comportamento do fruto de feijão em relação ao teor de proteína total, como também a atividade das enzimas alantoinase e asparaginase nas diferentes partes da semente, nos regimes estudados durante o desenvolvimento.

Como suporte básico para futuras pesquisas e para melhor entendimento dos aspectos fisiológicos e bioquímicos, procedeu-se o estudo anatômico do fruto e semente de feijão em idade de

5 dias após a ântese, cujos resultados estão representados por meio de fotomicrografias e esquemas obtidos através de câmara clara.

2. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda de alimentos e de recursos de água no mundo requerem que a agricultura seja mais eficiente no uso de água, sem sacrifício da produção de alimentos e fibras. Tanto para uma agricultura irrigada como para a natural é necessário melhor entendimento dos défices de água na planta, no solo e sua influência no crescimento, desenvolvimento e rendimento das plantas.

A avaliação quantitativa do estresse hídrico é importante para uma série de programas de pesquisas, incluindo classe de solo e minerais. Contudo, quando se faz uma avaliação da água do solo, da planta e dos estádios mais sensíveis do crescimento, que não corresponde à realidade, devido a erros experimentais, os esforços efetivos de reabilitação do fator água-solo-planta ficam seriamente limitados JOHNSON e BROWN (1977).

O feijão, produto de grande importância mundial na alimentação dos povos, cujo cultivo se localiza nas mais variadas condições, ou seja, indo desde as regiões onde o regime pluviométrico é regular até as regiões áridas, onde é necessário cultivar com suprimento adequado de água a intervalos regulares, para garantir o rendimento adequado.

O Brasil, sendo um dos maiores produtores e consumidores

de feijão, ainda necessita de conhecimento dos padrões de desenvolvimento das fases críticas ou sensíveis aos défices de água.

De grande importância social e econômica, a cultura de feijão necessita de técnicas e conhecimentos originados de uma pesquisa de base e regional. O comportamento de inúmeras cultivares existentes em relação a variação dos défices de água ao longo do ciclo fenológico, torna-se necessário para poder determinar quanto, como e quando aplicar água em um cultivo de seca ou quando a estiagem se prolonga por longo tempo. MEDINA (1972) , adverte que há necessidade de quantificar as quedas na produção de feijão em função da água necessária em cada fase do desenvolvimento.

BOYER e McPHERSON (1975) afirmam que o estresse hídrico severo limita a produção e que água é fator crítico que deve resultar em pesquisa prioritária.

No momento, a idéia que se tem da influência dos défices de água no solo sobre o crescimento das plantas, o uso da água pelas plantas e o rendimento, é controlado diretamente por défices de água na planta e só indiretamente por défices de água no solo (BEGG e TURNER, 1976). De fato, quando há um adequado suprimento de água no solo, os défices de água na planta podem ocorrer como resultado do aumento da demanda evaporativa para a atmosfera. Então, o deficit de água na planta que se desenvolve em uma situação particular é o resultado de uma complexa combinação de fatores do solo, da planta e atmosfera. A interação destes fatores controla a taxa de absorção e perda de água o que muitas vezes cria a situação de deficit (KRAMER e RUSSEL, 1959; VAADIA *et al.*, 1961).

Em vista de diferentes opiniões quanto a correlação entre o alto teor de prolina livre nas folhas e a condição de es -

três hídrico, dos inúmeros suportes para a idéia de que a oxidação de prolina como mecanismo das células para regular os "pools", levou-nos a estudar a evolução do problema com respeito às plantas de feijão (HANSON *et al.* 1977; BOGGES *et al.*, 1978; HUANG e CAVALIER, 1979; ELTHON e STEWART, 1981 e SELLS e KOEPPE, 1981) .

Os vários problemas mostrados por um grande número de pesquisadores, relacionados com o fator água e a ligação de macro e microelementos minerais no desenvolvimento de frutos de leguminosas tropicais, têm motivado pesquisas nesta área tentando definir a influência da água (WADLEIGH e RICHARDS, 1951; GATES, 1957; STANHILL, 1957; FAWCETT e QUIRK, 1960; SINHA, 1974 e 77 ; GUPTA e KALA, 1980).

ATKINS *et al.*, (1980) mostraram em plantas de feijão que alantoína e ácido alantoico são os principais produtos nitrogenados da fixação de N_2 exportados dos nódulos. Também IRELAND e JOY (1981) mostraram que a asparagina é o principal composto de transporte de nitrogênio para as plantas, e que segundo PATE *et al.*, (1975) ela representa importante papel no transporte de nitrogênio para as plantas. Uma vez que é evidente a importância deste composto, atraíu-nos o estudo para verificar as atividades das enzimas asparaginase e alantoinase nas partes componentes da semente de feijão.

Os objetivos deste trabalho foram o de estudar o comportamento das plantas de feijão, cultivar "Goiano precoce" em diferentes regimes de irrigação e avaliar :

- influência da frequência de irrigação no crescimento e desenvolvimento de plantas de feijão, bem como no estabelecimento de flores e frutos.
- o desenvolvimento do fruto de feijão nos diferentes regimes de irrigação e mais a suspensão do fornecimento de água dentro de cada regime (de 7 a 11 dias, o que

chamamos de condição de estresse hídrico).

- o teor de prolina livre nas folhas destacadas e o conteúdo de proteína total em diferentes idades do desenvolvimento do fruto.
- as atividades das enzimas alantoinase e asparaginase nas diferentes partes da semente de feijão e em diferentes fases do desenvolvimento.

Também procedeu-se o estudo anatômico do fruto e semente de feijão para melhor entendimento dos aspectos estudados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A água e o crescimento de plantas de feijão

Os estudos de REYNOLDS (1955), KATTAN e FLEMING (1965) , mostraram que o efeito da irrigação em estádios específicos do desenvolvimento, e o consumo de água na cultura do feijão, aumentavam com a idade das plantas. Na fase de floração a necessidade era bem maior, e as maiores produções sempre foram obtidas quando a umidade eficaz do solo era mantida em torno de 50%.

WARREN e LEGARDA (1978), observaram que a produção de matéria seca da parte aérea e o número de vagens por planta de feijão foi máxima quando a sucção de água do solo chegava a 0,8 bar a 5 cm de profundidade e 0,6 bar a 15 cm de profundidade.

O efeito dos défices de água em diferentes estádios do desenvolvimento, crescimento e rendimento das culturas, geralmente tem sido estudado empiricamente. Os trabalhos nesta área foram revisados por SOLTER e GOODE (1967), que observaram resposta diferencial para água em vários estádios do desenvolvimento , embora não acontecendo o mesmo para a maioria das plantas cultivadas. Existe considerável evidência de que muitos processos que determinam a produtividade das culturas são especificamente sensíveis aos défices de água no período de iniciação floral, duran

te a floração e mais raramente e em menor número de espécies , durante o desenvolvimento do fruto e semente (PURCINO e LIMA , 1978).

Segundo BEGGS e TURNER (1976), há boa indicação de que cada órgão e cada processo fisiológico pode responder diferentemente ao aumento dos défices de água.

O primeiro efeito do estresse, no crescimento, parece ser físico, como muitas linhas de evidências indicam (HSIAO e ACEVEDO, 1974). Em vista do crescimento ser extremamente sensível ao estresse de água, muitas das alterações no metabolismo associado com o estresse podem ser o resultado indireto, do crescimento reduzido (HSIAO *et al.*, 1976).

CLELAND (1971), propôs modelos para explicar a extensão da parede celular, mostrando a importância do fator água, e a interdependência e associação dos componentes físicos e bioquímicos. Outro modelo proposto por HETTIERATCHI e O'CALLAGHAN (1974), considera que a acumulação de solutos é o passo inicial, capaz de conduzir a uma pressão de turgescência crítica que estende a célula e só após esta expansão é que o novo material da parede é sintetizado. De fato, eventos bioquímicos do relaxamento do estresse e síntese de parede não são provavelmente separados dos eventos físicos de absorção de água e rendimento da parede celular (HSIAO *et al.*, 1976). Deste modo, absorção de água, rendimento da parede celular, e conseqüente aumento de volume da célula ocorrem sempre após o relaxamento do estresse. Quando alongamento da célula é mantido, o processo que produziu a diminuição do estresse deve ser continuado, a fim de que o alongamento possa ser crescimento verdadeiro. Portanto, o aumento em dimensão deve ser irreversível.

HSIAO *et al.*, (1976), afirmam que os eventos bioquímicos da redução do estresse e síntese da parede celular são provavel-

mente separados dos eventos físicos da absorção de água.

Por ocasião do desenvolvimento do estresse, os processos envolvidos, como fechamento estomático, fotossíntese e transpiração, apresentam respostas que operam numa escala de tempo muito curto, produzindo pouca ou nenhuma informação. O estresse de água pode reduzir drasticamente a fotossíntese por um curto período de tempo, mas a reirrigação faz recobrar a fotossíntese normal, embora possa haver uma gradual redução irreversível na área foliar, que poderá ter um efeito significativo sobre o crescimento, desenvolvimento e rendimento (BEGG e TURNER, 1976).

A produtividade das plantas é influenciada por um complexo de fatores e dentre estes, o tempo de permanência da folha, expansão da área foliar e efeitos sobre a assimilação merecem especial atenção.

O desenvolvimento das folhas depende da produção de células e de seu subsequente aumento em volume, e que para HSIAO (1973), é um dos processos mais sensíveis ao estresse de água.

O efeito injurioso da seca moderada ou severa sobre o rendimento pode ser imediato em vista do efeito dos défices sobre a folha em desenvolvimento (HSIAO *et al.*, 1976). O déficit de água na planta que se desenvolve em qualquer situação particular é o resultado de uma complexa combinação dos fatores do solo, da planta e da atmosfera, os quais interagem para controlar a taxa de absorção e perda de água (KRAMER, 1969; VAADIA *et al.*, 1961).

A respeito do rendimento do feijão, as maiores produções estão concentradas em culturas onde a umidade eficaz do solo se mantém acima de 50% VTP (volume total de poros), (REINOLDS, 1955; WARREN e LEGARDA, 1978).

Um período particularmente vulnerável para a cultura do feijoeiro é aquele que vai da sementeira a plena floração (BENAVI

DES, 1969). A cultura necessita de uma precipitação pluviométrica de 110-180 mm de água, e se houver estiagem prolongada, a fase de floração é afetada e a produção reduzida. As fases mais sensíveis do feijoeiro ocorrem um pouco antes da floração, durante a plena floração e no início da formação das vagens, sendo que o potencial reprodutivo fica bastante comprometido se ocorrerem défices de água nessas fases. BINKLEY (1932) observou que há de 44-76% de queda de flores em condições de escassez de água.

O rendimento de plantas de feijão depende principalmente do índice de área foliar no período de floração. O aumento do rendimento, em função do aumento em matéria seca, é possível através da liberação do crescimento axilar, aumentando o número de folhas capazes de melhor interceptação da luz (SCOTT e ALLEN, 1979). Também é possível conseguir aumento em rendimento quando se varia a densidade de plantas por área cultivada (TANAKA e FUJITA, 1979).

Existe pouca informação a respeito do efeito da falta de água na morte de folhas, um mecanismo que determina o número de folhas ativas por plantas (KARAMANOS, 1978). A taxa de morte de folhas é sempre acelerada por estresse hídrico em plantas de linho e feijão (FINCH *et al.*, 1976). Este é um dos aspectos capaz de reduzir a produção.

Mais recentemente, FARAH (1981b) mostrou que a falta de água reduz a área foliar, matéria seca e rendimento econômico de plantas de fava, sendo que rendimentos biológicos e econômicos de crescentes foram obtidos com tratamentos úmido, meio úmido e seco.

A demonstração da correlação genotípica negativa entre rendimento e número de nós por planta de feijão, sugere que ramos e caule principal podem estar em competição (DAVIS e EVANS, 1977).

SLATYER (1967), mostrou que o fator água, tanto em abundância como em deficit é uma das variáveis ambientais que afeta o desenvolvimento, e que mais preocupações tem dado aos pesquisadores. BOYER e McPHERSON (1975) afirmaram que estresse severo de água, limita muito a produção. Entretanto, a alta resposta das plantas de feijão à irrigação se deve ao fato desta cultura ser bastante sensível à falta de água, principalmente quando associada às altas temperaturas na fase de florescimento (DEMATTE *et al.* 1974). A queda no rendimento se deve principalmente à redução do número de vagens por planta, e em menor escala, à diminuição do número de sementes por vagem (STOKER, 1974). Os experimentos desenvolvidos nos campos de produção do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, mostraram que as maiores produções do feijoeiro ocorriam em culturas que recebiam adequado suprimento de água nas fases críticas (TEIXEIRA *et al.*, 1978).

MILLAR (1976/77) referiu-se ao fator água como um elo importante no rendimento. A necessidade de se ter informações básicas a respeito do comportamento das culturas anuais é importante para um manejo ideal do suprimento de água. Segundo MEDINA (1972), é necessário quantificar as quedas de produção da cultura do feijoeiro em função da água que se utilizou em cada fase do desenvolvimento, para que a necessária complementação de água seja feita.

A quantidade de água usada na cultura de feijão, segundo CAIXETA (1978), depende principalmente das condições climáticas locais, das características físico-hídricas dos solos, do sistema de irrigação e da cultivar a ser usada. Contudo, a frequência de irrigação é função do consumo de água pela planta e da quantidade da água que o solo consegue reter próxima a zona radicular.

Os estudos de MAGALHÃES *et al.*, (1979), para determinar o

efeito dos défices de água na produção do feijoeiro, mostraram que o período mais crítico ao deficit de água foi do início da floração a plena floração. A percentagem de perda foi de 38,85 % (início da floração a plena floração), 20,49% (pré-floração a início da floração) e 24% (início da frutificação a plena frutificação). Evidentemente, quem dispõe de facilidades para suprimento artificial de água, elimina essas desvantagens que ocorrem no período de estiagem.

No período reprodutivo, a falta de água provoca abscisão de flores, redução do número de vagens e do número de sementes por vagem (ROBINS e DOMINGO, 1976).

Os experimentos de SMITH e PRYOR (1962) indicam que mais de 80% das vagens produzidas pelas plantas de feijão são provenientes de flores que ocorrem nos dez primeiros dias do florescimento e que seu estabelecimento está condicionado a uma série de fatores climáticos, inclusive água.

3.2. Efeito da desidratação do solo e o teor de prolina livre.

Tem sido mostrado que plantas submetidas à seca, têm aumentado o teor de prolina livre nos tecidos, fenômeno este que parece estar relacionado com o caráter genético (PROTSENKO *et al.* 1968; SAUNIER *et al.*, 1968; PÁLFI e JUHÁSZ, 1971 e SINGH *et al.* , 1972).

O fato de plantas com deficit de água apresentando sintomas de murchamento acumularem prolina, é bem documentado (CHEN *et al.*, 1964; BARNETT e NAYLOR, 1966; ROUTLEY, 1966; THONPSON *et al.*, 1966; SAUNIER *et al.*, 1968; SINGH *et al.*, 1973 a, b e c).

A acumulação de prolina pode representar uma resposta generalizada dos estresses, pois tanto sob estresse salino e tér

mico (CHU *et al.*, 1974/76), como hídrico (SINGH *et al.*, 1973 a e STEWART *et al.*, 1977) um grande número de plantas acumula prolina.

O estudo de MASCIOTTI (1974), com algumas cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), mostrou que "Manteigão Fosco 11" foi o que mais acumulou prolina em folhas isoladas, sendo seguido por "Rico 23", "Mulatinho" e "Carioca", quando foram submetidas ao deficit hídrico. Entretanto, alguns estudos têm mostrado que alguns aminoácidos diminuem e outros aumentam, sendo a intensidade e padrão destas variações, consideradas como características da espécie e do grau de desidratação (CHEN *et al.*, 1964 ; BARNETT e NAYLOR, 1966; SAUNIER *et al.*, 1968 e SINGH *et al.*, 1973a).

A forte redução de prolina quando há reidratação dos tecidos foliares, levou STEWART *et al.*, (1966), SINGH *et al.*, (1973 a e c) e RENA e SPLITTSTOESSER (1974a e c), a sugerirem que prolina pode ser a principal fonte de energia nos primeiros momentos que sucedem a remoção do deficit hídrico. Entretanto, STEWART *et al.*, (1973), explicam que o deficit hídrico eleva o teor de prolina através da degradação de proteína, sendo a função dos carboidratos evitar a perda de prolina acumulada através da oxidação pelo ciclo de Krebs. Contudo, algumas evidências têm sido apresentadas, de que o estresse hídrico inibe mesmo a oxidação de prolina (BOGGES *et al.*, 1974, STEWART *et al.*, 1966 e STEWART *et al.*, 1977) e que o compartimento responsável para a realização deste fenômeno seja provavelmente o mitocôndria (BALBONI e HECHT, 1977).

As taxas de oxidação de prolina foram determinadas por MITRA *et al.*, (1975) e SINPSON *et al.*, (1976), através de medidas de água tritiada em ensaios com L-|5-3H|-prolina .

Para STEWART *et al.*, (1977) e STEWART e BOGGES (1978), a

conversão da prolina em ácido glutâmico e daí para compostos solúveis (oxidação da prolina) se dá realmente em folhas túrgidas, e é estimulada por altas concentrações de prolina, sugerindo que a "oxidação de prolina", funciona como um mecanismo de controle para manutenção do baixo nível de prolina nas células de tecidos túrgidos.

Em mamíferos, insetos, leveduras e bactérias, o metabolismo de prolina é conhecido pela conversão do P 5 C (Ácido Δ' -pirrolina-5-carboxílico) no mitocôndria. Esta conversão é catalizada pela prolina - oxidase, uma flavoproteína dependente de O_2 (JOHN - SON e STRECKER, 1962; FRANK e RANHAND, 1964; LING e HEDRICK, 1964; BRUNNER e NEUPERT, 1969; BALCH, 1971; STRECKER, 1971; GAMPER e MOSE, 1974; BALBONI e HECHT, 1977).

Para elucidar o mecanismo de acúmulo da prolina durante o estresse hídrico e também em condições normais, HUANG e CAVALIER (1979) idealizaram um esquema a partir dos conhecimentos do sistema em bactérias e animais, mais algumas informações em vegetais, o qual mostra as reações de envolvimento das enzimas entre glutamato e prolina (figura 1). A fosforilação acoplada e oxidação de prolina foram medidas por SELLS e KOEPPE (1981) em mitocôndria isolados de milho sob condições de estresse hídrico. As taxas da oxidação de prolina decresceram como função logarítmica do aumento do estresse hídrico nas plântulas de milho entre -5 a -10 bars.

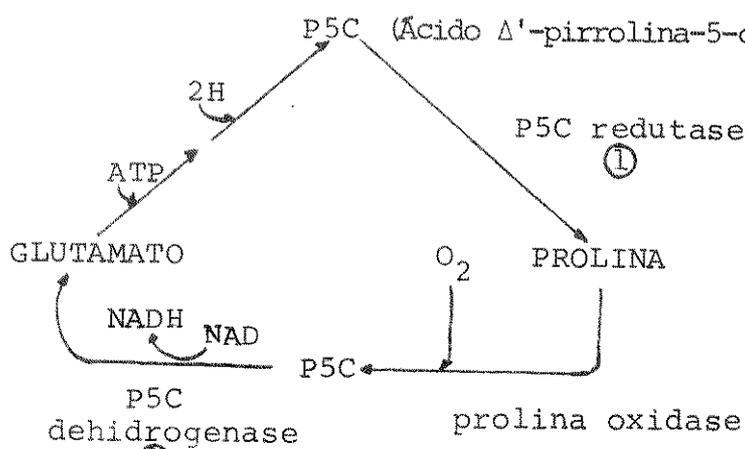


FIGURA 1 - Reações enzimáticas entre Glutamato e Prolina, segundo (HANG e CAVALIER, 1979).

Embora alguns estudos tenham mostrado que plantas que acumulam prolina são usualmente mais eficientes para resistirem condições de estresse hídrico, o trabalho de HANSON *et al.*, (1977) indicou que a correlação entre o alto teor de prolina e a condição de estresse hídrico severo pode não se manter.

As informações de BOGGES *et al.*, (1978), HUANG e CAVALIER (1979), ELTHON e STEWART (1981) e SELLS e KOEPPE (1981) forneceram suporte básico para a idéia de que a oxidação de prolina no mitocôndria pode ser um mecanismo das células para regular os "pools" de prolina. Vários trabalhos mostram que todo acúmulo de prolina não deve ser apenas devido a uma redução na oxidação de prolina, mas que deve haver um aumento na síntese a partir do glutamato (BOGGESS *et al.*, 1976; STEWART, 1977 e 1978).

3.3. Desenvolvimento de frutos

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) atualmente conta com uma grande quantidade de cultivares, cuja semente madura difere grandemente em tamanho (HUDSON *et al.*, 1973). Como o tamanho da semente de uma dada cultivar pode ser modulado pela interação de muitos fatores do desenvolvimento, em especial o suprimento de água (HSU, 1979), também o crescimento do fruto de uma dada cultivar pode ser modulado pela interação de vários fatores ambientais.

O desenvolvimento do fruto de feijão, um tipo deiscente com características próprias, provavelmente influirá no desenvolvimento e tamanho da semente.

Experimentos de melhoramento e genética básica têm identificado alguns genes que contribuem para identificação do tamanho da semente (DAVIES, 1975; BRAVO *et al.*, 1980; FRANK e FEHR, 1981). O mecanismo da regulação do desenvolvimento do fruto e da semente de feijão tem sido pouco explorado. Portanto, do ponto de vista do desenvolvimento, é importante entender como o tamanho da semente e do fruto são alcançados no curso da Ontogênese.

O fruto de feijão, tipo legume deiscente, é formado por um envoltório protetor, ou seja, a casca (parede do fruto) e vá-

rias sementes. O fruto é constituído de uma estrutura formada de três camadas. A camada externa é representada por um conjunto de células de formato regular, de aspecto retangular e entremeada por pelos e estômatos. A camada mediana é constituída de células de formato irregular, de vários aspectos, contendo cloroplastos, o que lhe confere a cor verde e a possibilidade de realizar fotossíntese. A camada interna é formada de células alongadas, curtas e de aspecto colunar (DOUTT, 1932; SINHA *et al.*, 1978 e HSU, 1979). Esta estrutura envoltória é percorrida por um sistema vascular. A semente, também constituída de três camadas no início do desenvolvimento, se transforma no final num órgão de características próprias, ou seja, a casca ($2n$), embrião ($2n$) e o endosperma ($3n$).

O tamanho do fruto, ou seja, a estrutura formada pela parede do fruto e semente, é regulado no seu curso de desenvolvimento por mecanismos da planta, do fruto, da semente e por fatores ambientais que se interagem. O efeito líquido destas interações, é refletido nas mudanças de tamanho no curso de seu desenvolvimento (HUDSON *et al.*, 1973). Dentre os fatores do meio ambiente, o suprimento de água provavelmente vai influenciar direta ou indiretamente o desenvolvimento do fruto.

Recentes estudos de BRAVO *et al.*, (1980) e de FRANK e FEHR (1981), com o objetivo de determinar a influência do comprimento, largura e espessura da vagem sobre o número de sementes, mostraram que o uso dessas medidas físicas foram importantes para avaliar a área e volume do fruto. Entretanto, a largura foi considerada a medida física mais prática de ser realizada e a mais eficaz para ser usada na seleção indireta.

Os estudos de SINHA *et al.*, (1978) mostraram para o feijão mungo, que o aumento rápido em matéria seca, proteína e amido na semente, no estágio inicial do desenvolvimento, é com -

pensado em parte por um decréscimo destes componentes na parede do fruto.

A importância da parede do fruto, também chamada de "casca do fruto", no desenvolvimento da semente, tem sido mostrada por vários autores (CROOKSTON *et al.*, 1974; KHANNA e SINHA, 1976 e SINHA e SANE, 1976). Mais recentemente, SINHA *et al.*, (1978) estudaram o aspecto do órgão como uma unidade fotossinteticamente ativa, constituído de pigmentos verdes (clorofitos) e estômatos e sua contribuição para o desenvolvimento da semente.

HUDSON *et al.*, (1973), numa revisão do problema do tamanho da semente, afirmaram que o órgão é suficientemente estável para ser usado como uma das variáveis para identificação de cultivares, e merece estudo mais detalhado quanto ao fator água.

Em ervilha, DAVIES (1975) fazendo uso de híbridos recíprocos entre variedades diferenciadas pelo tamanho da semente, mostrou que isto tem permitido o reconhecimento de dois sistemas de controle, ou seja, um interno dependente unicamente do genótipo da semente e outro externo dependente dos fatores ambientais.

A respeito dos fatores que regulam o desenvolvimento da semente, pouco é conhecido. Dentre estes, têm sido investigados, o movimento de assimilados para semente, o papel relativo dos drenos na semente e as fontes de assimilados. Embora o fator água seja deixado de lado, necessita ser esclarecido.

DUARTE e ADAMS (1972) mostraram que o número de vagens por planta foi altamente correlacionado com o rendimento, e que não foi possível estimar a capacidade da "casca do fruto" em produzir assimilados. Entretanto em *Vicia faba* L. KIPPS e BOUTER (1974) mostraram que a vagem contribuiu com 1/10 do carbono fornecido pela folha.

O estudo de CROOKSTON *et al.*, (1974) permitiu, através de determinações das mudanças de CO_2 , atividade enzimática e observações anatômicas, considerar a "casca do fruto" como órgão fotos-sintetizante ativo.

3.4. Conteúdo de macro e microelementos minerais em frutos.

O comportamento do fruto de feijão, em seu desenvolvimento, tem inúmeros problemas relacionados com a absorção e translocação de nutrientes, usualmente atribuídos aos efeitos dos défices de água da planta.

Em plantas bem irrigadas a atividade radicular é sempre aumentada, pois as raízes aumentam a habilidade da planta para explorar um volume de solo maior, além de aumentar a acessibilidade aos nutrientes, particularmente os imóveis (VIETS, 1967).

STANHILL (1957) afirmou que a maioria dos experimentos com planta anuais respondia às diferenças de regimes de umidade do solo, e que a causa de redução do crescimento era principalmente devido a pressão de turgescência dos tecidos, a qual restringe processos fisiológicos.

Os estudos de WADLEIGH e RICHARDS (1951) e FAWCETT e QUIRK (1960), mostraram que a disponibilidade de nutrientes não é dependente do estresse hídrico, pelo menos na faixa de água disponível do solo, embora GREENWAY *et al.*, (1969), tenham observado que a absorção de P decresceu quando o potencial da água do meio radicular era de $-0,2$ MPa. Também, GATES (1957) havia encontrado redução na absorção de N e P quando o potencial do solo estava decrescendo.

Outro grande problema focalizado por TANG *et al.*, (1962), foi o do potencial de lixiviação em função dos produtos de irriga

ção, chegando a estabelecer uma ordem desse potencial de lixiviação que ia de $Ca > Na > K > Mg$, e que conseqüentemente 10-20% dos óxidos desses elementos permaneceram quando comparados com a composição original da planta mãe.

Dentre os vários fatores que contribuem para o bom crescimento vegetal, estão os nutrientes e sua disponibilidade, os quais são de vital importância, podendo eles interagirem sinergicamente e ou antagonicamente, tanto no solo como na planta ou em sítios de absorção. Os elementos Cu e Mo exibem antagonismo nas plantas e portanto a razão Cu/Mo é de grande importância (GUPTA e KALA, 1980).

O trabalho comparativo de FARAH (1981), sobre a produção de fava em diferentes regimes de irrigação, mostrou que N, P, K, aumentaram em todos os tratamentos com o aumento da planta e decresceram durante o período de envelhecimento e morte das folhas. A deficiência da água reduziu as quantidades de N, P e K nas plantas em crescimento e nos grãos (HALL *et al.*, 1972; CROOKSTON *et al.*, 1974; OLIKER *et al.*, 1978).

Tem sido notada uma preferência dos pesquisadores para o uso de frutos indeiscentes em estudos de escoamento, absorção e recirculação de íons. Os estudos do comportamento dos tecidos dos frutos de banana, maçã, pera e outros têm fornecido uma série de informações que provavelmente podem ser usadas para frutos deiscentes como o caso do feijão, até o período de senescência. Apesar de sua estrutura anatômica bem diferente, provavelmente o mecanismo de escoamento seja o mesmo. Os ensaios de FERGUSON e WATKINS (1981) mostraram as relações de Ca, Mg e K em frutos de maçã em desenvolvimento e amadurecimento, sugerindo que o escoamento de todos os cátions está estritamente relacionado com a disponibilidade, quando expresso em função da concentração, e

que existe um aumento notável de escoamento do K^+ associado com a respiração no climatério. Também os estudos de EILAM (1965) e SACHER (1967) determinaram que K e Mg são os cátions mais abundantes e escoam livremente do tecido quando o fruto se aproxima da senescência e que Ca pelo contrário diminui.

FERGUSON e WATKINS (1981) afirmaram que existem inúmeros aspectos associados com as diferenças entre Ca, Mg e K e suas disponibilidades, as quais mudam constantemente em suas concentrações de íons livres para escoar. Existe sempre um processo de mudanças, bem complexo, que não se pode generalizar e qualquer variação no escoamento pode ter um pequeno efeito sobre o Ca menos do que sobre Mg e K, pois estes são localizados predominantemente nos espaços intercelulares livres.

3.5. Conteúdo de proteína total nas sementes de feijão

Os grânulos de proteína, reconhecidos como o principal sítio de armazenamento de proteína nas sementes e frutos, tem sido detectados há mais de um século (HARTIG, 1855). Entretanto, sua origem tem sido expressa com controvérsia. Uns consideram como originados de vacúolos (GUILLERMOND, 1921; BUTTROSE, 1963; ENGEIMAN, 1966), outros como originados de plastídeos (MONTON *et al.*, 1964).

WOLF e KHOO (1970), num estudo sobre origem e desenvolvimento de grânulos protéicos em endosperma de milho, observaram corpos esféricos simples dentro das membranas, com grande quantidade de proteína, cuja síntese se dava do lado de fora e acumulava nos grânulos. Esses autores também mostraram que os grânulos se desenvolveram de vesículas produzidas pelo retículo endoplasmático. No caso de algumas leguminosas, tem sido verificado que os dictiossomas também parecem produzir grânulos de vesículas ,

ou acumulam grânulos produzidos pelo aparelho de Golgi (BEEVERS, 1976).

Algumas linhas de evidências indicam que retículo endoplasmático rugoso é um sítio que mais se assemelha, nos cotilédones de leguminosas, como local de síntese e armazenamento de proteína. Em 1970, BARLEY *et al.*, fazendo uso de técnicas de autorradiografia, demonstraram que retículo endoplasmático rugoso é o principal sítio de incorporação de aminoácidos e de proteínas.

Uma outra linha de evidência aceita que proteína deriva da parte de carboidratos da proteína de reserva. Proteína de reserva são glicoproteínas com parte de polissacarídeos constituídas de N-acetil-glicosamina e resíduos de manose (ERICSON e CHRISPEELS, 1976; ERICSON e DELMER, 1978). Entretanto, NAGAHASH e BEEVERS (1978) mostraram que glicosil-transferase e N-acetil-glicosamina estão associadas com a membrana do retículo endoplasmático.

Para completar essas linhas de evidências, o estudo de BOLLINI e CHRISPEELS (1979), confirma e amplia as observações de SUN *et al.*, (1978) que mostraram que a síntese e acumulação de proteínas em cotilédones de feijão, é feita tanto nos polissomos livres como em grânulos esféricos nas membranas, cuja razão é de 18:1 respectivamente.

Os estudos de ROBERTS e WEAVER (1971) e RIES (1971) mostraram que o aumento do teor protéico nas sementes de feijão foi consequência da aplicação de nitrogênio. Também, verificaram diferenças fenotípicas no peso e conteúdo de proteína obtidas na cultivar "snap" com três regimes de nitrogênio.

Para estudar a hereditariedade da proteína-total e sua correlação com o rendimento, LELEJI *et al.*, (1972), mostraram que o material genótipo controla o conteúdo de proteína na semente e

que existe alta influência ambiental sobre o conteúdo de proteína-total e relativamente baixa variância aditiva genética. O rendimento de semente e de proteína foram altamente correlacionados. Geralmente, segregação para alto rendimento, tende a ser relativamente baixo em percentagem de proteína, embora possa haver exceção.

Vários trabalhos têm mostrado que os fatores suprimento de N, teor adequado de água no solo e a atividade de fixação do nitrogênio são importantes para o bom desenvolvimento das plantas de feijão, e que os aumentos no teor de proteína-total nas sementes é uma consequência da manutenção desses fatores no nível ideal às plantas (RIES, 1971; ROBERTS e WAVER, 1971; SPRENT, 1972; EDJE *et al.*, 1975 e CARELLI *et al.*, 1981).

BAKER *et al.*, (1976) estudando a purificação, caracterização e distribuição intracelular das proteínas nos cotilédones de feijão, identificaram subunidades protéicas, ambas PHA-6,5 S e Vicilin-6,9 S ocorrendo nos corpúsculos protéicos.

WAINES (1978) mostrou que a média do teor protéico é mais alta e o peso dos grãos é significativamente menor. Com base em seus resultados, mostrou também que a percentagem de proteína é negativamente correlacionada com o rendimento. Nos cruzamentos realizados entre progênies F_2 e F_3 , de linhas de alto e baixo valor protéico, observou que não houve variação no percentual de proteína.

Com referência ao fator água, os estudos de KROGMAN *et al.*, (1980) e MUTSCHLER e BLISS (1980), mostraram para *Vicia faba* L. e *Phaseolus vulgaris* L., que o aumento de rendimento, inclusive proteína, está condicionado a um teor de água do solo de 50%.

Os estudos de cinética de acumulação de proteína nos tecidos cotiledonares e endosperma de várias plantas, sugerem que

algum processo biológico contribui para diferenças em conteúdo e qualidade de proteína entre genótipos dentro da espécie, cuja prevenção ou redução da síntese de proteína possa modificar o conteúdo e qualidade das sementes (CATALDO *et al.*, 1975; COOKE *et al.*, 1979 ; COOKE *et al.*, 1980; MUTSCHLER e BLISS, 1980; VAN DER WILDEN *et al.*, 1980).

A seleção de progênie para obter linhas tendo a mais desejável quantidade e qualidade de proteína é o propósito de muitos geneticistas. Entretanto, os estudos de MUTSCHLER e BLISS (1980), mostraram que genótipos variam na iniciação da taxa de síntese e ou síntese de G₁ (Globulinas). Portanto, de acordo com as diferenças genotípicas relacionadas no controle da síntese e acumulação de G₁ ou proteína total, esses autores confirmaram que a possibilidade não está longe de ser realidade.

A existência de pausas, ou seja, intervalos de acumulação dos constituintes das sementes, inclusive proteínas, de um grande número de plantas tem sido observada por vários pesquisadores (KLOZ *et al.*, 1966; OPIK, 1968; OLIKER *et al.*, 1978 e POPA *et al.*, 1978), provavelmente devido às variações ambientais.

3.6. Enzimas Alantoinase e Asparaginase

Muitos estudos têm tentado elucidar a influência nutritiva e reguladora das camadas externas das sementes em desenvolvimento durante a formação e crescimento do embrião (COLLIER e MURRAY, 1977; MURRAY e COLLIER, 1977; MURRAY, 1979). O aspecto estrutural e metabólico das camadas externas das sementes de frutos tipo legume em desenvolvimento, indicam que eventos nas células destas camadas são de maior importância no controle do desenvolvimento do embrião e da própria sementes (MURRAY, 1979).

Em muitas leguminosas, asparagina é o principal aminoácido da fixação do nitrogênio e redução do nitrato. Como principal produto nitrogenado exportado da raiz para o caule através do xilema, é um importante constituinte do "pool" solúvel de nitrogênio acumulado na estrutura vegetativa durante os estádios de pré-floração do ciclo de crescimento (PATE, 1971; SREETER, 1972; PATE, 1973; MIPLIN e LEA, 1977). Entretanto, em certos gêneros como *Lupinus* e *Spatium*, a asparagina é o principal constituinte nitrogenado da seiva do floema coletada de frutos (ATKINS *et al.*, 1975). PATE *et al.*, 1974/75), sugeriram que asparagina é a principal fonte de nitrogênio para a síntese de proteína nas sementes.

LEA e FOWDEN (1975) discutem os fatores que causam a produção de grandes quantidades de asparagina em plântulas, folhas excisadas e no sistema de transporte de legumes e de certas árvores.

Muito esforço tem sido feito para correlacionar os estudos do precursor radioativo com o conhecimento enzimológico do metabolismo de asparagina. Embora a asparagina seja considerada como um depósito de nitrogênio, existe pouca evidência para demonstrar sua diminuição (LEA e FOWDEN, 1975).

ATKINS *et al.*, (1975) mostraram, através de estudos com ^{15}N , que as proteínas armazenadas nas sementes de lupino só contêm de 7-10% de asparagina e que a maioria da asparagina é rapidamente metabolizada para outros aminoácidos antes da síntese de proteína. O padrão de liberação do composto para a semente está relacionado com sua desaminação por uma enzima, a asparaginase, e seu destino metabólico foi seguido em experimento usando ^{14}C e ^{15}N , sendo que atividade da enzima no extrato cru de semente é maior do que as taxas observadas de asparagina utilizada.

A asparagina foi o componente de maior quantidade encon-

trada no exudato coletado de caule de plantas de soja (STREETER, 1972). Parece bem claro que asparagina desempenha um papel primordial no transporte de nitrogênio para plantas de soja, assim como para outros legumes (PATE *et al.*, 1975).

Estudos enzimológicos realizados por LEA *et al.*, (1978), sugerem que asparagina é desaminada por asparaginase (E.C.3.5.1.1) e a maior parte liberada é reassimilada em glutamina. Contudo, estudos preliminares foram incapazes de detectar atividade de asparaginase em lupino e outros legumes, incluindo ervilha (LEA *et al.*, 1978).

LEA, *et al.*, (1979), num estudo de cotiledones maduros cultivados *in vitro*, propuzeram uma rota explicativa do metabolismo de asparagina e glutamina. Mais recentemente, SODEK *et al.*, (1980), verificaram que asparaginase depende do potássio e isolaram-na de várias espécies de legumes. Assim, a enzima requerida para produzir amônia da asparagina é agora conhecida e completa o esquema metabólico proposto por LEA *et al.*, (1979).

SODEK *et al.*, (1980), examinando o desenvolvimento de sementes de ervilha, mostraram que a presença da asparaginase depende de potássio para estabilidade durante o isolamento e para atividade máxima no ensaio. Desta maneira, pode-se determinar a atividade da asparaginase no desenvolvimento de sementes de *Vicia faba*, *Phaseolus multiflorus*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare* e em duas variedades de *Lupinus*.

Em ervilha, segundo IRELAND e JOY (1981), a asparagina como principal composto de transporte de nitrogênio, é metabolizada por duas enzimas, a asparaginase (E.C.3.5.1.1.) e asparagina-piruvato-amino-transferase, cuja quantidade relativa das duas enzimas varia entre tecidos. O nível de asparaginase de sementes em desenvolvimento é muito alto, embora da aminotransferase exist

tam apenas traços.

Os grupos amino importados da asparagina e glutamina são metabolizados em grande parte pela asparaginase e glutamato sintase. O NH_4^+ liberado pela ação da asparaginase evidentemente é reassimilado nas células cotiledonares por ação conjunta da glutamato desidrogenase, glutamina-síntetase (MURRAY, 1980), cuja investigação levou a detetar mudanças de atividades e distribuição da enzima chave do metabolismo de nitrogênio entre membranas externas da semente e embrião em desenvolvimento, de plantas de ervilha.

COOMBS *et al.*, (1980) estudando os efeitos de nitrogênio combinado, assimilação de carbono e exudato de seiva em *Phaseolus vulgaris* L. através de radioatividade, mostraram que a seiva extraída de raízes de plantas alimentadas com $^{14}\text{CO}_2$ continha baixos níveis de alantoina. A análise química mostrou que a alantoina é o produto de maior quantidade transportada pelo xilema de plantas noduladas quer ou não elas fossem alimentadas com nitrogênio combinado. Em contraste, a seiva extraída de plantas não inoculadas acumula principalmente aminoácidos, cuja quantidade e composição depende da fonte combinada de nitrogênio. Houve diferenças e compartimentalização, provavelmente devido em parte ao transporte seletivo de aminoácidos do nódulo para o xilema e em parte pela existência de dois distintos sítios de fixação de $^{14}\text{CO}_2$ no escuro.

Estudos de MATSUMOTO *et al.*, (1977), mostraram que em certos legumes tropicais os ureídeos, alantoina e ácido alantóico entram com uma contribuição maior de que aminoácidos. Também COOMBS (1980) mostrou resultados consistentes com esses, confirmando que o mecanismo pelo qual a fixação do nitrogênio é inibida por nitrogênio combinado, não é completamente entendido, embo

ra pareça que a redução do nível de alantoina formada, seguindo o tratamento com NO_3^- ou NH_4^+ , seja em parte devido ao decréscimo de N-fixado. Tal fato também foi observado em outros vegetais por KAMBERGER (1977) ; LATIMORE *et al.*, (1977) e BETHLENFALVAY e PHILLIPS, (1978).

Experimentos usando carbono marcado, purina ou glicina , conduzido por BARNES (1959), KRUPHA e TOWERS (1959), BUTHER *et al.*, (1961), demonstraram que alantoina ou ácido alantóico é formado através da decomposição oxidativa da purina por sequência bem definida de reações em animais e microorganismos. MOTHE (1961) e REINBOTHE (1962) discutem, em suas revisões, uma outra maneira plausível de síntese de alantoina, ou seja, formada diretamente do ácido alantóico via condensação da uréia e ácido glioxílico . Geralmente, grande número de microorganismos como bactérias, fungos (leveduras) e algas têm habilidade para decompor oxipurina e conseqüentemente alantoina (BACHRACH, 1957; ROUSH e SHEIH , 1962; BARASH, 1972; BONGAERJS e VOGERS, 1976).

Uma série de estudos fisiológicos conduzidos no Japão por ISHIZUKA *et al.*, (1970) e ISHIZUKA (1971, relacionados com nutrição das plantas, mostraram que alantoina é um dos principais produtos nitrogenados em soja, com importante papel no metabolismo do nitrogênio, certificando que a relação alantoina-N/N-amino era afetada por suplementação de fertilizantes nitrogenados. Também, sugeriram que alantoina e ácido alantóico são as formas de nitrogênio características do estado reprodutivo, além da estreita correlação entre formação de nódulos e acumulação de alantoina (ISHIZUKA, *et al.*, 1964 a e b)

Com referência às plantas de feijão *Phaseolus vulgaris* L., MOTHE (1961) mostrou que quando existe um armazenamento grande de carboidratos ou um suprimento de N-exógeno em quantidades

relativamente grandes, havia acúmulo de alantoina. Por outro lado, MATSUMOTO *et al.*, (1977) constataram que existe pouca diferença na concentração de N-solúvel ou componentes de açúcar em plantas de soja crescendo em solução nutritiva com várias quantidades de compostos nitrogenados.

Enzimas de síntese de alantoina são encontradas nos nódulos (TAJIMA e YAMAMOTO, 1975), resultados confirmados por HERRIDGE *et al.* (1978) e assim, NH_4^+ , produto da fixação de N_2 , produzido pelos bacterióides é assimilado em ureídeos. Em contraste, NH_4^+ e NO_3^- são provavelmente absorvidos pelas pontas das raízes, as quais estão especialmente separadas dos nódulos, e onde resulta a assimilação na formação de aminoácidos. Isto seria consistente com o aumento geral em todos aminoácidos observados sob adição de nitrogênio absorvido em plantas não inoculadas (COOMBS, 1980).

Sobre as enzimas do catabolismo da purina em soja, TAJIMA e YAMAMOTO (1975) verificaram que a atividade da uricase é bastante alta na fração bacteróide de nódulos e não nas plantas hospedeiras maduras.

Numa demonstração de lucros e perdas levada a efeito por HERRIDGE *et al.*, (1978) para produção, armazenagem e utilização de ureídeos-N, durante o crescimento, constataram que todos (média de 90%) os ureídeos exportados das raízes foram metabolizados na entrada dos ramos, cujos compostos presumivelmente foram usados como fonte de nitrogênio para a síntese de proteína.

Os resultados encontrados por FUJIHARA e YAMAGUCHI (1978a), fazendo uso de inibidor da oxidase da xantina, sugerem que o principal caminho da formação de alantoina em plantas de soja foi através da decomposição da purina via xantina-ácido úrico, tendo notado um sistema especial muito ativo de decomposição em nódulos de soja. Entretanto, neste mesmo ano os mesmos autores (1978b)

investigaram um provável sítio de formação de alantoina, provando que a formação de alantoina nos nódulos é devido a decomposição oxidativa das purinas, e ainda reforçando a sua argumentação, explicam que investigações recentes mostraram que quando $^{15}\text{N}_2$ e $^{15}\text{NH}_4$ eram supridos para nódulos excisados ou para homogenados de nódulos, o ^{15}N , era incorporado no nitrogênio dentro da molécula de alantoina, cuja evidência sugere a forte existência de uma rota biossintética de alantoina nos nódulos (FUJIHARA *et al.*, 1977).

Mais recentemente, ATKINS e PATE (1980) estudando feijão de rama, mostraram que alantoina e ácido alantóico são os principais produtos nitrogenados da fixação de N_2 exportados dos nódulos e que os nódulos foram particularmente ativos em enzimas de oxidação da purina (da desidrogenase da xantina, uricase e alantoinase). Entretanto, quando usaram o inibidor alopurinol (4-hidroxipirazol [3,4-d] pirimidina), verificaram a inibição da exportação de ureídeos, reduzindo-os nos "pools" dos nódulos e causando a acumulação de xantina, nos nódulos. Quando glicina- $2,^{14}\text{C}$ foi suprida para fatias de nódulos, foi mais incorporada dentro da alantoina e ácido alantóico do que glucose- U^{14}C .

O estudo de WOOD *et al.*, (1980) para explicar o sítio de síntese de ureídeos dentro do nódulo de feijão de rama, fazendo uso de material radioativo e extrato de células livres de nódulos que fixaram N_2 , mostraram que ^{14}C recuperado na fração neutra do ácido estava presente no ácido úrico e alantoina (88-97%), e menos de 10% estavam no ácido alantóico e uréia.

Com a descoberta das enzimas alantoinase e alantoicase em plantas superiores na década de 1920/30 por BRUNEL e colaboradores (in: THOMAS e SCHRADER, 1981a), foi idealizado um esquema para utilização de ureídeos, no qual purinas são degradadas em uréia e glioxilato, considerando que uréia seria metabolizada

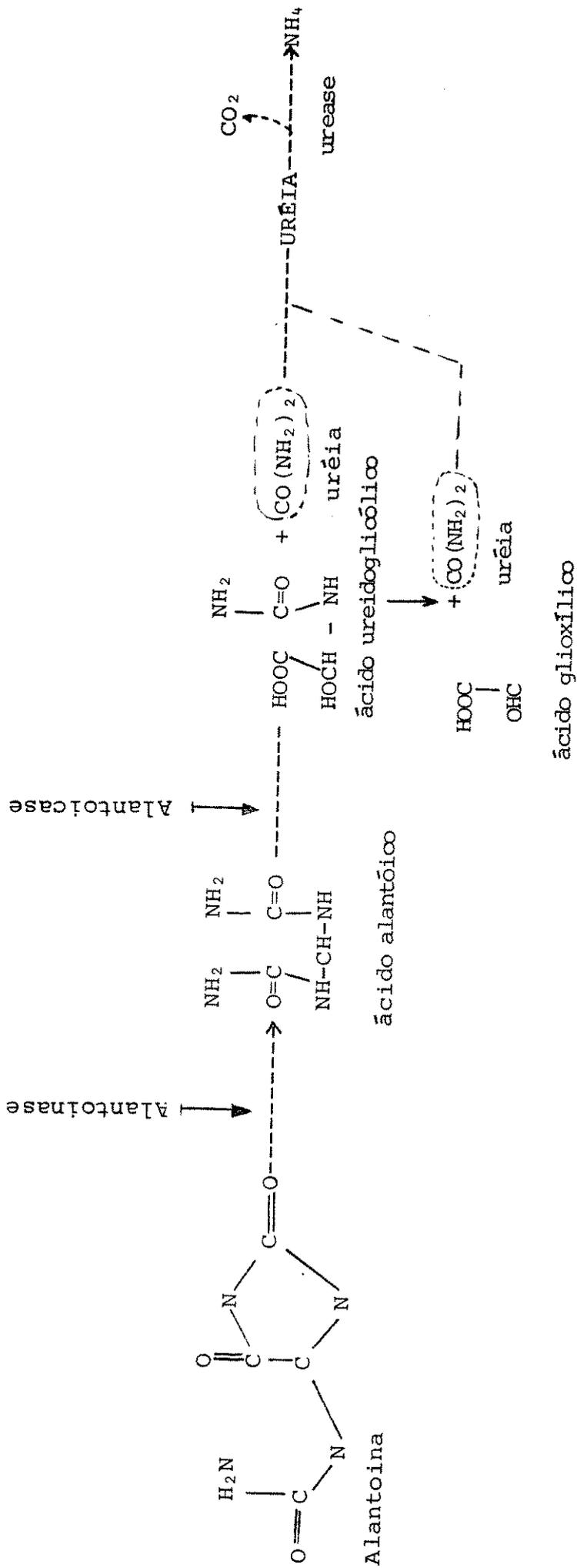


FIGURA 2 - Caminho metabólico para utilização do ácido alantóico. Seg. THOMAS e SCHRADER, (1981a).

via urease em amônia. Muitos anos depois foi mostrada que a reação catalizada por alantoinase (E.C.3.5.3.4 alantoato amidino hidrolasa) é de fato uma reação constituída de dois passos envolvendo pelo menos duas enzimas, a alantoicase e ureido-glicolase (VOGELS, 1966).

Observando a figura 2, verifica-se que o primeiro passo catalizado por alantoicase, hidrolisa alantoato até uréia e ácido ureidoglicólico. Este último é então degradado via ureidoglicolase até uréia e ácido glioxílico.

Muitas são as informações sobre a atividade de alantoicase em plantas superiores (TAJIMA, *et al.*, 1977 e THOMAS, *et al.*, 1980), mas somente o glicolato tem sido demonstrado ser produzido do alantoato. Pelo uso de um método de hidrólise para diferenciar derivados do glicolato, VOGEL e VAN DER DRIFF (1970) também sugeriram a presença de ambos ureidoglicolato ou ureidoglicina, em extrato de folhas de feijão incubados com alantoato, embora estes compostos não foram definitivamente identificados (THOMAS *et al.*, 1979; THOMAS e SCHRADER, 1981a).

Mais recentemente, THOMAS e SCHRADER (1981b) estudando utilização de ureídeos nos tecidos de caules de soja, verificaram mudanças da atividade de alantoinase e conteúdo de ureídeos das folhas e frutos. Também, constataram que a atividade de alantoinase atingiu um pico durante a formação da vagem e o crescimento inicial das sementes. Nos frutos em desenvolvimento a atividade da alantoinase na semente é de duas a quatro vezes maior do que aquelas da vagem, embora haja nos embriões atividades de alantoinase bem mais alta.

Uma vez que é evidente a importância de asparagina e os ureídeos alantoina e ácido alantóico na maturação de frutos de leguminosas tropicais, a utilização desses compostos pelo fruto ,

como fonte de nitrogênio para a síntese de aminoácidos necessários no suprimento de proteína de reserva, deve envolver, em primeira instância, as enzimas asparaginase e alantoinase.

3.7. Anatomia do fruto de feijão

DOUTT (1932) , cita que o primeiro trabalho de anatomia de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), foi publicado em 1958 por HAGELI, que investigou o curso dos feixes vasculares no caule . Além desse trabalho surgiram outros, como os de van TIEGHEM (1871), DODEL (1872), PETIT (1887), BARY (1884) e BOLD (1894), que desenvolveram 300 espécies da tribo *Phaseolae* com o objetivo de obter um critério para diferenciar antomicamente as espécies.

Dos trabalhos mais antigos segundo DOUTT (1932) o que mais se ressaltou é o de SOLEREDER (1908), que mostra vários aspectos anatômicos da planta de feijão. Entretanto, o trabalho mais representativo foi o de DOUTT em 1932, que caracterizou anatomicamente a raiz, o caule e a folha, além de descrever todo o desenvolvimento do sistema de vasos.

Na década dos 50, alguns trabalhos de pesquisas mostraram a natureza da superfície da semente do feijão mungo, exclusivamente pelo interesse em esclarecer o aspecto brilhante ou fosco da casca da semente, capaz de despertar maior ou menor interesse dos consumidores (BOSE, 1932 e SEN e CHOSH 1959).

Em feijão "Grão de bico" cv. preto (*Vigna mungo* L. Hepper), SEN e JANA (1963) observaram que a superfície da semente era áspera e pálida ou lisa e brilhante, e que uma região da camada das células epidérmicas continha pigmento castanho mais intensamente na semente pálida do que na semente brilhante. Já, MISRA e SAHU (1970) descreveram a casca da semente do feijão mungo co-

mo composta de uma camada externa de células epidérmicas semelhantes a paliças e uma camada interna de células que se originam do integumento externo.

Segundo DESHPANDE e BHASIN (1974), o feijão "Mat" (*Phaseolus aconitifolius* Jacq.), uma planta bastante cultivada, mereceu um estudo detalhado quanto à origem e desenvolvimento. Neste estudo, referiu-se ao embrião como um saco monospórico conforme o tipo *Poligonum*, de fertilização porogâmica singâmica e de tríplice fusão que ocorre quase que simultaneamente. Quando ao endosperma, é, no início, nuclear livre, sendo que parte dele mais tarde torna-se celular. A semente madura é do tipo não endospérmico e o embrião segue o tipo de desenvolvimento das Onagraceas, sendo que a casca da semente é derivada das duas outras camadas do integumento externo. As células de todo o pericarpo, exceto uma pequena camada no meio, permanecem parenquimatosas.

O trabalho de WATT *et al.*, (1977), sobre origem e composição da estrutura das camadas da semente do feijão mungo, mostra todo o aspecto externo da semente através de fotomicrografias tipo varredura, além de fotomicrografias de secções em microscopia de transmissão, de sementes com dois dias de idade após a polinização. Neste estudo, o envoltório do fruto, ou seja, parede (casca) e da semente em desenvolvimento é anatômicamente bem caracterizado.

SINHA *et al.*, (1978) estudando o desenvolvimento do fruto e semente de feijão mungo, mostraram aspectos anatômicos e fisiológicos relacionados com a fixação do fruto em diferentes nós. Este trabalho mostra, também, que os estudos histoquímicos da parede (casca) do fruto confirmam as observações do estudo quantitativo da matéria seca, proteína e amido nas paredes do fruto e da semente em diferentes idades.

CROOSKSTON *et al.*, (1974), KHANNA e SINHA (1976) e SINHA e SANE (1976), mostraram a importância da parede do fruto no desenvolvimento da semente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultivo de plantas

Foram usadas plantas de *Phaseolus vulgaris* (L.), cultivar "Goiano precoce", de ciclo curto e crescimento determinado, obtida de sementes fornecidas pela Secção de Leguminosas do I.A.C. (Instituto Agronômico de Campinas).

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e laboratórios do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, nos anos de 1981 a 1982.

Foram desenvolvidos dois experimentos nos períodos de 13/03/1981 a 21/05/1981 e de 22/09/1981 a 30/11/1981, ambos com ciclo completo de 65-70 dias. O primeiro experimento serviu para esclarecimento da influência do fator água nos diferentes estádios de crescimento, durante o ciclo de desenvolvimento do feijoeiro. O segundo experimento serviu para coleta de material a ser usado no estudo de laboratório e determinações do teor de água da planta e solo.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados com 6 tratamentos e 5 repetições.

Os tratamentos usados foram :

- Irrigação diária , "A"
- Irrigação duas vezes por semana, "B"
- Irrigação uma vez por semana, "C"
- Aplicação do estresse hídrico (suspensão da frequência de irrigação por 7 a 11 dias) nos tratamentos A, B e C nos períodos pré, plena floração (floração com 25 dias após a germinação) e frutificação.

O substrato usado nos vasos constou de uma mistura com 70% de solo tipo latossolo roxo de cerrado paulista e mais 30% de esterco de gado curtido. Esta mistura foi homogeneizada, peneirada e desinfetada com Brometo de metila a base de $80 \text{ cm}^3/\text{m}^3$ por um período de 48 horas.

Os vasos de formato cônico com capacidade de 6 litros , perfurados, enchidos com a mistura indicada até 5 cm da bordadura do vaso e adubados quimicamente com 3 g de adubo químico super concentrado na base de 8-26-16 tendo como fonte de N , P_2O_5 e K_2O respectivamente, sulfato de amônio, superfosfato e cloreto de potássio, distribuído num sulco periférico a 5 cm de profundidade (JACKSON, 1958).

Para o plantio, os vasos foram irrigados uniformemente , até a capacidade de campo, com frequência de acordo com a necessidade até haver o desbaste e seleção. Foram plantadas 5 sementes em cada vaso a uma profundidade de 2-3 cm. Após o período de germinação, procedeu-se a seleção. A partir disto aplicou-se a frequência de irrigação de cada tratamento.

Fisicamente, a mistura do substrato do vaso foi caracterizada quanto à densidade do solo, determinada após enchimento dos vasos (BLAKE, 1965a), densidade de partículas (BLAKE 1965b), volume total de poros (VTP) conforme (VOMOCIL, 1965) e curva ca-

racterística de retenção de água (FREIRE e SCARDUA, 1978).

O potencial mátrico do solo foi determinado conforme metodologia de FREIRE e SCARDUA (1978).

A obtenção dos dados dos parâmetros estudados, foi feita através de amostragem aos 15, 30, 40, 50 e 70 dias após o plantio. Nestas épocas determinou-se o comprimento da haste principal, o peso seco da parte aérea e subterrânea e área foliar.

Para determinação do peso seco das partes estudadas, fez-se a secagem do material em estufa com circulação de ar a 80°C por 48 horas, até a obtenção de peso constante (MAGALHÃES, 1979).

Para estimar a área foliar, utilizou-se um perfurador de rolhas para tomar amostras de discos de folhas, a fim de relacionar o peso seco da área conhecida do disco com o peso seco das folhas de cada planta (MAGALHÃES, 1979). As raízes foram coletadas de cada planta, lavadas em peneira de nylon sob jatos de água, em seguida secas e pesadas.

Para cálculos dos parâmetros de análise do crescimento, usou-se o método padrão internacional conforme (WATSON, 1952; RADFORD, 1976; BLACKMAN, 1968 e MAGALHÃES, 1979).

4.2. Avaliação dos parâmetros de rendimento

O controle do número de botões florais, flores e frutos foi feito duas vezes por dia, durante o período de floração para cada planta. O botão floral considerado apresentava tamanho de 3 a 6 mm, sépalas verdes cobrinho quase que totalmente as pétalas que apenas se mostravam unidas; as flores de tamanho maior do que o botão apresentavam as pétalas abertas de coloração roxo-claro, tipo papilonoidea, cobrindo as sépalas verdes pequenas; os frutos, tipo legume, de 10 mm, de cor verde com pelos. Para

esse controle, foram marcados inicialmente os botões, depois flores e frutos, com lã, utilizando-se diferentes cores ou tantas combinações de 2 a 2 etc., para cada contagem diária, durante o período de floração e frutificação, além de se obter os frutos de diferentes idades para estudos físicos e químicos conforme RAMALHO e FERREIRA (1979).

Para determinação do volume do fruto, baseou-se num método que faz uso do "princípio de Arquimedes", utilizado por HSU (1979), cujo valor é obtido pela aplicação da fórmula de HSU, ou seja :

$$V = (\text{peso do fruto no ar}) - (\text{peso do fruto na água}) \times (\text{densidade da água})$$

O peso seco dos frutos, foi obtido através de balança de precisão, após secagem em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 80°C até obtenção de peso constante.

4.3. Determinação do conteúdo de macro e microelementos minerais.

O material usado para análise do conteúdo dos elementos minerais que compõem o fruto (casca e semente) de feijão, nos diferentes tratamentos e estádios do desenvolvimento, foi o mesmo que forneceu dados para o estudo do desenvolvimento.

Os frutos coletados em diferentes idades de desenvolvimento ou seja 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias após a antese, foram secados em estufa com circulação de ar, 80°C, até a obtenção de peso constante.

Foram usadas de 5 a 10 repetições de cada idade de desenvolvimento.

A determinação do conteúdo de macro e microelementos minerais separadamente para a parede do fruto (casca) e semente foi realizada no Laboratório de Análise Foliar, do Departamento de Química da Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais, de acordo com VILLELA *et al.*, (1973), SARRUGE e HAAG (1974) e BATAGLIA *et al.*, (1978).

4.4. Estimativa da percentagem de proteína total

A estimativa da percentagem de proteína foi feita fazendo-se uso do fator 6,25 x conteúdo de N-total.

Dos dados obtidos, procedeu-se a análise estatística, determinando-se a regressão polinomial do 1º ao 4º grau. Fez-se uso do 4º grau cujo coeficiente de determinação múltipla foi o mais próximo de 1.

4.5. Determinação do teor de prolina livre em folhas destacadas de feijão.

4.5.1. Coleta do material vegetal

O material utilizado para determinação do teor de prolina, foi obtido de folhas de plantas de feijão "Goiano precoce", crescendo em casa de vegetação, em vasos de 5 litros de capacidade, sob a influência dos diferentes regimes de irrigação usados. Os vasos foram cheios com uma mistura de 70% de terra, tipo latossolo roxo de cerrado paulista, mais 30% de esterco curtido de gado e adubo químico na fórmula de 8-26-16 de N, P₂O₅, K₂O, respectivamente.

As folhas foram coletadas da posição do 3º e 4º nó, às 13 horas, de plantas irrigadas duas vezes por semana com 40-55

dias após a germinação, ou seja, durante o período de desenvolvimento dos frutos. Os períodos das coletas de folhas foram às 24, 96, 168, 192, 216 e 240 horas após o 40º dia de desenvolvimento.

O conteúdo de água do solo e o potencial hídrico, foram determinados conforme metodologia de RICHARDS e FIREMAN (1943), RICHARDS (1947) e GROHMAN e MEDINA (1962).

4.5.2. Dosagem do teor da prolina

As folhas coletadas em cada época, foram picadas e homogeneizadas através de POLYTRON PT 10/35 (Brinkman Instr., N.J., USA) em meio de metanol, clorofórmio e água (12:5:3 v/v).

O homogeneizado foi centrifugado a 2.500 g, por um período de 10 minutos. Para cada 4 volumes de sobrenadante foram adicionados 1 volume de clorofórmio e 3,5 volumes de água.

Após agitar bem a suspensão em um funil de separação foi deixada em repouso por algumas horas. Em seguida, realizou-se a separação das duas fases, ou seja, a superior aquosa contendo compostos polares solúveis e aminoácidos, e a inferior contendo clorofórmio, compostos lipossolúveis e pigmentos, que foi descartada.

A fase aquosa foi aquecida em banho-maria sob agitação constante para eliminar todo o resíduo de clorofórmio.

A determinação do teor de prolina foi feita segundo técnica descrita por PAQUIN e LECHASSEUR (1979), com modificações.

Da fase superior (aquosa), tomou-se uma alíquota de 0,2 a 2,0 ml e colocou-se em um tubo de hidrólise com 2 ml do reativo ninhidrina (0,125mg de ninhidrina + 2 ml de H₃PO₄ a 6M + 3 ml de ácido acético) e mais 2 ml de ácido acético, completando com

água destilada para 7 ml ou 10 ml conforme a concentração, sendo a mistura bem agitada. Colocou-se em banho-maria à temperatura de 100°C, por 45 minutos, e a seguir, resfriou-se em banho à temperatura ambiente. Após esta operação, acrescentou-se de 4 a 5 ml de benzeno e agitou-se por alguns segundos.

Verificou-se que houve a formação de duas fases, ou seja, a superior benzênica de cor rósea, a qual foi usada para a leitura de densidade ótica (DO) a 515 nm em espectrofotômetro.

Um branco foi preparado contendo todos os componentes da reação, exceto a amostra da fase aquosa.

Uma curva padrão foi determinada na faixa de 0,0-11,5 µg de prolina.

4.6. Determinação da atividade das enzimas alantoinase e asparaginase nas diferentes partes da semente de feijão.

Plantas de feijão *Phaseolus vulgaris* L., cultivar "Goiano precoce" foram cultivadas em vasos de polietileno com capacidade de 5 litros, tendo como substrato uma mistura de 3:1 de terra tipo latossolo roxo de cerrado paulista e esterco curtido de gado, com suprimento de adubação mineral na base de 8-26-16, para N, P e K, respectivamente. As plantas organizadas em blocos inteiramente casualizados, sob suporte de madeira a 1,10 m de altura recebiam suprimento adequado de luz e água até a capacidade de campo durante duas vezes por semana.

Por ocasião do período de floração, iniciada aos 28/30 dias após o plantio, procedeu-se a marcação de flores abertas por meio de lã (de diferente cores ou tantas combinações possíveis), diariamente às 9:00 horas da manhã até o final da floração que se deu ao 40º dia após o plantio, com a finalidade de

obtenção de frutos (legumes) de diferentes idades de desenvolvimento, ou seja 5, 10, 14, 20 24, 28, 34 dias , para determinar a atividade das enzimas alantoinase e asparaginase nestes períodos de desenvolvimento.

4.6.1. Extração para dosagem de enzimas

Tomaram-se frutos com 5, 10, 14, 20, 24, 28 e 34 dias de idades após a ântese. Procedeu-se a retirada das partes da semente, ou seja, casca, cotilédones e embrião de um certo número de sementes originadas dos frutos legumes, das quais determinou-se o peso. Em seguida juntou-se certa quantidade de solução tampão Tris-HCl pH 8,0, contendo 2-mercaptoetanol 15 mM e KCl 50 mM , na relação 4 ml/g peso, mantendo sempre em ambiente frio.

Cada uma das partes da semente juntamente com a solução tampão foi homogeneizada em graal no frio, depois centrifugada a 10.000g por 20 minutos. Recolheu-se o sobrenadante conservando-o em gelo. Este extrato foi utilizado para a dosagem de enzimas.

4.6.2. Determinação da atividade de alantoinase

A dosagem da alantoinase (E.C.3.5.2.5.) foi realizada incubando-se a 30°C, uma alíquota do extrato (0,1 ml) com alantoina 15 mM e tampão tris-HCl pH 7,0 - 50 mM num volume final de 2,0 ml (GOMES 1982). Cinco minutos após o início da incubação , e em intervalos de 15 minutos, foram retiradas do ensaio alíquotas de 0,2 ml para dosar a formação do produto, o ácido alantóico. A dosagem do ácido alantóico foi realizada pelo método de VOGELS *et al.*, (1966). A cada alíquota de 0,2 ml do ensaio, juntaram-se 1,15 ml de água destilada mais 0,05 ml de HCl a 0,65 N, e 0,2 ml de fenil-hidrazina HCl (10 mg/3ml) mantendo os tubos de

ensaio sempre em ambiente frio durante o procedimento. A seguir foram retirados do ambiente frio, sendo colocados em um becker com água fervente por 2 minutos, voltando-os imediatamente para o ambiente frio por 10 minutos. A seguir foram colocados 0,8 ml de HCl concentrado e mais 0,2 ml de $K_2Fe(CN)_6$ a 50mg/3ml. Após 10 minutos, o volume foi completado com água destilada para 3 ml ou 6 ml ou 9 ml etc., conforme a necessidade da concentração, para leitura no espectrofotômetro (B 280 Micronal) num comprimento de onda de 525 nm.

A atividade foi expressa em umol de produto (ácido alânico) formado por hora por g de peso fresco ou por órgão (parte da semente).

4.6.3. Determinação da atividade de asparaginase

A dosagem de asparaginase (E.C.3.5.1.1), foi realizada de acordo com SODEK *et al.*, (1980). Fazendo uso de uma micropipeta automática colocou-se 50 ul de $[U-^{14}C]$ asparagina (30 mM, 50.000 cpm/umole), 50 ul de KCl(150mM) e 50 ul de extrato (sobrenadante) em microtubo de polipropileno. Desta quantidade separou-se a metade, isto é, 75 ul em dois tubos com tampa sendo um para o tempo zero e o outro para a incubação a 30°C durante 90 minutos. Parou-se a reação, colocando-se os tubos em água fervendo 100°C por 5 minutos. Dos 75 ul para cada tubo nos diferentes tempos, ou seja zero a 90 minutos, retirou-se 30 ul para aplicação cromatográfica a fim de separar os aminoácidos asparagina e ácido aspártico.

4.6.4. Preparo das placas cromatográficas

Para confecção das cromatoplasmas (TURNER e REDGWELL, 1966) usou-se celulose, sílica gel-60 e água na proporção de 10:4:50 (g/g/v), respectivamente.

A aplicação do ensaio enzimático de 30 μ l, foi feita gota a gota na base da placa a uma distância de 2 cm da borda em faixas de 2 cm (sendo 8 por placas). Após esta operação colocaram-se as placas para correr em reagentes fenol e água 80:20 p/v (6 horas), deixando-as secar por 24 horas ou até ficarem livres de fenol.

A revelação é feita através de um reagente não destrutivo, preparado usando-se 20 mg de "ftaldialdeído" e mais 2 ml de álcool etílico, mais 25 ml de borato de Na a 0,05 N e mais 4 gotas de mercaptanoetanol, sob pulverizações a jatos finos (DAVES e MIPLIN, 1978). Após a secagem das placas, localizam-se os aminoácidos através da luz ultra violeta. Os aminoácidos aparecem altamente fluorescentes sobre um fundo neutro. Localizado o ácido aspartico, produto da reação, faz-se a raspagem da área correspondente, cujo pó é colocado em uma solução própria para contagem da radioatividade. A solução consta de 4 g/litro de PPO (2,5 diphenyloxazole) mais 100mg de POPOP {1,4 bis-|2-(4 methyl-5-phenyloxazolyl)|} - benzeno em tolueno. Esta mistura é levada ao contador de radioatividade (Beckman C-100). A atividade é calculada levando-se em conta que 1 μ mol corresponde a 50.000 cpm, e expressa em umoles de ácido aspártico formado por hora por g de peso fresco ou por órgão (parte da semente).

4.7. Análise estatística

As análises de variância dos parâmetros estudados, as determinações das equações de regressão e os modelos estatísticos foram feitos segundo SNEDECOR e COCHRAN (1967) e GOMES (1973).

4.8. Estudo das estruturas anatômicas do fruto e semente de feijão.

Os frutos foram coletados no estágio de desenvolvimento de 5-10 dias de idade após a ântese e foram fixados em FAA (formol, ácido acético e álcool a 70%). A desidratação foi conduzida numa série de bateria (xilol e álcool), sendo o material posteriormente embebido em parafina (JOHANSEN, 1940).

Foram feitas secções de 12 μ m de espessura, e coradas com hematoxilina e safranina de Heidenhain. As lâminas, contendo os cortes, foram passadas através do corante verde-rápido com duração de 1 minuto.

As lâminas foram guardadas em estufa numa temperatura de 40°C por um período de 24 horas para melhor fixação das lâminas (JANSEN, 1962).

Para estudar a origem e desenvolvimento das camadas interna e externa da casca do fruto e das camadas constituintes das sementes, observou-se cuidadosamente as várias secções fixadas nas lâminas em sequência da estrutura componente da casca do fruto e da semente, sendo selecionadas as mais representativas para confecção de esquemas dos diversos tecidos da estrutura, através de câmara clara em microscópio óptico, tipo binocular da Carl Zeiss.

Também foram selecionadas algumas secções para fotomicrografias através do Foto-microscópio modelo II Carl Zeiss.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resultados dos efeitos dos regimes de irrigação no crescimento e desenvolvimento das plantas.

5.1.1. Comprimento da haste principal

O comprimento da haste principal das plantas de feijão , cultivar "Goiano precoce" nos 3 regimes de irrigação é mostrado na figura 3a. Verifica-se que entre os tratamentos estudados, a análise de variância indicou diferenças significativas. As plantas que receberam suprimento de água duas vezes por semana, apresentaram melhor desenvolvimento, cuja taxa de crescimento relativo foi de $0,018 \text{ cm.cm}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$. As plantas que receberam suprimento de água diariamente e uma vez por semana, apresentaram uma taxa de crescimento relativo de $0,015 \text{ cm.cm}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, mostrando que o excesso como a escassez de água prejudicam o crescimento da haste principal nas condições em que se realizou o experimento (o cálculo das taxas foram feitos tomando por base os dois pontos extremos da equação). Levando em consideração o ciclo vegetativo, a taxa de crescimento relativo para cada tratamento foi :

$$A = 0,0588 \text{ cm.cm}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$$

$$B = 0,0593 \text{ cm.cm}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$$

$$C = 0,0544 \text{ cm.cm}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$$

O valor final do comprimento da haste principal para cada tratamento foi :

$$A = 61,609 \text{ cm}$$

$$B = 63,730 \text{ cm}$$

$$C = 45,170 \text{ cm}$$

Estes dados mostram claramente que o fator água é importante para o desenvolvimento da parte aérea das plantas de feijão.

5.1.2. Peso seco da parte aérea

O peso seco da parte aérea das plantas de feijão, cultivar "Goiano precoce" nos 3 regimes de água estudado é mostrado na figura 3b. A análise de variância indicou diferenças altamente significativas entre épocas e regimes estudados. A taxa de crescimento relativo com base no peso seco foi :

$$A = 0,044 \text{ g.g.}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$$

$$B = 0,048 \text{ g.g.}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$$

$$C = 0,042 \text{ g.g.}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$$

O valor do peso seco final para cada um dos tratamentos estudados foi :

$$A = 22,290 \text{ g}$$

$$B = 29,980 \text{ g}$$

$$C = 19,780 \text{ g}$$

Estes dados confirmam a importância do fator água no desenvolvimento da parte aérea.

5.1.3. Peso seco da parte subterrânea

Nota-se pela figura 3c, que o desenvolvimento do sistema radicular, medido com base no peso seco foi significativo a nível de 1% de probabilidade entre os tratamentos estudados. A taxa de crescimento relativo da parte subterrânea para os tratamentos estudados foi :

$$A = 0,0175 \text{ g.g.}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$$

$$B = 0,0193 \text{ g.g.}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$$

$$C = 0,0115 \text{ g.g.}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$$

O peso seco por planta no final do ciclo para os tratamentos estudados foi :

$$A = 1,819 \text{ g}$$

$$B = 1,859 \text{ g}$$

$$C = 0,937 \text{ g}$$

Estes dados também mostram que o fator água é importante para o desenvolvimento do sistema radicular.

5.1.4. Área foliar por planta

Os dados referentes ao desenvolvimento da área foliar estão expressos na figura 4, com um comportamento crescente até o 50º dia. A análise de variância acusou valores altamente significativos entre época, regimes e épocas dentro de regimes nos diferentes tratamentos estudados. Os 3 regimes de água apresentaram valores, para área foliar, crescentes até o 50º dia, onde atingiram um máximo, mas com valores diferentes. O melhor tratamento foi aquele em que as plantas receberam suprimento de água duas vezes por semana (B, com área máxima de 3.248,82 cm² por planta, seguido pelo tratamento A= 2.518,87 cm² e C= 2.512,90cm²).

A partir do 50º dia, as plantas do tratamento B, praticamente man tiveram estes valores, enquanto as plantas dos tratamentos A e C, apresentaram uma queda em seus valores.

A taxa de crescimento relativo da área foliar para os tratamentos estudados foi :

$$A = 0,0197 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$$

$$B = 0,0250 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$$

$$C = 0,0220 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$$

A área média dos tratamentos estudados foi: A = 1.830,61 cm², B = 2.326,23 cm², C = 1.794,48 cm².

A eficiência do sistema assimilador é observado através das taxas assimilatórias aparentes nos tratamentos estudados :

$$A = 0,2414 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$$

$$B = 0,2435 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$$

C = 0,2147 mg.cm⁻². dia⁻¹ , indicando que o tratamento B, em que as plantas receberam uma quantidade de água melhor distribuída, apresentou a melhor contribuição durante o período. A função quadrática indica muito bem o comportamento das plantas nos 3 regimes estudados.

5.1.5. Rendimento e seus componentes

Os resultados dos componentes do rendimento estudados nos diferentes regimes de irrigação e mais a aplicação do estresse hídrico dentro de cada regime estão apresentados na tabela 1.

a) Número de botões florais : observando a tabela 1, verifica-se que houve diferenças significativas entre regimes e mais a influência do estresse hídrico dentro de cada regime. Analisando a influência dos regimes de irrigação sem estresse hídri

co, nota-se que de A para B, houve redução no número de botões florais da ordem de 19,30, de B para C, uma redução de 8,30 no número de frutos. Quando houve suspensão da frequência de irrigação dentro de cada regime, constata-se que só em A e C houve redução do número de botões florais da ordem de 24,80 e 3,90 respectivamente. Em termos percentuais a redução de botões florais atingiu 31,70% no tratamento A, e 7,72% em C e de responsabilidade do estresse hídrico 24,71% de A para B e de 14,10% de B para C.

b) Número de flores estabelecidas : o número de flores estabelecidas foi afetado de modo significativo pela frequência de irrigação e também pela aplicação do estresse hídrico dentro de cada regime de irrigação testado. A aplicação do estresse hídrico reduziu em 19,10, o número de flores estabelecidas no tratamento A, em 9,70 no B e em 2,30 no C (em termos percentuais A= 35,90%, B=24,18% e C=7,14%). As plantas do tratamento A sem aplicação do estresse hídrico apresentaram uma redução de 27,80 botões florais que não produziram flores estabelecidas, no tratamento B tal redução foi de 18,70 e no C de 18,40 (em termos percentuais A= 35,60%, B=31,80% e C= 36,40%, atribuídos a outros fatores). Com aplicação do estresse hídrico a perda de botões florais que não produziram flores estabelecidas no tratamento A foi de 41,46%, no B de 49,50%, no C de 36,00%, também de responsabilidade de outros fatores não controlados.

c) Número de frutos estabelecidos : observa-se que quando se compara com o número de flores estabelecidas, verifica-se redução no tratamento A sem estresse de 33,30 frutos e com estresse de 18,50; no tratamento B sem estresse de 22,70 frutos e com estresse de 17,60 e no tratamento C sem estresse de 18,10 frutos e com estresse de 16,20. Em termos percentuais nota-se que entre os três regimes estudados a redução foi de A= 25,29% , B= 26,34% e C= 2,85%, valores esses altamente comprometedores da produção.

Se relacionarmos o número de frutos estabelecidos com o número máximo de botões florais estabelecidos em cada tratamento, verifica-se que houve redução ainda maior do número de botões que não produziram frutos, ou seja (A sem estresse= 61,10 frutos, A com estresse= 40,60 frutos; B sem estresse= 41,40 frutos, B com estresse= 47,80 frutos; C sem estresse = 36,50 frutos e C com estresse= 33,00 frutos). A condição de estresse hídrico aplicada a cada tratamento afetou o número de frutos estabelecidos, com redução da ordem de A= 4,30 frutos, B= 4,60 frutos e C = 0,40 frutos. Assim sendo, tanto regimes de irrigação como a condição de estresse hídrico, aplicada dentro de cada regime afetaram consideravelmente o potencial de produção das plantas de feijão.

d) Número de frutos não estabelecidos : o número de frutos não estabelecidos foi obtido pela diferença entre o número de flores estabelecidas e o número de frutos estabelecidos em cada regime estudado, e a aplicação de estresse dentro de cada regime confirma que o fator água influencia no estabelecimento dos frutos, cuja redução também compromete muito a produção final da cultura.

e) Número de sementes por fruto : o número de sementes por fruto apresentou diferenças altamente significativas nos regimes A e B influenciados pela aplicação do estresse hídrico, já no regime C não houve influência. Quando se compara os regimes A e C sem estresse hídrico, verifica-se que houve uma redução de 1,10 sementes de responsabilidade apenas da frequência de irrigação. As diferenças atribuídas ao estresse hídrico em A, B e C atingiram 1,20, 1,50 e 0,20 sementes respectivamente. Estes valores representam muito em cultivo por área.

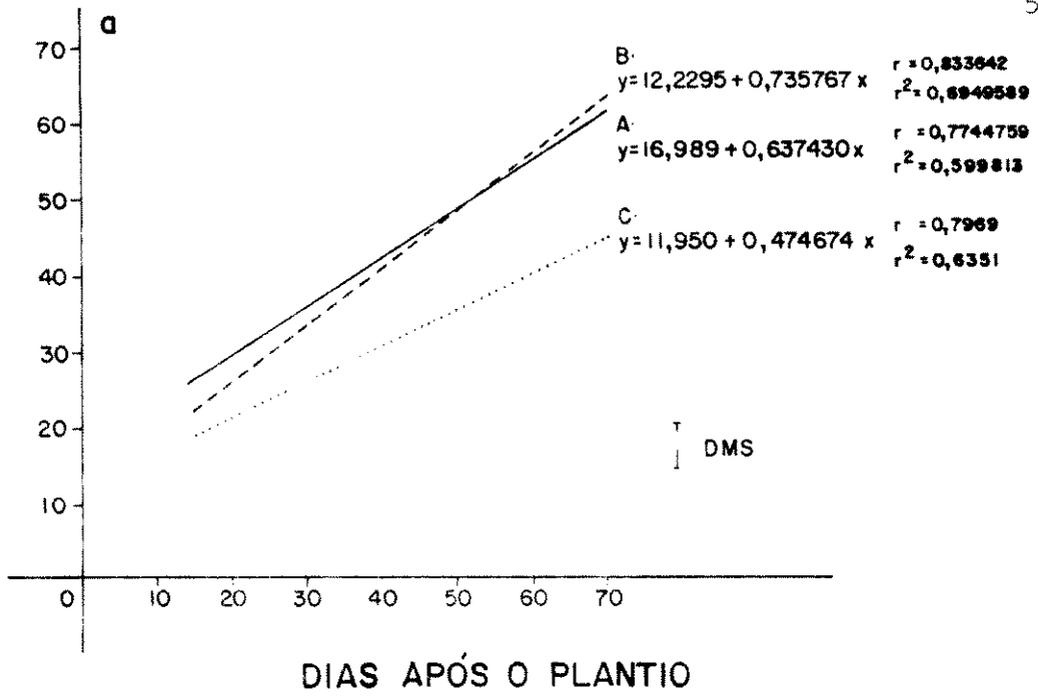
FIGURA 3 - Comprimento da haste principal, (a); Peso seco da parte aérea, (b); Peso seco da parte subterrânea, (c), durante o curso de desenvolvimento das plantas de feijão.

A - irrigado diariamente _____

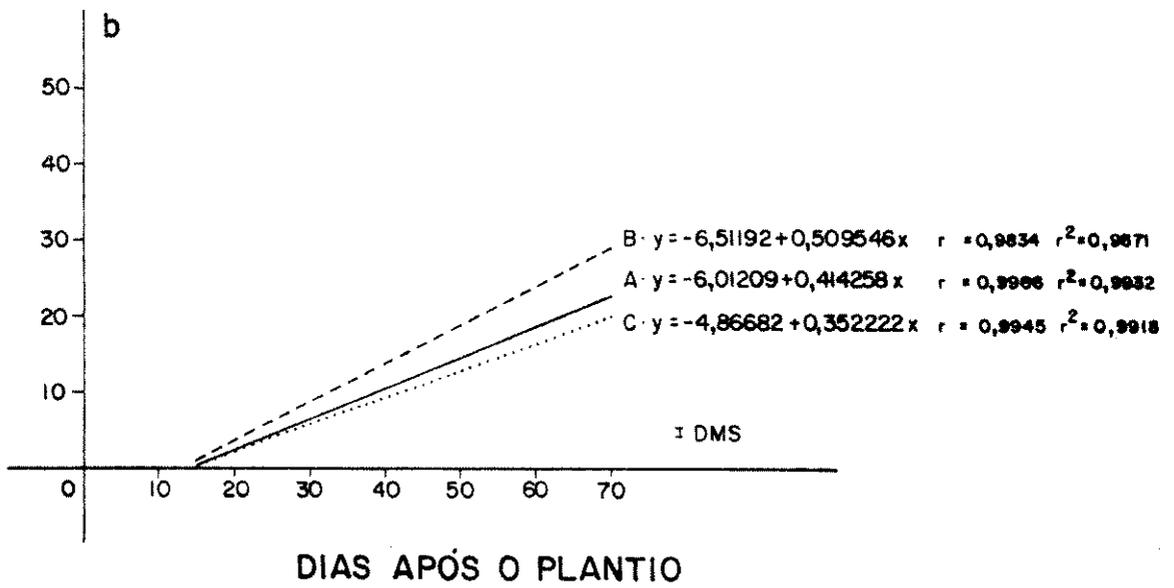
B - irrigado duas vezes por semana - - - - -

C - irrigado uma vez por semana

COMPRIENTO DA HASTE PRINCIPAL (cm)



PESO SECO DA PARTE AÉREA (g)



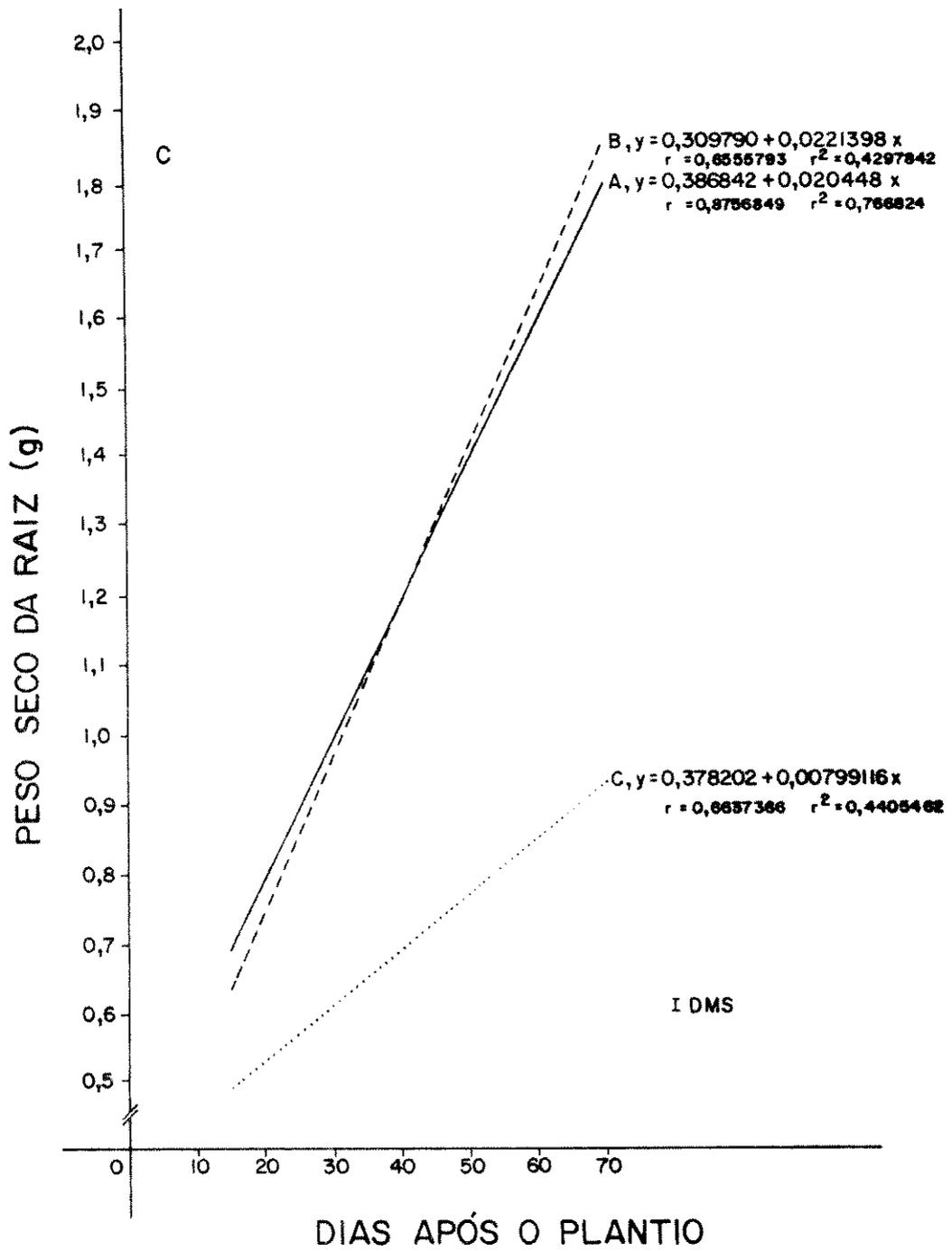


FIGURA 4 - Variação da área foliar de plantas de feijão.

A - plantas irrigadas diariamente _____

B - plantas irrigadas duas vezes por semana -----

C - plantas irrigadas uma vez por semana

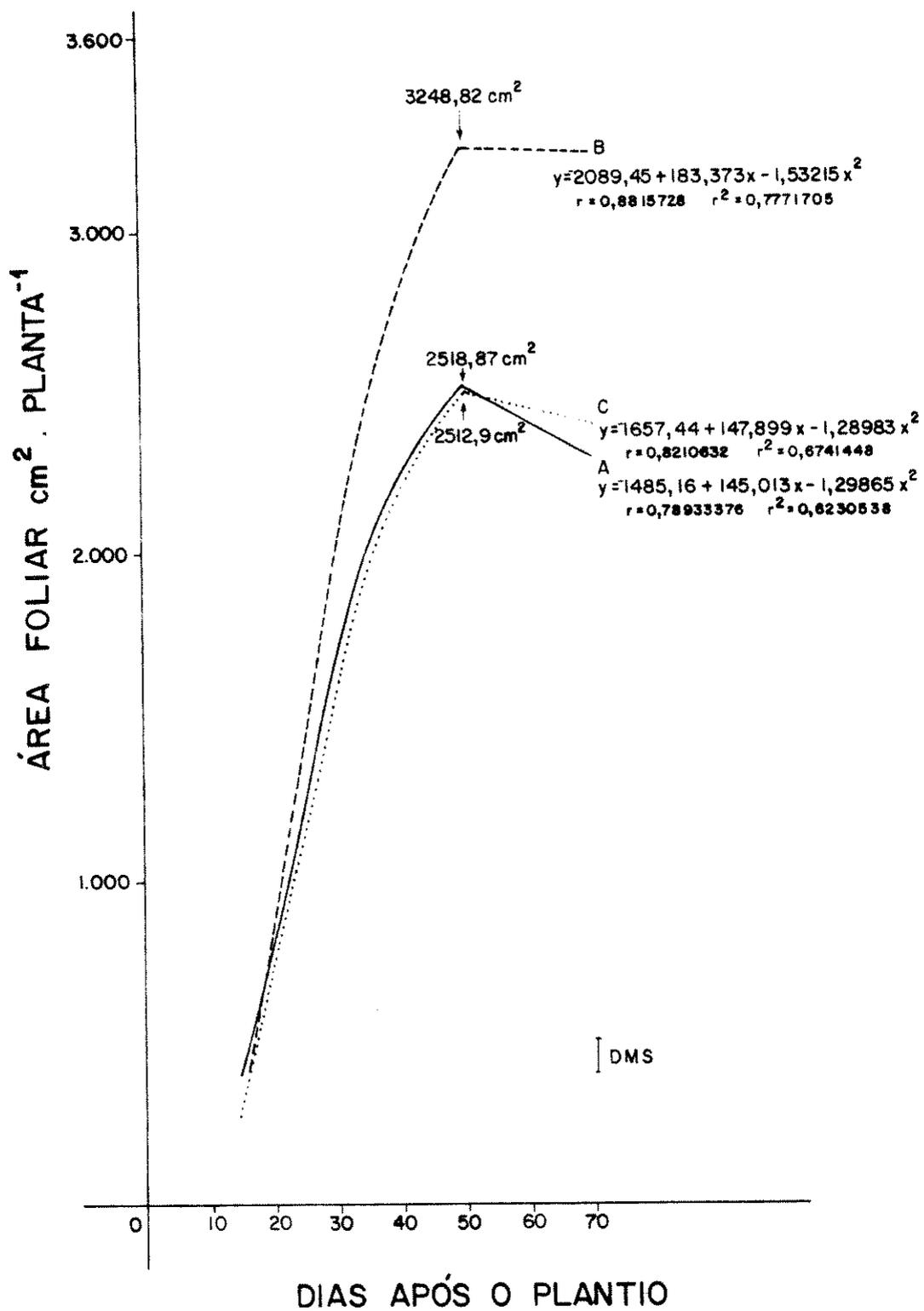


TABELA I - Diferentes características de reprodução e produção de plantas de feijão, cultivar "Goiano precoce". *

Características	Tratamentos						DMS
	A		B		C		
	S/Stress	C/Stress	S/Stress	C/Stress	S/Stress	C/Stress	
Nº de botões florais	78,10	53,30	58,80	60,20	50,50	46,60	17,75
Nº de flores estabelecidos	50,30	31,20	40,10	30,40	32,10	29,80	9,09
Nº de frutos estabelecidos	17,00	12,70	17,40	12,80	14,00	13,60	2,36
Nº de frutos não estabelecidos	33,30	18,50	22,70	17,60	18,10	16,20	6,53
Nº de sementes por fruto	4,60	3,40	4,60	3,10	3,50	3,30	0,32
Peso seco das sementes (g)	1,80	1,30	1,70	1,20	1,30	1,20	0,05
Peso seco da casca do fruto (g)	0,50	0,47	0,56	0,43	0,42	0,36	0,003

* Análise estatística no apêndice

Valores reais (média de 10 repetições)

f) Peso seco das sementes : o peso seco das sementes , nos tratamentos estudados, foi afetado significativamente a nível de 5% de probabilidade. As reduções mostradas na tabela 1, são valores que também comprometem a produção por planta e por área.

g) Peso seco da casca do fruto (parede): o peso seco da casca do fruto de feijão foi afetado tanto entre regimes quanto pela condição de estresse hídrico aplicado nos regimes. Verifica-se que as diferenças existentes relacionadas com o fator água são importantes na avaliação da matéria seca total rendida por planta.

5.2. Discussão dos efeitos dos regimes de irrigação no crescimento e desenvolvimento das plantas.

Os coeficientes de regressão e de determinação para as funções obtidas para avaliar as mudanças no comprimento da haste principal, peso seco das partes aérea e subterrânea, mostram o hábito de crescimento da cultivar "Goiano precoce" nos 3 regimes de irrigação, figuras 3a, b e c.

A análise do crescimento indica, claramente, que durante o ciclo de desenvolvimento da cultivar "Goiano precoce" nos 3 regimes estudados, as plantas que melhor rendimento apresentaram foram as do tratamento B, irrigadas duas vezes por semana. Em todos os parâmetros estudados foi confirmado o melhor comportamento do tratamento B, com alto rendimento. Essa alta produtividade se deve a maior taxa de crescimento relativo das partes aérea e subterrânea, com maior TAA (Taxa de assimilação aparente) e melhor aproveitamento do potencial do sistema assimilador, o que também foi evidenciado por KARAMANOS, 1978; ROBITAILLE, 1978 e FARAH , 1981b.

Neste estudo evidencia-se o papel importante da água no crescimento das partes aéreas e subterrâneas, cujas diferenças mostradas, indicam que tanto o excesso de água como a escassez, podem prejudicar o desenvolvimento das plantas de feijão.

Existem evidências que sugerem, que quando água não é limitada, o crescimento das partes aéreas e subterrâneas é bem maior e, mais efetivamente, expansão foliar pode ter uma relação linear com a temperatura (DALE, 1965; WILLIAMS e BIDDISCOMBE, 1965 e BULL, 1968).

A área foliar máxima e o peso seco total por planta, atingido nos diferentes tratamentos estudados foram melhor no tratamento B, figuras 1a, b, c e 2, ou seja com irrigação duas vezes por semana.

Segundo WILLIAMS *et al.*, 1965; SHIBLES e WEBER, 1965 e FARAH, 1981, havendo um maior número de folhas, como maior tamanho das folhas durante o período, possivelmente uma maior proporção da irradiação interceptada permite melhor desenvolvimento das plantas, e muitas vezes a irradiação interceptada tem uma relação linear para as taxas de crescimento da cultura.

Nossos resultados confirmam a relação discutida aqui, indica que existe uma área foliar ótima para o crescimento da cultivar "Goiano precoce" quando as plantas receberam irrigação duas vezes por semana. Pode isto sugerir que a acumulação de matéria seca foi máxima quando a área foliar ótima foi encontrada no período de tempo mais curto após o plantio. (WATSON e FRENCH, 1962; WHITEHEAD e MYERSCOUGH, 1962).

Os resultados para os componentes do rendimento apresentados na tabela I, mostram que do grande potencial existente, ou seja número de botões florais, muito se perde em função dos 3 regimes de suprimento de água. Também os défices provocados em

cada tratamento, tiveram alguma influência sobre a redução da produtividade da cultura. O período compreendido entre a pré e a plena floração, ou seja de 20-30 dias após a germinação é crítico. Os défices provocados nesta fase reduziram o rendimento da cultura em 25-35%. Estes resultados são concordantes com os de KATAN e FLEMING, 1965; ROBINS e DOMINGO, 1976 e MAGALHÃES *et al.*, 1979.

Para se ter uma idéia da extensão do problema, basta analisar a perda de botões florais em relação ao número de flores estabelecidas mesmo nas melhores condições de irrigação. Nas plantas condicionadas à falta de água, mas dentro do limite de tolerância (irrigação das plantas uma vez por semana), as perdas foram menores, embora a produção tenha caído muito, pois o potencial reprodutivo já estava bem reduzido pela própria condição de água imposta ao tratamento. Isto mostra, também, a amplitude do aspecto da influência da água nos diferentes órgãos da planta e nas diferentes fases de desenvolvimento. Uma correlação negativa bastante alta entre rendimento por planta e a percentagem de abscisão de flores foi registrado em feijão por BINKLEY (1932) e SUBHADRABANDHU *et al.*, (1978).

Estas nossas observações estão de acordo com as de KOGBE (1972); SINHA *et al.*, (1978); RAMALHO e FERREIRA (1979) ; IZQUIERDO e HOSFIELD (1981).

Também os regimes estudados e a condição estresse hídrico, imposta a cada regime, afetam significativamente o número de sementes por fruto. Este aspecto foi também observado por KOGBE (1972) em plantas de feijão.

O peso seco das sementes também sofreu este tipo de influência quanto ao fator água. Já o peso seco da casca do fruto, foi também influenciado pelos regimes de água e a condição de estresse hídrico dentro dos regimes.

Neste estudo, os efeitos da água nos componentes do rendimento, são muito claros. Tal fato pode estar associado à sensibilidade desta cultivar ao estresse hídrico, observado durante os intervalos, nas fases críticas.

Conclui-se que para obter uma produção de pelo menos 80% da produção potencial (número máximo possível de botões relacionados com os frutos estabelecidos), não pode faltar água para a cultura desta cultivar "Goiano precoce" na fase antes da floração à plena floração. Assim, há necessidade de uma análise de vários fatores para melhorar as propriedades do potencial reprodutivo.

5.3. Resultados do efeito da desidratação do solo e o teor de prolina livre nas folhas destacadas de plantas de feijão.

Os resultados obtidos no experimento delineado para verificar o efeito do conteúdo de água do solo e o teor de prolina livre em folhas de feijão "Goiano precoce" são expressos na figura 5.

O teor de prolina em relação ao conteúdo de água no solo dos vasos é representado pela equação de regressão $Y=1,18+0,9156X$, com coeficiente de correlação ($r= 0,9979$)

Verificou-se que a medida que o potencial hídrico do solo se torna mais negativo, ou seja o solo está cada vez mais seco, o teor de prolina livre nas folhas aumenta.

Observa-se que em plantas com falta de água por 8 dias, o teor de prolina livre nas folhas destacadas atingiu o valor de 2,0 $\mu\text{g/g}$ quando o potencial hídrico do solo estava em torno de -0,75 atm. Contudo, entre o 9º e o 10º dia o potencial do solo tornou-se mais negativo, ou seja, foi drasticamente de -1,5 a -5,0 atm., e o teor de prolina livre nas folhas destacadas refle

tiu bem este estado, indo de 2,4 $\mu\text{g/g}$ a 5,6 $\mu\text{g/g}$.

As plantas irrigadas diariamente (A), apresentaram um teor, às 13 horas, equivalente a quantidade de 0,0 - 0,80 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco, quando o potencial hídrico do solo estava em torno de -0,05 atm.

As plantas irrigadas duas vezes por semana (B), apresentaram um teor de prolina oscilando de 0,00 a 1,15 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco, quando o potencial hídrico do solo variava de -0,05 a -0,15 atm.

As plantas irrigadas uma vez por semana (C), apresentaram um teor de prolina oscilando de 0,00 a 1,60 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco, quando o potencial hídrico do solo variava de -0,05 a -0,25 atm. (Dados transformados, relacionados com o ψ solo do primeiro experimento).

Estes resultados mostram que quando se modificou a frequência de irrigação dos regimes A, B e mais raramente C, pela suspensão da irrigação pelo período de 7-11 dias (o que chamamos de aplicação de estresse hídrico dentro de cada regime), ficou bem caracterizado o estado de falta de água na planta.

As plantas de feijão "Goiano precoce" em condições de estresse severo apresentam altos níveis de prolina e o aumento da estiagem aumenta o teor de prolina. As plantas reirrigadas apresentavam níveis baixos, semelhante ao controle (dados não apresentados).

De modo geral, altos teores de prolina correlacionam bem com a falta de água do solo.

5.4. Discussão do efeito da desidratação do solo e o teor de prolina livre nas folhas destacadas de plantas de feijão.

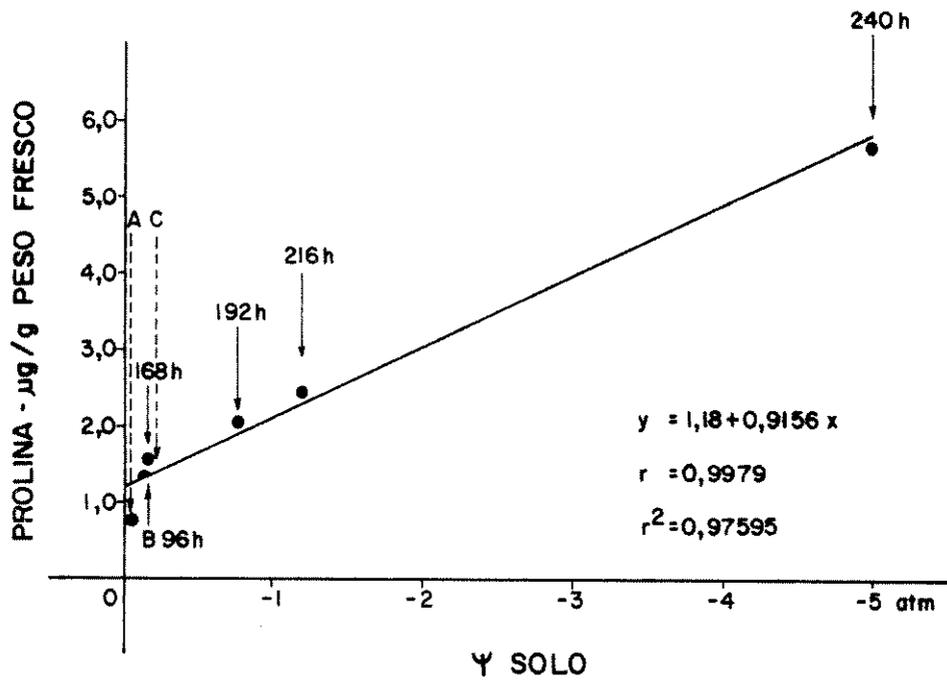
Este estudo mostrou que o teor de prolina aumentava consistentemente com o aumento do deficit hídrico. Estes resultados estão de acordo com os de MASCIOTTI (1974), que mostrou aumento do teor de prolina nos discos de folhas primárias turgidas a partir de 10 bars. Também SINGH *et al.*, (1973b) observaram que em folhas destacadas de cevada, prolina é acumulada rapidamente, após um período de defasagem inicial de 16 horas, mesmo estando os tecidos foliares flutuando em água.

Nas condições em que se realizou este experimento, registraram-se variações no teor de prolina desde 0,73 a 5,50µg/g de peso fresco, num período que foi de 0 até 240 horas sem irrigação, estando a variação do potencial hídrico do solo de -0,06 a -5,00 atm.

Conforme STEWART, (1973), o deficit hídrico eleva o teor de prolina livre nas folhas de feijão, através da diminuição da síntese e ou do aumento da degradação de proteína, e que a função dos hidratos de carbono é evitar a perda de prolina através da oxidação no ciclo de Krebs. Provavelmente, pode estar ocorrendo uma situação dessas ou havendo "síntese de novo", pois sem conhecimento da fonte de prolina fica difícil esclarecer a causa.

Tentando esclarecer as prováveis causas do deficit hídrico e dos estresses, FLOWER e HANSON (1969); BELL *et al.*, (1971) ; VIEIRA DA SILVA *et al.*, (1974); TUCKER *et al.*, (1975), mostraram que o estresse hídrico provoca alterações na estrutura do mitocôndria, enzimas e processos oxidativos, fazendo com que o teor de prolina seja aumentado, havendo, portanto, a inibição da oxidação de prolina e perda de compartimentação. Também, RENA e MASCIOTTI (1975), mostraram que folhas intactas de plantas sujeitas ao es -

FIGURA 5 - Efeito do período de desidratação do solo sobre o teor de prolina livre de folhas destacadas de plantas de feijão.



trêsse hídrico, acumulam prolina, aminoácidos livres e proteínas insolúveis.

Em geral, plantas que acumulam grande quantidade de prolina, sob condições de estresse modesto, também possuem capacidade metabólica para diminuir o "pool" de prolina rapidamente e recuperação dos potenciais de água anteriores.

Este estudo mostrou que as plantas, nas condições dos tratamentos impostos, alteraram o teor de prolina e produtividade (Tabela 1 página 57). Tal fenômeno se acentua quando o estresse se aplica às fases mais críticas.

5.5. Resultados do desenvolvimento do fruto de feijão

O aspecto mais interessante do fruto de feijão é o desenvolvimento diferencial. O nosso propósito foi observar o desenvolvimento num primeiro estudo do fruto, através de dois parâmetros físicos, ou seja, o volume e peso seco do fruto em diferentes idades em três regimes de irrigação e mais a condição de estresse hídrico (figuras 6, A,B, e C e figuras 7, A, B e C).

5.5.1. Volume

Observa-se que houve a mesma tendência de relação entre as mudanças de volume do fruto fresco, originado de plantas com e sem estresse hídrico, irrigadas diariamente, fig. 6A. O volume aumentou rapidamente a partir do 5º dia até o 28º dia, onde alcançou seu pico máximo (A sem estresse= 7,4 cm³ e A com estresse= 6,1 cm³). No início a diferença de valores entre frutos de plantas sob influência ou não do estresse é pequena, depois aumenta até atingir o máximo de 1,3 cm³ entre os picos máximos, mostrando bem claramente que o fator água nesta fase de desenvolvimento é muito importante.

Os frutos de plantas irrigadas duas vezes por semana , fig. 6B, com e sem estresse hídrico, apresentaram o mesmo comportamento, embora a diferença de valores entre picos máximos seja um pouco menor ($1,25 \text{ cm}^3$). A diferença de valores no início é pequena, depois aumenta atingindo picos máximos superiores ao tratamento A (B sem estresse= $7,50 \text{ cm}^3$ e B com estresse= $6,30 \text{ cm}^3$). Isto mostra que uma frequência de água duas vezes por semana é melhor, mesmo havendo influência do estresse hídrico.

Os frutos de plantas irrigadas uma vez por semana fig.6C, com e sem estresse hídrico, também apresentaram a mesma tendência, com valores diferentes e menores (C sem estresse= $6,95 \text{ cm}^3$ e C com estresse= $6,30 \text{ cm}^3$). Neste tratamento, mesmo as plantas estando adaptadas à condição de falta de água (7 em 7 dias), a aplicação de mais 4 dias de falta de água foi capaz de reduzir ainda mais o volume do fruto em seu desenvolvimento.

5.5.2. Peso seco

Uma análise das mudanças do peso seco, nas diferentes fases do desenvolvimento do fruto de feijão, confirmou as diferenças no crescimento padrão exibido pela tomada do volume do fruto fresco. O peso do fruto nas diferentes idades e nos diferentes regimes de irrigação e mais condição de estresse hídrico, exibiu crescimento padrão semelhante, embora existam diferenças no curso de seu crescimento. No final do desenvolvimento, ou seja ao 40º dia após a ântese, o peso seco dos frutos originados de plantas sem estresse hídrico nos tratamentos estudados, apresentou valores $A > B > C$ embora para os frutos originados de plantas com estresse hídrico os valores foram $A > B = C$ (figuras 7AB e C).

FIGURA 6 - Volume do fruto de feijão.

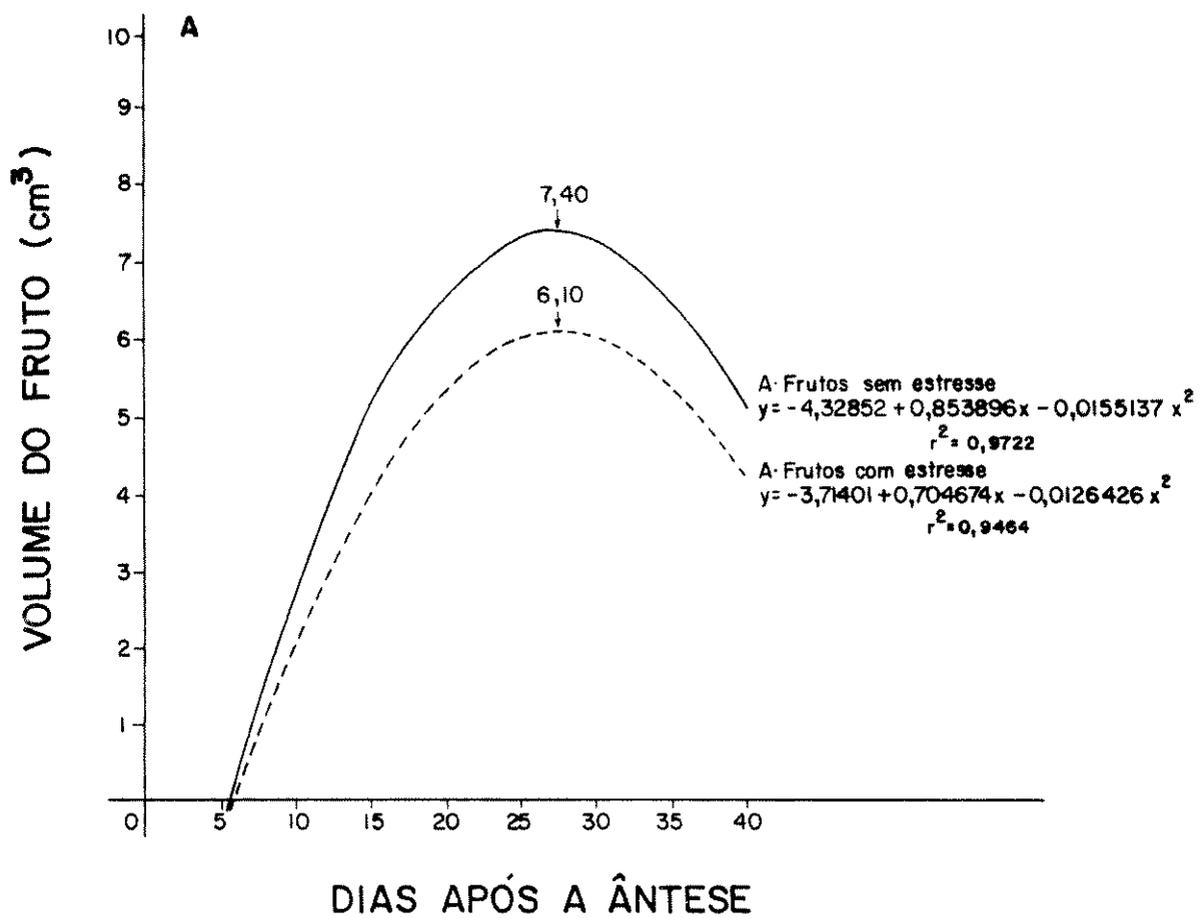
A - Volume de fruto originado de plantas irrigadas diariamente.

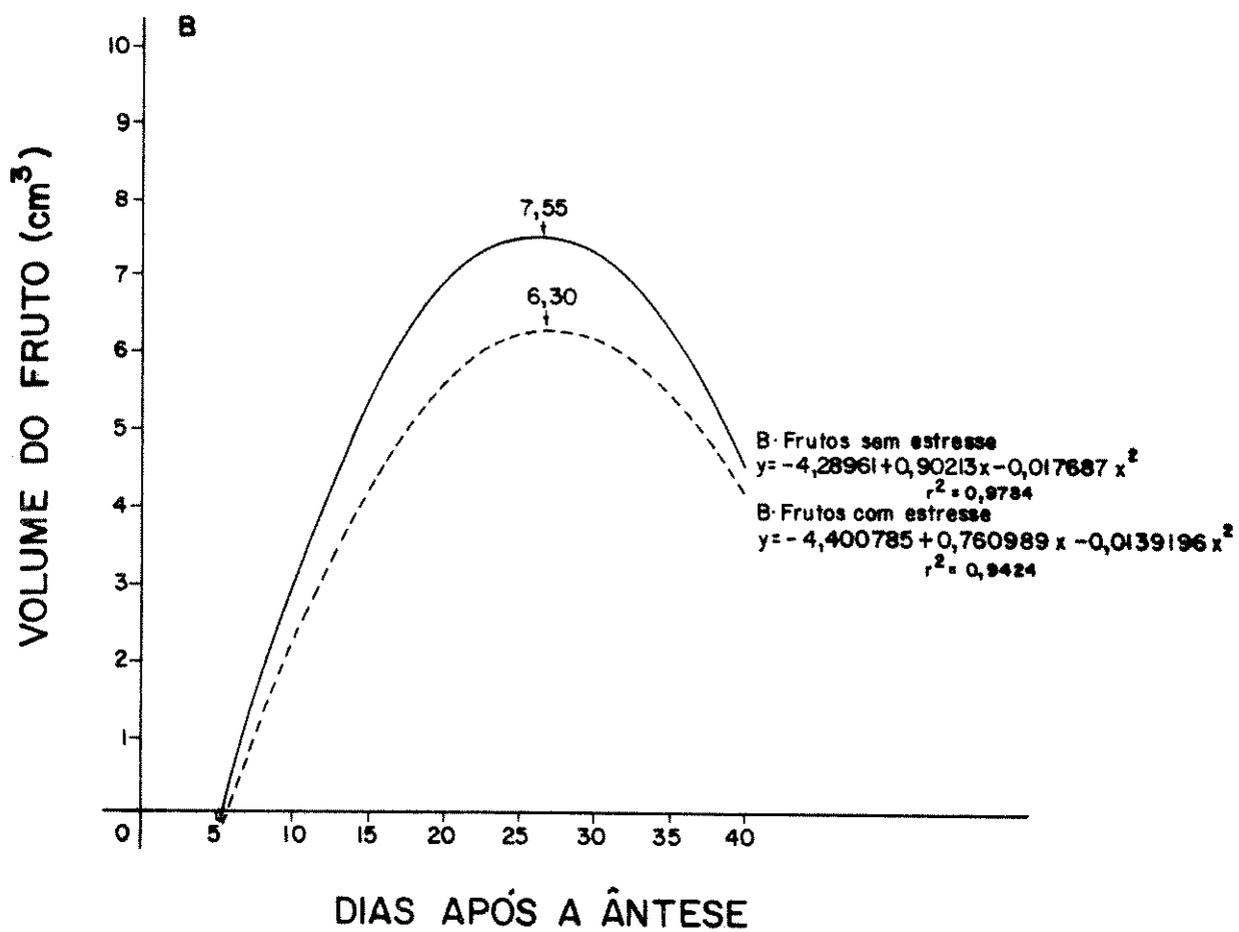
B - Volume de fruto originado de plantas irrigadas duas vezes por semana.

C - Volume de fruto originado de plantas irrigadas uma vez por semana

- sem estresse hídrico _____

- com estresse hídrico - - - - -





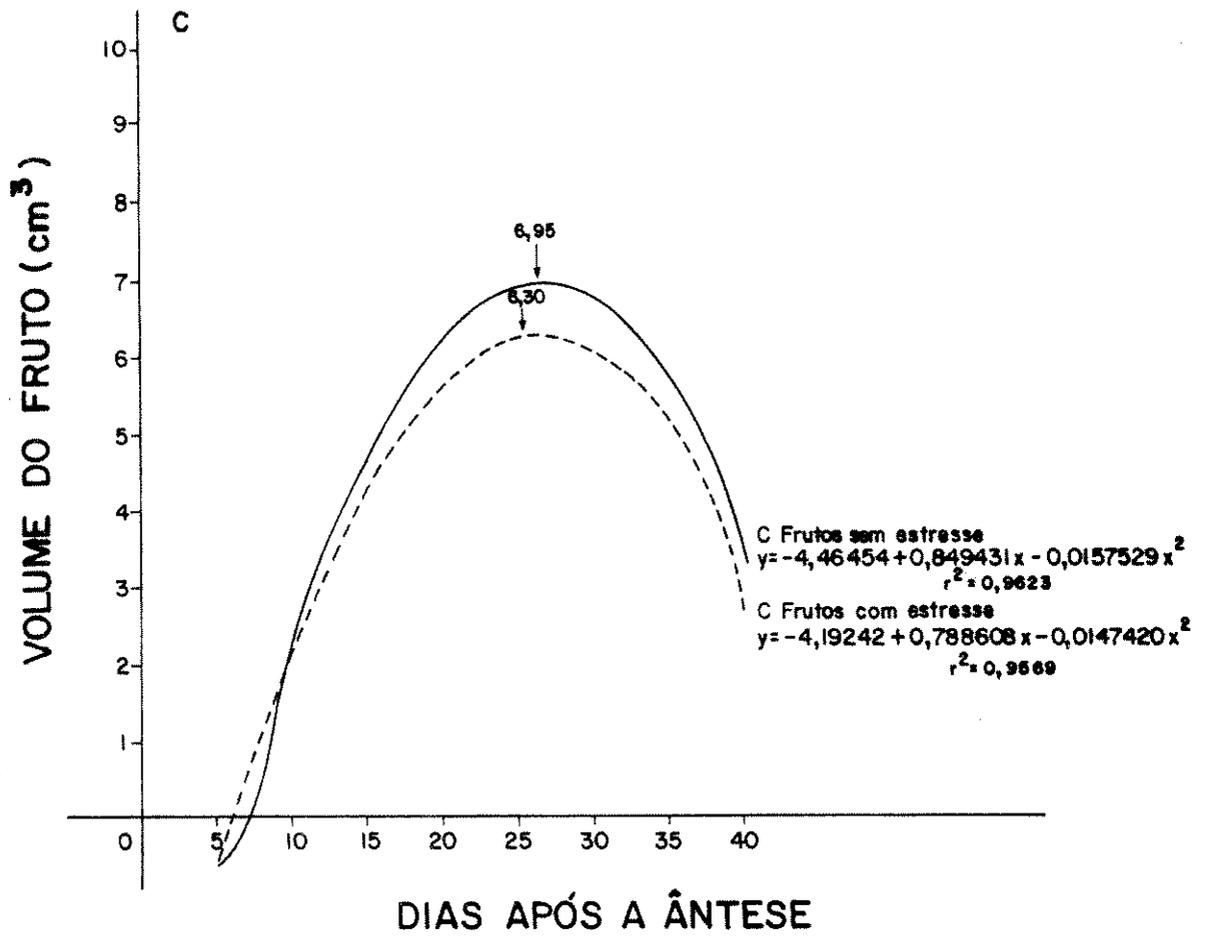
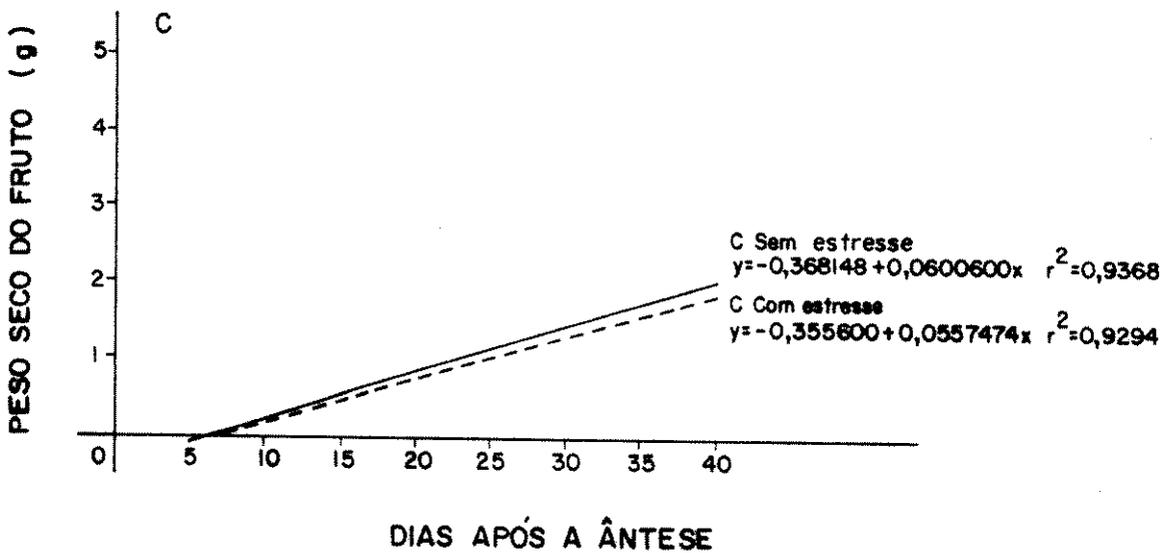
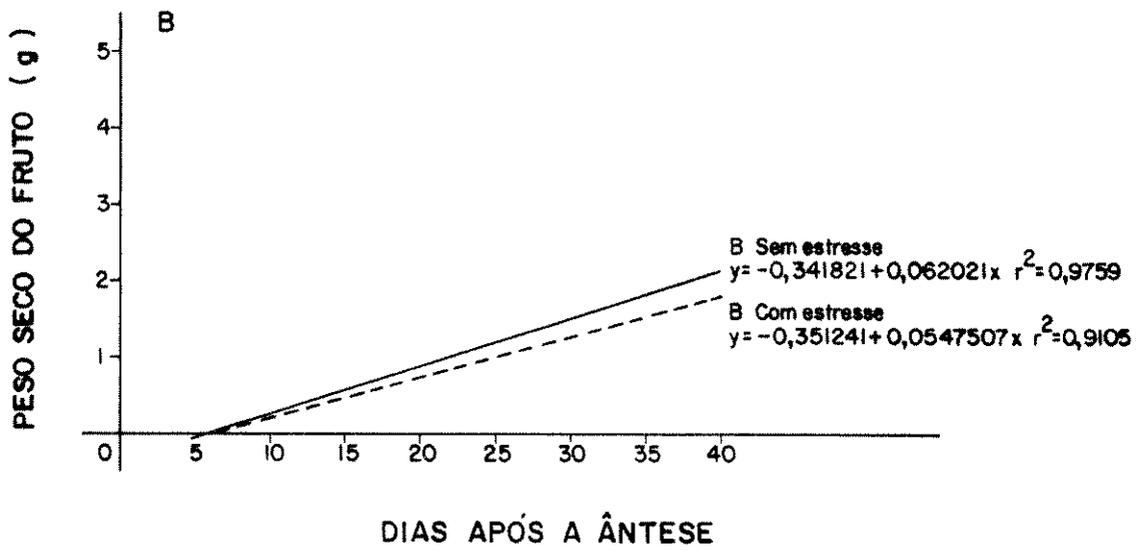
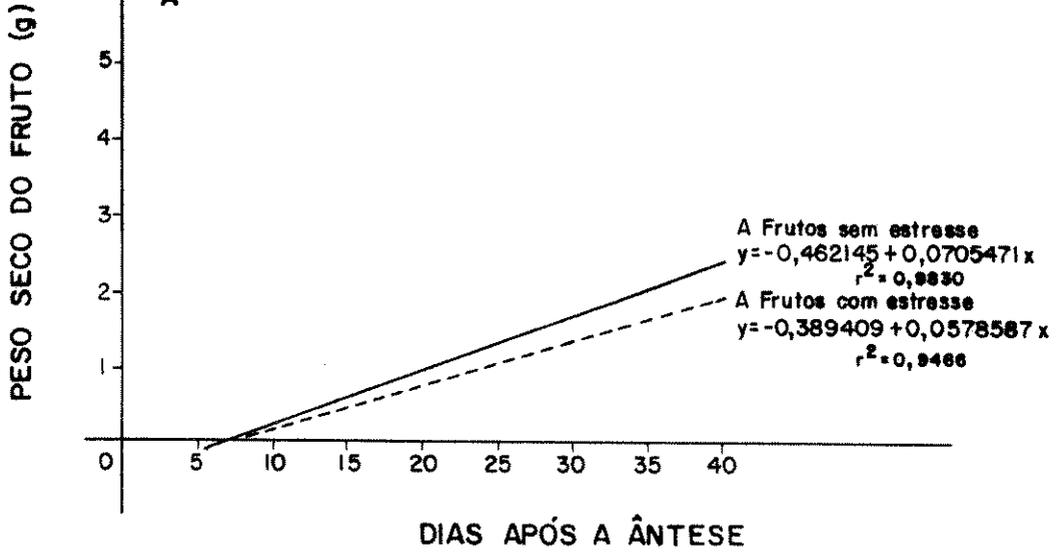


FIGURA 7 - Peso seco do fruto de feijão :

- A- peso seco de fruto originado de plantas irrigadas
diariamente
 - B- peso seco de fruto originado de plantas irrigadas
duas vezes por semana
 - C- peso seco de fruto originado de plantas irrigadas
uma vez por semana
- sem estresse hídrico _____
 - com estresse hídrico - - - - -



5.6. Discussão do desenvolvimento do fruto de feijão

O presente estudo foi feito com a intenção de entender o crescimento padrão do fruto de feijão sob influência de diferentes regimes de irrigação e condição de estresse hídrico. Ficou evidenciada a influência da água no desenvolvimento e rendimento do fruto de feijão "Goiano precoce". Os volumes encontrados nas diferentes fases de crescimento do fruto de plantas nos três regimes de irrigação, sem estresse hídrico, foram sempre maiores do que aqueles de plantas com estresse hídrico. Mesmo entre os três regimes aplicados, sem influência do estresse hídrico, houve diferenças, sendo que o melhor desenvolvimento do fruto foi encontrado no tratamento A, entretanto, a água fornecida duas vezes por semana até capacidade de campo (30% peso/peso) foi o melhor esquema para a maior produtividade (TABELA 1), mostrando que nem muita água e nem pouca água é o ideal. Estas nossas observações estão de acordo com as de SINHA *et al.*, (1978).

O curso de desenvolvimento do fruto seguido nos diferentes tratamentos estudados indica que o aumento de volume ou peso durante o curso de formação do fruto de feijão é regulado por um mecanismo interno, condicionado pela própria planta e que água tem participação importante. Verifica-se também, que a quantidade de água a se aplicar e sua frequência de aplicação são condições para garantir a produtividade. Este tipo de mecanismo também foi sugerido por HSU (1979), com respeito a semelhança do padrão de desenvolvimento da casca da semente, embrião e cotilédones.

Alguns pesquisadores têm mostrado a importância da parede do fruto no desenvolvimento da semente, como elemento fotosintetizante (CROOKSTON *et al.*, 1974), ou como reservatório de elementos necessários ao desenvolvimento da semente (SINHA

et al., 1978; KHANNA e SINHA, 1976; SINHA e SANE, 1976).

O peso seco do fruto (casca do fruto + semente), com valores crescentes até o 40º dia após a antese, observados por nós, são semelhantes aqueles encontrados por SINHA *et al.*, (1978), em feijão mungo, e HSU (1979) em dois cultivares de feijão "TH" e "PT".

O método de medida de volume, adotado por nós, nos pareceu bem prático e de amplo potencial de aplicação, sendo particularmente eficiente para medir o aumento do crescimento de frutos pequenos e de forma irregular.

Segundo HSU (1979), os processos de determinação do tamanho da semente, como: translocação de nutrientes das partes vegetativas para a parede do fruto e daí para as sementes em desenvolvimento; duração de multiplicação de células da parede do fruto e da semente; extensão da armazenagem do material sintetizado; sequestração, e muito outros, podem ser afetados por vários mecanismos reguladores e conseqüentemente afetar o tamanho do fruto e semente. Mais investigações serão necessárias para determinar a exata natureza destes mecanismos e sua interação com água, temperatura e outros fatores nos diferentes estádios de desenvolvimento do fruto e semente e a interrelação entre parede do fruto e semente.

5.7. Resultados da avaliação do conteúdo de macro e microelementos minerais em diferentes fases do desenvolvimento do fruto de feijão.

As análises químicas feitas para verificação do conteúdo dos macro e microelementos na composição do fruto (parede do fruto mais semente) de feijão, cultivar "Goiano precoce", durante o curso de seu desenvolvimento, revelaram valores expressos nas figuras (8a, b, c, d, e) e (9a, b, c, d).

As figuras citadas mostram a variação do conteúdo dos macro e microelementos nos tratamentos estudados, como, também, a

faixa de variação de cada elemento mineral.

O conteúdo do elemento N, na semente em desenvolvimento, variou dentro da faixa de 4,00-4,50%, permanecendo no final do desenvolvimento na faixa de 0-40-0,70%. Na casca do fruto os valores do conteúdo de N variaram dentro da faixa de 0,80-3,00% , permanecendo no final do desenvolvimento na faixa de 0,80-1,00% .

O conteúdo do elemento P , na semente em desenvolvimento, variou dentro da faixa de 0,40-0,70%, permanecendo no final na faixa de 0,50-0,70%. Na casca, os valores do conteúdo de P , variaram na faixa de 0,00-0,30%, permanecendo no final na faixa de 0,01-0,12%. Portanto, os valores do conteúdo de N e P na semente foram sempre superiores aqueles da casca, e embora em quantidades diferentes, nos pareceu de comportamento muito semelhante.

Já o elemento K, na semente em desenvolvimento, apresentou valores que variaram dentro da faixa de 0,02-0,90%, permanecendo no final na faixa de 0,20-0,50%. Na casca, os valores do K variaram dentro da faixa de 0,70-2,50%, permanecendo no final, na faixa de 1,00-2,50%. Portanto, os valores da casca foram sempre superiores aqueles da semente, cujo comportamento foi contrário ao do N e P.

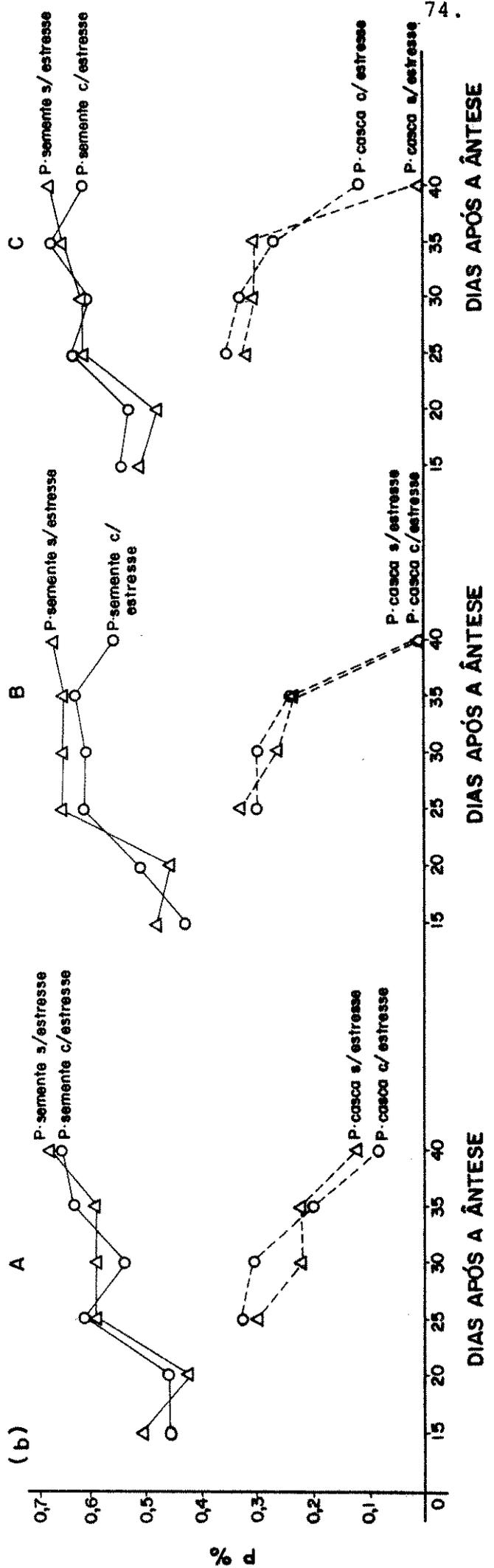
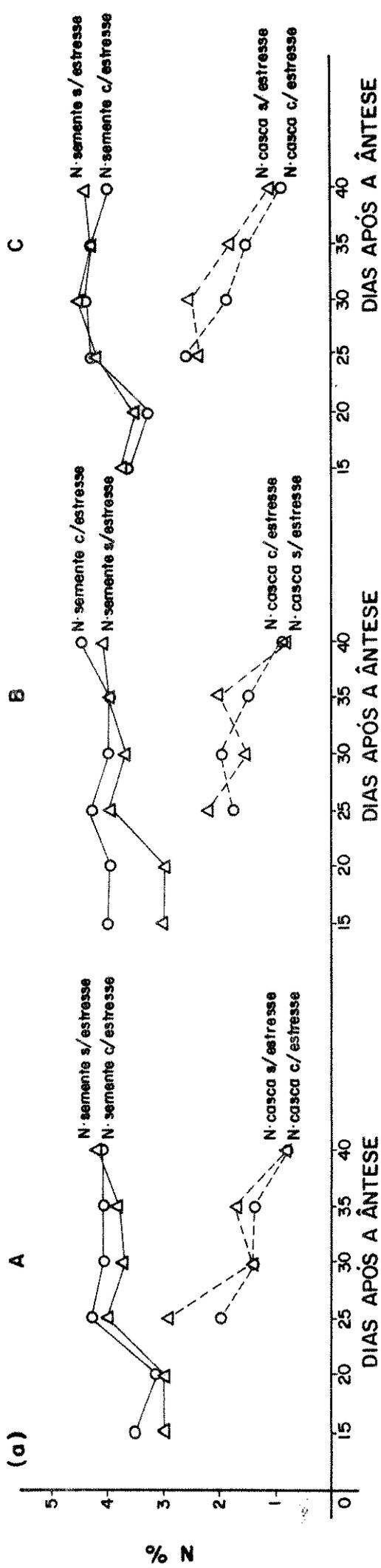
O conteúdo de Ca, na semente em desenvolvimento, apresentou valores que variaram dentro da faixa de 0,02-0,40%, permanecendo no final na faixa de 0,02-0,04%, sendo que nos tratamentos B e C, a faixa de variação foi bem baixa, não sendo superior a 0,00-0,10%. Na casca, os valores variaram dentro da faixa de 0,11-0,42%, permanecendo no final na faixa de 0,25-0,42%. Embora os valores fossem baixos, foram mais altos do que aqueles da semente.

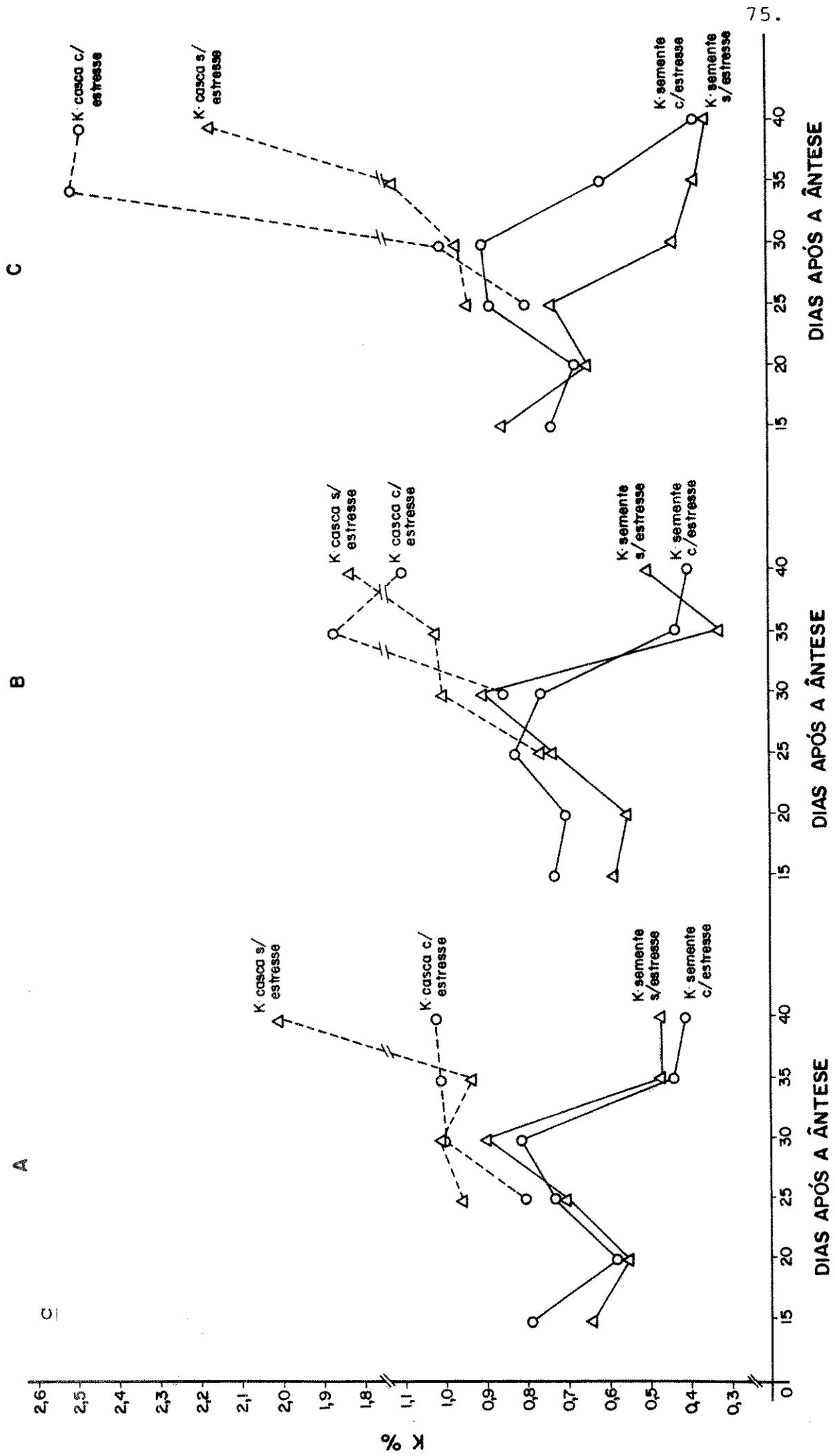
FIGURA 8 - Conteúdo de macronutrientes da parede do fruto (casca) e semente de feijão.

- (a) percentagem de N
- (b) percentagem de P
- (c) percentagem de K
- (d) percentagem de Ca
- (e) percentagem de Mg

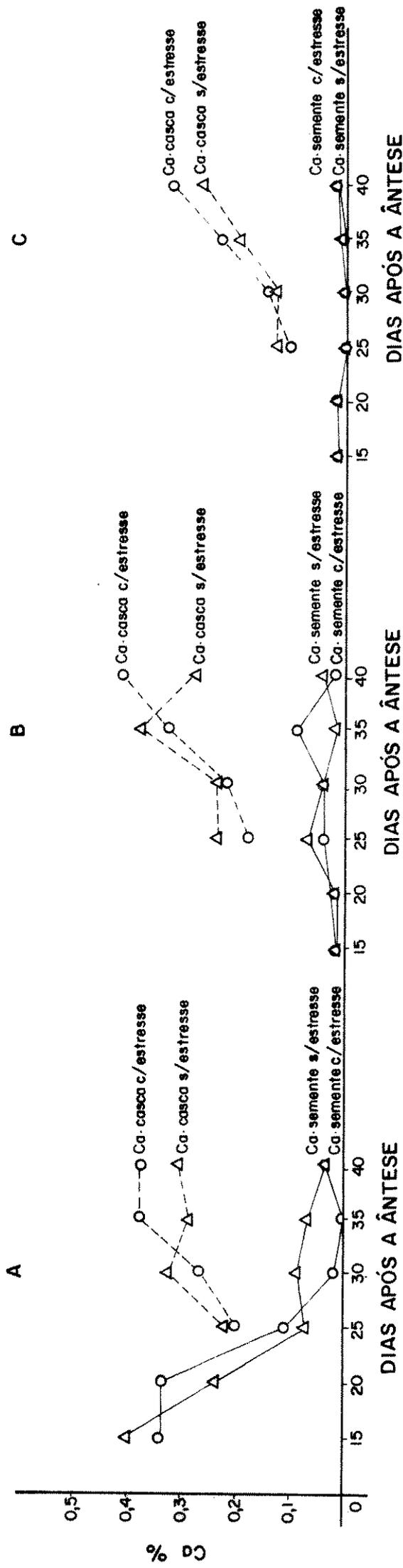
- A - fruto originado de plantas com irrigação diária
- B - fruto originado de plantas com irrigação duas vezes/semana
- C - fruto originado de plantas com irrigação uma vez/semana

—○—○—○— com estresse hídrico (semente)
—△—△—△— sem estresse hídrico (semente)
--○--○--○-- com estresse hídrico (casca)
--△--△--△-- sem estresse hídrico (casca)





(d)



(e)

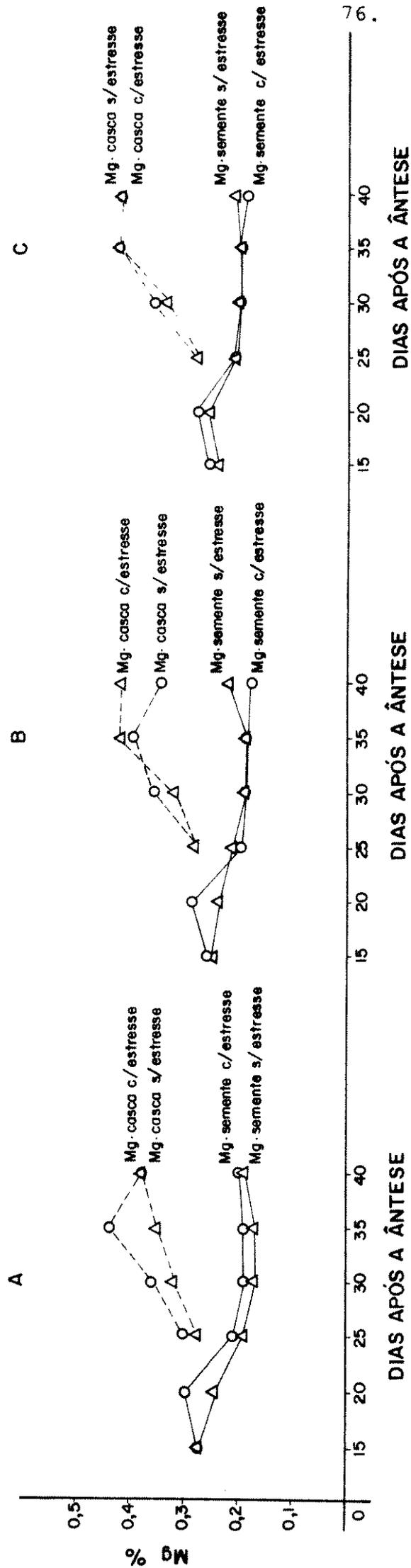


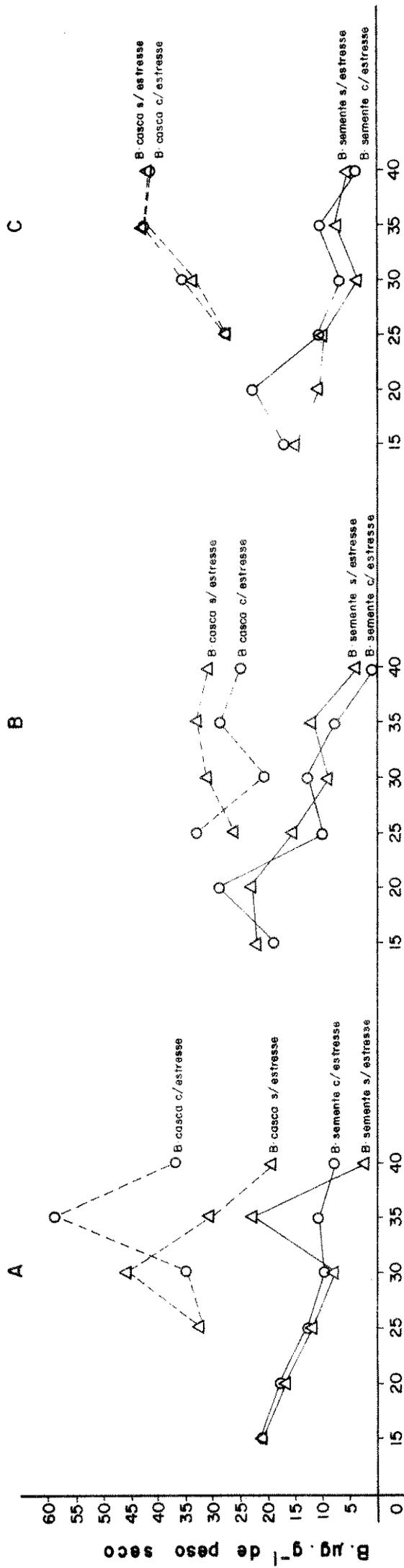
FIGURA 9 - Conteúdo de microelementos da parede do fruto (casca) e semente de feijão.

- (a) conteúdo de B, $\mu\text{g/g}$ de peso seco
- (b) conteúdo de Cu, $\mu\text{g/g}$ de peso seco
- (c) conteúdo de Mn, $\mu\text{g/g}$ de peso seco
- (d) conteúdo de Zn, $\mu\text{g/g}$ de peso seco

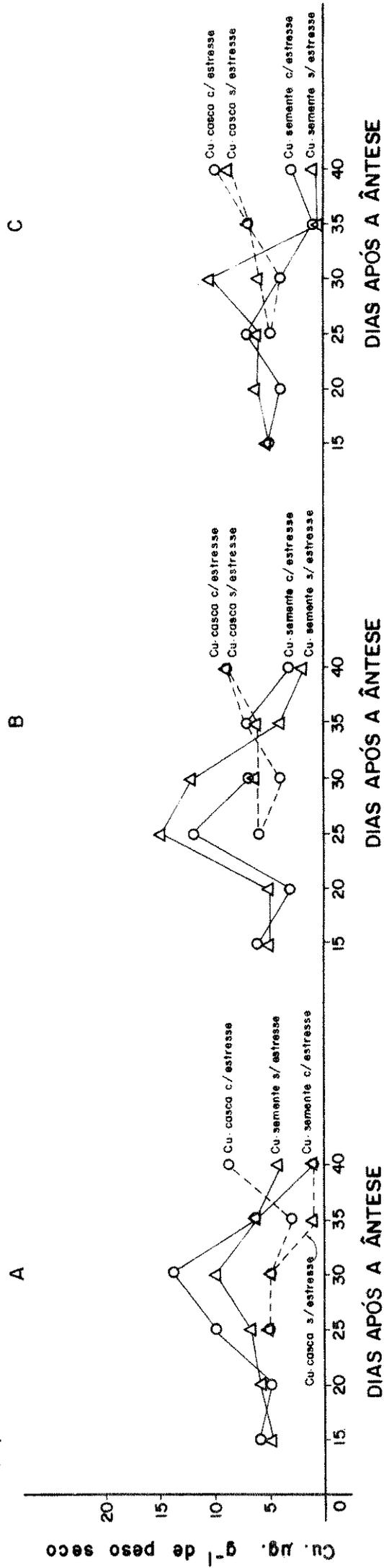
- A - fruto originado de plantas com irrigação diária
- B - fruto originado de plantas com irrigação duas vezes/semana
- C - fruto originado de plantas com irrigação uma vez/semana

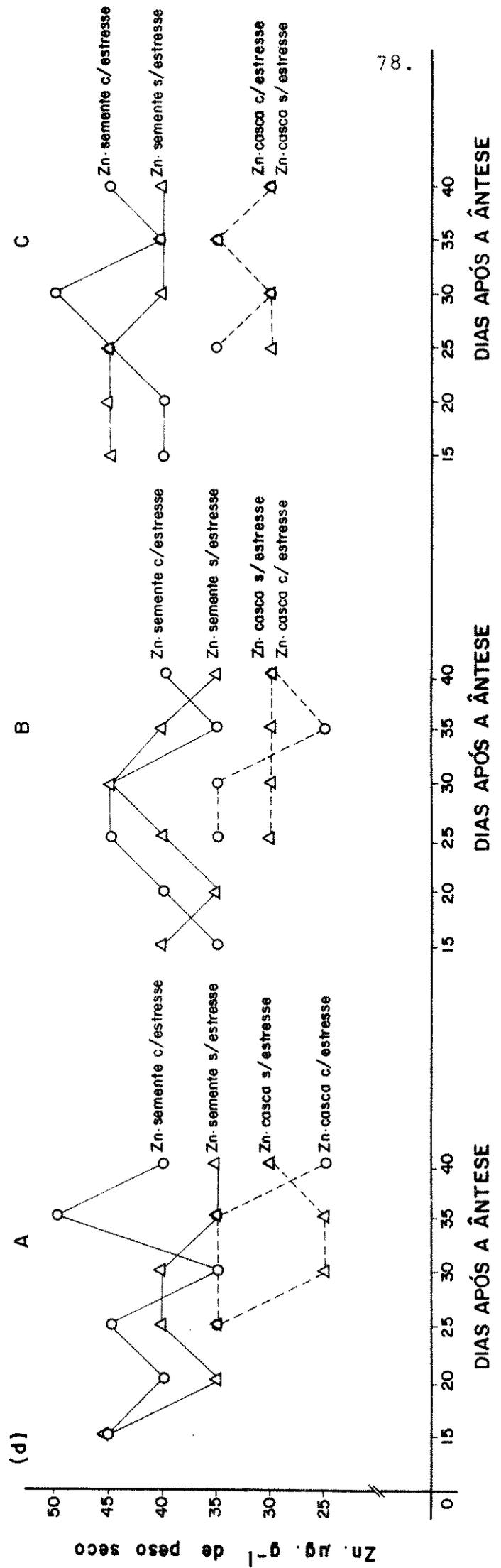
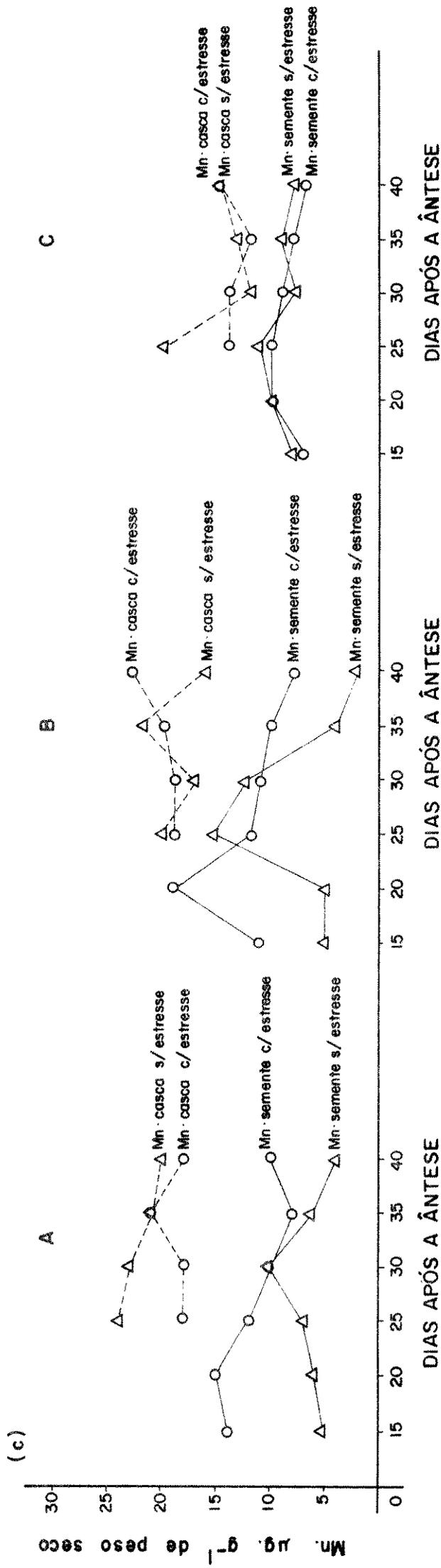
—○—○—	com estresse hídrico (semente)
—△—△—	sem estresse hídrico (semente)
---○---○---	com estresse hídrico (casca)
---△---△---	sem estresse hídrico (casca)

(a)



(b)





O conteúdo de Mg, na semente em desenvolvimento, apresentou valores que variaram dentro da faixa de 0,15-0,30%, permanecendo no final na faixa de 0,18-0,22%. Na casca, o conteúdo de Mg, variou dentro da faixa de 0,25-0,45%, permanecendo no final na mesma faixa. Embora, sendo estes valores baixos, são mais altos do que aqueles da semente.

Ca e Mg, durante o curso de desenvolvimento da parede do fruto e semente, apresentaram comportamento muito semelhante.

Nossos resultados indicam que K, Ca e Mg, se comportaram diferentemente do N e P, pois aqueles apresentaram valores menores na semente e maiores na casca e estes apresentaram valores que foram maiores na semente e menores na casca.

A variação dos microelementos (B, Cu, Mn e Zn), é mostrada nas figuras (9a, b, c, d). Verifica-se que as sementes originadas de plantas de diferentes regimes de irrigação, apresentaram durante o curso de desenvolvimento, valores que variaram diferentemente em diferentes faixas de atuação.

Para o B, Cu e Mn nas sementes, nos tratamentos estudados, os valores do conteúdo variaram dentro da faixa de 1,0-30,0 $\mu\text{g/g}$, sendo que o Cu não excedeu a 15,0 $\mu\text{g/g}$. O conteúdo de Zn, variou numa faixa maior, ou seja, de 35-50 $\mu\text{g/g}$.

Para a parede do fruto, o conteúdo de B e Mn variou dentro da faixa de 12-60 $\mu\text{g/g}$, superior aquele da semente.

Para o Cu, os valores mantiveram-se, tanto para a casca como para semente, dentro da faixa de variação de 1-15 $\mu\text{g/g}$.

O conteúdo de Zn, na casca, variou numa faixa inferior àquela da semente, ou seja de 25-35 $\mu\text{g/g}$. O que pode ser observado foi que o tratamento com estresse, tanto na parede do fruto, como na semente apresentaram comportamento diferente. Entretanto

Estas variações foram mínimas, estando os valores muito próximos parecendo que o fator água esteja envolvido apenas indiretamente. O conteúdo final apresentou diferenças mínimas, indicando também a não influência, pelo menos direta do fator água. Este estudo, serviu para mostrar que existem variações no curso de desenvolvimento do fruto de feijão e que possivelmente a água esteja fazendo parte do sistema.

5.8. Discussão da avaliação do conteúdo de macro e microelementos minerais em diferentes fases do desenvolvimento do fruto de feijão.

Os resultados referentes ao conteúdo de macro e microelementos minerais que compõem a casca e semente do fruto de feijão, durante o curso de seu desenvolvimento, mostraram, claramente, que o conteúdo dos macro e microelementos minerais que fazem parte da composição do fruto, variam com o estágio do desenvolvimento, seguindo o mesmo comportamento nos diferentes regimes de irrigação estudados.

O conteúdo dos macro e microelementos minerais que entra na composição da semente de feijão, variou com a idade de desenvolvimento, aumentando para alguns e decrescendo para outros, independente do regime de água. Os nossos resultados são consistentes com os de PECK *et al.* (1980) em feijão "snap" e de FARAH (1981b) em fava, os quais afirmam que as possíveis diferenças que ocorrem, podem ser atribuídas às características do elemento em si, e sua função de compartimentalização. Segundo FARAH (1981b), qualquer redução em minerais pode ser atribuída à atividade radicular ou caulinar, ou ambas, ou das folhas, e mesmo transpiração, quando a água é pouca. VIETS (1967) argumenta que quando aumenta a disponibilidade de certos elementos minerais, há maior cresci-

mento, o que pode reduzir a concentração deles, pois consome-se mais do que se absorve, e isto faz variar constantemente as quantidades no fruto em desenvolvimento.

A percentagem dos macro e microelementos minerais na composição do fruto de feijão, nos diferentes regimes de água estudado, foi bastante semelhante, às vezes quase iguais, mudando apenas com a idade de desenvolvimento. Isto sugere que o fator água não influenciou diretamente o percentual de cada macro ou microelemento mineral no estágio final do desenvolvimento, e que as condições impostas não foram suficientemente drásticas para alterar o sistema. Segundo FARAH (1981b), só as variações de estresses muito longas e longos períodos de estresse podem causar transtornos nas plantas de feijão.

Os trabalhos de SIMON (1977) com frutos de maçã, mostram que o escoamento de íons minerais, aumenta no pré-climatério. Também, EILAM (1965) e SACHER (1967) mostraram que qualquer escoamento aumentado é função do aumento da desorganização do tecido e membranas de frutos em senescência. As variações por nós encontradas, deferentemente entre parede e semente do fruto, no curso de seu desenvolvimento, talvez sejam em parte, devidas a este aumento em função do pré-climatério e senescência.

Também, FERGUSON e WATKINS (1981) enfocam o problema de escoamento de cátions, que está estritamente relacionado com a disponibilidade, o que provavelmente pode ter acontecido com K, Ca e Mg a partir de uma certa idade do desenvolvimento.

Os estudos de WILKINSON e PERRING (1964) mostraram mudanças na composição química de frutos de maçã durante seu desenvolvimento, sendo que os níveis de Ca eram maiores no início do desenvolvimento; com o aumento na diluição, deveria haver limitação na sua disponibilidade. Além disso, o K e Mg continuam a mover-se no

fruto em desenvolvimento.

Segundo BARLOW (1979), o P segue o mesmo padrão de assimilação cuja distribuição se associa a filotaxia, e portanto, pode ser levado a outros setores particulares que não seja a parede do fruto. MENGEL *et al.*, (1981) estudando o efeito do ion K na formação de proteína e queda de aminoácidos em grãos de trigo em desenvolvimento, mostraram que a taxa de translocação de aminoácidos dentro dos grãos era aumentada por influência do ion K e que a conversão de proteína estava indiretamente correlacionada com K.

O comportamento do Zn variou na faixa de 35-45 $\mu\text{g/g}$ oscilando ora para mais ora para menos, mostrando teores maiores em frutos de plantas estressadas do que em plantas não estressadas. DESMET e DIRKSE (1980) explicam a forte ligação do Zn com compostos orgânicos específicos nas células, tentando relacionar a variação de sua concentração com o grande número atrativo de sítios (WALKER, 1962; PRASK e PLAKE, 1971; RANDALL e BOUMA, 1973; FALCHUK *et al.*, 1976; VALLEE, 1977). Provavelmente, este mecanismo possa estar atuando de maneira a variar o conteúdo do Zn no fruto de feijão, ou outros mecanismos possam estar envolvidos, e os dados deste trabalho são ainda insuficientes para uma explicação.

O B, Cu e Mn, em nosso estudo, mostraram comportamento semelhante; seu conteúdo decresceu até o 40º dia, acompanhando o prosseguimento da fase de senescência, num mecanismo de exclusão desconhecido e independente do fator água.

MACKAY *et al.* (1966) e GUTA e KALA, (1980), observaram que o balanço de Mo e Cu é muito importante para nutrição animal quanto ao aspecto sanitário. Se o tecido tiver mais do que 10 $\mu\text{g/g}$, pode causar toxicidade por molibdênio e alta razão de Cu para Mo

teria sido a causa do rápido acúmulo de Cu nos animais que vivem em pastagens, quando a concentração de Mo foi menor do que 0,1 µg/g.

A figura 8b mostra, para semente, baixos teores de Cu , estando abaixo de 5 µg/g, cuja faixa de variação foi de 0-5 µg/g, entretanto, para a vagem (casa do fruto) os teores foram maiores, mas não excedendo valores acima de 10 µg/g. Observa-se que no período em que se acentua a senescência, os teores de Cu aumentaram. Um sistema diferente de fluxo deve existir para manter essa relação, fazendo com que Cu seja escoado para a vagem em senescência, não excluindo a possibilidade de que água esteja envolvida.

Nosso estudo sugere um aspecto muito importante, ligado à translocação da semente para a casca e desta para a semente , pois quando o conteúdo dos elementos aumentava na casca, diminuía na semente e vice-versa ou pelo menos mantinha a faixa de atuação. Embora não tenhamos avaliado o estado de macro e micro elementos minerais nas outras partes da planta, ou seja folhas , ramos e raízes, para melhor interpretação dos dados de translocação e distribuição para os frutos (vagem) e deste para semente e vice-versa, este aspecto abordado nos pareceu de grande valia para outros estudos, tais como translocação , fluxo e recirculação de elementos minerais entre fruto e semente.

5.9. Resultados da avaliação do conteúdo de proteína total nas sementes de feijão.

A variação do conteúdo de proteína total, durante o desenvolvimento da semente de feijão "Goiano precoce", figura 10, originada de plantas irrigadas diariamente, com e sem aplicação do estresse hídrico, seguiu comportamento semelhante. As semen -

tes de plantas sem estresse hídrico apresentaram valor máximo no início, aos 7 dias após a ântese, depois decrescendo até atingir o mínimo (24,8% e 18,0%), voltando a crescer até atingir, no final, o seu pico máximo (25,7%) aos 40 dias. Já as sementes de plantas com estresse hídrico, apresentaram seu valor máximo no início (28%), depois decrescendo até atingir um valor mínimo aos 15 dias (20,0%), voltando depois a crescer atingindo o 2º pico (25,9%) aos 35 dias após a ântese. Os valores do conteúdo de proteína total, de sementes originadas de plantas com estresse hídrico foram sempre superiores aqueles de sementes de plantas irrigadas diariamente, mas sem estresse hídrico. Entretanto, o percentual do conteúdo de proteína total de sementes originadas de plantas com e sem estresse hídrico foi praticamente igual (A com estresse= 25,8% e A sem estresse= 25,7%).

O conteúdo de proteína total de sementes de plantas originadas de plantas submetidas a duas irrigações por semana, figura 11, sem estresse hídrico atingiu valor máximo no início, aos 7 dias após a ântese (27,6%), decrescendo depois até o valor mínimo aos 15 dias (17,6%), e voltando a crescer até o final do desenvolvimento no 40º dia (25,5%). As plantas submetidas ao estresse hídrico apresentaram o conteúdo de proteína total na semente com valor máximo no final do desenvolvimento (28,0%). A percentagem no 7º dia após a ântese, foi de 25,8%, decrescendo a valor mínimo ao 10º dia (24,3%), depois crescendo até atingir um pico (25,8%) no 25º dia, voltando a decrescer até o 35º dia e depois crescendo novamente até atingir o valor máximo (28,0%) no 40º dia. O valor percentual de proteína total no final do desenvolvimento foi diferente para sementes originadas de plantas com estresse hídrico e sem estresse hídrico (28,0% e 25,5%) respectivamente.

FIGURA 10 - Variação do conteúdo de proteína total durante o desenvolvimento da semente de feijão, originada de plantas irrigadas diariamente, com e sem aplicação de estresse hídrico.

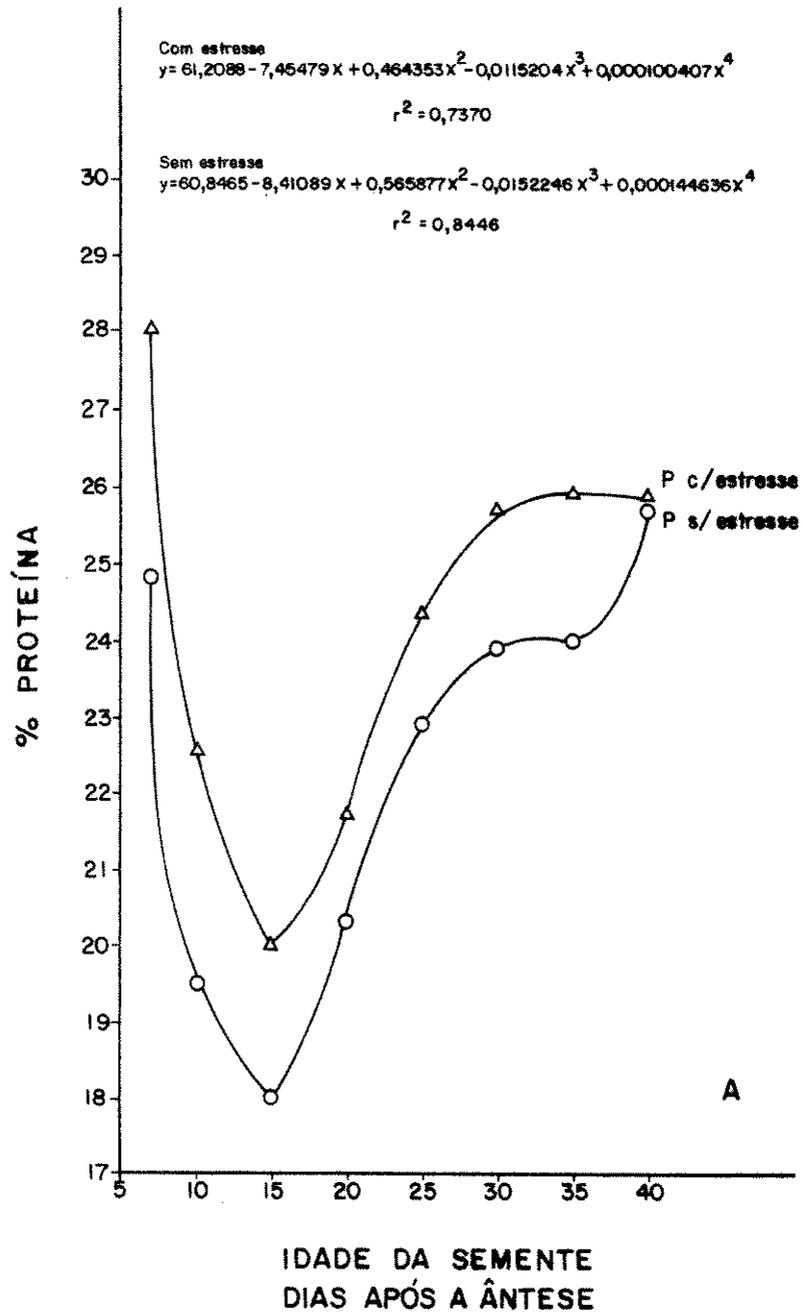


FIGURA 11 - Variação do conteúdo de proteína total durante o desenvolvimento da semente de feijão, originada de plantas irrigadas duas vezes por semana, com e sem aplicação de estresse hídrico.

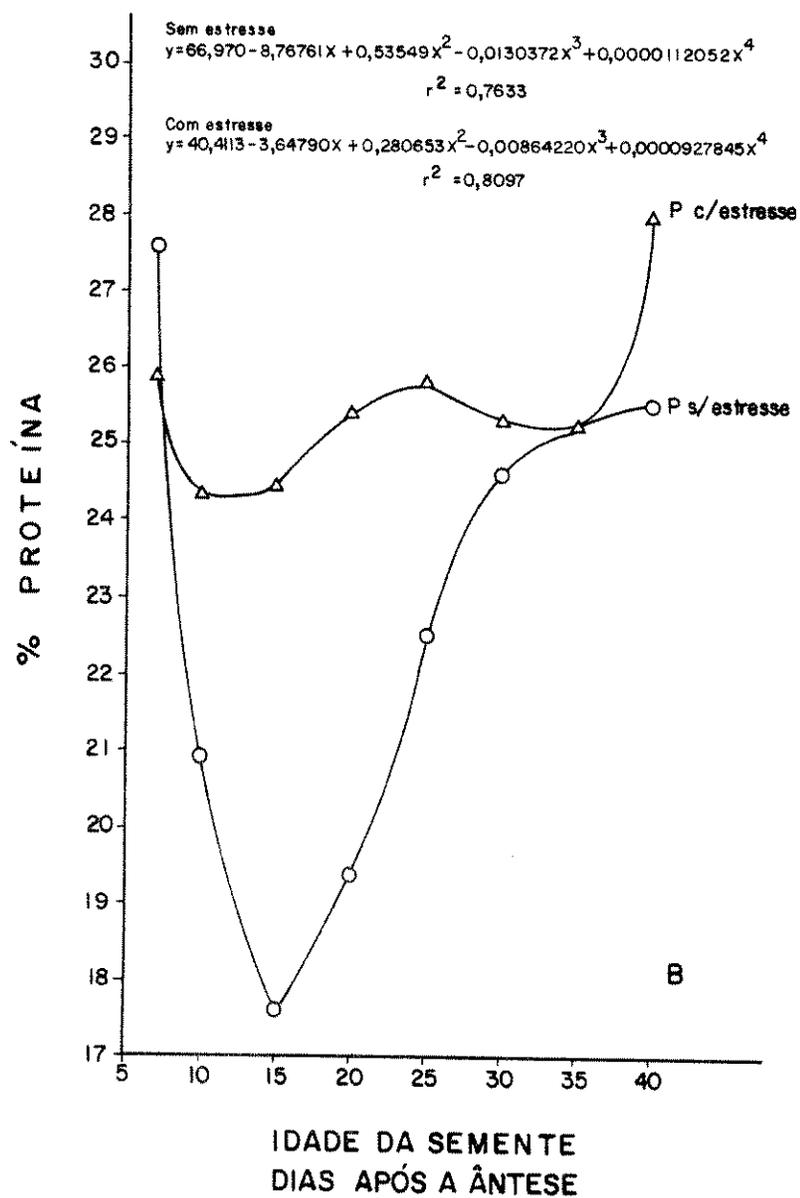
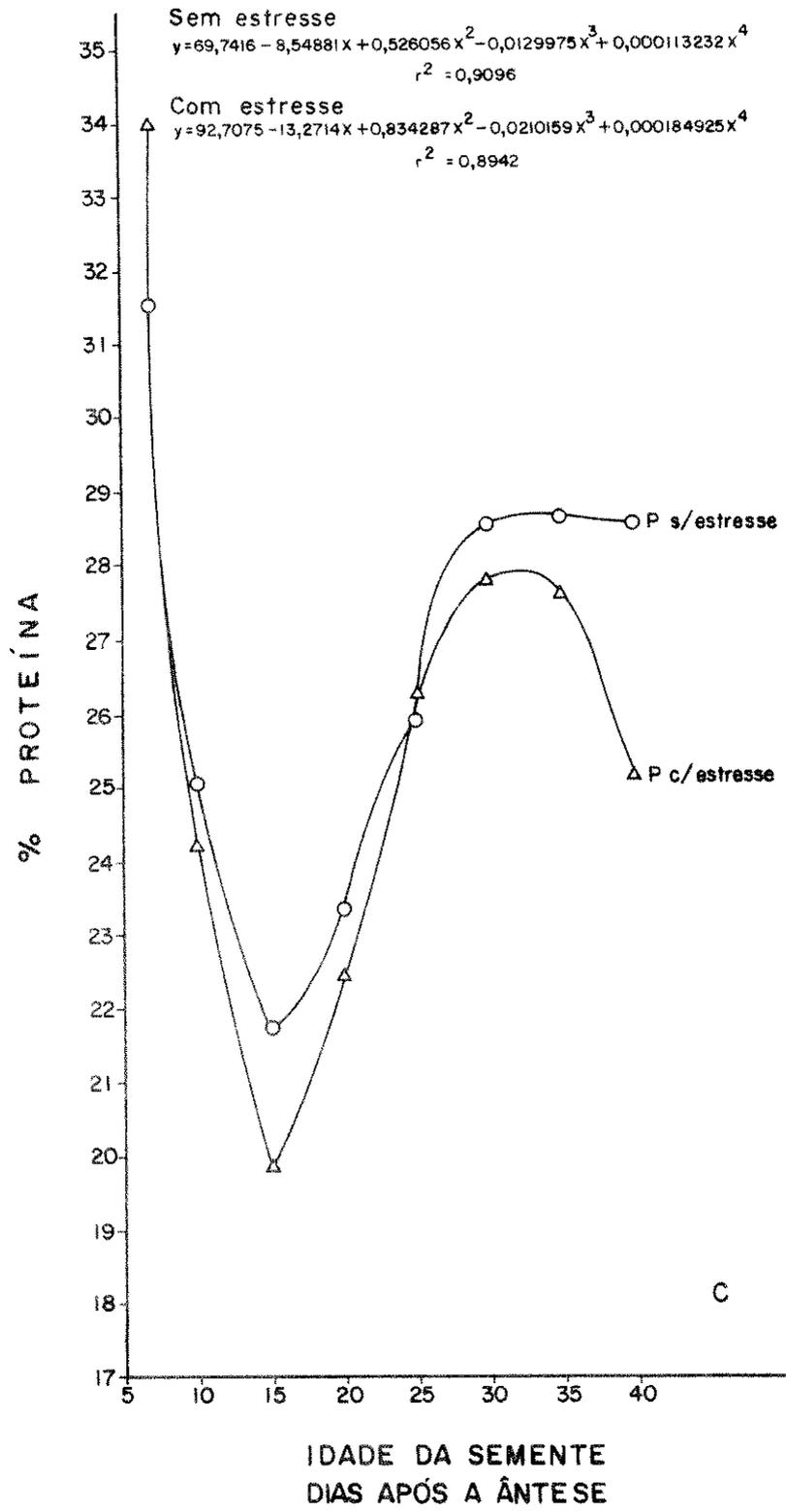


FIGURA 12 - Variação do conteúdo de proteína total durante o desenvolvimento da semente de feijão originada, de plantas irrigadas uma vez por semana, com e sem aplicação de estresse hídrico.



A variação do conteúdo de proteína total nas sementes originadas de plantas irrigadas uma vez por semana, figura 12, submetidas ao estresse hídrico, foi máximo no início aos 7 dias (34%) e a partir daí, decrescendo até o 15º dia a um valor mínimo (19,8%), passando a crescer até o final do desenvolvimento no 35º dia (28,6%). Já para as sementes originadas de plantas sem estresse hídrico, observou-se comportamento semelhante, apresentando valores menores mas muito próximos. Entretanto, as percentagens do conteúdo de proteína total, no final do desenvolvimento no 40º dia, foram diferentes entre sementes originadas de plantas com e sem estresse hídrico (25,3% e 28,5%) respectivamente.

muito semelhantes, apesar de plantas diferentes. Em *Lemna minor*, esses autores mostraram que condições adversas ou estresse hídrico produzem aumento na taxa de degradação de proteína, e que isto não parece ser devido a um aumento na atividade da enzima proteolítica solúvel. Evidências bioquímicas indicam que estresse, talvez influenciado via hormônio, afeta a permeabilidade de certas membranas, particularmente o tonoplasto. Agora, como água entra no sistema de regulação é ainda obscuro, embora existam evidências, que ácido abscísico (ABA) e N⁶-BA (6 benzil-adenina), afetam a taxa constante de degradação de proteína (COOKE *et al.*, 1979).

Nos três tratamentos estudados (A, B e C), as sementes originadas de plantas sem estresse hídrico seguiram o mesmo comportamento, havendo apenas pequenas diferenças nos níveis. No regime A, o estresse não aumentou nem diminuiu o conteúdo de proteína total no final do desenvolvimento (maturação completa). Em B, o estresse prejudicou o conteúdo de proteína total no final. Em C, o estresse foi positivo em melhorar o conteúdo de proteína total.

Outros fatores estão envolvidos e água ocupa um lugar no sistema, mas deve haver outras implicações na sequência do controle da entrada do nitrogênio e síntese de proteína no fruto de feijão, contudo aqui ainda não podemos formar um consenso, havendo portanto necessidade de explorar mais o complexo a fim de estabelecer o mecanismo de controle.

5.11. Resultados das mudanças na atividade das enzimas Alantoinase e Asparaginase, durante o desenvolvimento da semente de feijão.

A atividade da alantoinase, medida nos extratos do sobrenadante da casca, cotiledone e embrião da semente de feijão em desenvolvimento, tabela 2 e figura 13, apresentou comportamento semelhante para os cotiledones e embrião. Embora as quantidades tenham sido diferentes, os picos ocorreram no mesmo período, ou seja ao 28º dia após a ântese. Verifica-se que a atividade aumentou a partir do 14º dia até o 28º dia, espaço de 10 dias, atingindo o pico, para depois decrescer até o 34º dia, um espaço de 6 dias, quando a casca do fruto entra em senescência.

Para a casca da semente, constatou-se um período de atividade crescente desde o 14º dia até o 24º dia, onde atingiu o pico máximo. Depois deste período até o 34º dia, um espaço de 10 dias, passou a decrescer. Também, verificou-se que a atividade se concentrou num período de 8 dias, ou seja do 20º ao 28º dia, sendo que no 24º dia a atividade chegou ao máximo. Durante o período de crescimento da semente e desenvolvimento do embrião que se deu do 14º ao 24º dia, nos pareceu que a atividade da alantoinase nas três partes da semente também aumentou, embora o pico da casca ocorra 4 dias antes. As sementes, neste estágio de desenvolvimento (35 dias de idade), estavam vigorosas, de cor verde até o amarelo e atingiram o peso fresco máximo. A atividade da alantoinase mais alta por g de peso fresco, foi medida no embrião aos 28 e 34 dias após a ântese, chegando a quase dez vezes mais do que nos cotiledones (Tabela 2).

A atividade da asparaginase medida no extrato do sobrenadante da casca, cotiledone e embrião da semente em desenvolvimento, fazendo do uso de ^{14}C asparagina, Tabela 3 e figura 14,

TABELA 2 - Atividade da alantoinase nas diferentes partes da semente de feijão "Goiano precoce" durante seu desenvolvimento.

Idade (dias)	Partes da semente	Alantoinase	
		$\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$	$\mu\text{mol.parte}^{-1}.\text{h}^{-1}$
5	semente	195,02	0,260
10	semente	30,67	0,096
14	casca	0,35	0,018
	cotiledone	14,43	0,819
	embrião	21,70	0,065
20	casca	1,53	0,158
	cotiledone	27,90	4,841
	embrião	78,26	0,640
24	casca	64,35	6,096
	cotiledone	109,79	24,309
	embrião	523,53	5,900
28	casca	12,93	0,930
	cotiledone	153,27	40,146
	embrião	985,77	13,137
34	casca	25,06	0,735
	cotiledone	72,53	12,928
	embrião	827,88	5,588

FIGURA 13 - Mudanças na atividade da enzima alantoinase durante o desenvolvimento das partes da semente de feijão.

———— cotiledone
----- casca
..... embrião

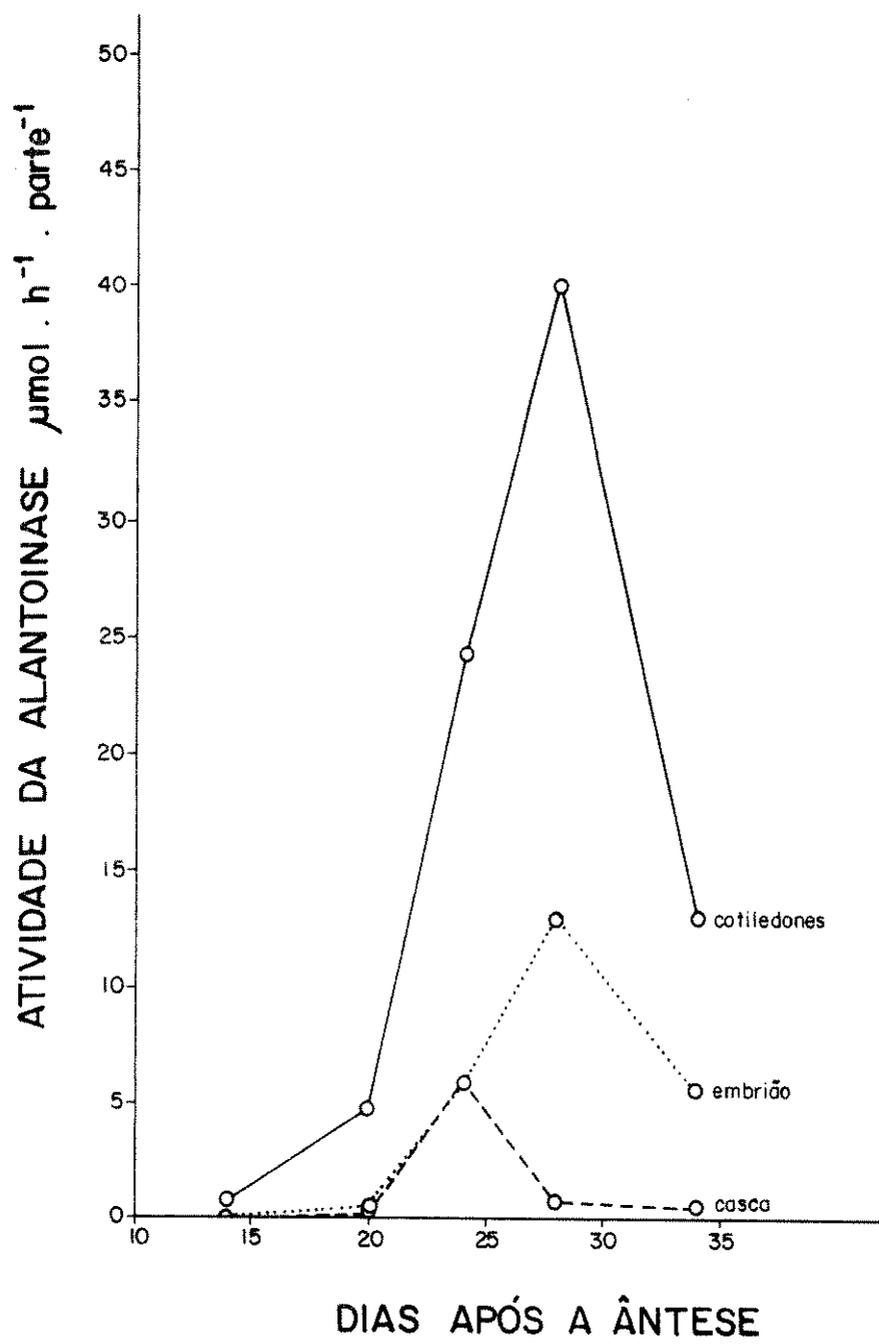
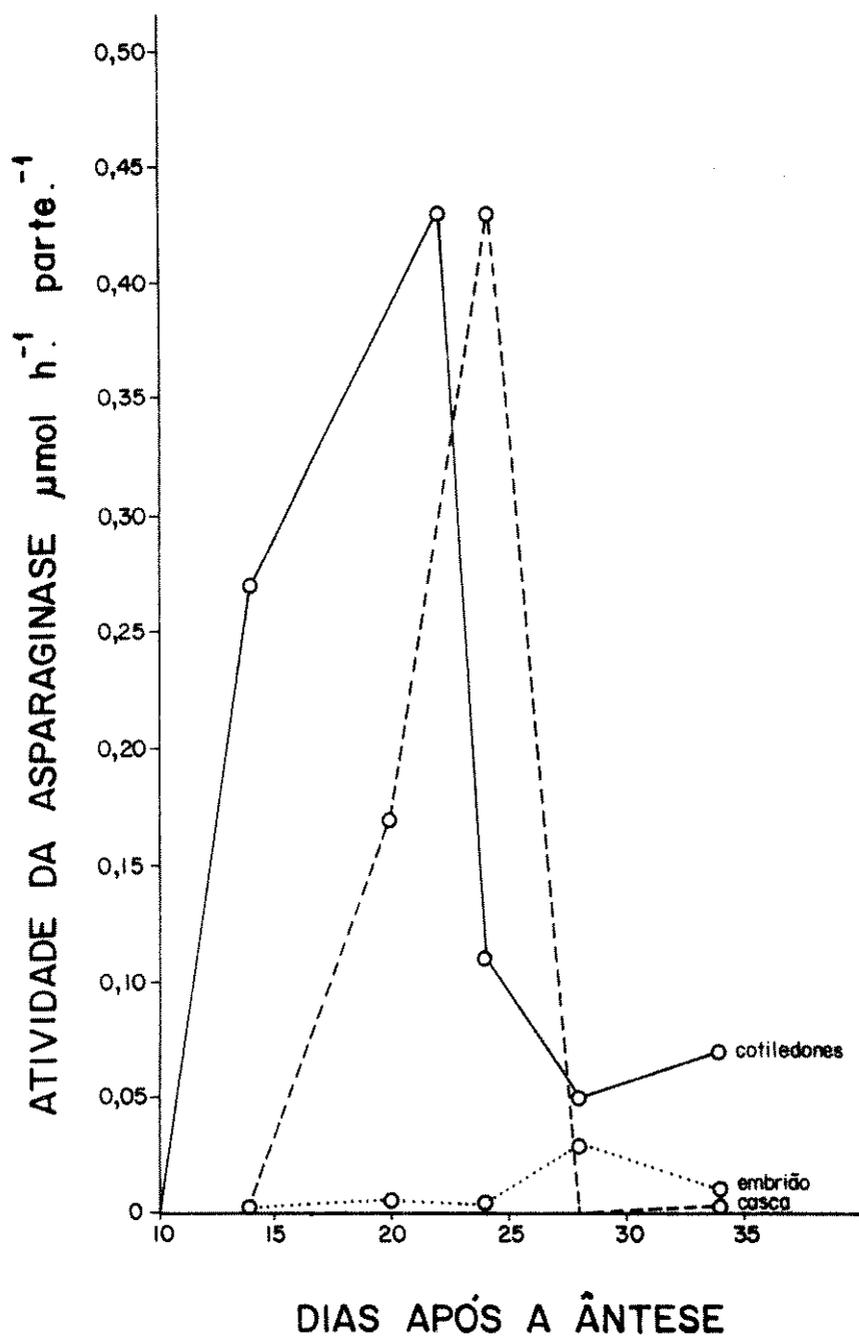


TABELA 3 - Atividade da asparaginase nas diferentes partes da semente de feijão "Goiano precoce" durante seu desenvolvimento.

Idade (dias)	Partes da semente	Asparaginase	
		$\mu\text{mol.g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$\mu\text{mol.parte}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
5	semente	0,22	0,003
10	semente	-	-
14	casca	-	-
	cotiledone	2,36	0,2700
	embrião	1,46	0,0045
20	casca	1,64	0,1700
	cotiledone	1,24	0,4300
	embrião	0,76	0,0077
24	casca	4,55	0,4300
	cotiledone	0,25	0,1100
	embrião	0,28	0,0036
28	casca	-	-
	cotiledone	0,09	0,0500
	embrião	0,68	0,0280
34	casca	0,14	0,0047
	cotiledone	0,20	0,0700
	embrião	1,48	0,0100

FIGURA 14 - Mudanças na atividade da enzima asparaginase durante o desenvolvimento das parte da semente de feijão.

———— cotiledone
----- casca
..... embrião



apresentou comportamento específico para cada parte da semente estudada nas diferentes idades. Verifica-se que o comportamento da asparaginase na casca da semente nas diferentes idades estudadas ficou restrito à faixa de 14-28 dias de idade, sendo que a partir do 14º dia aumentou até atingir um máximo de atividade ao 24º dia, daí para frente caiu atingindo a zero em 4 dias, para voltar a crescer a níveis mínimos até 34º dia. A atividade da asparaginase nos cotiledones cresce a partir do 10º dia, atingindo um pico máximo ao 20º dia para depois decrescer até 28º dia; daí até o 34º dia a atividade da asparaginase torna a crescer mas não ultrapassa $0,070 \text{ umol.h}^{-1}$. Já para o embrião há uma variação com dois picos, sendo que a atividade cresce desde 14º até o 20º dia, onde alcança o 1º pico, depois decresce até o 24º dia, para depois crescer, atingindo novamente o 2º pico ao 28º dia, de valor maior que o 1º, decrescendo posteriormente até o 34º dia. Entretanto, as atividades da asparaginase mais altas por g de peso fresco foram medidas na casca no 24º dia após a ântese, chegando quase 20 vezes mais do que nos cotiledones e quase 15 vezes mais do que no embrião (Tabela 3).

5.12. Discussão das mudanças na atividade das enzimas Alantoinase e Asparaginase, durante o desenvolvimento da semente de feijão.

Este estudo demonstrou que todas as partes da semente de feijão, cultivar "Goiano precoce" têm alguma capacidade para utilizar alantoina via ácido alantóico, através da alantoinase. A alta atividade no cotiledone corresponde a fase de mais intenso acúmulo de reservas. Seria nesta fase que o cotiledone necessita de maior quantidade de aminoácidos para síntese de proteína de reserva. Uma das fontes pode ser alantoina que, através da ação

de alantoinase é degradada para aproveitamento de seu N para síntese de aminoácidos. A coincidência dos picos dos cotiledones e embrião ao 28º dia, nos pareceu mais provável que o substancial aumento da atividade enzimática está associado com a fase de maior crescimento, pois a distribuição entre as diferentes partes, ou seja casca, embrião e cotiledones em ordem crescente é semelhante aqueles registrados em caupí (*Vigna umguiculata* L.), por HERRIDGE *et al.*, (1978) e em soja (*Glicine max* L.) por THOMAS e SCHRADER (1981 a). As atividades enzimáticas mais altas nas sementes do que em vagens (THOMAS e SCHRADER 1981a), e mais alta concentração de ureídeos nas vagens do que nas sementes, sugerem que os ureídeos se acumulam nas vagens. Podem ser parcialmente utilizados e parcialmente translocados para a semente onde são rapidamente utilizados para formar compostos de reservas, acumulando mais no cotilédones, daí termos detectado maior atividade da enzima nesta parte. Embora, no embrião também ocorra comportamento semelhante, mas em menor quantidade, mostra também que em tecidos em plena atividade de crescimento, a enzima alantoinase tem importante papel, confirmando os estudos de THOMAS e SCHRADER (1981a) que detetaram em sementes maduras atividade específica da alantoinase mais alta na porção do eixo do embrião. Uma semelhante distribuição da atividade da alantoinase dentro da semente de legume, foi registrado em germinação de semente de *Lathyrus sativus* L. por NIRMMALA e SASTRY (1975).

A atividade da alantoinase tanto em cotiledones como no embrião, apresentou comportamento semelhante, crescendo a partir do 14º dia até 28º dia onde atingiu o pico, embora os níveis fossem diferentes. No entanto, daí para frente caiu em ambos, quando iniciou o período de senescência da casca do fruto. A distribuição da atividade da alantoinase entre as diferentes partes da semente é semelhante aquelas registradas por HERRIDGE *et al.*, (1978),

e THOMAS e SCHRADER (1981b) em *Vignia e Glicine*. A semente, neste estágio de desenvolvimento, ou seja do 14º até 28º dia, onde se encontram os picos, a casca está passando por uma transformação na coloração, isto é, de verde vai clareando até atingir a cor bege no pico do 28º dia e daí para frente se intensifica, até atingir a cor amarelo forte, sempre perdendo água.

Também, verificou-se uma alta atividade para a enzima asparaginase no cotiledone de feijão a partir do 14º dia até o 20º dia após a ântese; esse período de 6 dias, corresponde a fase de mais intenso acúmulo de reservas. Esta fase, é quando o cotiledone necessita de grande quantidade de aminoácidos para síntese de proteína de reserva. O N-amino originado pela desaminação do excesso de asparagina na semente em desenvolvimento, através da asparaginase, num metabolismo bem intenso (ATKINS, *et al.*, 1975) é usado como um doador geral de N-amino para formação de aminoácidos e proteína MURRAY (1979) e LEA *et al.*, (1979) mostraram que asparagina é uma fonte de nitrogênio, capaz de suportar o crescimento limitado de cotiledones de ervilha em cultura "in vitro". Entretanto, MURRAY (1980), mostrou que o aumento e persistência da atividade de asparaginase dos cotiledones de ervilha, é uma forte evidência de sua capacidade para utilizar sua fonte de N-amino "in vivo".

O trabalho de MURRAY (1980), mostra os resultados de uma investigação sobre as mudanças de atividades e distribuição da enzima asparaginase no metabolismo do N na casca e embrião durante o desenvolvimento da semente de ervilha, enfatizando a importância central do α -cetogluturato-glutamato, ciclando na redistribuição dos grupos aminos associada com a síntese de aminoácidos e proteína de reserva.

A reutilização de NH_4^+ produzida dentro das células cotiledonares, pela ação da asparaginase, evidentemente é efetuada pela ação conjunta de glutamato-desidrogenase, glutamina-sintase e glutamina-oxoglutarato-amino-transferase ou glutamato-sintetase MURRAY (1980). Este comportamento da asparaginase nos cotiledones observado por nós é bem semelhante aquele encontrado em ervilha por SODEK *et al.*, (1980) e MURRAY e KENNEDY (1980). Segundo estes autores o carbono da asparagina é doado para a proteína e também para compostos solúveis não amino e componentes insolúveis da semente.

A asparaginase, em níveis bem mais baixos do que alantoinase, seguiu caminhos diferentes nos cotiledones de feijão, pois quando a atividade da asparaginase é alta, do 14º ao 20º dia, a alantoinase começou a aumentar a partir do 14º dia para atingir o pico só ao 28º dia, ou seja 4 dias mais tarde. Isto parece bem semelhante as observações de IRELAND e JOY (1981) e GOMES (1982).

Na casca, o comportamento da asparaginase se restringe ao período que vai só do 14º ao 20º dia, cuja atividade cresce rapidamente até o 20º dia atingindo um pico no 24º dia e daí cai rapidamente para zero ao 28º dia, confirmando os estudos realizados por GOMES (1982) em soja.

A atividade da asparaginase em tecidos jovens da casca de sementes de ervilha parece ser amplamente responsável para produzir o NH_4^+ livre, liberado no líquido do saco embrionário. MURRAY (1979 e 1980), confirma nossas observações sobre a atividade de alantoinase que aumentou do 20º ao 24º dia. Assim, as células em pleno crescimento apresentam-se turgidas, ou seja, com muito líquido e provavelmente este líquido seja tão rico quanto aquele do saco embrionário (MURRAY 1980).

Na semente de feijão constatamos o contrário, pois o 14º dia está com atividade baixa e ao 24º dia estava com atividade máxima, quando a vagem iniciava o período de senescência. Isto provavelmente porque esta cultivar de feijão é bem precoce e o desenvolvimento do fruto se dá numa fase curta em 35 dias, sendo a floração de 10 dias e a frutificação de 25 dias, num ciclo total de 60-70 dias.

Comparando com a atividade da alantoinase, verifica-se que ambas enzimas são restritas só ao período de 14 a 28 dias, embora os níveis sejam bem diferentes, confirmando nossa idéia de que esta fase corresponde à fase de acúmulo mais intenso de materiais de reserva.

Quanto à atividade específica da asparaginase no embrião, pode-se constatar um comportamento flutuante com níveis bem mais baixos ($0,0036$ a $0,4300 \text{ umol.h}^{-1}$) e dois picos, sendo um no 20º dia e o outro no 28º dia. A atividade foi atuante no período do 14º ao 34º dia, ou seja 20 dias. MURRAY (1980), sugeriu com base em suas observações que as células periféricas do embrião só admitem NH_4 em taxas muito baixas, portanto confirmando nossas observações.

O período de acumulação de matéria seca e formação de reservas específicas de algumas sementes como feijão, lupino, ervilha e soja têm na primeira semana os "pools" de açúcar e aminoácidos estabelecidos (ATKINS *et al.*, 1975; MURRAY, 1980; SODEK *et al.*, 1980), sendo que a asparagina utilizada numa forma não metabolizada da semente pode entrar ou no "pool" de N-solúvel ou por incorporação em proteína (ATKINS *et al.*, 1975).

5.13. Resultados e discussão das estruturas anatômicas do fruto e semente de feijão

As estruturas do fruto de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), serão caracterizadas e discutidas a seguir :

5.13.1. Estruturas do fruto de feijão

BC/4036
O fruto está constituído de três regiões bem distintas A, B e C (figura 15a), sendo que a região mais interna, a A, é formada de várias fileiras de células, constituindo um tecido parenquimatoso com espaços intercelulares. Suas células são de formato variado, com membranas mais ou menos delgadas, de aspecto mais claro, parecendo mais um tapete protetor da semente que se desenvolve. São radialmente alongadas e caracterizando-se por um denso conteúdo protoplasmático (DESHPANDE e BHASIN (1974)).

A região mais central, a B, formada de três ou mais camadas de células de membranas bem nítidas, espessadas, aspecto fibroso, alongadas, unidas e sem espaços, cujo conjunto se organiza formando um anel tipo ferradura, um provável tecido esclerenquimatoso no fruto maduro.

A região mais externa, a C, formada de células organizadas em várias camadas, de aspecto irregular, constituindo o tecido parenquimatoso irregular, como resultado de divisões periclinais. É nesta região, mais precisamente nas proximidades do anel de vasos que estão distribuídos vários grupos de células de tamanho menor, de aspecto mais escuro, de membranas também nítidas, constituindo o sistema de ramificação vascular do fruto, visto no sentido transversal. O grupo de células, tipo poliédricas se organiza de pontos em pontos com aparência de um rosário contornando o anel. Este sistema, visto no sentido longitudinal, apresenta-se

como uma rede pondo em comunicação as duas nervuras (sistema vascular) que contornam as bordas do fruto.

Junto a região C, está uma camada de células periféricas em contacto com o meio exterior, formada de células dispostas radialmente e de aspecto colunar, chamada de epiderme, figura(15b-E). A epiderme é constituída de uma única camada de células em toda sua extensão, exceto nas proximidades do funículo , e de espaço em espaço encontram-se pelos e estômatos (figuras 15b-pl e st) e (figuras 19C-pl e st; 20D-st e pl). Com referência à epiderme, ela tem sido referida por CORNER, (1951) e ESAU (1953) como uma camada de células em paliças de altura reduzida, de consistência firme , como resultado da deposição de lignina (DESHPANDE e BHASIN(1974).

Nas regiões F1 e F2 (figuras 15a, 19C, D-sv e 22C e D-sv) o sistema vascular dá continuação desde o pedicelo até o ápice do fruto. Na região F3 (figuras 15a, 19B,C e D) próxima a união dos carpelos também existe um sistema vascular, completando assim todo o sistema vascular que percorre o fruto, formando o que se chama vulgarmente de nervura central e periférica da casca do fruto. Mais especificamente, o grupo de células está distribuído organizadamente, onde se encontram células poliédricas, pequenas e grandes, de membranas bem espessadas, bem evidentes, de aspecto de raias, chamadas de traqueídeos. Estes traqueídeos se alternam com outro grupo de células de tamanho bem menor, também poliédricas , com denso conteúdo protoplasmático, que se dirige mais para a parte superior, constituindo o floema e xilema. Para completar esta região de aspecto de meia lua, associa-se outro tipo de células parenquimatosas e fibrosas, conferindo a esta região maior consistência. Estas observações também são coincidentes com as de DOUTT (1932); DESHPANDE e BHASIN (1974); WATT (1974 e SINHA *et al.*, (1978).

Quanto ao aspecto longitudinal, nosso estudo mostra através dos esquemas obtidos por meio de câmara clara, figuras 16a e b, e fotomicrografias (figuras 20AB e C-sv), regiões bem distintas, ou seja L, M, N 0, M1 e M2 e como os tecidos estão organizados. Verifica-se que a região L é uma rede de vasos distribuídos por toda a parede do fruto, concentrando-se mais na região entre os espaços onde se desenvolvem as sementes. Nesta rede estão associados vasos (xilema e floema), traqueídeos, células parenquimatosas e esclerenquimatosas preenchendo os espaços. Mais para a periferia encontram-se as regiões M1 e M2, ou seja, as nervuras do fruto, onde se encontram também vasos (xilema e floema), células fibrosas e parenquimáticas.

A região 0, se apresenta mais organizada, constituída de células mais unidas, poliédricas e de bordos ponteagudos, figura 16b-0 e fotomicrografias 20C.

Nestas ilustrações mostramos os aspectos, em detalhes, de como os tecidos estão organizados na parede do fruto de feijão tanto no sentido longitudinal como no transversal.

5.13.2. Estrutura da semente de feijão

A semente é conectada à parede do fruto, através do funículo, região G, da figura 17a-G e fotomicrografias 19A, 21A e 22A, por meio de um único ponto de contacto, onde passam os sistemas de vasos, formados por um conjunto de células parenquimatosas e fibrosas que reforçam o sistema de comunicação. Verifica-se que entre a região A e D1 da semente que se desenvolve, figuras 15a, 19A e 22A, a existência de um espaço vago e separado da casca da semente por completo.

Os esquemas representativos da semente, obtidos através de câmara clara e fotomicrografias (figuras 17a, 17b-I e 21D) , mostram diferentes regiões, ou seja, G,H,I, J, J₁ e K, que passaremos a caracteriza-las :

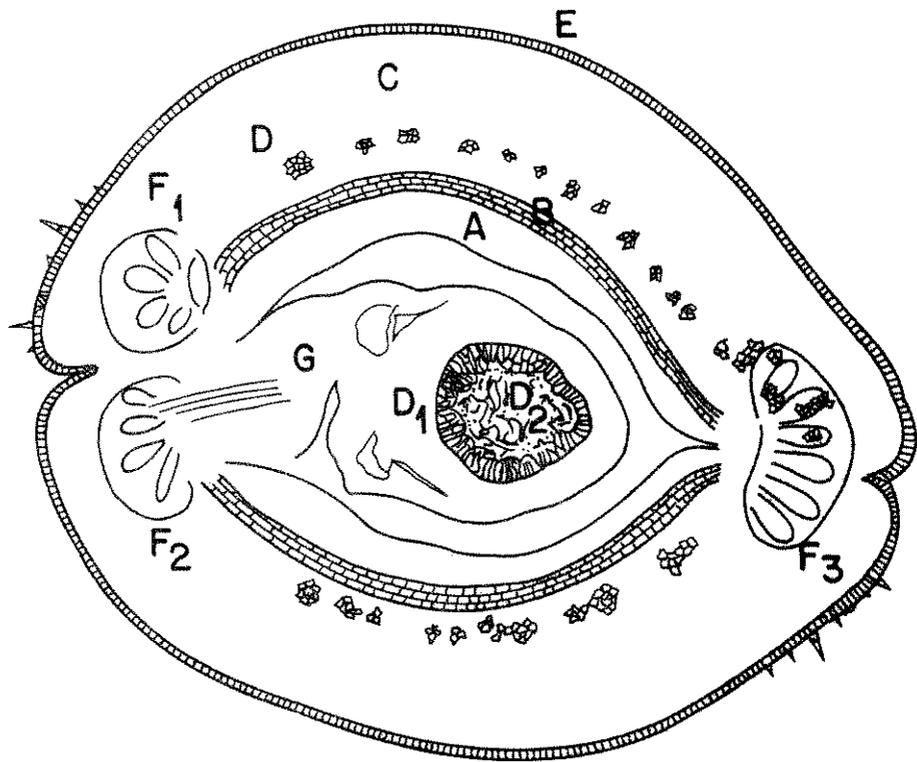
Na região I, as camadas de células a₁ e a₂ , são respectivamente originadas do integumento externo e interno, e que segundo DESHPANDE e BHASIN (1974), na semente madura, a camada do integumento interno sofre colapso e a camada do integumento externo é que forma a testa. A camada a₁ , localiza-se mais para o interior, em contacto com o vago central na semente, sendo constituída de células colunares, unidas, maiores e mais regulares . A camada a₂, que se localiza mais externamente, também é constituída de células colunares, que dependendo do local pode ser maior ou menor do que as da camada a₁, e regulares e irregulares. A camada a₃ , entre a₁ e a₂, é constituída de várias fileiras de células de diferentes formatos, espaçadas, formando o parênquima irregular, figuras 21B e D. Cada uma dessas camadas de células tipo paliça (a₁ e a₂), fica com suas paredes espessadas como resultado da deposição de lignina em grande quantidade, modificando bem o aspecto no estágio maduro (ESAU, 1953). O lúmen fica mais reduzido, ou seja, mais estreito na parte externa e mais largo na parte interna, como se fosse uma taça e em contacto com a hipoderme que se assemelha a ampulhetas (DESHPANDE e BHASIN (1974).

SEN e GHOSH (1959) e SEN e JANA (1963) mostraram que a casca da semente contém uma camada colunar com células de formato irregular e regular e que ambos os tipos foram observados tanto em casca de sementes imaturas como maduras, exceto na região do hilo. Entre essas camadas, existe outra que é chamada de residual e permanece após modificações parenquimatosas, como fibras apertadas , parecendo ser as mesmas descritas por MISRA e SAHU (1970).

Na região central da semente existe um vago, principalmente neste início de desenvolvimento, até aproximadamente 8 dias após a ântese, que se apresenta cheio de líquido, portanto um endosperma líquido passageiro, figura 21A.

Na região K, figuras 21A e C, verifica-se o início do desenvolvimento do embrião, organizado de células poliédricas, de protoplasma bem denso e de núcleo bem evidente, numa região que DESHPANDE e BHASIN (1974) chamou de porção nuclear livre do endosperma, que é usado para o desenvolvimento do embrião, desaparecendo nas sementes maduras (figura 22B).

Observando detalhadamente a região D₂, figuras 18, 22A e B e 22B, verificam-se os núcleos livres no meio líquido. Em fruto maduro, ou seja 12 dias após a ântese, o líquido desaparece. O embrião parece seguir o tipo das Onagraceas e, através de divisões transversais e verticais a partir de células tétrades, dependendo do plano de orientação, se enquadra no "Sistema de Classificação de SOUÉGÉS", no primeiro período da série A₂ e B₂ (SOUÉGÉS, 1950).



0 1,0 2,0 mm

FIGURA 15b - Aspecto específico de cada região estudada A,B,C,D e E, mostrando a organização celular nas diferentes camadas em secção transversal de fruto de feijão "Goiano precoce" aos 5 dias após a ântese.

e pi.ex.- epiderme externa

cam.in.- camada interna

par. - parênquima

sv. - sistema de vasos

va. - vasos anelados

pl. - pelos

cam.an.- camada anelar

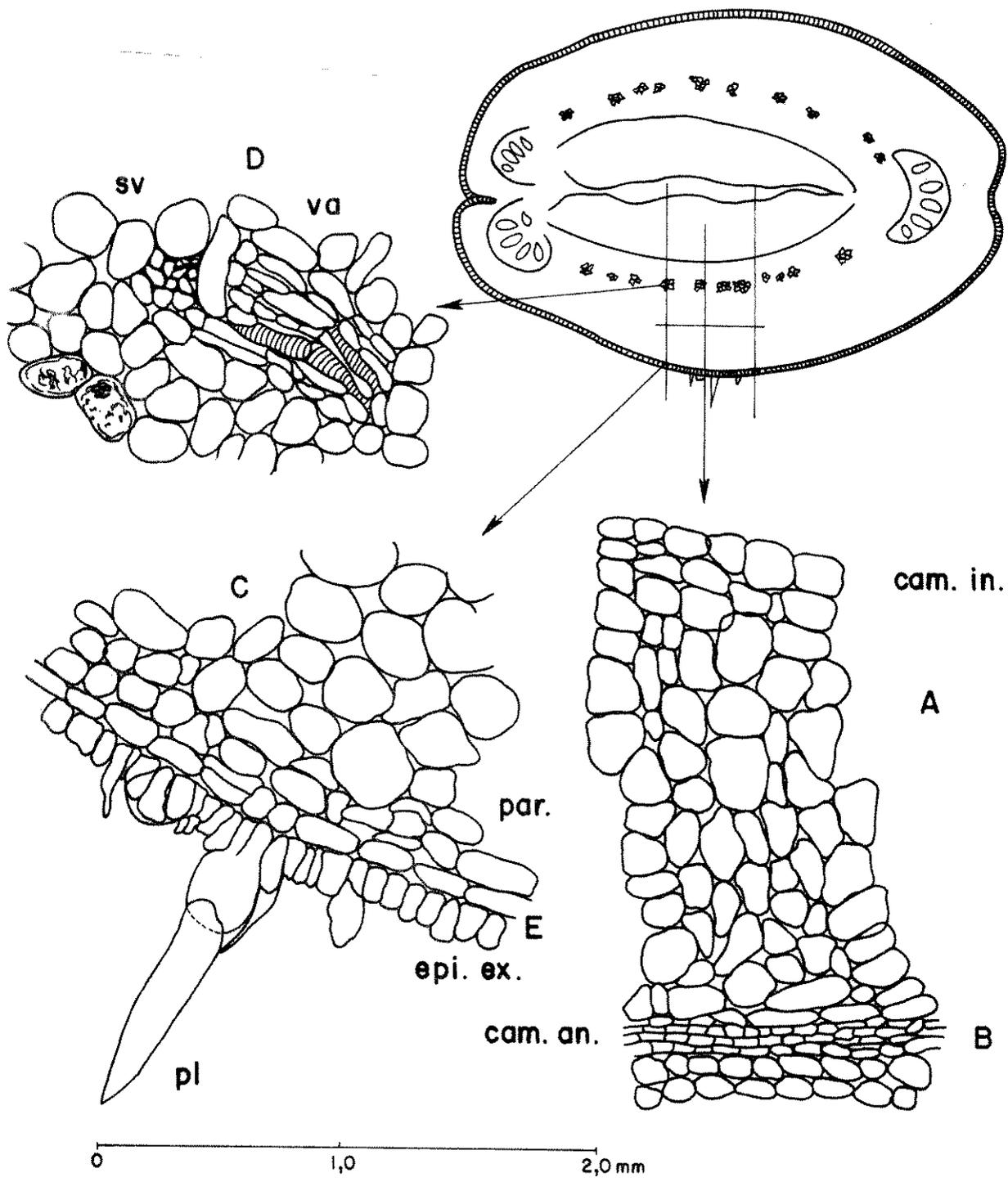


FIGURA 16a - Secção longitudinal do fruto de feijão "Goiano precoce" com 5 dias após a ântese, obtida através de camara clara, mostrando as diferentes regiões estudadas.

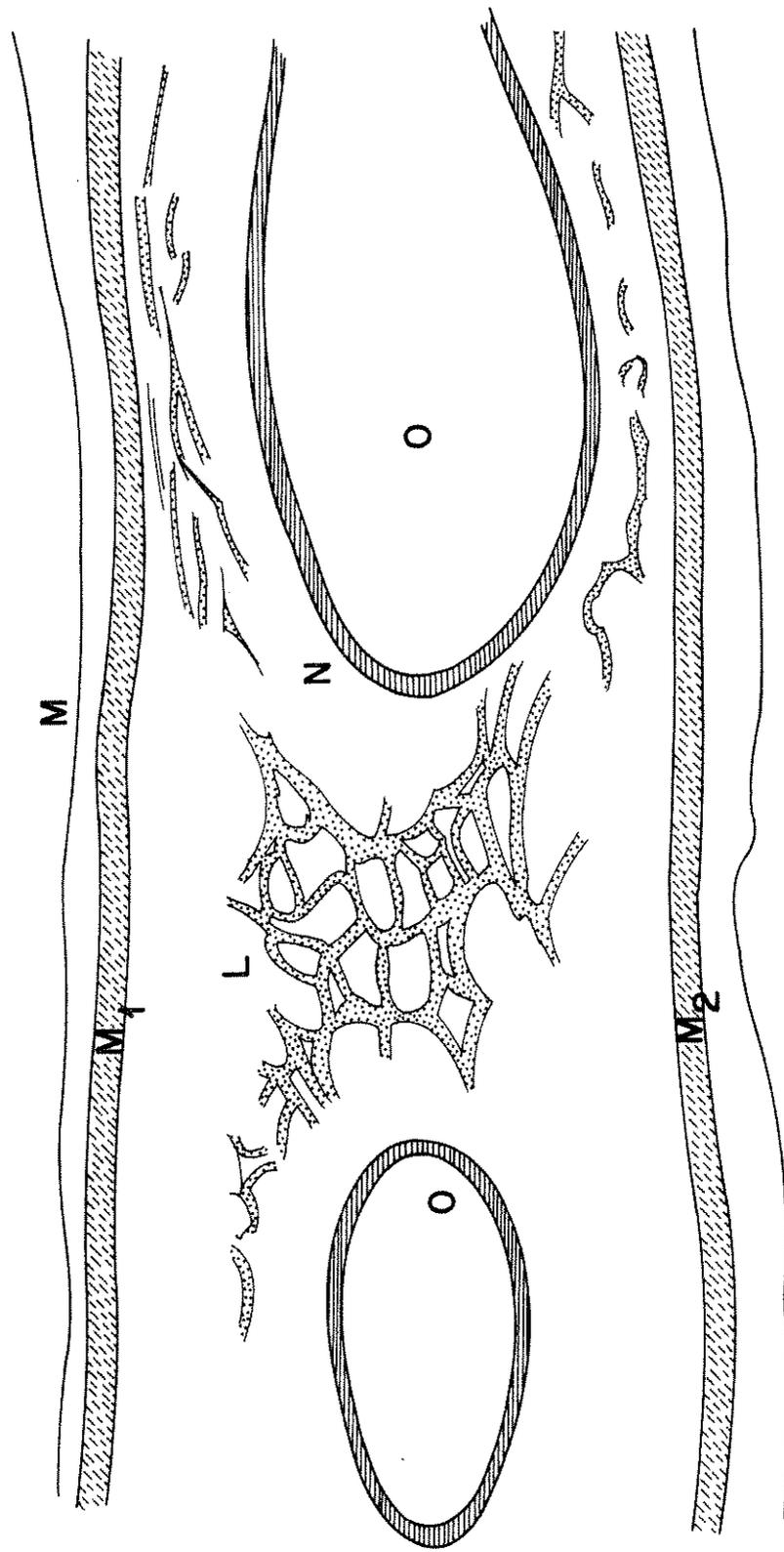
L - Sistema de ramificação dos vasos

M - Epiderme

M₁ e M₂ - Sistema de vasos (lenhosos, liberiano e fibras esclerenquimáticas)

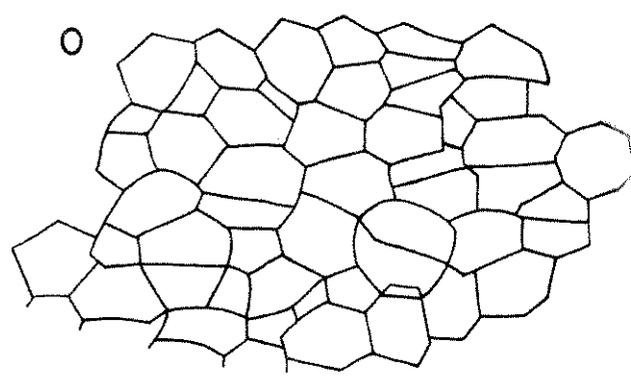
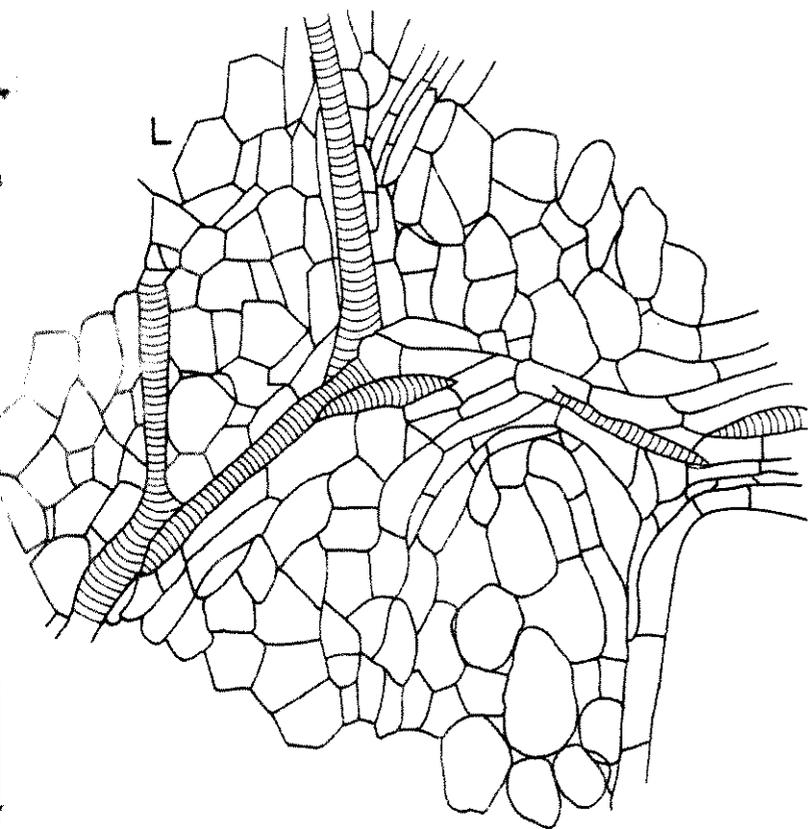
N - Tecido parenquimatoso

O - Espaço reservado à semente



0 1,0 2,0 mm

FIGURA 16b - Aspecto específico de cada região estudada L, M₁₋₂,
N e O , mostrando a organização celular nas diferen-
tes camadas, secção longitudinal.



0 1,0 2,0 mm

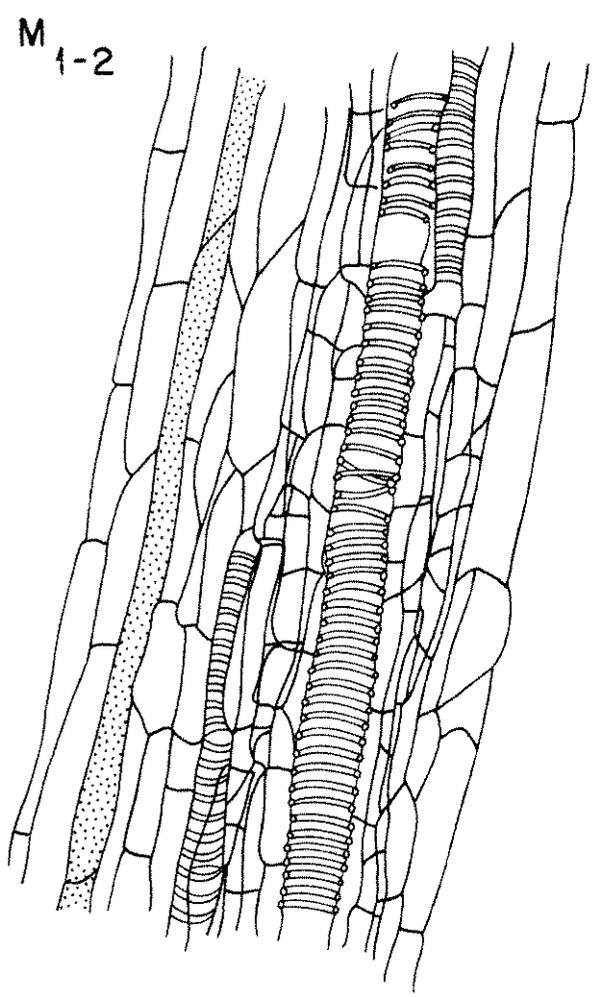
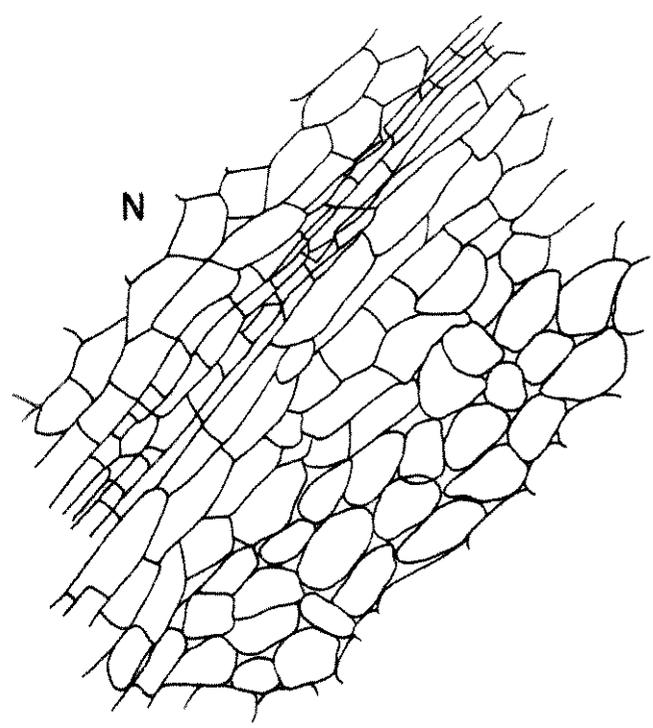


FIGURA 17a - Secção longitudinal de semente de feijão "Goiano precoce", mostrando as diferentes regiões.

G - Funículo

H - Epiderme (testa)

I - Integumento constituído de várias camadas de células.

J - Embrião desenvolvendo

J₁ - Endosperma líquido

K - Corpo e o embrião

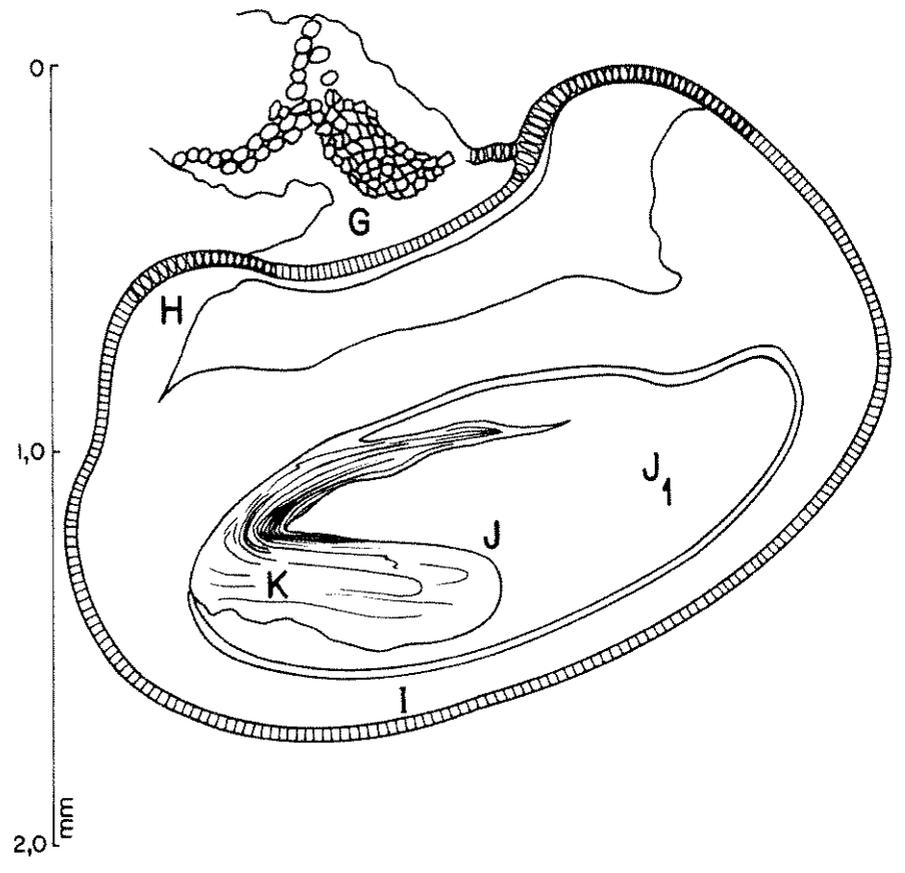


FIGURA 15a - Aspecto geral das regiões do fruto de feijão "Goiano precoce", mostrando a localização das diferentes estruturas anatômicas, obtidas através de câmara clara, secção transversal.

- A - Camada interna, constituída de células parenquimatosas.
- B - Camada central, constituída de células esclerenquimatosas ou camada fibrosa.
- C - Camada externa, constituída de células parenquimatosas.
- D₁ - Tegumento externo e interno da semente
- D₂ - Endosperma líquido
- E - Epiderme com pelos e estômatos
- F₁, F₂ e F₃ - Sistema de vasos lenhosos e liberianos.

FIGURA 17b - Aspecto específico de cada região estudada H, I e J, mostrando a organização celular nas diferentes camadas, secção longitudinal.

H - região constituída da epiderme (células colunares - cel. col.) e parênquima - par. e traqueídeos- tr.

I - região parenquimatosa constituída de três camadas :

a₁ - camada interna - células colunares
a₂ - camada externa - { células irregulares
 e
a₃ - camada mediana { células colunares
 ou central

J - Células poliédricas do ápice do embrião

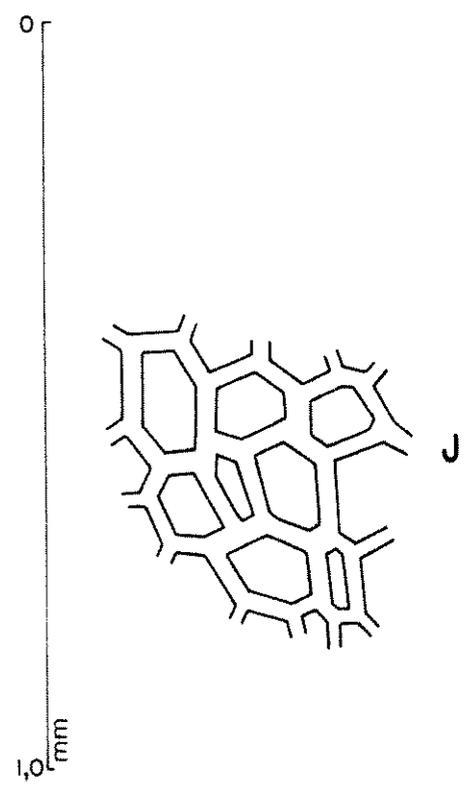
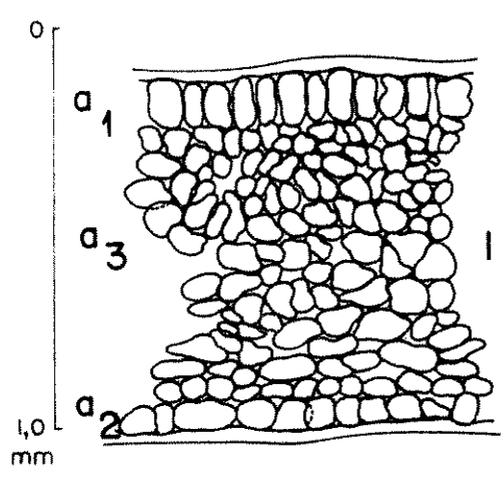
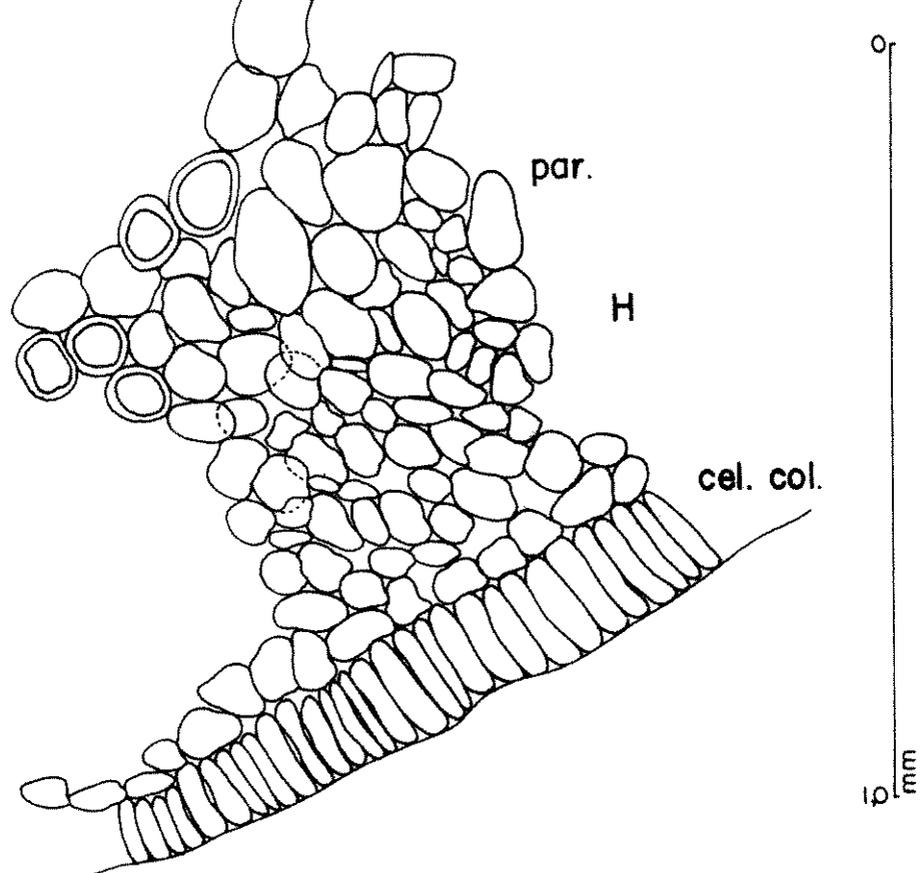
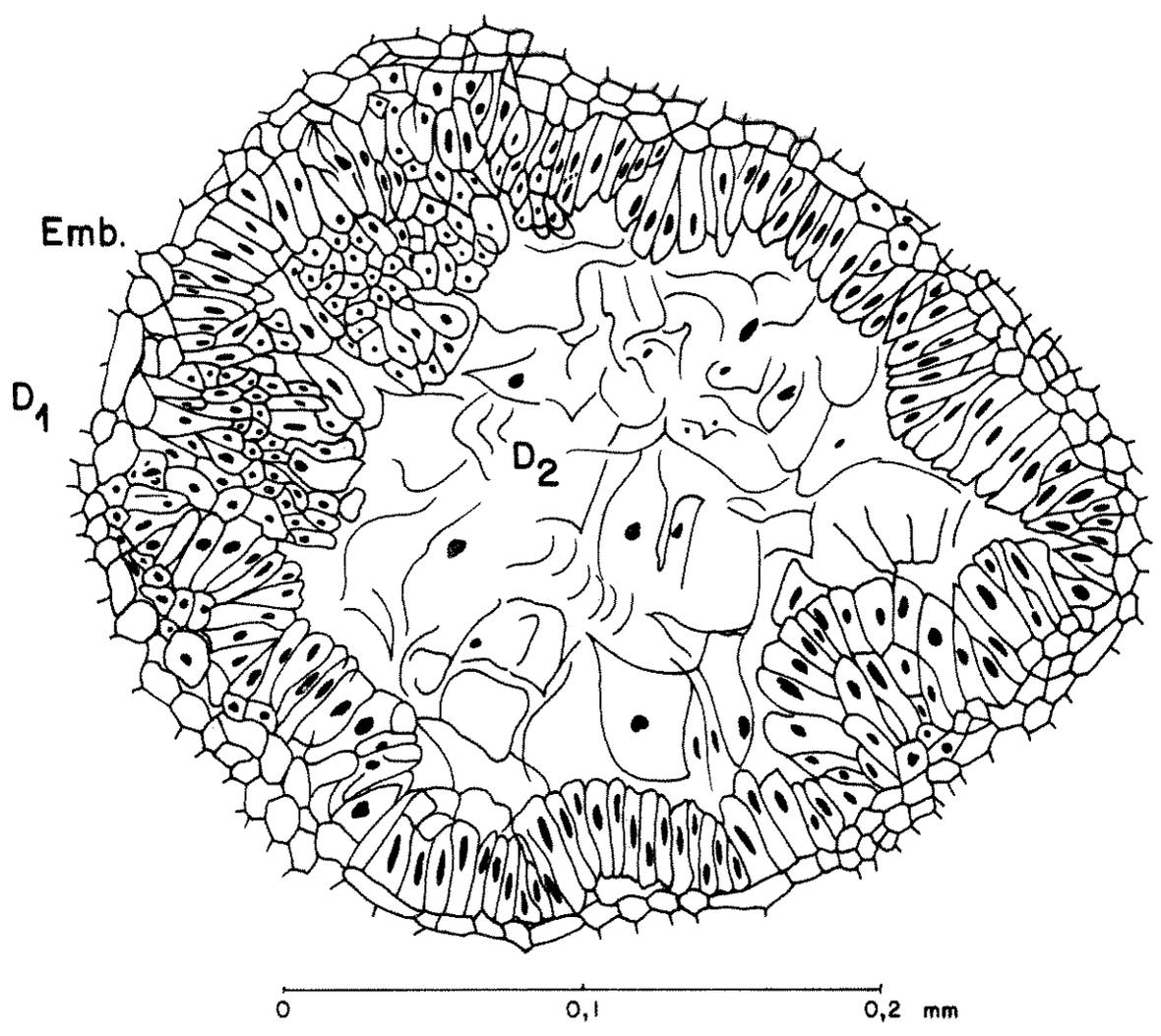


FIGURA 18 - Secção transversal das regiões D_1 e D_2 , da parte central da semente de feijão "Goiano precoce" com 5 dias após a ântese, mostrando, bem no centro, células nucleadas livres sobrenadando o líquido.
Emb. - embrião iniciando sua formação.



- FIGURA 19 - Fotomicrografias . Secção transversal do fruto de feijão "Goiano precoce", com 5 dias após a ântese:
- A - Aspecto geral mostrando as diferentes camadas de casca do fruto e da semente, 40x.
 - B - Aspecto geral mostrando somente a região da casca do fruto entre os locais de crescimento das sementes, 48x.
 - C - Aspecto geral da nervura principal do fruto, sistemas de vasos, 120x.
 - D - Aspecto em detalhe do sistema de vasos, xilema , floema e traqueídeos, 200 x.

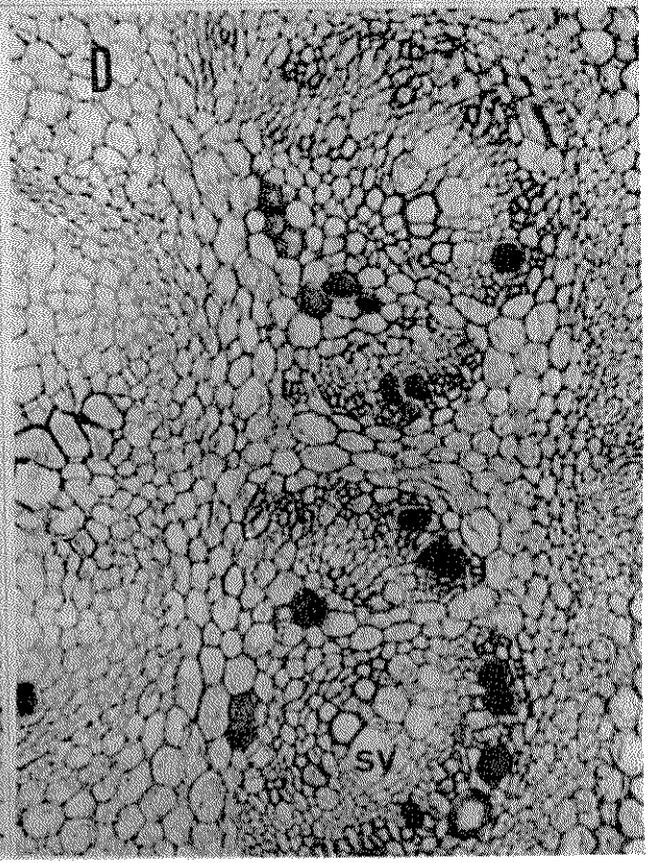
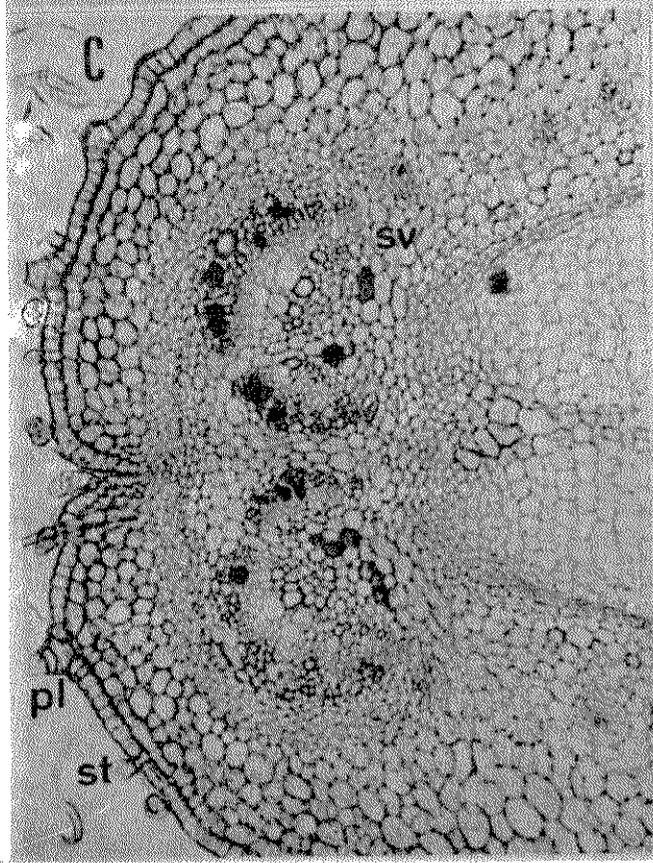
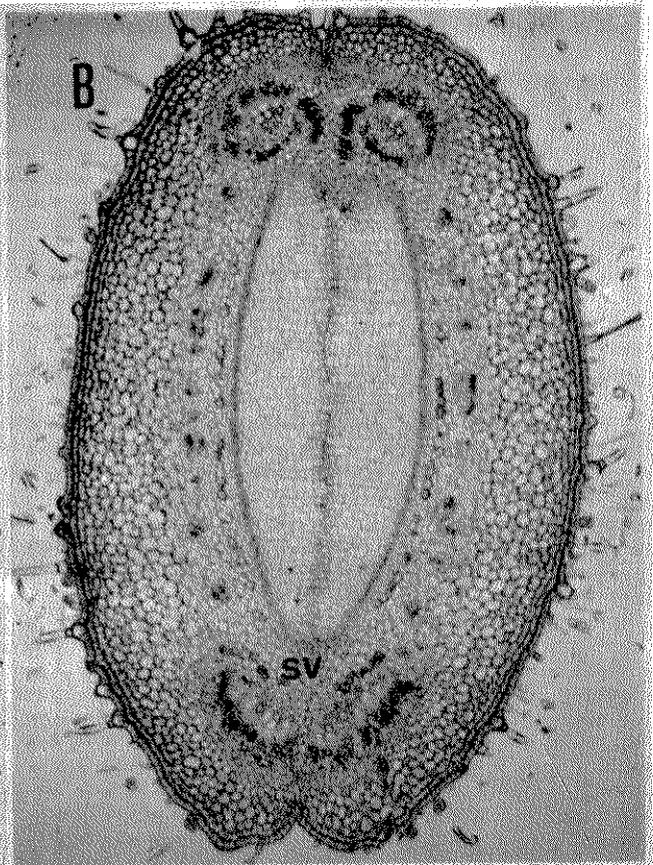


FIGURA 20 - Fotomicrografias. Secção longitudinal do fruto de feijão "Goiano precoce" com 5 dias após a ântese:

- A - Aspecto geral em secção longitudinal, mostrando as regiões onde se desenvolvem as sementes e a disposição do sistema vascular dentro da casca do fruto, 36x.
- B - Aspecto somente do sistema vascular na região entre os dois espaços onde se desenvolvem as sementes, e também o tecido de enchimento de toda a casca, 96x.
- C - Aspecto longitudinal da nervura que contorna o fruto, contendo os vasos anelados, traqueídeos, floema, fibras esclerenquimatosas e parênquima de enchimento, 82x.
- D - Aspecto da casca do fruto mostrando dois tipos de pelos, reto e em gancho, estômato, epiderme e tecido parenquimatoso, 82x.

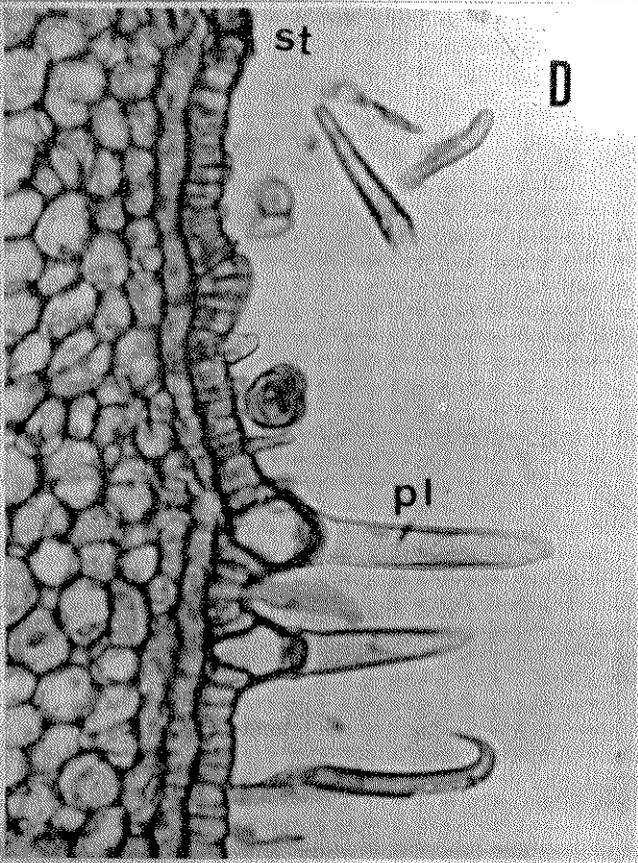
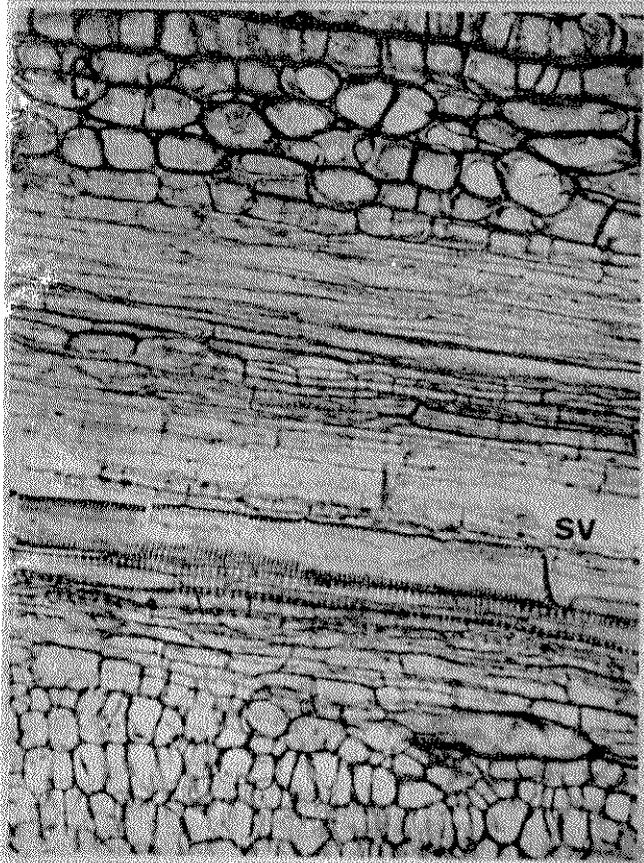
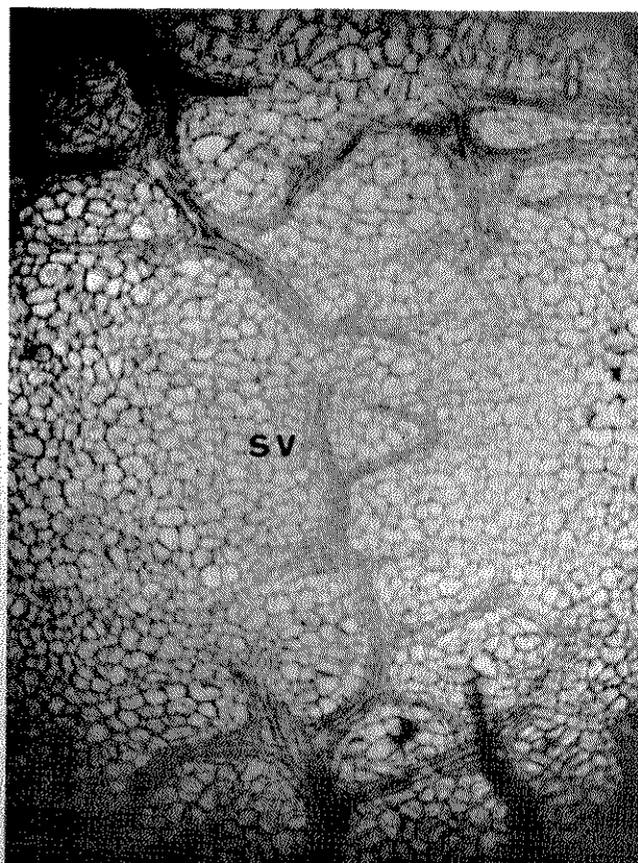


FIGURA 21 - Fotomicrografias. Secção transversal da semente de feijão "Goiano precoce" em desenvolvimento aos 5 dias após a ântese :

- A - Aspecto geral, mostrando o hilo, camadas interna, mediana e externa, embrião se desenvolvendo e a massa líquida no espaço interno da semente, 40x.
- B - Aspecto longitudinal da camada externa, mostrando as células tipo colunares, 600x.
- C - Aspecto longitudinal, mostrando o embrião em desenvolvimento, ainda no meio líquido, 190x.
- D - Aspecto longitudinal, mostrando as 3 camadas em desenvolvimento, sendo que a camada externa apresenta células colunares de tamanho menor e a camada interna, células colunares maiores e a camada mediana com células tipo parenquimatosas , 480 x.

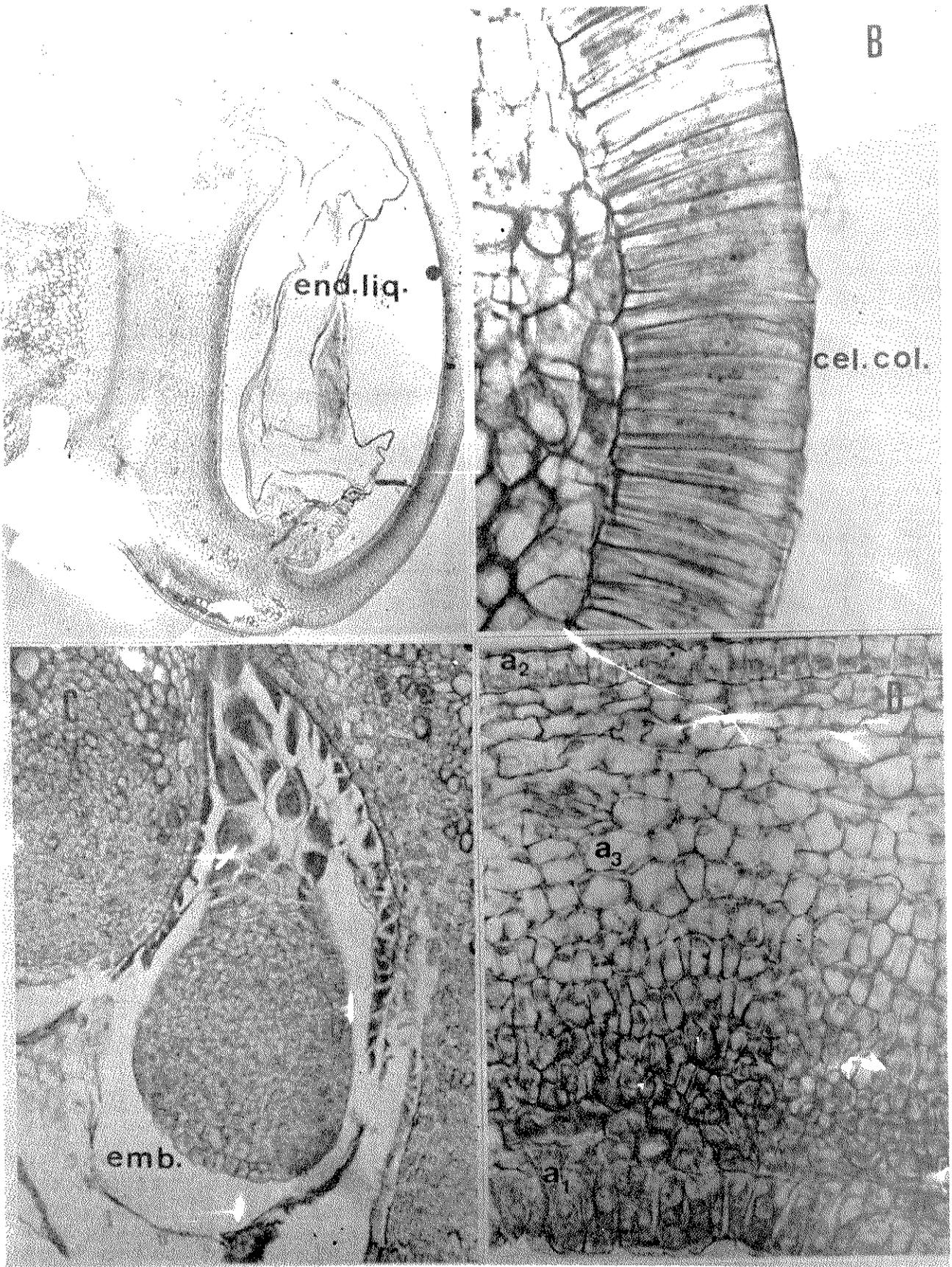
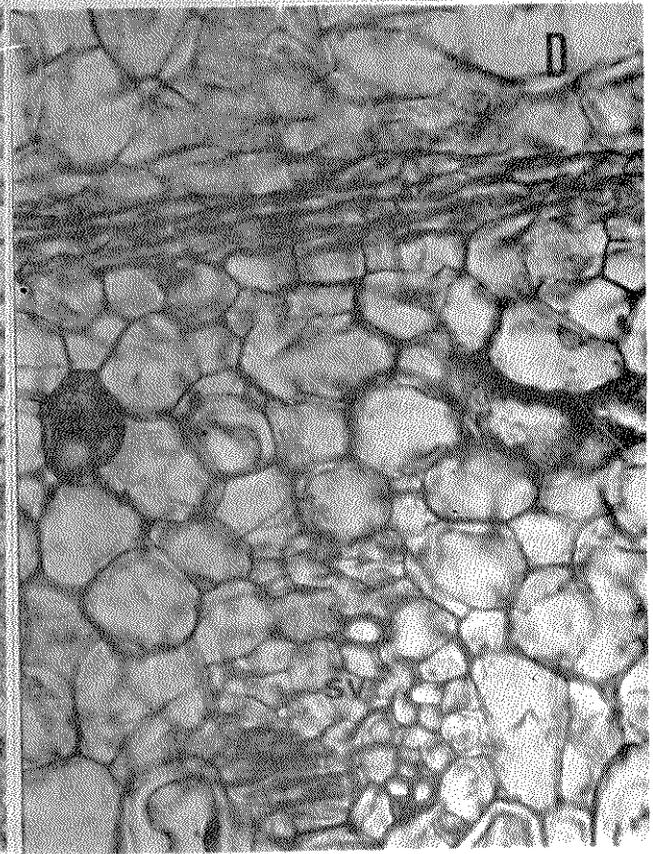
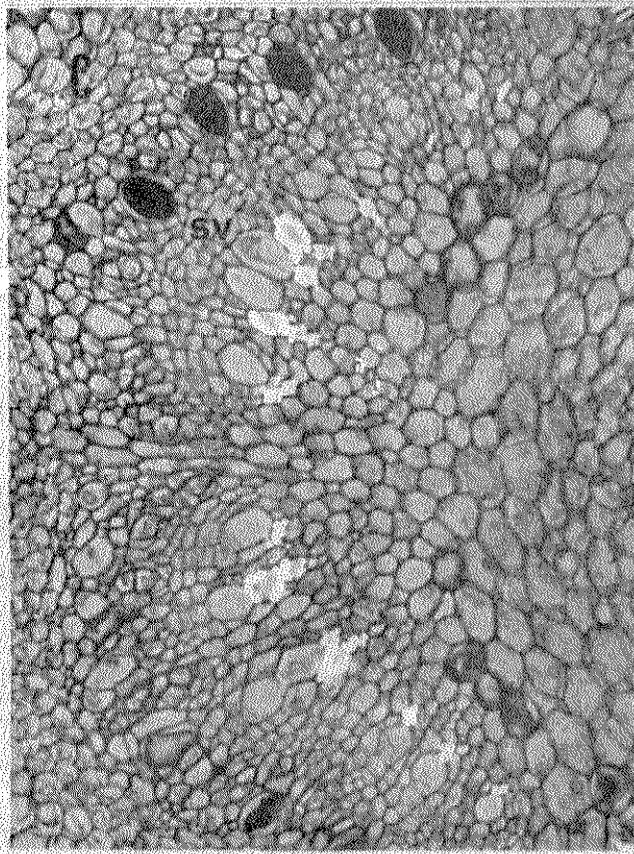
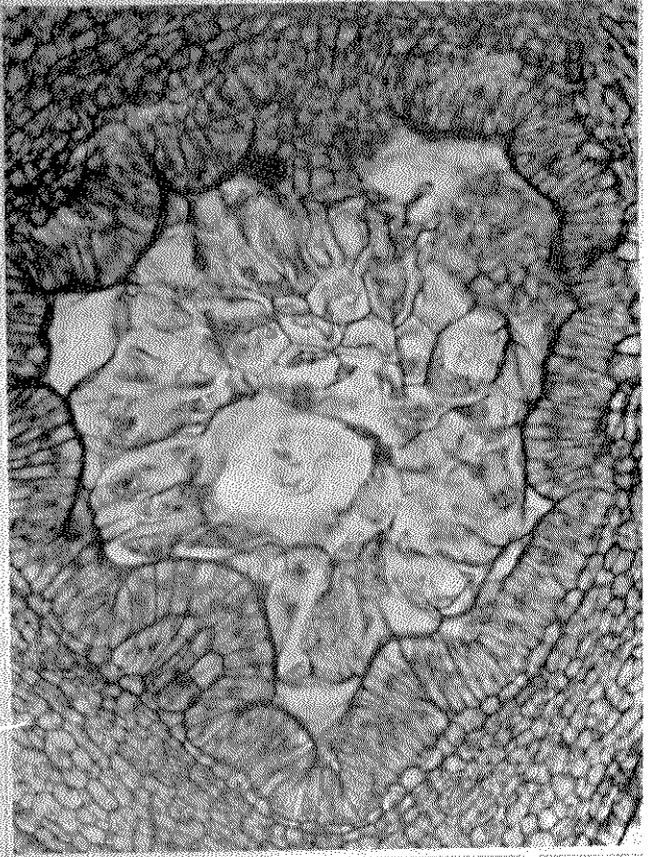


FIGURA 22 - Fotomicrografias . Secção transversal da semente de feijão "Goiano precoce" com 5 dias após a ântese e sistema vascular da casca do fruto (com luz semi-polarizada):

- A - Aspecto transversal da semente mostrando o hilo, camada interna em desenvolvimento e a parte central com células nucleares livres no líquido endospermico, 120x.
- B - Aspecto sô do centro, onde se observam as células nucleares em divisão, 240x.
- C - Aspecto do sistema vascular em secção transversal, que percorre a casca do fruto, e do anel tipo ferradura que separa o sistema de vasos e a parte interna do fruto, 600x.
- D - Aspecto transversal, obtido através de luz semi-polarizada, onde se observam em destaque, células com incrustações de lignina em birrefringência, o proto e metaxilema, o proto e metafloema, 245x.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATKINS, C.A., PATE, J.S. e SHARKEY, P.J. 1975. Asparagine metabolism key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. Plant Physiol. 56,807-812.
- ATKINS, C.A., RAINBIRD, R. e PATE, J.S. 1980. Evidence for a purine pathway of ureide synthesis in N₂-fixing nodule os cow pea (*Vigna unguiculata* (L.) WALP) Z. Pflanzphysiol. 97.S . 249-260.
- BACHRACH, U., 1957. The aerobic breakdown of uric acide by certain Pseudomonals. J.Gen. Microbiol. 17,1-11.
- BAICH, A. 1971. The biosynthesis of proline in *Escherichia coli*. Phosphate dependent gutamate α -semialdehyde dehydrogenase (NADP), the second enzyme in the pathway. Biochim. Biophys. Acta 224-129-134.
- BAKER, R.D.J.; DERBYSHIRE, E.; YARWOOD, A.; BOULTER, D. 1976 . Purificary and characterization of the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. seeds, and their intracellular and cotyledonary distribution. Phytochemistry, 15:751-757.
- BALBONI, E. e HECHT, R.I. 1977. Studies on the inner mitochondrial membrane localization of proline dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 426: 171-176.

- BARASH, I. 1972. Acumulation of urea and allantoin during purine utilization by germinating spore *Geotrichum candidum*. J.Gen.Microbiol. 72:539-542.
- BARLEY, C.J., COBB, A., BOULTER, D. 1970. A cotyledons slice system for the electron autoradiographic study of the synthesis and intracellular transport of seed storage protein of *Vicia faba*. Planta (Berl.) 95:103-118.
- BARLOW, H.W.B. 1979. Sectorial patterns in leaves on fruit tree shoots produced by radioactives assimilates and solutions. Ann.Bot. (Lond.) 43:593-602.
- BARNETT, N.M. e NAYLOR, A.M. 1966. Amino acid and protein metabolism in bermuda grass during water stress. Plant Physiol . 41:1222-1230.
- BARNES, R.L. 1959. Formation of allantoin and allantoic acid from adenine in leaves of *Acer saccharum* L. Nature (Lond.) 184, 1944.
- BATAGLIA, O.C., TEIXEIRA, J.P.F., FURLANI, A.M.C., FURLANI, P.R. e GALLO, J.R. 1978. Análise química de plantas. Instituto Agronômico, 3lp. Campinas, S.P., (Circular nº 87).
- BEEVERS, L. 1976. Nitrogen Metabolism in Plants. Ed. Arnold , London.
- BEGG, J.E. e TURNER, N.C. 1976. Crop water deficits. Adv. Agron. 28:161-217.
- BELL, D.T.; KOEPPE, D.E.; MILLER, R.J. 1971. The effects of drought stress on respiration of isolated corn mitochondria. Plant Physiol. 48:413-415.
- BENAVIDES, J.G. 1969. Zonificación de *Phaseolus vulgaris* L. en función de su régimen hídrico. Agr. Tro., Maracay, 19(3):197-203.

- BETHLENFALVAY, G.J., PHILLIPS, D.A. 1978. Interactions between symbiotic nitrogen fixation, combined-N application and photosynthesis in *Fisum sativum*. Physiol. Plant. 42:119-123.
- BINKLEY, A.M. 1932. The amount of blossom and pod drop on six varieties of garden beans. Proc. Am. Soc. Hort. Sci., New York , 29:489-492.
- BLACKMAN, G.E. 1968. The application of the concepts of growth analysis to the assessment of productivity. In: Eckardt, F.E. (ed) Functioning of Terrestrial Ecosystems at the Primary Production Level. UNESCO, Paris, pags. 243-259.
- BLAKE, G.R. 1965a. Bulk density. In: Black, C.A., ed. Methods of soil analysis, physical and mineralogical properties, including statistic of measurement and sampling, 1^a ed. Madison, Am. Soc. Agron. p. 374-390.
- _____. 1965b. Particle density. In: Black, C.A. ed. Methodes of soil analysis, physical and mineralogical properties , including statistics of measurement and sampling, 1^a ed. Madison, Am. Soc. Agron., p.371-373.
- BOGGES, S.F., ASPINAL, D. e PALEG, L.G. 1974. Inhibition of proline oxidation by water stress. Plant Physiol. 59:930-932.
- _____, _____, _____. 1976. Stress metabolism. IX . The significance of End-product inhibition of proline biosynthesis and of compartimentation in relation to stress-induced proline accumulation. Aust. J. Plant Physiol. 3:513-525.
- _____; STEWART, C.R.; KOEPPE, D.E. 1977. Metabolism of proline by wheat mitochondria. Plant Physiol. 60:S-386.
- _____; KOEPPE, D.E. ; STEWART, C.R. 1978. Oxidation of proline by plant mitochondria. Plant Physiol. 62:22-25.

- BOLLINI, R. e CHRISPPEELS , M.J. 1979. The rough endoplasmic reticulum is the site of reserve protein synthesis in developing, *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 146:487-501.
- BONGAERJS, G.P.A., VOLGERS, G.D. 1976. Uric acid degradation by *Bacyllus fastidiosus* strains. J.Bacteriol. 125:689-697.
- BOSE, R.D. 1932. Studies in Indian pulses , nº 4. Mung or green gram (*Phaseolus radiatus*). Indian J. Agric. Sci. 2:607-624.
- BOYER, J.S. e McPHERSON, H.G. 1975. Physiology of water deficits in cereal crops. Adv. Agron. 27:1-23.
- BRAVO, J.A., FEHR, W.R. e RODRIGUEZ de CIANZIO, S. 1980. Use of pod width for indirect selection of seed weight in soybean . Crop Sci. 20:507-510.
- BRUNNER, G., NEUPERT, W. 1969. Localization of proline oxidation and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid dehydrogenase in rat liver. FEBS. Lett, 3:283-286.
- BULL, T.A. 1968. Expansion of area per plant in field beans (*Vicia faba* L.), as related to daily maximum temperature. J. Appl. Ecol. 5:61-68.
- BUTLER, G.W., FERGUSON, J.D., ALLISON, R.M., 1961. The biosynthesis of allantoin in *Symphytum*. Physiol. Plant. 14:310-321.
- BUTROSE, M.S. 1963. Ultrastructure of the developing wheat endosperm. Aust. J. Biol. Sci. 16:305-317.
- CAIXETA, T.J. 1978. Irrigação do feijoeiro. Informe Agropecuário , Belo Horizonte, 4:36-40.
- CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I. e TEIXEIRA, J.P.F. 1981. Efeito do nitrogênio no teor de proteína e composição em aminoácidos de sementes de feijão. Pesq. Agropec. Bras., Brasília, 16:789-794.

- CATALDO, D.A., SCHRADER, L.E., PETERSON, D.M. e SMITH, D. 1975. Factors affecting seed protein concentration in oats. I. Metabolism and distribution of N and carbohydrate in two cultivars that differ in groat protein concentration. Crop Sci . 15:19-23.
- CHEN, D., KESSLER, B., MONSELISE, S.P. 1964. Studies on water regime and nitrogen metabolism of citrus seedling grown under water stress. Plant Physiol. 39:379-386.
- CHU, T.M., ASPINAL, D., PALEG, L.G. 1974. Stress metabolism . VI. Temperature stress and the accumulation of proline in barley and radish. Aus. J. Plant Physiol. 1:87-97.
- _____ ; _____ ; _____. 1976. Stress metabolism. VII. Salinity and proline accumulation in barley. Aust. J. Plant Physiol. 3:219-228.
- CLELAND, R. 1971. Cell wall extension. Annu. Rev. Plant Physiol. 22:197-222.
- COLLIER, M.D. e MURRAY, D.C., 1977. Leucyl β -naphylamidase activities in developing seeds and seedling of *Pisum sativum* L. Aust. J. Plant Physiol. 4:571-582.
- COOKER, J.; OLIVER, J.; DAVIES, D.D. 1979. Stress and protein turnover in *Lemna minor*. Plant Physiol. 64:1109-1113.
- _____ ; ROBERTS, K. e DAVIES, D.D. 1980. Model for stress induced protein degradation in *Lemna minor*. Plant Physiol. 66 : 1119-1122.
- COOMBS, J.; HUGHES, H. e COOKSON, C. 1980. Effects of combined nitrogen on anapleurotic carbon assimilation and bleeding sap composition in *Phaseolus vulgaris* L. Planta (Berl.) 148:338-345.

- CORNER, E.J.H. 1951. The leguminous seed. Phytomorphology 1: 117-150.
- CROOKSTON, R.K.; O'TOOKE, J. e OZBUN, J.L. 1974. Characterization of the bean pod as a photosynthesizing organ. Crop Sci. 14:708-712.
- DALE, J.E. 1965. Leaf growth in *Phaseolus vulgaris*. II. Temperature effects and the light factor. Ann. Bot. (Lond.) 29:293-308.
- DAVIES, D.R. 1975. Studies of seed development in *Pisum sativum*. I. Seed size in reciprocal crosses. Planta (Berl.) 124:297 - 302.
- DAVIES, H.M.; e MIPLIN, B.J. 1978. Advantage of o-phthalaldehyde for visualizing ¹⁴C-labelled amino acids on thin-layer chromatograms and improvement method for their recovery. J. Chromatogr. 135:284-286.
- DAVIS, J.H.C. e EVANS, A.M. 1977. Selection indices using plant type characteristic in navy beans (*Phaseolus vulgaris* L.) . J. Agric. Sci. 89:341-348.
- DEMATTE, J.B.I., DEMATTE, J.D.I., MIYASAKA, L., DE ALMEIDA, L.D'A, BULISANI, E.A., IGUE, T. e ALVES, S. 1974. Estudo da interação entre irrigação, adubação mineral e incorporação de matéria verde semedecomposta na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Campinas, Instituto Agrônômico 27p. (Bol.Técnico , 15).
- DESHPANDE, P.K. e BHASIN, R.K. 1974. Embryological studies in *Phaseolus aconitifolius*. Bot.Gaz. 135:104-113.
- DESMET, G.M. e DIRKSE, W.G. 1980. Growth and zinc accumulation in spinach. Physiol. Plant. 50:314-318.

- DOUTT, M.T. 1932. Anatomy of *Phaseolus vulgaris* L. var. Black valentine, East Lousing, Michigan Agricultural Experiments Station. Michigan Technical Bulletin nº 128.
- DUARTE, R.A. e ADAMS, M.W. 1972. A path coefficient analysis of some yield component interrelation in field beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Crop Sci. 12:579-582.
- EDJE, O.T.; MOGHOGHO, L.K. e AYONOADY, U.W.U. 1975. Responses of dry bean to varying nitrogen levels. Agron. J. 67:251-255.
- EILAM, Y. 1965. Permeability changes in senescing tissue. J. Exp. Bot. 16:614-627.
- ELTHON, T.E. e STEWART, C.R. 1981. Sub mitochondrial localization and election transport characteristic of enzymes involved in proline oxidation. Plant Physiol. 67:780-784.
- ENGELMAN, E.M. 1966. Ontogeny of aleurone grains in cotton embryo. Am. J. Bot. 53:231-237.
- ERICSON, M.C. e CHRISPPEELS, M.J. 1976. The carbohydrate moiety of mung bean vicilin. Aust. J. Plant Physiol. 3:763-769.
- _____ ; DELMER, D. 1978. Glycoprotein synthesis in plants . III. Interaction between UDP-N-acetylglucosamine and 6DP-mannose as substrate. Plant Physiol. 61:819-823.
- ESAU, K. 1953. Plant Anatomy. Wiley, New York.
- FALCHUK, K.H.; MAZUS, B.; ULPINO, L. e VALLEE, B. 1976. *Euglena gracilis* DAN dependent RNA polymerase. II: zinc metallo enzyme. Biochemistry 15:4468-4475.
- FARAH, S.M. 1981a. An examination of the effects of water stress on leaf growth of crops of field beans (*Vicia faba* L.). 1. Crop growth and yield. J. Agric. Sci., Camb. 96:327-336.

- FARAH, S.M. 1981b. An examination of the effects of water stress on leaf growth of crops of field beans (*Vicia faba* L.). Z. mineral content. J. Agric. Sci., Camb. 96:337-346.
- FAWCETT, R.G. e QUIRK, J.P. 1960. Effects of soil-water stress on the absorption of soil phosphorus by wheat plants. Nature (Lond.) 188:687-688.
- FERGUSON, I.B. e WATKINS, C.B. 1981. Ion relations of apple fruit tissue during fruit development and ripening. I. Cation leakage. Aust. J. Plant. Physiol. 8(2):155-64.
- FINCH-SAVAGE, W.E. e ELSTON, J.F. 1976. The death of leaves in crops of field beans. Ann. Appl. Biol. 85:463-465.
- FLOWER, T.J. e HANSON, J.B. 1969. The effects of reduced water potential on soybean mitochondria. Plant Physiol. 44:939-945.
- FRANK, L. e RANHAND, B. 1964. Proline metabolism in *E. coli*. III. The proline catabolic pathway. Archs. Biochem. Biophys. 107 : 325-331.
- FRANK, S.J. e FEHR, W.R. 1981. Association among pod dimension and seed weight in soybean. Crop Sci. 21(4):547-550.
- FREIRE, J.C. e SCARDUA, R. 1978. Curvas características de retenção de água de um latossolo roxo distrófico do município de Lavras, Minas Gerais. Rev. Bras. Ciênc. Solo, 2:95-98.
- FUJIHARA, S. e YAMAGUCHI, M. 1978a. Effects of allopurinol |4-hydroxypyrazole (3,4-d)Pyrimidine| on the metabolism of allantoin in soybean plants. Plant Physiol. 62:1,134-138.
- _____ e _____. 1978b. Probable site of allantoin formation in nodulating soybean plants. Phytochemistry 17:1239-43.
- _____ ; YAMAMOTO, K. e YAMAGUCHI, M. 1977. A possible role of allantoin and the influence of nodulation on its production in soybean plants. Plant Soil 48:233-242.

- GAMPER, H. e MOSE, 1974. Enzyme organization in the proline biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. 354:75-87.
- GATES, C.T. 1957. The responses of the young tomato plant to a brief period of water shortage. III. Drifts in nitrogen and phosphorus. Aust. J. Biol. Sci. 10:125-246.
- GOMES, M.A.F. 1982. Metabolismo de ureídeos e asparagina durante a ontogenia do fruto de plantas de soja noduladas e não noduladas. Tese mestrado. Universidade Estadual de Campinas . São Paulo
- GOMES, F.P. 1973. Curso de Estatística Experimental. Ed.3. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Piracicaba , 404p.
- GRAHAM, P.H. e ROSAS, J.C. 1979. Phosphorus fertilization and symbiotic nitrogen fixation in common bean. Agron. J. 71(6) :925-926.
- GREENWAY, H. e KLEPPER, B. 1968. Phosphorus transport in the xylem and its regulation by water flow. Planta (Berl.) 83:119-136.
- _____ ; HUGHES, P.G. e KLEPPER, B. 1969. Effects of water deficits on tomato to plants. Plant Physiol. 22:199-207.
- GROHMAN, F. e MEDINA, H.P. 1962. Características de umidade dos principais solos do Estado de São Paulo. Bragantia, 21:285 - 295.
- GUILLERMOND, A. 1921. Origin et evolution des vacules dans les cellules végétales et grains d'aleurone. C.R.Soc. Bio. 85:1033-1036.
- GUPTA, V.K. e KALA, R. 1980. Effects of Cu and Mo on Cu/Mo ratio their concentration in different organs of cowpea (*Vigna sinensis* L.) Plant Soil 56, (2):235-241.

- HALL, I.C.; McLEESTER, R.C. e BLISS, F.A. 1972. Electrophoretic analysis of protein changes during the development of the french bean fruit. Phytochemistry 11:647-649.
- HANSON, A.D., NELSON, C.E., EVERSON, E.H. 1977. Evaluation of free proline accumulating as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars. Crop Sci. 17:720 - 726.
- HARTING, J. 1855. Uber dos Klebermehl. Bot. Z. 13:881-882.
- HERRIDGE, D.F., ATKINS, C.A. e PATE, J.S. 1978. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy fo the cowpea (*Vigna unguiculata* L. WALP). Plant Physiol. 62:4,495-498.
- HETTIERATCHI, D.R.P. e O'CALLAGHAN, J.R. 1974. A membrana model of plant cell extension. J. Theor. Biol. 45:459-465.
- HSIAO, T.C. 1973. Plant responses to water stress. Annu. Rev. Plant Physiol. 24:519-570.
- _____ e ACEVEDO, E. 1974. Plant response to water deficits, water use efficiency and drought resistance. Agric. Metereol. 14:59-84.
- _____, ACEVEDO, E. e FERERES, E. 1976. Stress metabolism . Water stress, growth, and osmotic ajustment. Phil. Trns. R. Soc. Lond., B.273:479-500.
- HSU, C.F. 1979. A developmental analysis of seed size in common bean. Crop Sci. 19:226-230.
- HUANG, A.H.C., CAVALIERI, A.J. 1979. Proline oxidase and water stress induced proline accumulation in spinach leaves. Plant Physiol. 63:531-535.
- HUDSON, L.W., DIETZ, A.M. e PESHO, G.R. 1973. Bean inventory (*Phaseolus vulgaris* L.) Western Regional Plant Introduction stn, Pullman, Wash.

- IRELAND, R.J. e JOY, K.W. 1981. Two routes for asparagine metabolism in *Pisum sativum* L. Planta (Berl.) 151:289-292.
- ISHIZUKA, J. 1971. Nitrogen nutrition of soybean plants. 1. The relationships between growth and nitrogenous constituents. Res. Bull. Hokkaido Nat. Agric. Exp. Stn. 98:27-33.
- ISHIZUKA, M.; ISHIZUKA, J. e AKAMATSU, F. 1964a. Physiological studies on the nutrition of soybean plants. 1. Effects of nodulation on the growth yield and nitrogen content. J. Sci. Soil Manure Tokyo 35:319-322.
- _____; _____ e _____. 1964b 2. Effect of nodulation on the nitrogen constituent. J. Sci. Soil Manure Tokyo 35:323 - 27.
- ISHIZUKA, J., OKINO, F. e HOSHI, S. 1970. The relationship between shoot contents of nitrogenous components and vegetative growth. J. Sc. Soil Manure Tokyo. 41:78-82.
- IZQUIERDO, J.A., HOSFIELD, G.L. 1981. A collection receptable for field abscission studies in common beans. Crop Sci. 21 : 622-625.
- JACKSON, M.L. 1958. Soil chemical analysis. London, Constable and Co-Lt.
- JENSEN, W.A. 1962. Botanical Histochemistry. San Francisco , U.S.A.:F.A. Freeman and Co.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant Microtechnique. Delhi. Tota. Mc - Graw-Hill Publishing Co. Ltd.
- JOHNSON, A.B., STRECKER, H.J. 1962. The interconversion of glutamic acid and proline. IV. The oxidation of proline by rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 237:1876-1882.

- JOHNSON, D.A. e BROWN, R.W. 1977. Psychrometric Analysis of Turgor Pressure Response : A possible technique for evaluating plant water stress resistance. Crop Sci. 17:507-510.
- KAMBERGER, W. 1977. Regulation of symbiotic nitrogen fixation in root nodules of alfafa (*Medicago sativa*) infected with *Rhizobium melioli*. Arch. Microbiol. 115:103-108.
- KARAMANOS, A.J. 1978. Water stress and leaf growth of field beans (*Vicia faba* L.) in the field: Leaf number and total leaf area. Ann. Bot. 42:1393-1402.
- KATTAN, A.A. e FLEMING, J.W. 1956. Effect of irrigation at specific of stages of development on yield, quality, growth and composition os snap beans. Proc. Am.Soc.Hort. Sci. 68:328-342.
- KHANNA, R. e SINHA, S.K. 1976. Importance of fruit wall in seed yield of pea (*Pisum sativum* L.) and mustard (*Brassica campestris* L.). Indian J. Exp. Biol. 14:159-62.
- KIPPS, A.E. e BOULTER, D. 1974. Origins of amino acids in pods and seeds of *Vicia faba* L. New Phytol 73:675-684.
- KLOZ, J.V. TURKOVA, E. KLOZOVA. 1966. Proteins found during maturation and germination of seeds of *Phaseolus vulgaris* L. Bio Plant Prague 8:164-173.
- KOGBE , J.O.S. 1972. Factor influencing yield variation of field bean (*Vicia faba* L.) Ph.D. Thesis, University of Nottingham.
- KRAMER ,P.J. e RUSSEL, M.B. 1959. Plant water relations. Adv. Agron. 11:51-57.
- _____. 1969. Plant end soil water relationships: a modern synthesis. McGraw-Hill. New York. 482p.
- KROGMAN, K.K., MCKENZIE, R.C. e HOBBS, E.H. 1980. Response of fabean yield, protein production and water use to irrigation. Can.J.Plant Sci. 50:91-96.

- KRUPKA, R.M., TOWERS, H.N. 1959. Studies of the metabolic relations of allantoin in wheat. Can. J. Bot. 37:539-545.
- LATIMORE, M.; GIDDENS, J., ASHLEI, D.A. 1977. Effect of ammonium and nitrate nitrogen upon photosynthate supply and nitrogen fixation by soybeans. Crop Sci., 17:399-404.
- LEA, P.J. e FOWDEN, L. 1975. Asparagine metabolism in higher plants. Biochem. Physiol. Pflanz. 168:3-14.
- _____ ; _____ e MIFLIN, B.J. 1978. The purification and properties of asparaginase from *Lupinus species*. Phytochemistry. 17:217-222.
- _____ ; HUGHES, J.S, e _____. 1979. Glutamic and asparagine dependent protein synthesis in maturing legume cotyledone cultured in vitro. J. Exp. Bot. 30:116,529-537.
- LELEJI, O.I.; DICKSON, M.H.; GROWEDER, L.V., e BOWLEE, J.B. 1972. Inheritance of crude protein percentage and its correlation with and yield in beans *Phaseolus vulgaris* L. Crop Sci. 12:168-171.
- LING, C.M. e HEDRICK, L.R. 1964. Proline oxidase in *Hansenula subpelliculosa*. J. Bact. 87:1462-1470.
- MACKAY, D.C., CHIPMAN, E.W. e GUPTA, V.C. 1966. Copper and molybdenum nutrition of crops grow on acid sphagnum peat soil. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 30:755-759.
- MAGALHÃES, A.C.N. 1979. Análise quantitativa do crescimento In: FERRI, M.G., Fisiologia Vegetal, 1^a. ed. EPU:Ed. da Universidade de São Paulo p. 331-350.
- MAGALHÃES, A.A.; MILLAR, A.A. e CHOUDHURY, E.N. 1979. Efeito do deficit fenológico de água sobre a produção de feijão. Turrialba, 29:269-273.

- MASCIOTTI, G.Z. 1974. Efeito do déficit hídrico sobre o metabolismo do nitrogênio e o crescimento de alguns cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Tese Mestrado, Viçosa Minas Gerais. 37pp.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1977. Effects of exogenous nitrogen. Compounds of allantoin and various constituents in several organs of soybean plants. Plant Cell Physiol 18:3,613-624.
- _____; _____ e _____. 1977. Distribution and change in contents of allantoin and alantoic acid in developing nodulating and non-nodulating soybean plants. Plant Cell Physiol. Tokyo . 18,353-359.
- MEDINA, J.C. 1972. Aspectos gerais sobre feijão. Viçosa, MG . Imprensa Universitária. UFV. 160p.
- MENGEL, K., SECER, M. e KOCH, K. 1981. Potassium effect on Protein formation and amino acid turnover in developing wheat grain. Agron. J. 73:74-78.
- MIFLIN, B.J., LEA, P.J. 1977. Ar _____ metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 28:299-329.
- MILLAR, A. 1976/77. Relatório CODEVAS/FAO/USAID. 1976. 62p. e PNUD/FAO. Projeto BRAS/74/008, 1977. 23p. conferencia , Brasília, 1976.
- MISRA, R.C. e SAHU, R.C. 1970. Embryology and seed structure in green gram (*Phaseolus vulgaris* Roxb.) Indian J. Agric.Sci. 40:216-222.
- MITRA, R.; GROSS, R.D. e VARNER, J.E. 1975. An intact tissue assay for enzymes that labilize C-H bonds. Anal. Biochem. 64: 102-109.

- MORTON, R.K.; POLK, B.A. e RAISON, J.K. 1964. Intracellular components associated with protein synthesis in developing whe at endosperm. Biochem.J. 91:522-528.
- MOTHES, K. 1961. The metabolism of ureia and ureides. Can. J. Bot. 39:1785-1807.
- MURRAY, D.R. 1979. Nutritive role the seed coats during embryo development in *Pisum sativum* L. Plant Physiol. 64:763-769.
- _____. 1980. Functional significance of acid phosphatase distribution during embryo development in *Pisum sativum* L. Ann. Bot. (Lond.) 5:273-281.
- _____ e COLLIER, M.D. 1977. Acid phosphate activities in developing seeds of *Pisum sativum* L. Aust. J. Plant Physiol. 4:843-848.
- _____ e KENEDY, I.R. 1980. Changes in activities of enzymes of nitrogen metabolism in seed coats and cotyledons during embryo development in pea seeds. Plant Physiol. 66:782-786.
- MUTSCHLER, M.A. e BLISS, F.A. 1980. Variation in the accumulation of seed storage protein among genotype of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 65:627-637.
- NAGAHASHI, J. e BEEVERS, L. 1978. Subcellular localization of glycosyltransferase involved in glycoprotein biosynthesis in the cotyledons of *Pisum sativum* L. Plant Physiol. 61:451-459.
- NIRMALA, J.; SASTRY, K.S. 1975. The allantoinase of *Lathyrus sativus*. Phytochemistry 14:1971-1973.
- OLIKER, M.; POLJAKOFF-MAYBER, A.; MAYER, A.M. 1978. Changes in weight nitrogen accumulation respiration and photosynthesis during growth and development of seeds and pods of *Phaseolus vulgaris*. Ann. J. Bot. 65:366-371.

- OPIK, H. 1968. Development of cotyledon all structure in ripening *Phaseolus vulgaris* seeds. J. Exp. Bot. 19:64-67.
- PATE, J.S. 1971. Movement of nitrogenous solutes in plants . In: Nitrogen-15 in soil-plant studies. International Atomic Energy Agency, Vienna pp 165-187.
- _____. 1973. Uptake assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. Soil Biol. Biochem. 5:109-119.
- _____ ; SHARKEY, P.J. e LEWIS, A.M. 1974. Phloem bleeding from legume fruits. A technique for study of fruits nutrition. Planta (Berl.) 120:229-243.
- _____ ; _____ e _____. 1975. Xilem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legume, studied by phloem bleeding technique. Planta (Berl.) 122:11-26.
- PÁLFI, G. e JÚHASZ, J. 1971. The teorical basis and practical application of a new method of selection for determining water deficiency in plants. Plant Soil 34:503-507.
- PAQUIN, R. e LECHASSEUR, P. 1979. Observations sur une methode de dosage de la prolina libre dans les extrits de plantes . Can. J. Bot. 57:1851-1854.
- PECK, N.H.; GRUNES, D.L.; WELCH, R.M. e MacDONALD, G.E. 1980 . Nutritional quality of vegetable crops as affected by phosphorus and zinc fertilizers. Agron. J. 72, (3):528-534.
- POPA, G.; COPELAND, L.O.; ADAWS, N.W. 1978. Physiological development of seeds of two dry edible beans variets. Annu. Rep. Bean Improvement Cooperative. 21:41-44.
- PRASK, J.A. e PLOCKE, D.J. 1971. A role for zinc in the structural integrity of the cytoplasmic ribosomes of *Euglena gracilis*. Plant Physiol. 48:150-155.

- PROSENKO, D.F., SHMAT'KO, I.G.; RUBANYUK, E.A. 1968. Drought hardiness of winter wheat varieties as related to their amino acid composition. Fiziol. Rast. 15:680-687.
- PURCINO, J.R.C. e LIMA, C.A.S. 1978. Efeito de diferentes regimes de irrigação sobre o rendimento do feijoeiro na região norte de Minas Gerais. Projeto Feijão, relatório 77/78 In : EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. Relatório de pesquisa 1978.
- RADFORD, P.J. 1967. Growth analysis formulae their use and abuse. Crop Sci. 7:171-175.
- RAMALHO, M.A.P. e FERREIRA, M.M. 1979. Comportamento de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em relação ao florescimento e vingamento das vagens. Ciência e Prática, Lavras 3:80-84.
- RANDALL, P.J. e BOUMA, D. 1973. Zinc deficiency, carbonic anhydrase and photosynthesis in leaves of spinach. Plant Physiol. 52:229-232.
- REINBOTHE, H.; MOTHES, K. 1962. Urea, ureides and guanidines in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 13:129-250.
- RENA, A.B. e MASCIOTTI, G.Z. 1975. Water stress nitrogen metabolism in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. Ciê.n.e.Cult. 27-S:28-H 9.
- _____ e SPLITTSOESSER, W.E. 1974a. The metabolism of proline in cotyledons of pumpkin (*Cucurbita moschata*). Plant Cell Physiol. 15:681-686.
- _____ e _____. 1974b. Δ -pyrroline-5-carboxylcarboxylate: the product of proline dehydrogenase from *Cucurbita moschata* cotyledons. Phytochemistry 13:2081-2084.

- RENA, A.B. e SPLITTSOESSER, W.E. 1974c. Proline dehydrogenase from pumpkin (*Cucurbita moschata*) cotyledons. Physiol. Plant. 32:177-181.
- REYNOLDS, C.W. 1955. Irrigação of snap beans, cucumber and sweet corn Report of the Md. Veg. Growers. Assoc. 36th. Annual Meeting: 5-8.
- RICHARDS, L.A. e FIREMAN, M. 1943. Pressure-plate apparatus for measuring moisture sorption and transmission by soils. Soil Sci. 56:395-404.
- _____. 1974. Pressure membrane apparatus, construction and use. Agric. Engng., 28:415-454.
- RIES, S.K. 1971. The relationships of protein content and size of bean seed with growth and yield. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 96:577-600.
- ROBERTS, S. e WEAVER, N.A. 1971. Relationship among nitrogen nutrition, growth, and yield of three beans varieties. Sl. Washington Agric. Exp. Stat. (Bulletin, 742).
- ROBINS, J.S. e DOMINGO, C.E. 1976. Moisture deficits in relations to growth and development of dry beans. Agron. J. 48 : 488-492.
- ROBITALLE, H.A. 1979. Dry matter accumulation patter in indeterminate *Phaseolus vulgaris* L. cultivars. Crop Sci. 18(5):740 - 743.
- ROUSH, A.H. e SHEIH, T.R. 1962. Diffusion, active transport and metabolism of purines in the yeast *Torulopsis candida*. Biochim. Biophys. Acta 61:255-264.
- ROUTLEY, D.G. 1966. Proline accumulation in wilted ladino clover leaves. Crop.Sci. 6:358-361.

- SACHER, F.A. 1967. Studies of permeability, RNA and protein turnover during ageing during of fruit and leaf tissues. Symp. Soc. Exp. Biol. 21:269-303.
- SARRUGE, J.R. e HAAG, H.P. 1974. Análises químicas em plantas. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Piracicaba, S.P. 56p.
- SAUNIER, R.E.; HULL, H.M.; EHRENICH, J.H. 1968. Aspecto of the drought tolerance in creosotebush (*Larrea divaricata*). Plant Physiol. 43:401-404.
- SCOTT, R.K. e ALLEN, E.J. 1979. Crop physiological aspects of importance to maximum yield-potatoes and sugar beet. In: Proc. Agric. Develop. and Advisory Service-Agricultural Research Council Symposium, Maximising yields of crops, 219pp HMSO, London.
- SELLS, D.G. e KOEPPE, D.E. 1981. Oxidation of proline by mitochondria isolated from water stressed Mayze shoots. Plant Physiol. 68:1058-1063.
- SEN, N.K. e GHOSH, A.K. 1959. Genetic studies in green gram. Indian J. Genet. Plant Breed. 19:210-227.
- _____ e JANA, M.K. 1963. Genetica of black gram (*Thaseolus mungo* L.) Genetica 34:46-57.
- SHIBLES, R.M. e WEBER, C.R. 1965. Leaf area, solar radiation interception and dry matter production by soybeans. Crop. Sci. 5:575-578.
- SIMON, E.W. 1977. Leakage from fruit cells in water. J. Exp. Bot. 28:1147-1152.
- SIMPSON, E., BURTON, J., VARNER, J.E. 1976. Proline metabolism of oat seedlings. Plant Physiol. 57:s-154.

- SINGH, T.N.; ASPINALL, D.; PALEG, L.G. 1972. Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: a potential metabolic measure of drought resistance. Nature (Lond.). 236:188-190.
- _____; PALEG, L.G.; ASPINALL, D. 1973a. Stress metabolism . I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. Aust. J. Biol. Sci. 26:45-56.
- _____; _____ e BOGGERSS, S.F. 1973b. Stress metabolism . II. Changes in proline concentration in excised plant tissues. Aust. J. Biol. Sci. 26:57-63.
- _____; _____ e ASPINALL, D. 1973c. Stress metabolism . III. Variation in response to water deficit in the barley plant. Aust. J. Biol. Sci. 26:65-76.
- SINHA, S.K. 1974. Yield of grain legumes: problems and prospects. Indian J. Genet. Plant Breed. 39A, 988-994.
- _____ e SANE, P.V. 1976. Relative photosynthesis rate in leaves and fruit wall of peas. Indian J. Exp. Biol. 14:592-4.
- _____. 1977. Food legumes. Distribution adaptability and Biology of yield. Rome. FAO.
- SINHA, S.K.; SAVITHRI, K.S. e GANAPATHY, P.S. 1978. Fruit and seed development in mung beans (*Phaseolus aureus* Roxb). J. Agric. Sci. Camb. 90:551-556.
- SLATYER, R.O. 1967. Plant water relationships. Academic Press. New York. 366p.

- SMITH, F.L. e PRYOR, R.H. 1962. Effects of maximum temperature and age of flowering and seed production in three beans varieties Hilgardia, Berkeley 33:669-687.
- SNEDECOR, G.M. e COCHRAN, W.G. 1967. Statistical methods. Ed. 6. Iowa State Univ. Press, Ames. 593p.
- SODEK, L.; LEA, O.J. e MIPLIN, B.J. 1980. Distribution and properties of a potassium dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* L., and other plants. Plant Physiol. 65,22-26.
- SOLTER, P.T. e GOODE, J.E. 1967. Crop responses to water at different stages of growth common wealth. Agr. Bur., Farnham Royal.
- SOUÈGÈS, R. 1950. Developpement de l'embryon chez le *Phaseolus vulgaris* (L.), C.R. Acad. Sci. (Paris) 231:627- 631
- SPRENT, J.I. 1972. The effects of water stress on nitrogen-fixing root nodules. IV. Effects on whole plants of *Vicia faba* e *Glycine max.* New Phytol. 71:603-611.
- STANHILL, G. 1957. The effect of differences in soil moisture status on plant growth. Soil Sci. 58:205-214.
- STEWART, C.R. 1973. The effects of wilting on proline metabolism in excised bean leaves in the dark. Plant Physiol. 51 : 508-511.
- _____ e BOGGESS, S.F. 1978. Metabolism of $[5-^3\text{H}]$ -proline by barley leaves and its use in measuring the effects of water stress on proline oxidation. Plant Physiol. 61:654-657.
- STEWART, C.R.; MORRIS, C.J.; THOMPSON, J.F. 1966. Changes in amino acid content of excised leaves during incubation. II . Role of sugar in the accumulation of proline in wilted leaves. Plant Physiol. 41:1585-1590.

- STEWART, C.R.; BOGGES, S.F. ; ASPINALL, D.; PALEG, L.G. 1977 .
Inhibition of proline oxidation by water stress. Plant Physiol
59:930-932.
- STOLKER, R. 1974. Effect on dwarf beans of water stress at dif-
ferent phase of growth. NZ Jl. Exp. Agri. 2(1):13-15.
- STRECKER, H.J. 1971. Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase (calf
liver) reduction of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate to proline .
Methods Enzymol. 17B:258-261.
- STREETER, J.G. 1972. Nitrogen nutrition of field grow soybean
plants. I. Seasonal variations in soil nitrogen and nitrogen
compositions of stem exudate. Agron. J. 64,311-314.
- SUBHADRABANDHU, S., ADAMS, M.W. e REICOSKY, D.A. 1978. Abscis -
sion of flowers and fruits in *Phaseolus vulgaris* L. I. culti -
var differences in flowering patter and abscission. Crop Sci.
18:897-896.
- _____.; MUTSCHLER, M.A.; BLISS, F.A.; HALL, T.C. 1978. Pro -
tein synthesis and accumulation in bean cotyledons during grow-
th. Plant Physiol. 61:918-923.
- TAJIMA, S.; YAMAMOTO, Y. 1975. Enzymes of purine catabolism in
soybean plants. Plant Cell Physiol. 16:271-282.
- _____.; YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1977. Allantoin produc -
tion and its utilization in relation to nodules formation by
soybean enzymatic studies. Soil Sci. Plant. Nutr. 23:225-235.
- TAKANA, A.A. e FUJITA, K. 1979. Growth photosynthesis and yield
components in relation to grain yield of beans. J. Fac. Agric.,
Hokkaido (Imp.)Univ. 59:146-238.
- TANG, Y.L.; XIE, Y.C.; WANG, J.S.; MOI, J.R. e DENG, S.T. 1962 .
Characteristics of several mayor biochemical lands cape type
in kwangting. Acta. Geogr. Sinica (in Chinese), 28:290-305.

- TEIXEIRA, H.A.; RAMALHO, M.A.P.; LIMA, L.A. de P.; ANDRADE, M.A. de e SANTA CECÍLIA, F.C. 1978. Viabilidade do cultivo de feijão irrigado no período de inverno em Lavras, MG. Projeto feijão, relatório 73/75. Belo Horizonte. 39-40.
- THOMAS, R.J. e SCHRADER, L.E. 1981a. Ureide metabolism in higher plants. Phytochemistry 20:361-371.
- _____ e _____. 1981b. The assimilation of ureides in shoot tissues of soybean. Plant Physiol. 67:973-976.
- _____; FELLER, U.; ERISMANN, K.H. 1979. Allantoic acid metabolism in nodulated bush beans. Plant Physiol. 63:S,50- section 12, nº 275.
- _____; KHANDAVILLI, V.; SCHRADER, L.E. 1980. Allantoinase activity in soybean leaves and fruit during development. Plant Physiol. 66:S-55-seccion 16 nº 296.
- THOMPSON, J.F.; STERWART, C.R.; MORRIS, C.T. 1966. Changes in amino acid content of excised leaves during incubation. I. The of water content of leaves and atmospheric oxygen level. Plant Physiol. 41:1578-1584.
- TUCKER, E.B.; COSTERTON, J.W.; BEWLEY, J.D. 1975. The ultrastructure of the moss *Tortula ruralis* on recovery from desiccation. Can. J. Bot. 53:94-101.
- TURNER, N.A.; REDGWELL, R.J. 1966. A mixed layer for separation of amino acids by thin layer chromatography. J. Chromatogr. 21, 129-132.
- VAADIA, Y.; RANEY, F.C. e HAGAN, R.M. 1961. Plant water deficits and physiological processes. Annu. Rev. Plant Physiol. 12:265-292.

- VALLEE, B.L. 1977. Recent advances in zinc biochemistry-In:A.W. Adison, W.R. Culleus, D. Dolphin e B. R. Jonas, eds.). Biological Aspect of Inorganic Chemistry. John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto. p.37-70.
- VAN,DER WILDEN, W.; HERMAN, E.M.; CHRISPPEELS, M.J. 1980. Protein bodies of mung bean cotyledons as autophagic organelles. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77:428-432.
- VIEIRA DA SILVA, J.; NAYLOR, A.W.; KRAMER, P.J. 1974. Some ultrastructural and enzymatic effects of water stress in cotton (*Gossypium hirsutum*) leaves. Proc. Nat. Acad. Sci., USA. 71:3242-3247.
- VIETS, F.G. 1967. Nutrient availability in relation to soil water. In: Irrigation of agricultural lands (ed. R.M. Haysan, H.R. Hoise e T.W. Edminister) Agronomy 11:458-471.
- VILLELA, G.G.; BASILIA, M. e TASTALDI, H. 1973. Técnicas e Experimentos de Bioquímica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro . 400 p.
- VOGELS, G.D. e VAN DER DRIFF, C. 1970. Differential analyse of glyoxilate derivatives. Analyt. Biochem. 33:143-157.
- _____; TRIJBELS, F.; UFFINK, A. 1966. Allantoinase from bacterial, plant and animal source. I. Purification and enzymatic properties. Biochim. Biophys Acta 122:482-496.
- VOMOCIL, J.A. 1965. Porosity In:Black, C.A. ed. Methods of soil analysis, physical and mineralogical properties, including statistical of measurement and sampling, 1^a ed. Madison, Am. Soc. Sec. Agron. p.299-314.
- WADLEIGH, C.H. e RICHARDS, L.A. 1951. Soil moisture and the mineral nutrition of plants. In:E.Trug, (eds.) Mineral Nutrition of Plants : University of Wisconsin Press, Wisconsin, Madison, 441p.

- WAINES, J.G. 1978. Protein contents, grain weights, and breeding potential of wild and domesticated tepary beans. Crop Sci. 18:587-589.
- WALKER, W.E.C. 1962. Nucleic acid and metals. III. Changes in nucleic acid, protein and metal content as a consequence of zinc deficiency in *Euglena gracilis*. Biochemistry 1:859-861.
- WARREN, M.F. e LEGARDA, L.B. 1978. Soil water and aeration and red bean production. I. Mean maximum soil moisture suction. Turrialba, 28(1):81-85.
- WATSON, D.J. 1952. The physiological basis of variation in yield. Adv. in Agron. 4:101-145.
- _____ e FRENCH, S.A.W. 1962. An attempt to increase yield by controlling leaf area index. Ann. Appl. Biol. 50:1-10.
- WATT, E.E.; POEHIMAN, J.M. e CUMBIE, B.G. 1977. Origin and composition of texture layer on seeds of mung bean. Crop Sci. 17:211-215.
- WHITEHEAD, F.H. e MYERSCOUGH, P.J. 1962. Growth analysis of plants. The ratio of mean relative growth rate to mean relative rate of leaf area increase, New Phytol. 61(3):314-321.
- WILKINSON, B.G. e PERRING, M.A. 1964. Changes in the Chemical composition of apple during development, and near picking time. J. Sci. Food Agric. 15:146-152.
- WILLIAMS, C.N. e BIDDISCOMBE, E.F. 1965. Extension growth of grass tillers in the field. Aust. J. Agric. Res. 16:14-22.
- _____; LOOMIS, W.G. e LEPLEY, C.R. 1965. Vegetative growth of corn as affected by population density. II. Components of growth, net assimilation rate and leaf area expansion. Crop Sci. 5:215-221.

- WOLF, M.J. e KHOO, U. 1970. Origin and development of protein granules in maize endosperm. Am. J. Bot. 57:1042-1050.
- WOOD, K.C.; ATKINS, C.A. e PATE, J.S. 1980. Biosynthesis of ureides from purine in a cell-free system from nodule extracts of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) WALP]. Plant Physiol. 66 : 739-739.

ANEXO

- Número do Botão Floral

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F	
A	2	0.3016433E+04	0.1508217E+04	23,117	0,0000%
B - A	3	0.3161050E+04	0.1053683E+04	16,150	0,0000%
ERRO	54	0.3523100E+04	0.6524259E+02		
Total	59	0.9700583E+04			

Fatores : A = Regime B = Stress C= Repet.

Coef. de Variação (1) = 13,95%

Média Geral = 57,917

- Número de Flores Estabelecidas

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F	
A	2	0.9652000E+03	0.4826000E+03	14,450	0,0009%
B - A	3	0.2320950E+04	0.7736501E+03	23,164	0,0000%
ERRO	54	0.1803500E+04	0.3339815E+02		
Total	59	0.5089650E+04			

Fatores : A = Regime B= Stress C= Repet.

Coef. de Variação (1) = 16,21%

Média Geral = 35,650

- Número de Frutos Estabelecidos

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F	
A	2	0.1903333E+02	0.9516666E+01	1,097	34,1227%
B - A	3	0.1990500E+03	0.6635000E+02	7,648	0,0238%
ERRO	54	0.4685000E+03	0.8675926E+01		
Total	59	0.6865834E+03			

Fatores : A = Regime B = Stress C= Repet.

Coef. de Variação (1) = 20,20%

Média Geral = 14,583

- Número de Frutos não Estabelecidos

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F	
A	2	0.9812333E+03	0.4906167E+03	20,431	0,0000%
B - A	3	0.1092650E+04	0.3642167E+03	15,168	0,0000%
ERRO	54	0.1296700E+04	0.2401296E+02		
Total	59	0.3370583E+04			

Fatores : A = Regime B = Stress C = Repet.

Coef. de Variação (1) = 23,24%

Média Geral = 21,083

- Número de Sementes

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F	
A	2	0.3900000E+01	0.1950000E+01	1,679	19,6074%
B - A	3	0.1865000E+02	0.6216667E+01	5,354	0,2660%
ERRO	54	0.6270000E+02	0.1161111E+01		
Total	59	0.8525000E+02			

Fatores : A = Regime B = Stress C = Repet.

Coef. de Variação (1) = 28,73%

Média Geral = 3,750

- Peso Seco das Sementes

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F	
A	2	0.9980286E+00	0.4990143E+00	2,706	7,5875%
B - A	3	0.1900521E+01	0.6335071E+00	3,435	2,3152
ERRO	54	0.9958818E+01			
Total	59	0.1285737E+02			

Fatores : A = Regime B = Stress C = Repet.

Coef. de Variação (1) = 30,90%

Média Geral = 1,390

- Peso Seco das Cascas

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F	
A	2	0.1355265E+00	0.6776326E+01	5,806	0,5203%
B - A	3	0.1033298E+00	0.3444326E+01	2,951	4,0710%
ERRO	54	0.6302909E+00	0.1167205E+01		
Total	59	0.8691471E+00			

Fatores : A = Regime B = Stress C = Repet.

Coef. de Variação (1) = 23,64%

Média Geral = 0,457