

CRISTIANA DE NORONHA BEGNAMI



ALTERAÇÕES CELULARES DURANTE O
ENVELHECIMENTO EM SEMENTES DE
Phaseolus vulgaris L. E
Senna reticulata (Willdenow)
Irwin & Barneby

Este exemplar
corresponde à redação
final da tese defendida pela
candidata Cristiana de Noronha
Begnami e aprovada pela Comissão julgadora

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para a Obtenção do Título
de Mestre em Ciências Biológicas,
área de Biologia Celular

Orientador: Prof.Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

CAMPINAS

1991

20/9/103033

dedico à memória dos meus avós
Ercole Begnami e Angela Fioramonte
João Ribeiro de Noronha Junior e
Maria Lange de Carvalho Noronha,
por tudo o que foram ...

Agradeço especialmente ao meu marido Paulo, que muito colaborou na elaboração deste trabalho.
Agradeço pelo seu carinho, compreensão e apoio irrestrito.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, meu orientador, por sua amizade e orientação durante estes cinco anos de convívio, que muito contribuíram para a minha formação;

Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek pelas valiosas sugestões feitas após a leitura do manuscrito deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Luiz Fernandez Rasesa pelo fornecimento das sementes de feijão, possibilitando assim a realização de parte deste trabalho, e pelas valiosas sugestões dadas após a leitura do manuscrito;

A Profa. Dra. Mary Anne Heide Dolder pelo auxílio carinhoso prestado em vários momentos durante a elaboração desta tese e por ter acreditado em mim aceitando-me como sua orientada de doutorado;

Ao Prof. Edson Rosa Pimentel pelas valiosas sugestões na análises das eletroforeses e a Profa. Dra. Maria Encarnación Fernandez-Gómez pela atenção dispensada na análise das imagens de impregnação pela prata;

A Profa. Dra. Lucia Furlan Vada pelo carinho e amizade com que sempre me atendeu nos momentos de necessidade;

A Profa. Dra. Laurecir Gomes, a Kátia Denise de Souza Arcanjo e Francisco Angelo Malatessa que me auxiliaram nas eletroforeses;

Ao Prof. João Semir pelas valiosas sugestões dadas para a escolha da espécie selvagem aqui analisada,

Aos meus irmãos Angela, Daniel e Alexandre e ao Sr. Prado e Dna. Johanna pelo carinho, amizade e incentivo que me proporcionaram;

Aos meus pais Selvílio e Lucila, por tudo o que sou;

A Carmem S. Zickel, pela amizade e incentivo, contribuindo sempre de forma positiva;

A Dna Irma Chamarro SanSeverino, pelas horas agradáveis que passamos juntas durante boa parte da elaboração deste trabalho;

As secretárias e amigas Maria Aparecida da Cunha e Lilliam Alves Senne pelo carinho dispensado a mim e pelos valiosos serviços prestados;

Ao Depto de Biologia Celular e Depto de Fisiologia Vegetal do I.B - UNICAMP, por possibilitarem a realização do presente trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão de bolsa de mestrado;

A Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP -, que através de auxílio financeiro possibilitou a realização de parte deste trabalho com a concessão de Bolsa de Incentivo Acadêmico;

A todos os que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e que por esquecimento meu não foram citados, peço desculpas e os agradeço.

INDICE

1. Introdução.....	01
Objetivos.....	09
2. Material e métodos.....	10
2.1. Determinação da massa e conteúdo	
de Água das sementes	10
2.2. Envelhecimento acelerado.....	11
2.2.1. Tempo Médio de Germinação	12
2.3. Análise do material "in situ".....	13
2.3.1. Fixação e processamento.....	13
2.3.2. Azul de toluidina a pH 4,0 (AT) para a	
detecção de radicais aniônicos e meta-	
cromasia.....	13
2.3.3. Impregnação pela prata para nucléolo.....	14
2.3.4. Métodos para inclusão em Epon e obten-	
ção de cortes semi-finos.....	14
2.3.5. Reação de Feulgen para DNA.....	15
2.3.6. Xylidine Ponceau a pH 2,5 (XP) para a	
detecção de radicais catiônicos.....	15
2.3.7. Reação do Ferricianeto Férrico para	
evidenciar compostos redutores.....	16
2.3.8. Método do PAS para a detecção de polis-	
sacarídeos e glicoproteínas.....	16
2.3.9. Microscopia de polarização.....	17
2.4. Contagem dos grãos de amido.....	17

2.5. Análise bioquímica.....	18
2.5.1. Dosagem de amido.....	18
2.5.2. Extração de proteínas totais e proteínas solúveis em NaCl 0,2M	20
2.5.3. Dosagem do material protéico.....	22
2.5.4. Caracterização do material protéico.....	25
3. Resultados.....	26
3.1. Determinação da massa e conteúdo de água das sementes	26
3.2. Teste de envelhecimento acelerado.....	26
3.3. Métodos citoquímicos de análise.....	38
3.3.1. <i>Phaseolus vulgaris</i>	38
3.3.2. <i>Senna reticulata</i>	48
3.4. Número de grãos de amido por célula de <i>P. vulgaris</i>	58
3.5. Métodos bioquímicos de análise.....	61
3.5.1. Dosagem de amido.....	61
3.5.2. Dosagem de proteínas.....	61
3.5.3. Caracterização do material protéico.....	68
4. Discussão.....	74
4.1. Germinação.....	74
4.2. Análise do material "in situ".....	76
4.2.1. Radicais aniônicos e núcleo	76
4.2.2. Polissacarídeos.....	81
4.2.3. Material protéico.....	84

5. Conclusões.....	93
6. Resumo.....	97
7. Abstract.....	99
8. Referências Bibliográficas.....	101

1. INTRODUÇÃO

A estocagem de sementes foi essencial às mudanças de atividade do homem da caça pastoril para a prática agrícola, o que requereu planejamento, defesa das sementes contra o ataque de pássaros, roedores e microrganismos. As regiões secas do Egito e do Oriente Próximo foram as primeiras a desenvolver civilizações agrícolas. Em outras regiões do mundo, altas temperaturas e umidades relativas tornavam a estocagem mais difícil.

Com o aumento da complexidade das atividades agrícolas, o homem teve que estocar sementes produzidas em anos de alta produtividade a fim de serem utilizadas em anos de baixa produtividade. Mesmo quando estas práticas tinham êxito, sementes cuidadosamente guardadas perdiam sua capacidade germinativa ou vigor, e muito cedo se percebeu que isto se devia, principalmente, a condições adversas de temperatura e umidade. Passou-se então a secar as sementes no sol ou próximas a uma fonte de calor antes de estocá-las em recipientes próprios, em locais frescos e secos (HARRINGTON, 1972).

Práticas como estas são utilizadas ainda hoje por pequenos produtores de todo o mundo, mas, com o advento da agricultura em larga escala, surgiu a necessidade de se compreender a natureza dos processos de envelhecimento das se-

mentes e estabelecer uma metodologia sistemática de estocagem.

Toda semente apresenta um conteúdo de umidade que varia em função da espécie e do tipo de reserva presente na semente (HARRINGTON, 1972). No entanto, esse conteúdo de umidade sofre oscilações de acordo com as variações da umidade relativa do ar no armazém (LOPES, 1990).

Os primeiros sintomas do envelhecimento das sementes são: atraso na germinação, redução na taxa de germinação, incapacidade para germinar nos extremos de seu limite ambiental, maior susceptibilidade ao ataque por microrganismos nesses extremos, crescimento diminuído, mudança na cor, aumento no número de plântulas anormais e baixa sobrevivência no campo, determinando baixa produtividade (CHING & SCHOOLCRAFT, 1968; DELOUCHE, 1968; HARRINGTON, 1972; GRANGE, 1980).

Períodos prolongados de estocagem, em condições não ideais de temperatura e umidade, provocam, além da perda da capacidade germinativa e vigor, danos que podem conduzir à morte celular.

Inúmeras teorias têm procurado explicar o envelhecimento das sementes. Fatores externos, tais como ataque por fungos e irradiação, além de fatores internos, tais como perda de vitaminas e/ou hormônios, acumulação de componentes tóxicos, degradação de ácidos nucleicos, proteínas e membranas (VILLIERS, 1983; CHEAH & OSBORNE,

1978; PARRISH & LEOPOLD, 1978; LEOPOLD, 1983; PRIESTLEY, 1986; DELL'AGUILA, 1987; RAD et alii, 1988) e peroxidação de lipídios (SIMON, 1974; HARMAN & MATTICK, 1976; PRIESTLEY & LEOPOLD, 1979; 1983; PRIESTLEY et alii 1980; STEWART & BEWLEY, 1980; POWELL & MATTHEWS, 1981; WILSON & McDONALD, 1986; PUNTARULO & BOVERIS, 1990) parecem estar envolvidos no fenômeno.

Associada a estes processos, já foi reportada progressiva perda da integridade da membrana plasmática, o que é demonstrada pela perda de eletrólitos do citoplasma para o meio externo, quando as sementes são colocadas em água (ABDUL-BAKI & ANDERSON 1970; PANDEY, 1989a; 1989b; LOPES, 1990). Inúmeros autores têm proposto que a perda de integridade das membranas seja decorrente da peroxidação de seus ácidos graxos insaturados e formação de radicais livres (PARRISH & LEOPOLD, 1978; PRIESTLEY & LEOPOLD, 1979; 1983; PRIESTLEY et alii, 1980; OSBORNE, 1983; GIDROL et alii, 1988; LOPES, 1990).

Um outro evento que ocorre em sementes envelhecidas é a diminuição da atividade respiratória, limitando os processos de síntese, e que pode estar relacionada com menor organização das suas membranas (PARRISH & LEOPOLD, 1978; LEOPOLD & MUSGRAVE, 1980; WOODSTOCK et alii, 1984; AMABLE & OBENDORF, 1986; FERGUSON et alii, 1990). Associadas a esta alteração estão a perda de atividade de desidrogenases mitocondriais (PANDEY, 1989a) e reduzidas taxas de síntese de ATP, com

consequente diminuição dos passos metabólicos da síntese protéica dependentes de ATP e GTP. (ROBERTS & OSBORNE, 1973)

Também foram detectadas, em sementes envelhecidas perda da integridade de RNAm pré-existente presentes no embrião, que é responsável pela síntese protéica nas primeiras horas de embebição (BLOWERS et alii, 1980; OSBORNE, 1983; GIDROL et alii, 1988; PETRUZZELLI & TARANTO, 1989) e alteração na atividade de certas enzimas (LANGRIDGE, 1963; PUNTARULO & BOVERIS, 1990). Sementes de centeio inviáveis apresentam diminuição da síntese protéica e deficiência na síntese de moléculas de RNA de baixo peso molecular (4-5S), sugerindo a ocorrência de lesões bioquímicas em componentes do sistema de síntese proteica e de RNA (OSBORNE, 1983).

Sementes com baixa viabilidade apresentam fragmentação do DNA nuclear e ativação de DNases. A perda de integridade do DNA pode ser responsável por aberrações cromossômicas e diminuição do processo de transcrição (CHEAH & OSBORNE, 1978; BERNSTAM, 1978). Alterações do núcleo e nucléolo, com compactação crescente da cromatina e desagregação do nucléolo também foram detectadas em sementes inviáveis (VILLIERS, 1983; LOPES, 1990) e em cotilédones em processo de abscisão (CORTELAZZO, 1989) sugerindo que esses tecidos encontram-se em estágio de deterioração e morte celulares (SANCHEZ-LUCAS, 1959).

As sementes podem ser classificadas como sementes ortodoxas ou recalcitrantes. Sementes ortodoxas são aquelas que

podem secar na planta mãe ou no ambiente, até atingir um baixo conteúdo de umidade, podendo ser armazenadas secas por longos períodos de tempo, sem que ocorra perda da sua capacidade germinativa e vigor. Sementes recalcitrantes não secam na planta de origem e apresentam um valor crítico alto para o seu conteúdo de umidade, morrendo abaixo desse valor. Essas sementes apresentam longevidade curta, mesmo quando armazenadas sob condições de alta umidade relativa (ROBERTS, 1973).

A longevidade das sementes varia em função da sua espécie e das condições de armazenamento. Alto teor de oxigênio tende a apressar a perda da viabilidade, principalmente em condições de alta umidade. Altos teores de gás carbônico e nitrogênio podem retardar a deterioração em algumas circunstâncias, mas esses efeitos são menores quando comparados com os efeitos decorrentes da **temperatura e umidade** (HARRINGTON, 1972; MAYER & POLJAKOFF-MAYER, 1982).

Estes dois últimos parâmetros são considerados como os principais determinantes da perda total ou parcial da viabilidade (SILVA & DIAS, 1985; ELLIS et alii, 1987). Segundo HARRINGTON (1972), para um aumento de 1% na sua umidade, a semente tem sua vida reduzida à metade. Esta regra só é válida na faixa de umidade de 5 a 14%. Abaixo de 5%, o envelhecimento pode se acelerar devido a auto-oxidação dos lipídios; e acima de 14% a semente pode ser destruída por fungos e por um aumento da sua taxa respiratória. Da

mesma forma, um acréscimo de 5°C na temperatura da semente também reduz pela metade a sua vida. Os dados até agora disponíveis mostram que esta regra é válida na faixa de 0 a 50°C. As duas regras mencionadas aplicam-se independentemente.

De fato, observa-se uma redução na respiração, e em outros processos metabólicos, em sementes mantidas sob condições controladas de umidade e temperatura, o que promove uma melhor manutenção da sua capacidade germinativa e vigor (HARTMAN & KESTER, 1975).

Condições de temperatura e umidade relativa adequadas são características próprias de cada espécie (DELOUCHE & POTTS, 1974), o que dificulta o estabelecimento de condições padrão para o armazenamento.

Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) são classificadas como ortodoxas e apresentam grande susceptibilidade à rápida perda da sua capacidade germinativa e vigor quando estocadas sob condições de alta temperatura e umidade.

Após a colheita, sementes desta espécie apresentam alto teor de umidade, o que determina uma atividade respiratória alta (LOPES, 1990). Portanto estas sementes devem ser previamente secas, fumegadas e estocadas de forma conveniente. Segundo TOOLE (1973), sementes de *P. vulgaris* devem ser estocadas com 11% de umidade a 21°C, no entanto, com o aumento da temperatura para 26,5°C a umidade deverá ser reduzida para 8%.

LOPES (1990), trabalhando com envelhecimento natural de sementes de *P. vulgaris*, verificou que o tempo de armazenamento, associado às oscilações de temperatura e umidade relativa elevadas, afetou o vigor e a capacidade germinativa. Paralelamente, foram detectadas várias alterações bioquímicas e citoquímicas. Essas sementes apresentaram diminuição na quantidade de macromoléculas e aumento de micromoléculas, menor resistência à entrada de água, maior efluxo de eletrólitos e solutos orgânicos e aumento nos níveis de peróxidos.

Além dessas alterações bioquímicas, foram encontradas alterações celulares. Sementes com baixa viabilidade, quando comparadas com sementes com alta viabilidade, apresentaram aumento no grau de compactação cromatínica; alterações no volume nuclear, com o aumento no número de núcleos picnóticos; alterações nucleolares; redução na quantidade de material proteico; redução na quantidade de grãos de amido e rompimento de paredes e membranas celulares do cotilédone.

Senna reticulata (Willdenow) Irwin & Barneby é uma espécie amazônica pioneira que produz uma abundante quantidade de sementes que secam na vagem e apresentam testa dura, sendo provavelmente ortodoxas. Ocorre em clareiras e bordas de matas, especialmente em ambientes alagados como margens de rios, barrancas e remansos (IRWIN & BARNEBY, 1982). Além de ser uma espécie de fácil obtenção, é um rico material de

estudos, tanto do ponto de vista morfológico quanto fisiológico.

O estudo de uma espécie selvagem justifica-se, sob o ponto de vista de pesquisa básica, pelo fato de que pouco se conhece sobre os biomas brasileiros e a biologia de suas espécies. É sabido que a sobrevivência de sementes de uma espécie vegetal influencia a dinâmica de suas populações e da comunidade à qual ela pertence (WATKINSON, 1986).

O estudo dos processos bioquímicos e citoquímicos que ocorrem em sementes, durante a estocagem, pode ser de fundamental importância para a prática de estocagem de colheitas, para a ecologia vegetal no que diz respeito à dinâmica de populações e também para a estocagem de germoplasma em banco de sementes (HARRINGTON, 1972; VILLIERS, 1983).

Assim, não sendo possível melhorar a qualidade das sementes durante seu armazenamento, deve-se controlar a deteriorização das mesmas através do manejo conveniente durante o período de estocagem. Portanto, o conhecimento da existência de um padrão de eventos celulares, que possam ocorrer durante o envelhecimento de sementes cultivadas e selvagens, pode ser utilizado com proveito na avaliação da viabilidade de sementes estocadas.

O envelhecimento acelerado é uma técnica utilizada na previsão do potencial de armazenamento de lotes de sementes, sendo também eficiente na comparação do vigor dos mesmos (DELOUCHE, 1968). A técnica consiste em manter as sementes

em condições de altas temperaturas e umidade relativa, por certo período de tempo, que varia em função da espécie. Este tratamento não resulta em uma mera extrapolação do envelhecimento em condições normais de estocagem. As diferenças entre envelhecimento natural e acelerado são muito mais de ordem quantitativa que qualitativa (VILLIERS, 1983).

Neste trabalho, optou-se pela técnica de envelhecimento acelerado, em função da sua praticidade referente aos recursos materiais requeridos e o reduzido tempo de execução.

Assim, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Verificar comparativamente as alterações celulares durante a perda de viabilidade em sementes de duas espécies de leguminosas, sendo uma selvagem (*Senna reticulata*) e uma espécie geneticamente melhorada e de interesse econômico (*Phaseolus vulgaris*), que ocorrem em condições de envelhecimento acelerado em períodos crescentes de tempo.
2. Verificar a existência ou não de um padrão de eventos celulares durante o envelhecimento dessas sementes, através de análises topoquímicas e bioquímicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes quiescentes de *Phaseolus vulgaris*, variedade carioca 80 S.H., provenientes da Estação Experimental de Votuporanga do Instituto Agronômico de Campinas - IAC e sementes quiescentes de *Senna reticulata* provenientes do campus da UNICAMP. Ambas as espécies foram coletadas em agosto de 1989 e armazenadas sob refrigeração a 4°C.

2.1. Determinação da massa e conteúdo de água das sementes:

As sementes foram caracterizadas quanto à sua massa de matéria fresca e seca. Para cada uma das espécies, determinou-se a massa fresca de 1000 sementes em balança analítica Marte A200 com 3 casas decimais. A massa de matéria seca foi determinada do mesmo modo, após os materiais permanecerem a 80°C por 48 horas em estufa FANEM, com circulação de ar.

O teor de água das sementes foi calculado com base na sua massa fresca e seca, através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{massa fresca} - \text{massa seca}}{\text{massa fresca}} \times 100$$

2.2. Envelhecimento Acelerado:

Para cada espécie, 4 amostras de 50 sementes foram colocadas em "gerbox" adaptada para teste de envelhecimento acelerado e mantidas em estufa a aproximadamente 42°C e 100% de umidade relativa (DELOUCHE & BASKIN, 1973) por 24, 48, 72, 96, 144, 192 e 384 horas, para posterior teste de germinação. Simultaneamente, foram envelhecidas sementes para análise bioquímica e citoquímica.

A seguir, as sementes foram submetidas a testes de germinação em rolos de papel de filtro umedecido (*P. vulgaris*) ou em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido (*S. reticulata*), à temperatura ambiente, no escuro. Diariamente as sementes germinadas eram contadas e descartadas. O teste era finalizado apenas após dois dias sem germinação. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam protrusão da radícula.

Embora a temperatura não tenha sido controlada durante os testes de germinação, aceitamos para fins práticos que ela tenha se mantido constante. Este pressuposto justifica-se pelo fato de que os testes foram realizados em um pequeno intervalo de tempo (junho a julho) em ambiente fechado. Na sala onde foram realizados os testes foram colocados, próximo aos mesmos, aparelhos STERILAR com o objetivo de diminuir a contaminação por fungos.

Precedendo-se aos testes de envelhecimento acelerado e de germinação, sementes de *S. reticulata* foram imersas, por 2 min, em solução de Micostatin 100 u/ml a 100°C, a fim de se romper a testa e quebrar a dormência da semente, possibilitando sua embebição e consequente germinação (METIVIER, 1986). O Micostatin é um fungicida que foi utilizado com a finalidade de impedir o ataque por fungos durante os testes de envelhecimento e germinação.

Após o envelhecimento acelerado, sementes de ambas as espécies foram fixadas, desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol (de 70 a 100%), diafanizadas em xilol por 15 min e mantidas em óleo de cedro por, no mínimo, 14 dias (POLICARD et alii, 1957) para posterior análise citoquímica.

Adicionalmente, 4g de sementes de *S. reticulata* e 10g de sementes de *P. vulgaris*, submetidas ao envelhecimento acelerado, nos referidos tempos, foram estocadas a -20°C para posterior análise bioquímica de suas reservas.

2.2.1. Tempo Médio de Germinação

O tempo médio de germinação (TMG) foi calculado com base no número de sementes que germinaram a cada dia, segundo a seguinte fórmula (ELLIS & ROBERTS, 1981):

$$TMG = \Sigma(nt) / \Sigma n$$

onde: n = número de sementes que germinaram no tempo t

2.3. Análise do material "in situ"

2.3.1. Fixação e Processamento

As sementes foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de potássio 0,1M a pH 7,0 e glutaraldeído a 2,5% (PF) durante 48 horas a 5°C (KIERNAN, 1981) ou em etanol e ácido acético 3:1 v/v durante 30 min a temperatura ambiente (McLUNG, 1967). Para a impregnação pela prata, o método de fixação utilizado está descrito juntamente com a metodologia.

Após a fixação, os materiais foram desidratados, diafanizados em xilol e mantidos em óleo de cedro, conforme descrito anteriormente. Os materiais foram então incluídos em parafina e seccionados com 8 µm de espessura em micrótomo R.Jung-Heidelberg, sendo a seguir desparafinizados e reidratados.

2.3.2. Azul de Toluidina a pH 4,0 (AT) para a detecção de radicais aniônicos e metacromasia

Os materiais fixados em PF foram corados com AT 0,025% em tampão McIlvaine a pH 4,0, durante 15 min, a temperatura ambiente, seguindo-se 3 banhos rápidos em água destilada, secagem ao ar, diafanização em xilol por 10min e montagem em bálsamo do Canadá (VIDAL, 1977).

2.3.3. Impregnação pela prata para nucléolo

Os materiais foram fixados em uma mistura 1:1 de formol a 10% e hidroquinona 1% durante 1 hora e 30 minutos, a temperatura ambiente, seguindo-se um mínimo de 3 banhos em água destilada por 1 hora. A seguir foram colocados em solução de nitrato de prata a 2% em estufa FANEN a 70°C, no escuro, durante 16 horas e lavados em água destilada durante 1 hora (3x). Após a lavagem, os materiais foram deixados na mesma solução fixadora por 1 hora, e novamente lavados 3x em água destilada por 1 hora (RISUENO et alii, 1976).

Os materiais foram então incluídos em parafina e seccionados em micrótomo com 8 µm de espessura, desparafinizados e montados em bálsamo do Canadá.

Parte dos materiais foram contracolorados com AT a pH 4,0, como descrito no item anterior.

2.3.4. Método para inclusão em Epon e obtenção de cortes semi-finos

Sementes de *S. reticulata* e *P. vulgaris*, envelhecidas por 0, 96, 192 e 384 horas, submetidos à impregnação pela prata para nucléolo, como descrito no item acima, foram desidratadas em soluções crescentes de etanol (50, 75, 95 e 100°GL). Após desidratação, os materiais foram imersos em solução de acetona P.A./etanol 100°GL, por 5 min, e então colocados em acetona P.A. durante 5 min, por 3 vezes.

Os materiais foram então embebidos em solução de Epon/acetona (1:1), durante 16 horas, em recipiente aberto e à temperatura ambiente. A seguir, procedeu-se à inclusão em Epon e a polimerização ocorreu em estufa FANEN a 60°C, por 72 horas (GLAUERT, 1975).

Cortes semi-finos, com aproximadamente 0,2 µm de espessura, foram obtidos em ultra-micrótomo LKB ULTRATOME III e montados em bálsamo do Canadá.

2.3.5. Reação de Feulgen para DNA

Os cortes obtidos dos materiais fixados em etanol e ácido acético 3:1 v/v foram submetidos a hidrólise com HCl 4N, por 1h e 30 min, a temperatura ambiente; a seguir foram lavados em água destilada, imersos em reativo de Schiff (LILLIE, 1954) durante 40 min, lavados 3 vezes durante 5 min cada, em água sulfurosa (1 parte de HCl 1N, 1 parte de metabissulfito de sódio a 10% e 18 partes de água destilada). Os materiais foram então desidratados em etanol 95 e 100%, durante 2 min cada, diafanizados em xilol por 10 min e montados em bálsamo do Canadá (MELLO & VIDAL, 1980).

2.3.6. Xylidine Ponceau a pH 2,5 (XP) para a detecção de radicais catiônicos

Os materiais fixados em PF e processados como descrito em 2.3.1. foram corados por 15 min à temperatura ambiente com solução aquosa de ácido acético a 3% e Xylidine Ponceau

0,1%, pH 2,5, seguindo-se lavagem em ácido acético a 3%, durante 30 min, água destilada por 5 min, desidratação em etanol a 95 e 100% (5 minutos cada), diafanização em xilol por 10 min e montagem em bálsamo do Canadá (VIDAL, 1970).

2.3.7. Reação do ferricianeto férrico para evidenciar compostos redutores

Cortes dos materiais fixados em PF foram desparafinizados e lavados em água destilada.

A seguir, foram tratados durante 10 min com 10 ml de solução de ferricianeto de potássio, 75 ml de cloreto férrico a 1% e 15 ml de água destilada.

Os cortes foram então lavados em ácido acético a 1% e montados em óleo de cedro (LILLIE, 1951 apud LISON, 1960)

2.3.8. Método de PAS para detecção de polissacarídeos e glicoproteínas

Os cortes dos materiais fixados com etanol e ácido acético 3:1 v/v foram oxidados durante 10 min em ácido periódico a 0,5%, lavados em água, imersos em reativo de Schiff (LILLIE, 1954), por 8 min, lavados em água sulfurosa como descrito em 2.3.5., desidratados em etanol com concentrações crescentes até 100%, seguindo-se diafanização em xilol por 10 min e montagem em Bálsamo do Canadá (MAIA, 1979).

Como controle do método, as lâminas contendo os materiais analisados foram imersas em Reativo de Schiff, sem terem sido oxidadas pelo ácido periódico, procedendo-se as demais etapas desse método, como descrito acima.

2.3.9. Microscopia de polarização

Para a detecção da birrefringência dos grãos de amido e das paredes celulares, cortes dos cotilédones das sementes, submetidas aos vários tempos de envelhecimento acelerado, foram analisados em microscópio de polarização POL ZEISS, com analisador e polarizador cruzados.

2.4. Contagem dos Grãos de Amido

A fim de se determinar o número médio de grãos de amido por célula do parênquima cotiledonar, em cada um dos tempos analisados, procedeu-se à contagem do número total de grãos em 50 dessas células em *P. vulgaris*. Foram escolhidos 10 campos ao acaso. Em cada um deles, foram contados os grãos de amido de 5 células localizadas nos extremos e no centro de uma letra "X" imaginária.

2.5. Análise Bioquímica

Foram realizadas dosagens de amido pelo método de antrona (McCREADY et alii, 1950)

As dosagens do conteúdo protéico foram realizadas utilizando-se o método do Coomassie Blue (BRADFORD, 1976).

Foram ainda determinados os perfis eletroforéticos dos diversos materiais protéicos, a partir de eletroforeses em gel de poliacrilamida, em tampão redutor e não redutor.

2.5.1. Dosagem de amido

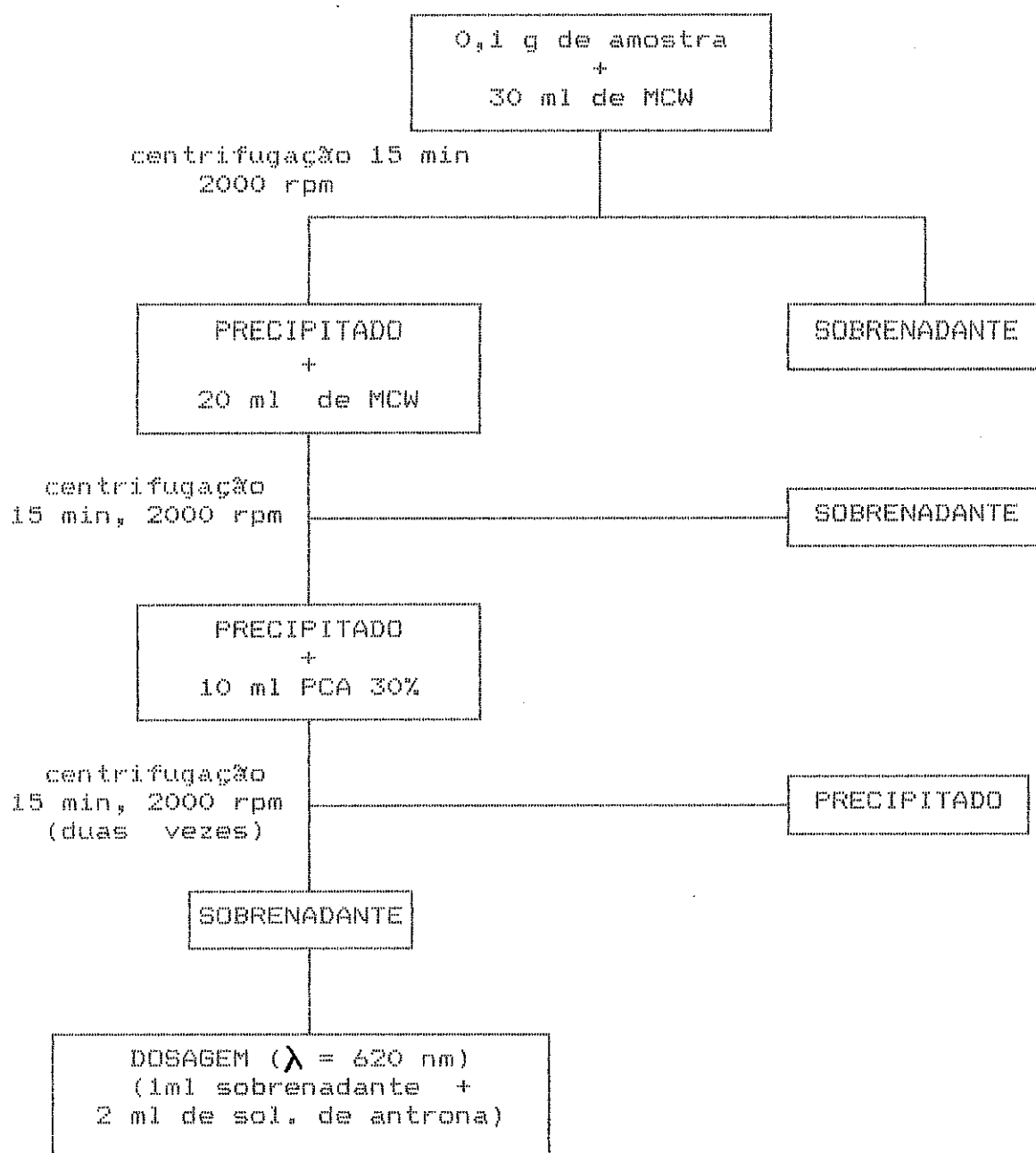
Para as dosagens de amido foram utilizados cotilédones de sementes com 0, 24, 48, 72, 96, 144, 192 e 384 horas de envelhecimento.

Foram utilizadas 3 amostras com 0,1g dos materiais. Após maceramento, os materiais foram colocados em 30ml de uma mistura de metanol, clorofórmio e água (MCW), na proporção 12:5:3 v/v segundo adaptação de SHANNON (1968). Após homogeneização, os materiais foram centrifugados em centrífugador International por 15 min a 2000 rpm, os precipitados ressuspensos em 20ml de MCW e novamente centrifugados nas mesmas condições

Após as centrifugações, os sobrenadantes foram descartados e o precipitado ressuspensionado com ácido perclórico a 30% (PCA) (McCREADY et alii, 1950), sendo a seguir centrifugado durante 15 min a 2000 rpm, por 2 vezes. Os precipitados

ESQUEMA 01

EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE AMIDO



foram descartados e os sobrenadantes foram utilizados para as dosagens (Esquema 1)

As dosagens de amido foram realizadas com o reagente de antrona, obtido a partir da mistura de 200mg de antrona (Sigma) em 100ml de ácido sulfúrico a 95% (McCREADY et alii, 1950). Foram adicionados, em tubo de ensaio, 2ml do reagente de antrona a 1ml dos sobrenadantes obtidos. Após agitação, os tubos foram aquecidos e mantidos em água fervente por 5 min (SCOTT & MELVIN, 1953).

Após o resfriamento, foram efetuadas leituras das absorbâncias a 620 nm em espectrofotômetro SPEKTROMOM 1950. Quando necessário, foram realizadas diluições das amostras com água destilada (Esquema 01).

Os resultados das leituras foram confrontados com a curva padrão construída a partir de soluções aquosas de glicose com 10, 30, 50, 70 e 100 ug/ml e multiplicados pelo fator 0,9 para a conversão a amido (McCREADY et alii, 1950).

2.5.2. Extração de proteínas totais e proteínas solúveis em NaCl 0,2M

Os extratos totais foram obtidos a partir de 2g de farinha (0 h de envelhecimento acelerado) ou do homogeneizado das sementes (24, 48, 72, 96, 144, 192 e 384 hs de envelhecimento acelerado) de *S. reticulata*. A essa massa foram adicionados 20ml de NaOH 0,1N, centrifugando-se essa mistura durante 15 min a 2000 rpm por 3 vezes. Os precipitados foram

então descartados e ácido perclórico(PCA) foi adicionado aos sobrenadantes até uma concentração final de 5% de PCA. Após centrifugação, os precipitados e sobrenadantes foram recolhidos separadamente e estocados a -20°C (Esquema 02).

Foram ainda realizadas extrações das albuminas e globulinas presentes nas sementes em todos os tempos, a partir de 2g da farinha (tempo 0) ou dos homogeneizados das sementes (24, 48, 72, 96, 144, 192 e 384 hs de envelhecimento acelerado) de *P.vulgaris* e *S.reticulata*.

A extração realizou-se com 50ml de NaCl 1M em tampão fosfato 0,05M a pH 7,4. A seguir, os materiais foram centrifugados durante 15 min 2000 rpm. Os precipitados foram resuspendidos em 50ml de NaCl e novamente centrifugados nas mesmas condições por 2 vezes. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes contendo as subfrações de albuminas e globulinas foram dializados em solução de NaCl 0,2M por 24 horas a 5°C .

Os dializados foram centrifugados durante 10 min a 12.000 rpm. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes estocados a -20°C (Esquema 03).

2.5.3. Dosagem do material protéico

As dosagens dos materiais protéicos foram realizadas segundo método do Coomassie Blue (BRADFORD, 1976).

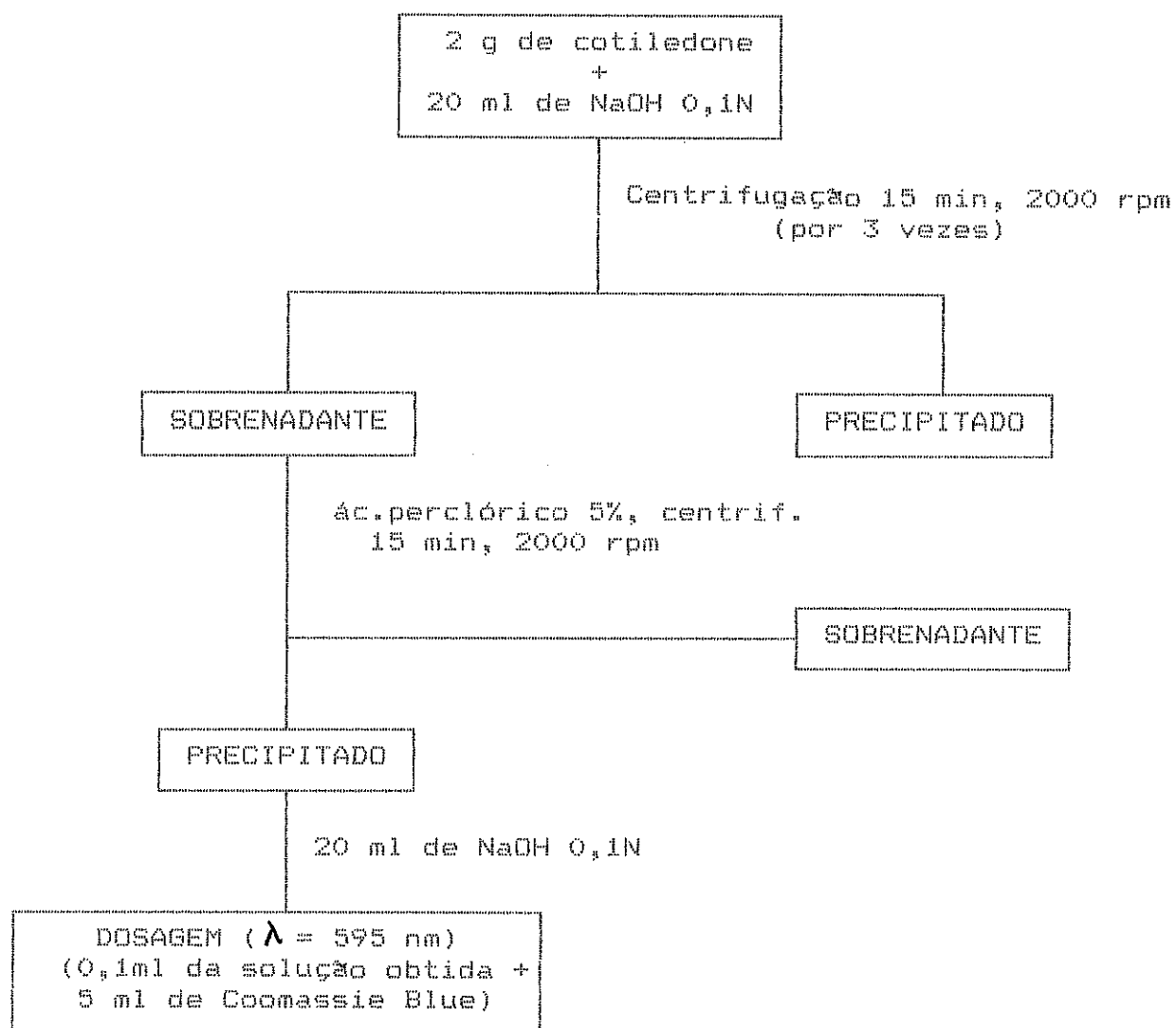
A solução de Coomassie Blue para as dosagens foi preparada com 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma B-1131) em 50 ml de etanol a 95%. A esta solução, acrescentou-se 100 ml de ácido ortofosfórico a 85% e, a seguir, completou-se o volume para 1000 ml, com água destilada.

Para o cálculo das dosagens, foi construída uma curva padrão, a partir dos valores das absorbâncias em 595 nm, lidas em soluções de BSA, contendo 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg dessa proteína/ml.

Foram realizadas 3 repetições de cada dosagem a partir de 0,1 ml de cada solução e 5 ml da solução de Coomassie Blue, com as absorbâncias sendo lidas após 2 min, em $\lambda = 595$ nm (Esquema 02)

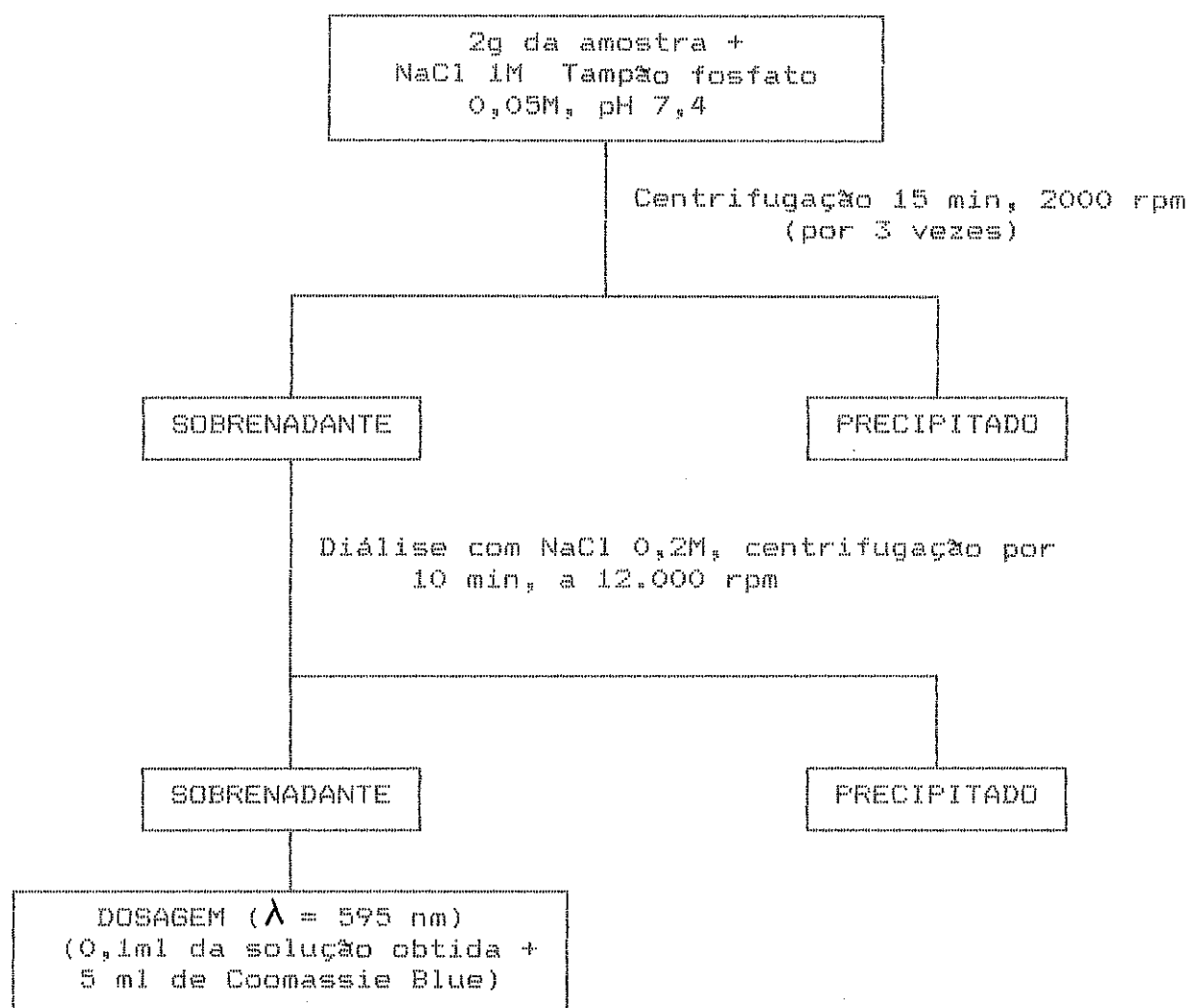
ESQUEMA 02

EXTRAÇÃO E DOSAGEM DO MATERIAL PROTEICO TOTAL



ESQUEMA 03

EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS EM NaCl 0,1 M



2.5.4. Caracterização do material protéico

Após as dosagens, as sub-frações protéicas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (ZINGALES, 1984).

Foram aplicados 40 µl dos extratos obtidos em gel de poliacrilamida a 12,5%, preparadas em tampão redutor (Tampão Tris-HCl 62 mM, pH 6,8; SDS 2%; Glicerol 10%; EDTA 10 mM; Azul de Bromofenol 0,01% e 2-Mercaptoetanol 0,2%), ou em tampão não redutor (idêntico ao anterior, mas sem 2-Mercaptoetanol).

Antes da aplicação, as amostras foram fervidas por 3 minutos. O tampão de corrida utilizado foi Tris 2 mM, Glicina 190 mM e SDS 0,1% (GOMES, 1988). As condições de corrida foram 25mA e 100V. Foram analisados em paralelo padrões de peso molecular (Sigma) contendo miosina (PM = 205.000), b-galactosidase (PM = 116.00), fosforilase-b (PM = 97.400), albumina bovina (PM = 66.000), ovalbumina (PM = 45.000) e anidrase carbônica (PM = 29.000).

Após a corrida os géis foram submetidos à coloração pelo Coomassie Blue R-250 a 2%. Para a descoloração foi utilizada solução contendo metanol a 50% e ácido acético a 10%. Os géis foram deixados por, pelo menos dois dias, em solução aquosa de glicerol a 3% e metanol a 50% em geladeira (BLUM et alii, 1987), sendo posteriormente fotografados.

3. RESULTADOS

3.1. Determinação da massa e conteúdo de água das sementes

A massa seca e fresca das sementes das duas espécies utilizadas no presente trabalho encontram-se descritos na tabela 1. Pode-se notar que a massa fresca das sementes de feijão é cerca de 15 vezes maior que a encontrada nas sementes de *S. reticulata*. Em termos de umidade as sementes de feijão apresentaram 10,1% e em *S. reticulata* esse valor foi de 12,5%.

3.2. Teste de Envelhecimento Acelerado

A partir dos resultados dos testes de germinação obtidos, após 0, 24, 48, 72, 96, 144 e 192 e 384 horas de envelhecimento acelerado, foram construídas curvas de germinação para *P. vulgaris* (Fig. 1).

Sementes quiescentes de *P. vulgaris*, não submetidas ao envelhecimento (0 horas), apresentaram aproximadamente 23% de germinação com 24 horas de embebição, e alcançaram 100% de germinação no segundo dia, o que dá um tempo médio de germinação de 42,7 horas (Fig. 1, Tab.2).

Após 24 horas de envelhecimento, notou-se um aumento na velocidade de germinação, sendo que 76% das sementes germi-

Tabela 1: Caracterização das sementes quiescentes de *Phaseolus vulgaris* e *Senna reticulata*.

Descrição	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. reticulata</i>
Massa fresca (MF)(g)	0,2380±0,002	0,0160±0,0002
Massa seca (MS)(g)	0,2140±0,002	0,0140±0,0002
Teor de água (%)	10,08±1,58	12,50±2,31

Obs.: Os valores representam a média de 1000 sementes e respectivos intervalos de confiança a 5%.

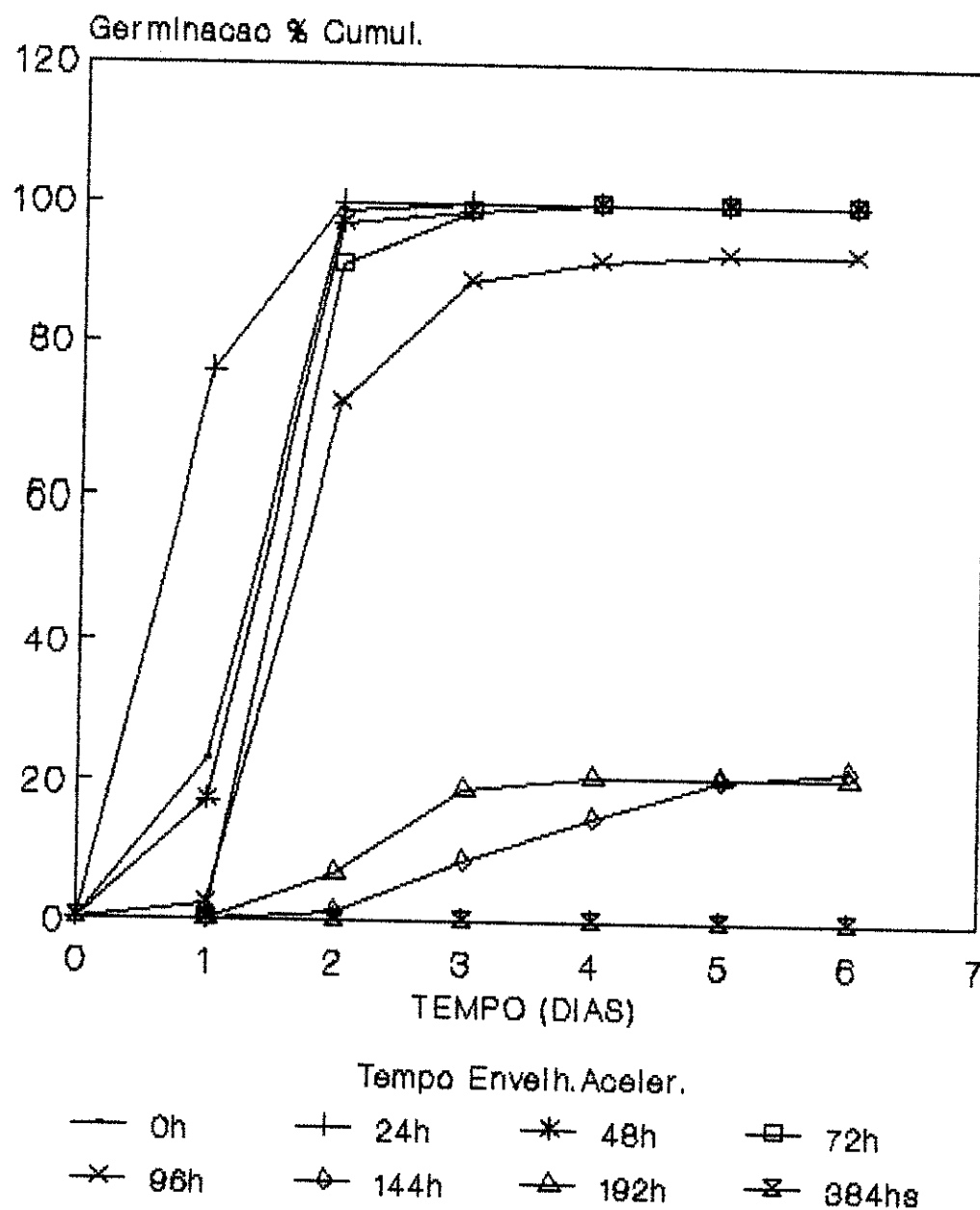


Fig.1 - Curvas de Germinacao de P.vulgaris em Diversos Tempos de Envelhecimento Acelerado (Medias de 4 amostras de 50 sementes)

Tabela 2: Testes de Germinação de *P. vulgaris* Para Vários Tempos de Envelhecimento Acelerado.

TEMPO DE ENVELHECIMENTO (h)	GERMINAÇÃO FINAL (%)	TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (h)
0	100,0 ± 0	42,7 ± 1,5
24	100,0 ± 0	29,9 ± 1,4
48	98,0 ± 4,8	44,8 ± 1,5
72	100,0 ± 0	50,2 ± 1,0
96	93,0 ± 9,1	54,5 ± 2,2
144	21,9 ± 10,1	95,3 ± 9,0
192	20,5 ± 27,5	65,6 ± 4,5
384	0	

Obs.: Os valores representam as médias de 4 repetições de 50 sementes cada ± intervalo de confiança a 5%.

naram com apenas 24 horas de embebição (Fig. 1), o tempo médio de germinação foi reduzido para 29,9 horas (Tab. 2).

A tendência geral, todavia, foi a de uma germinação mais lenta, à medida que o tempo de envelhecimento avançou. Com efeito, o tempo médio de germinação aumentou linearmente em função do tempo de envelhecimento no intervalo considerado, conforme mostra a linha da regressão na Fig. 2 ($r = 0,729$; $F = 29,52$; $p \approx 0$), ou mesmo o deslocamento das curvas de germinação para a direita na Fig. 1.

A capacidade germinativa de *P. vulgaris* manteve-se constante até 96 h de envelhecimento. A viabilidade registrada neste tempo (93,0%) não diferiu significativamente de 100% ($t = 2,26$; $p = 0,11$). A partir de 144 h, observou-se uma queda acentuada do percentual de sementes germinadas, declínio que prossegue até a perda completa da viabilidade em 384 h de envelhecimento acelerado (Tab. 2).

As curvas de germinação em *S. reticulata* foram construídas a partir dos resultados dos testes obtidos após 0, 24, 48, 72, 96, 144, 192 e 384 horas de envelhecimento (Fig. 3).

As sementes de *S. reticulata* não mostraram qualquer tendência a germinar mais lentamente com o aumento do tempo de envelhecimento. Ao contrário, os tempos médios de germinação flutuaram em torno de um valor constante, independente do tempo de envelhecimento, não havendo correlação significa-

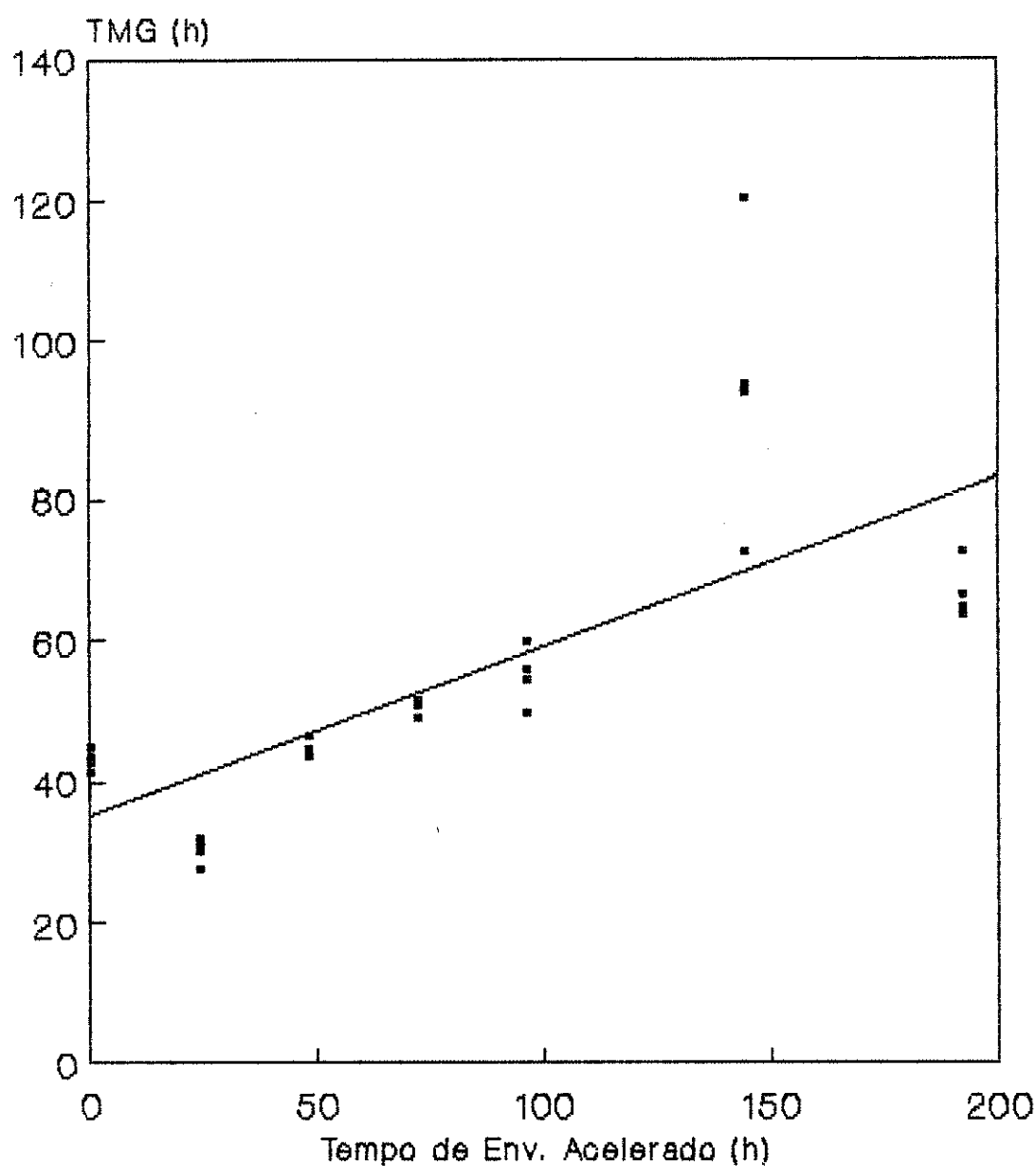


Fig.2 - Tempo Medio de Germinacao (TMG) em Funcao do Tempo de Envelhecimento Acelerado em P.vulgaris ($r = 0,729$; $p < 0,0001$)

Cada ponto e' a media de um rolo

tiva entre estas duas variáveis (Tab.3; Fig.4: $r = 0,15$; $F = 0,988$; $p = 0,414$).

Todavia observou-se uma tendência ao aumento da germinação final, após 24 e 48 h de envelhecimento, bem como uma tendência à redução do tempo médio de germinação nesses períodos (Tabela 3).

Pelos perfis obtidos, pode ser notada uma manutenção da capacidade germinativa dessa espécie até 192 h de envelhecimento acelerado. As oscilações na viabilidade das sementes, até este tempo, não são significativas (Teste de Tukey sob $p < 0,05$; diferença crítica entre duas médias = 26,22). Apenas sob 384 h de envelhecimento, verificou-se uma redução significativa no percentual de sementes germinadas (Fig. 3, Tabela 3).

A observação comparativa do comportamento da germinação cumulativa final das espécies utilizadas demonstrou uma queda acentuada, que ocorre em 144 h de envelhecimento em *P.vulgaris* e apenas em 384 h para *S.reticulata* (Figs. 5 e 6).

A partir de 96 h de envelhecimento, sementes consideradas germinadas de *P.vulgaris* apresentaram crescimento anômalo de raiz e lesões de cor negra na extremidade das mesmas. Com 384 h de envelhecimento, o tegumento apresentou-se seco e quebradiço. Em *S.reticulata* estas alterações só foram verificadas após 144 h de envelhecimento acelerado.

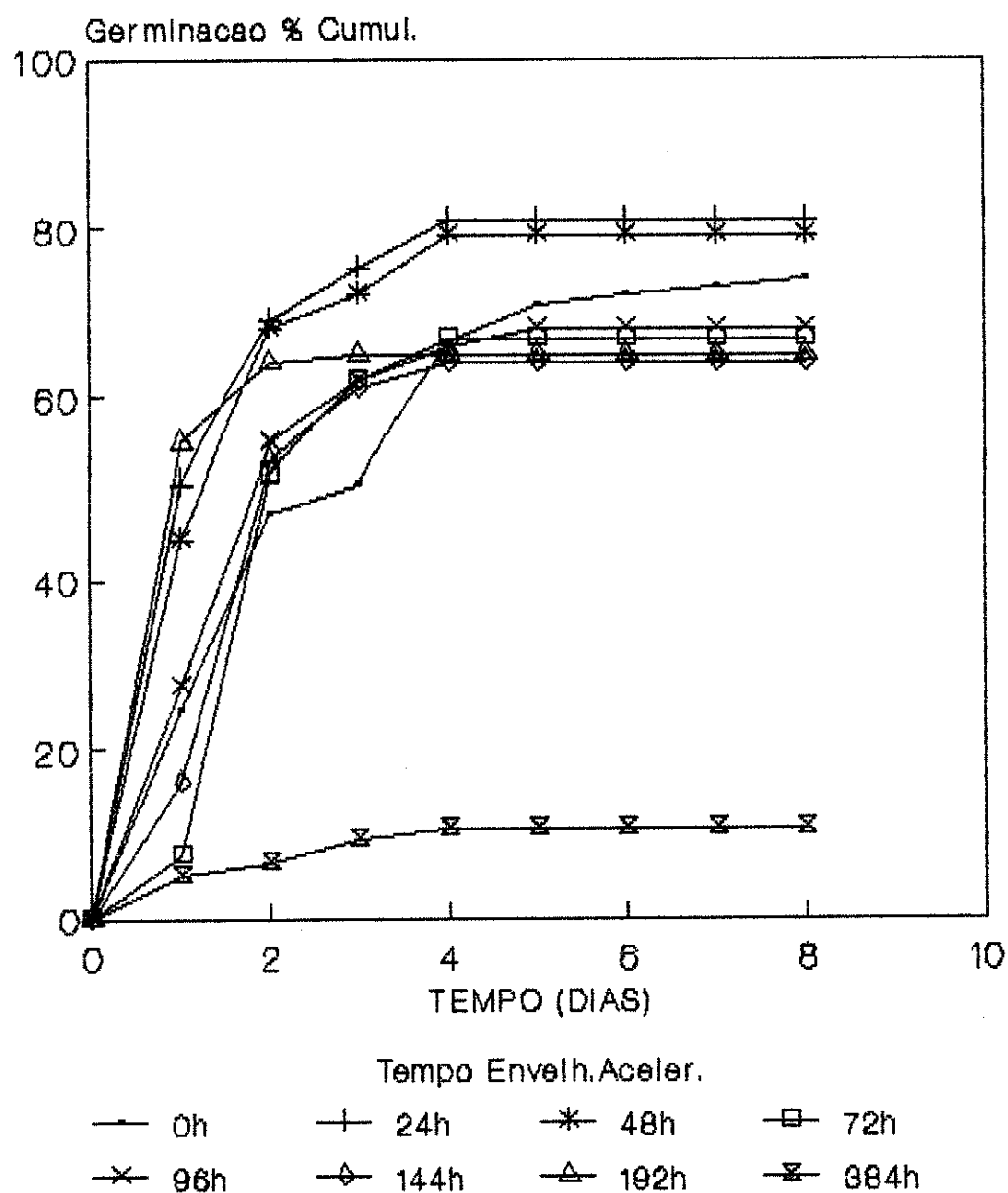


Fig.3 - Curvas de Germinacao de *S.reticulata* em Diversos Tempos de Envelhecimento Acelerado (Medias de 4 Amostras de 50 sementes)

Tabela 3: Testes de Germinação de *S. reticulata* Para Vários Tempos de Envelhecimento Acelerado.

TEMPO DE ENVELHECIMENTO (h)	GERMINAÇÃO FINAL (%)	TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (h)
0	70,5 ± 5,4	60,8 ± 6,5
24	80,5 ± 9,9	37,9 ± 3,4
48	86,0 ± 7,8	46,3 ± 4,6
72	66,0 ± 30,4	52,4 ± 3,0
96	68,4 ± 14,9	45,7 ± 4,1
144	64,5 ± 30,6	57,6 ± 3,4
192	65,0 ± 12,3	28,1 ± 1,7
384	10,5 ± 5,4	48,0 ± 12,0

Obs.: Os valores representam as médias de 4 repetições de 50 sementes cada ± intervalos de confiança a 5%.

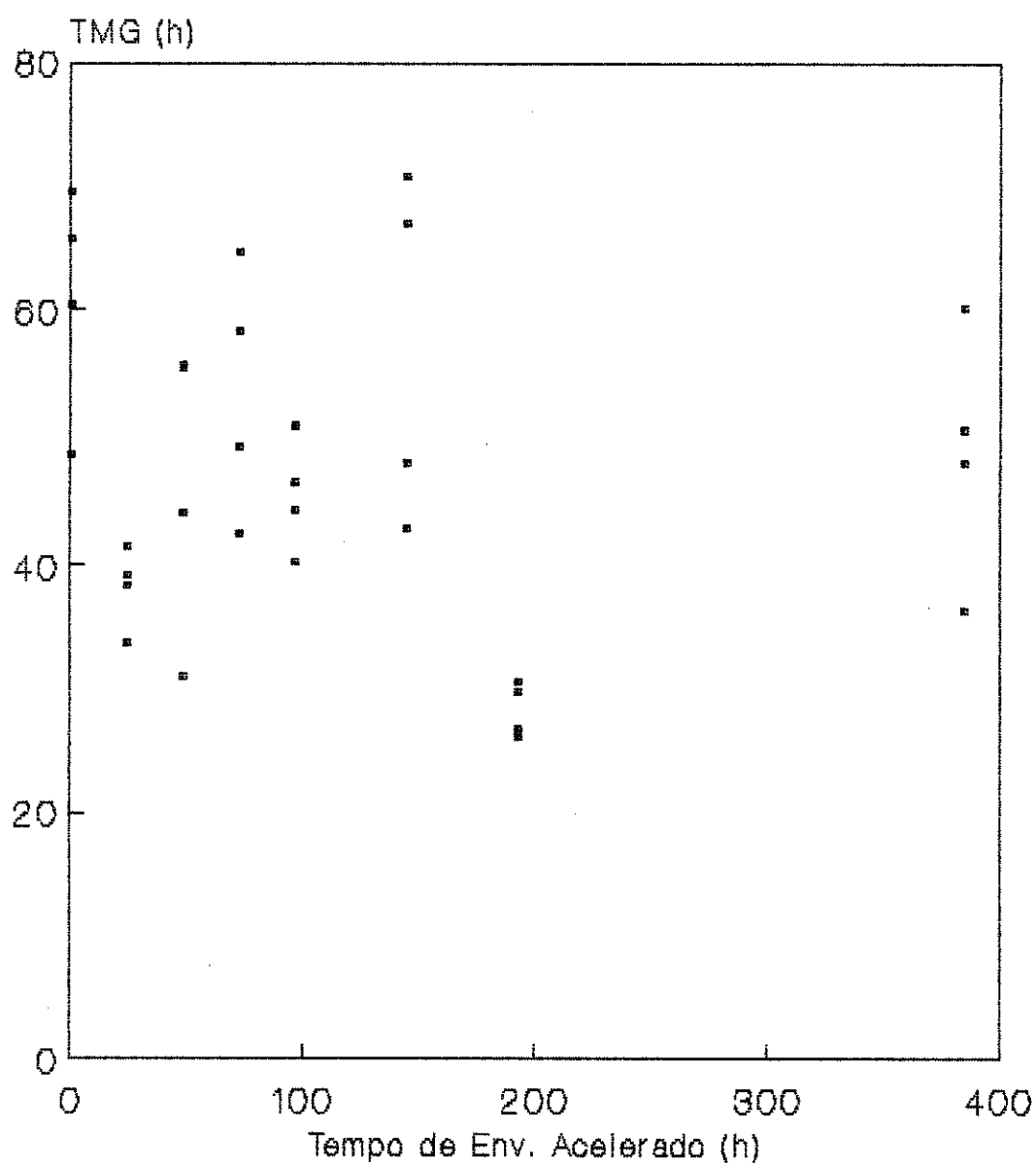


Fig.4 - Tempo Medio de Germinacao (TMG) em Funcao do Tempo de Envelhecimento Acelerado em *S.reticulata* ($r = 0,16$; $p = 0,414$)

Cada ponto e' a media de uma placa

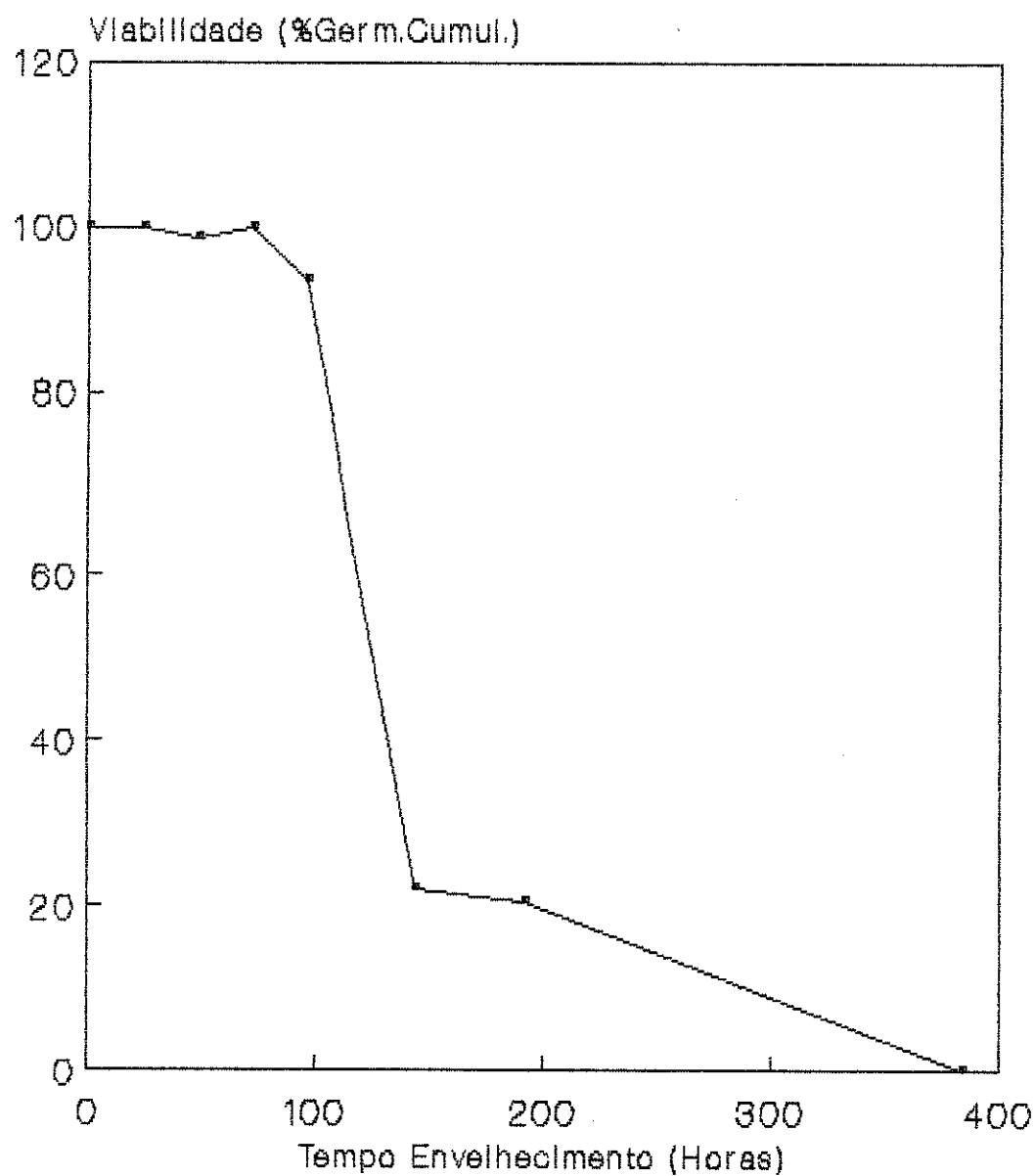


Fig.6 - Germinacao Cumulativa Final em P.vulgaris em Funcao do Tempo de Envelhecimento Acelerado

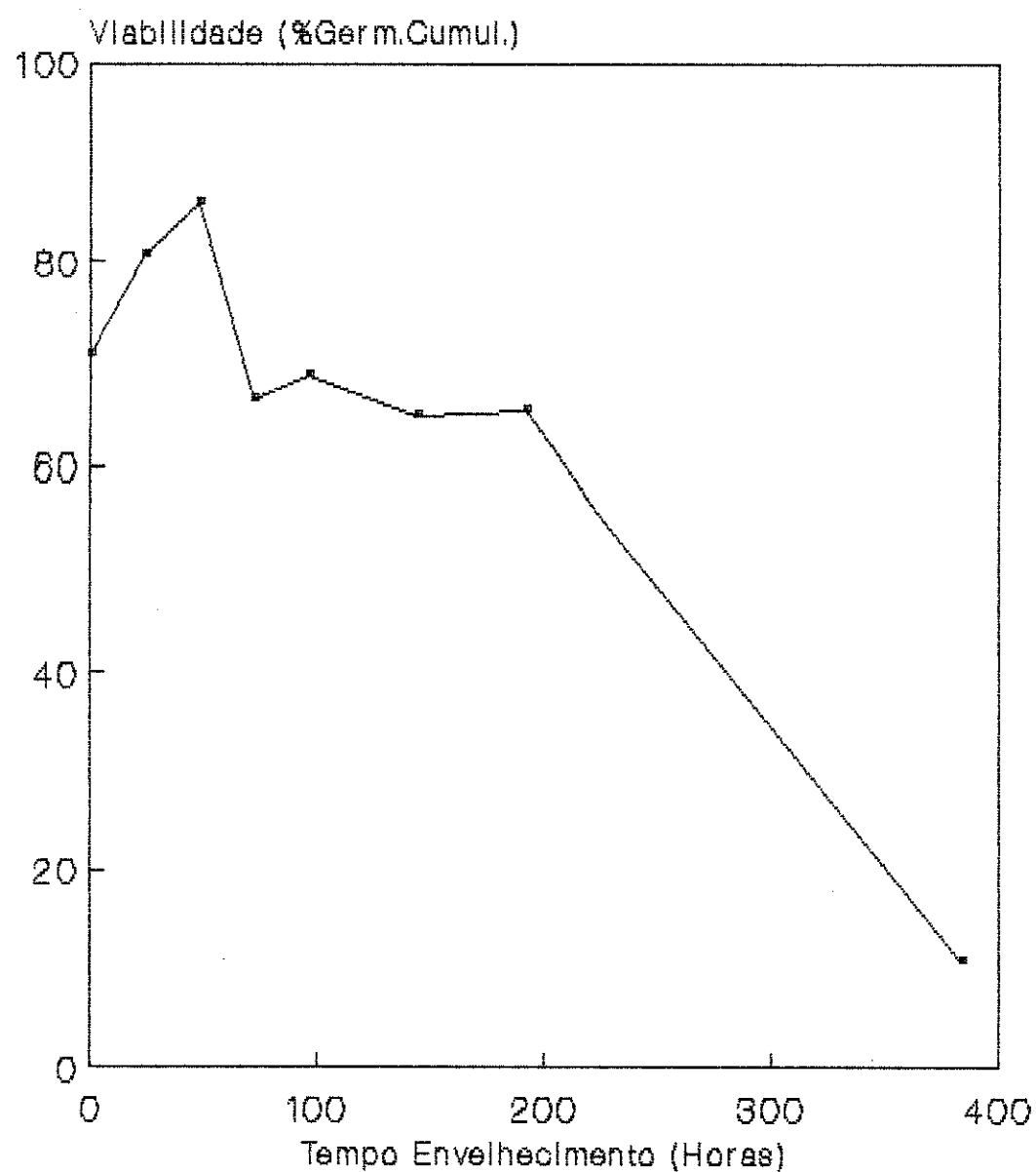


Fig.6 - Germinacao Cumulativa Final em S.reticulata em Funcao do tempo de Envelhecimento Acelerado

3.3. Métodos Citoquímicos de Análise

3.3.1. *Phaseolus vulgaris*

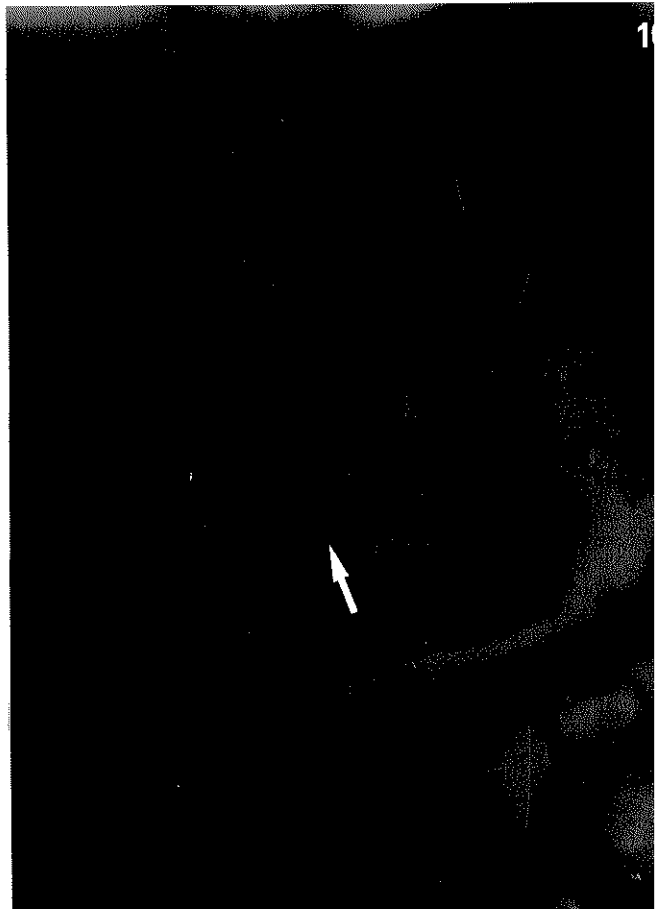
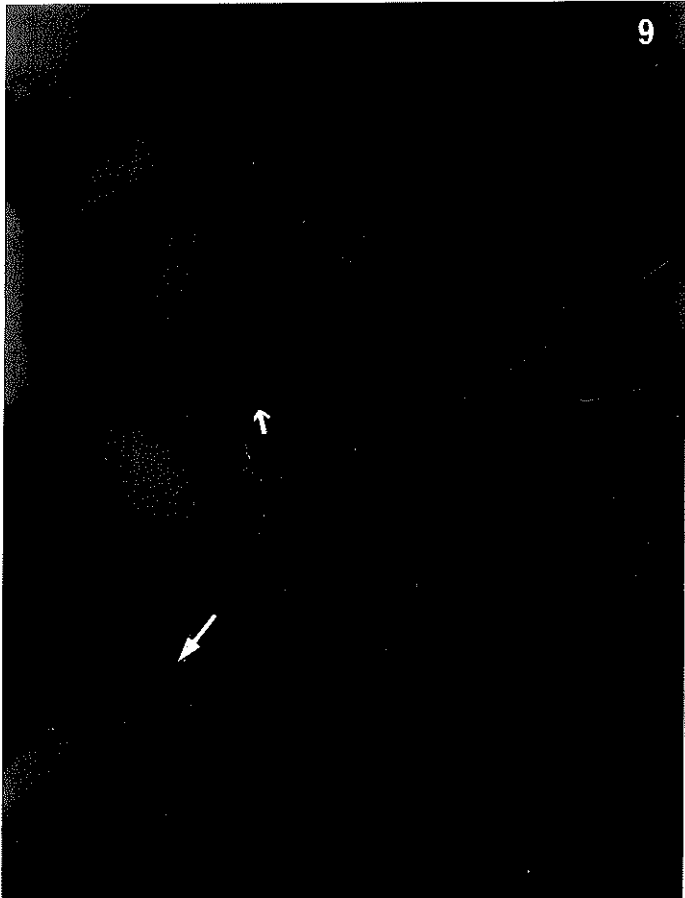
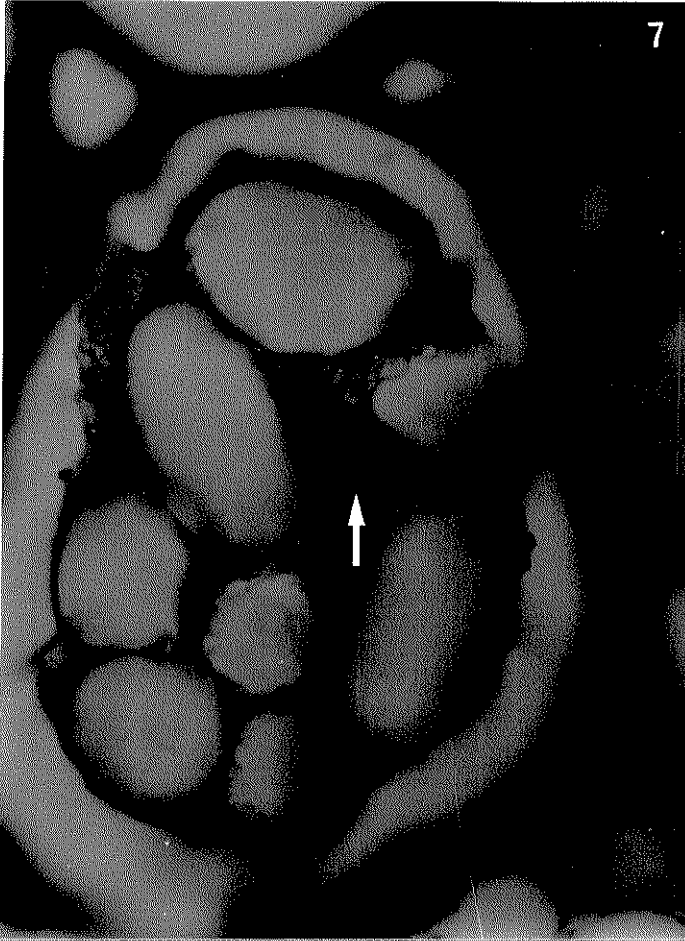
A coloração pelo AT a pH 4,0 revelou as paredes celulares coradas e metacromáticas em todos os tempos analisados. Foram notadas inúmeras pontuações não coradas que sugerem uma comunicação entre células vizinhas.

No citoplasma foram observados grãos de tamanho elevado corados apenas em seus limites. Circundando esses grãos foram visualizados inúmeros glóbulos de menor tamanho que se apresentaram pouco corados, exceto em sua porção periférica. Núcleos e nucléolos foram corados em azul.

Em sementes quiescentes, a cromatina apresentou-se mais descompactada e os nucléolos foram evidenciados (Fig. 7). Com o aumento do tempo de envelhecimento acelerado, foram notadas alterações ao nível do núcleo, com compactação crescente da cromatina e alterações nucleolares. Essas alterações ocorreram inicialmente nos materiais envelhecidos por 72-96 horas, que continham poucas células com núcleos alterados (Fig. 8).

A ocorrência dessas alterações aumentou com o avanço do tempo de envelhecimento. Em 192 h, grande parte dos núcleos apresentaram inúmeros segmentos cromatínicos mais compactados e nucléolos de difícil detecção (Fig. 9). Os fenômenos de compactação cromatínica acentuaram-se até o tempo de

Figs 7 a 10 : Cortes longitudinais de cotilédones de *P. vulgaris* (Fv) em vários tempos de envelhecimento acelerado corados pelo AT a pH 4,0. Podem ser notadas as paredes celulares coradas em tom arroxeado. No citoplasma são vistos grãos não corados e inúmeros glóbulos envoltos por material AT-positivo. Podem ser vistos ainda núcleos corados em azul. Aumento: 1050 X. **Fig. 7:** Fv 0h. O núcleo apresenta-se descompactado e pode ser visualizado o nucléolo (↑). **Fig. 8:** Fv 96h. A cromatina apresenta algumas regiões mais compactadas (↑). **Fig. 9:** Fv 192h. O núcleo já se apresenta bastante alterado em relação ao tempo 0 de envelhecimento acelerado. Os envoltórios dos glóbulos citoplasmáticos ainda estão bastante evidentes (↑) e podem ser vistos espaços não corados na parede, que sugerem uma ligação entre células vizinhas (↑). **Fig. 10:** Fv 384h. O grau de compactação cromatínica atinge seu máximo, e ocorre o desaparecimento do nucléolo (↑).

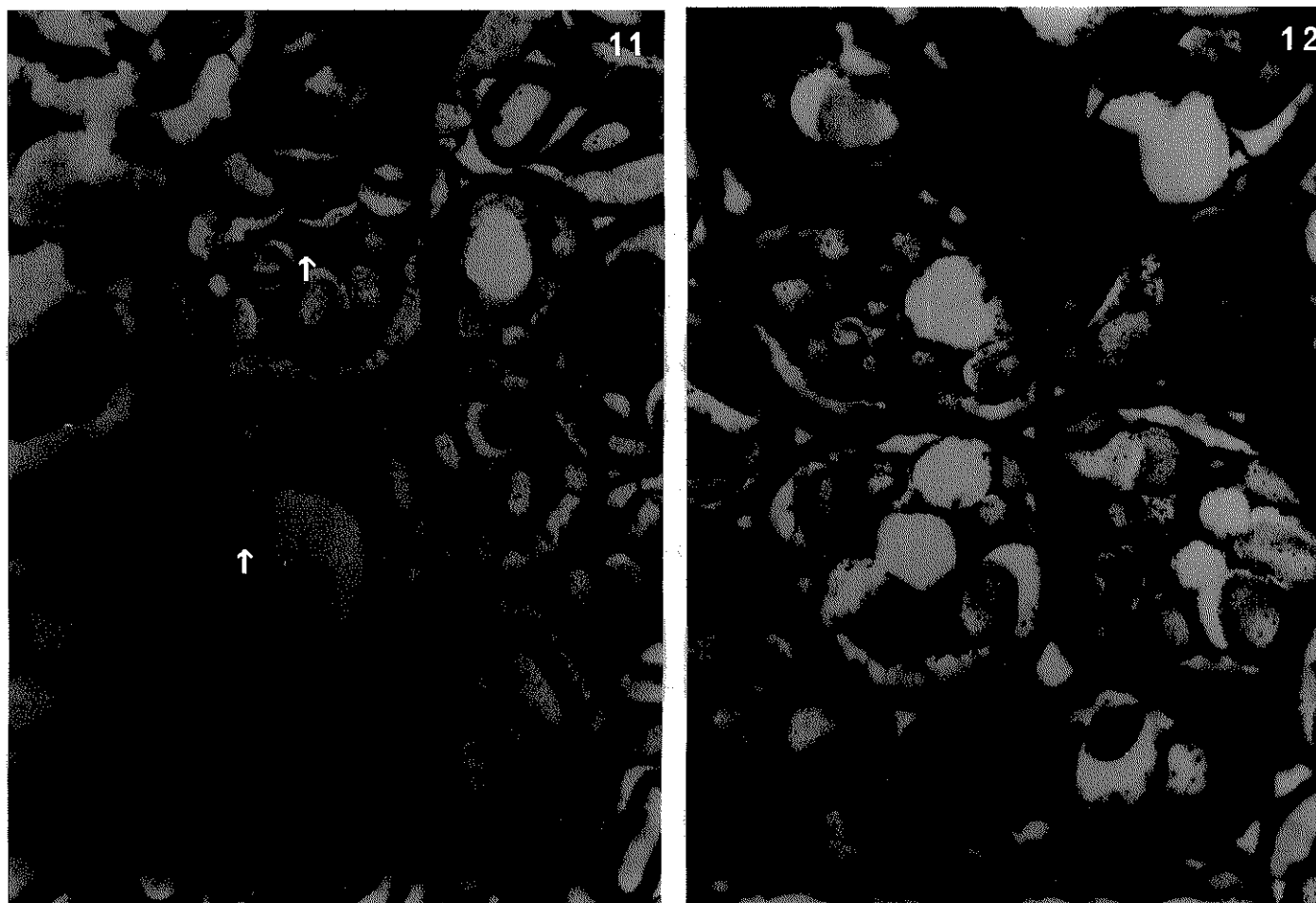


384 h, quando a maioria dos núcleos apresentaram-se picnóticos e, em muitos casos, pode ser observada a imagem negativa dos nucléolos (Fig. 10)

A impregnação pela prata seguida de contracoloração pelo AT reforçou as observações realizadas a nível nuclear, mostrando nucléolos mais evidentes nos tempos iniciais do envelhecimento (Fig. 11) em relação aos tempos finais (Fig. 12). Esse método revelou ainda, em sementes quiescentes, uma maior impregnação pela prata na periferia dos grãos não corados pelo AT (Fig. 11). Essa impregnação diminuiu em 384 h, quando apenas alguns desses grãos apresentaram esse aspecto. Além disso, o envelhecimento acelerado acarretou uma deposição finamente granular de prata nos glóbulos citoplasmáticos (Fig 12).

Cortes submetidos a coloração pela prata, sem contracoloração, mostraram as paredes celulares mais evidentes, um conteúdo citoplasmático castanho e nucléolos fortemente impregnados em negro (Fig 13). Com o avanço do tempo de envelhecimento, as alterações anteriormente descritas foram confirmadas e as paredes celulares tornaram-se menos susceptíveis à impregnação (Fig.14). Outra alteração verificada neste método foi a diminuição do tamanho das células das sementes inviáveis (Figs. 13-14).

Ainda para o método de impregnação pela prata, os cortes semi-finos mostraram sementes quiescentes castanho-amareladas, com nucléolos bem evidentes, castanho-escuros

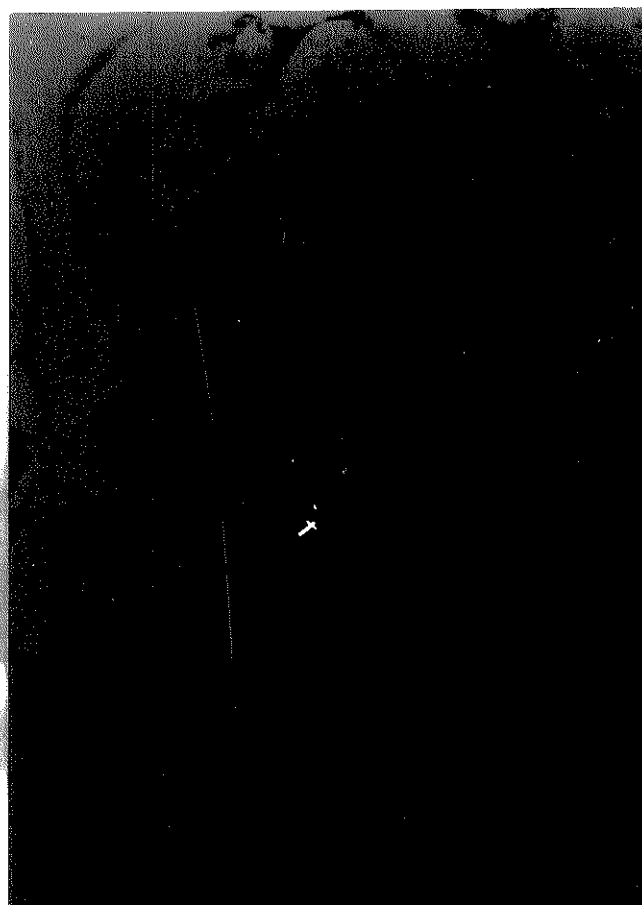
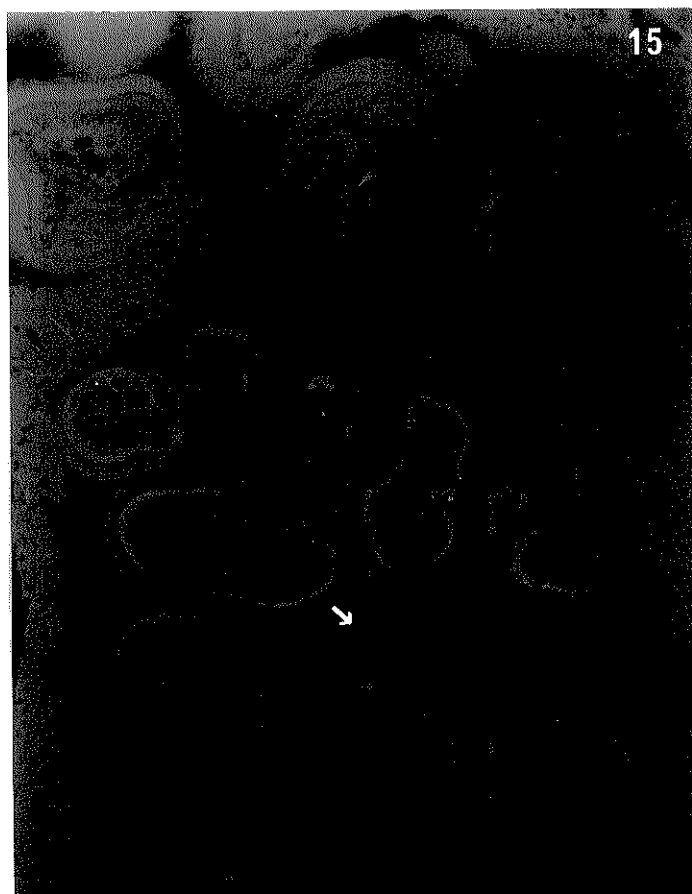
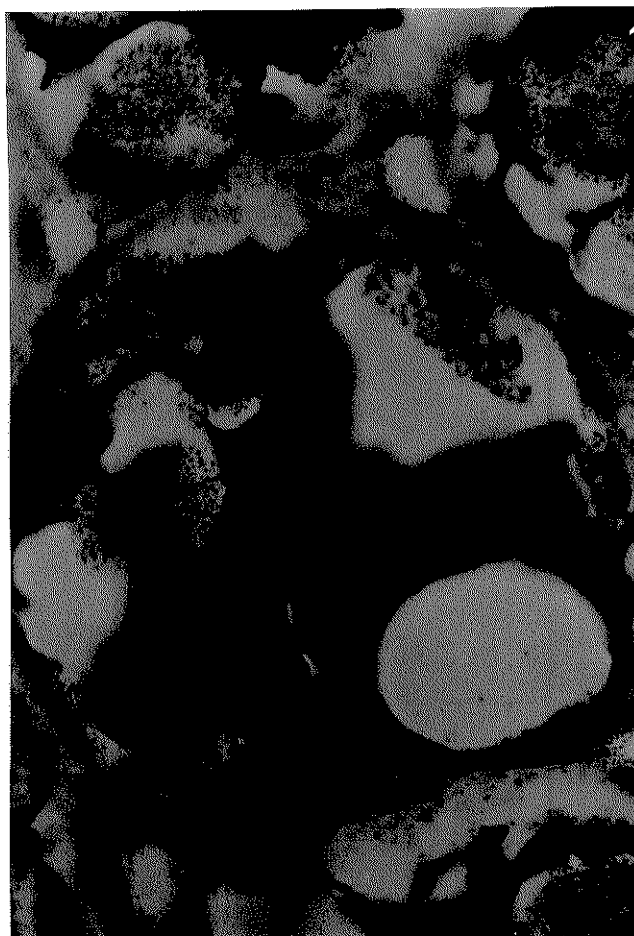


Figs. 11 e 12 : Cortes longitudinais de cotilédones de *P. vulgaris* (Pv) impregnados pela prata e contracolorados pelo AT a pH 4,0. As paredes celulares são evidenciadas em roxo pelo AT. Os grãos e glóbulos citoplasmáticos, núcleos e nucléolos estão mais impregnados pela prata. Aumento: 420 X.

Fig. 11: Pv 0 h. Os grãos citoplasmáticos apresentam regiões impregnadas pela prata. Os nucléolos encontram-se em negro ().

Fig. 12: Pv 384 h. A impregnação de grãos citoplasmáticos é menos evidente, assim como os nucléolos. Ao nível dos glóbulos do citosol, ocorre uma deposição finamente granular de prata, por todo o citoplasma.

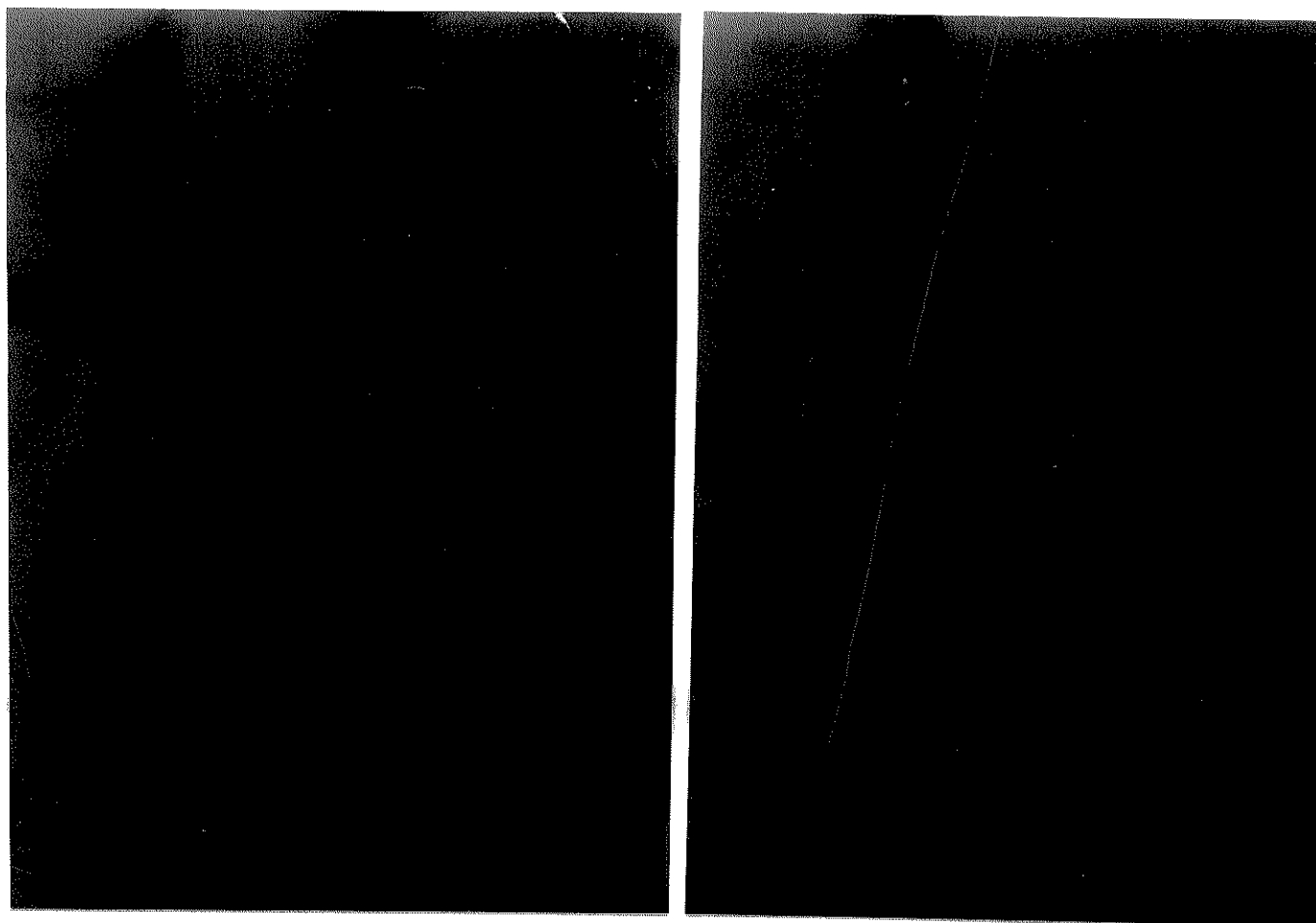
Figs. 13 a 16 : Cortes de cotilédones de *P. vulgaris* (Pv) impregnados pela prata. Núcleo, citoplasma e paredes celulares podem ser visualizados. Aumento: 1050 X. **Figs. 13-14**: Cortes com 8 μ m de espessura. **Fig. 13**: Pv 0h. O conteúdo citoplasmático apresenta-se homogeneamente impregnado em castanho, exceto ao nível dos grãos. O nucléolo, em negro, é facilmente evidenciado ($\uparrow$) e os orifícios dos plasmodesmos nas paredes celulares também são notados ($\uparrow$). **Fig. 14**: Pv 384h. A região nucleolar não está bem definida e o citoplasma encontra-se repleto de deposições de prata finamente granulares. As paredes celulares apresentam-se menos impregnadas, com uma coloração amarelo-acastanhada. **Figs 15-16**: Cortes com 0,2 μ m de espessura. As paredes encontram-se pouco impregnadas. **Fig. 15**: Pv 0h. São confirmadas as observações da Fig. 13, mostrando o citoplasma castanho, os grãos pouco corados e o nucléolo bem evidente ($\uparrow$). **Fig. 16**: Pv 384h. Os grãos citoplasmáticos aumentam em número e diminuem em tamanho. Os glóbulos estão menos acastanhados e é confirmado a deposição granular de prata. O nucléolo ainda pode ser notado ($\uparrow$), mas o núcleo mostra regiões não impregnadas.



(Fig.15). Já o material envelhecido mostrou uma impregnação mais granulosa, com a região nuclear menos impregnada. Os nucléolos, quando presentes, apresentaram-se aparentemente menores (Fig. 16). Observou-se ainda uma tendência à diminuição do tamanho e aumento do número de grãos presentes no citoplasma (Fig 15 e 16).

Confirmando os resultados obtidos na coloração pelo AT, a reação de Feulgen demonstrou a compactação cromatínica com o decorrer do envelhecimento em *P.vulgaris*, mostrando o DNA menos compactado em sementes quiescentes e nos tempos iniciais de envelhecimento (Fig.17). Sementes inviáveis ou envelhecidas por tempos mais prolongados (a partir de 96 h) apresentaram cromatina comparativamente mais picnótica. Foram observadas, ainda, células com núcleos vacuolizados em menor quantidade (Fig. 18). Apesar de terem sido utilizados diversos tempos de hidrólise, parte do material citoplasmático de *P.vulgaris* apresentou-se corado e, em *S.reticulata*, não puderam ser realizadas observações conclusivas.

Os cortes corados pelo XP tiveram suas paredes celulares pouco coradas em todos os tempos analisados. Os grãos não corados pelo AT também não foram evidenciados por esta coloração, enquanto que os glóbulos citoplasmáticos foram intensamente corados, em contraste com os resultados anteriores.



Figs. 17 e 18 : Cortes de cotilédones de *P.vulgaris* (Pv) submetidos à Reação de Feulgen. Nota-se uma fraca coloração de todo o corte, exceto na região do núcleo. Aumento 1050 X.
Fig. 17: Pv 0 h. A cromatina encontra-se descompactada e pode ser observada a imagem negativa do nucléolo (↑). **Fig. 18:** Pv 384 h. Pode ser notada uma maior compactação da cromatina e uma vacuolização da mesma (↑).

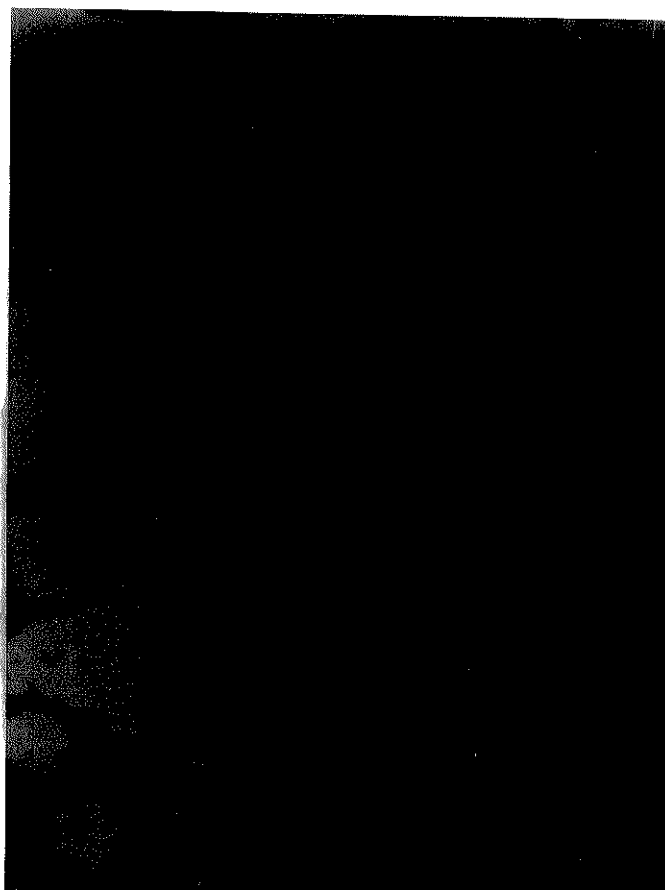
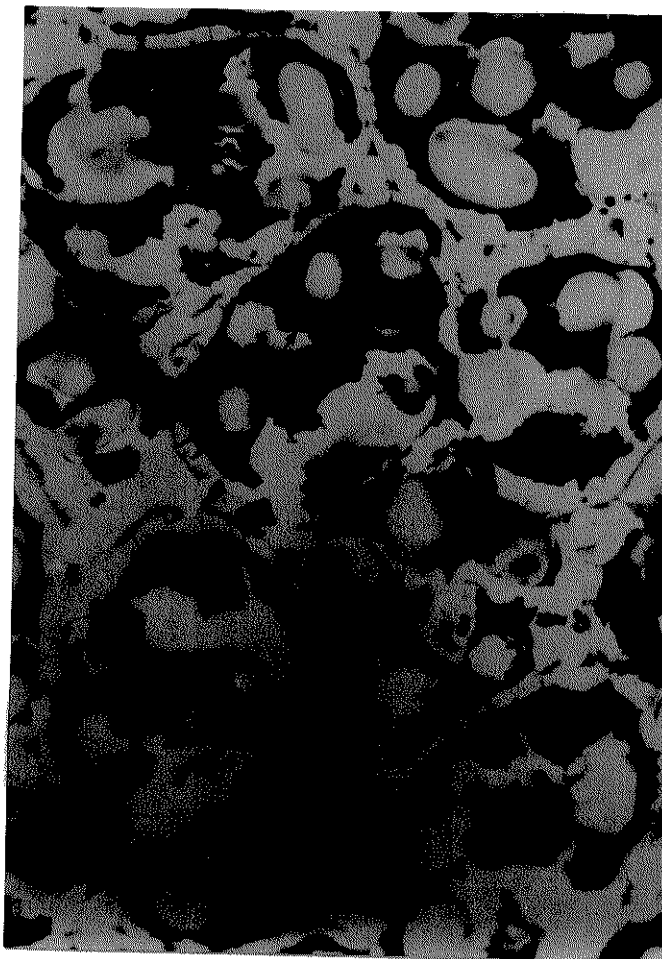
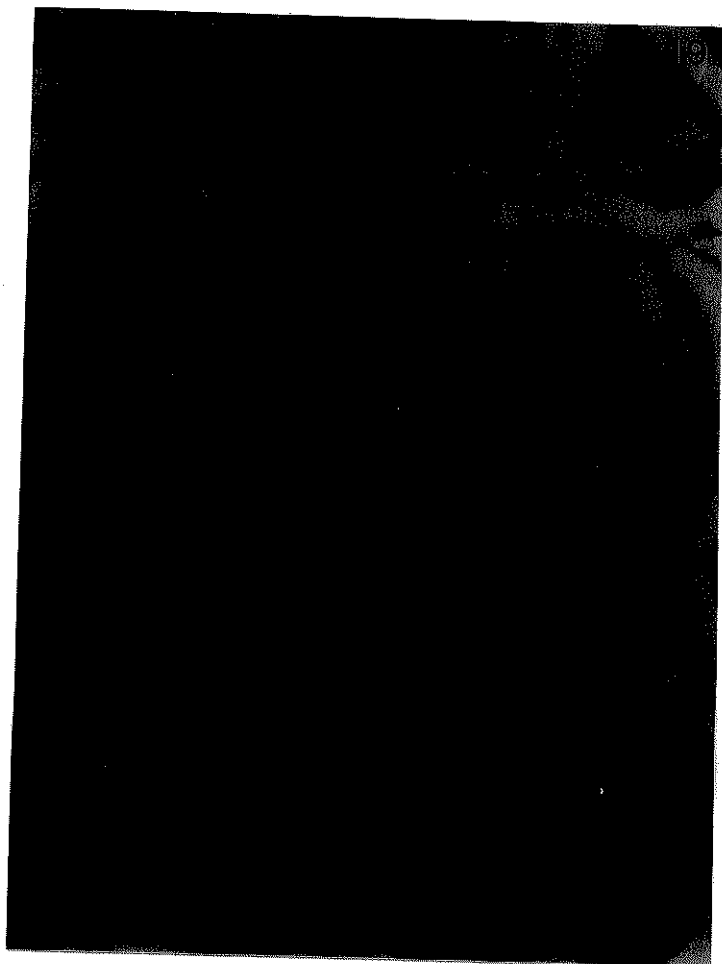
Cortes de sementes quiescentes revelaram um conteúdo XP-positivo bastante homogêneo e íntegro (Fig.19). A partir de 72 h de envelhecimento, o material corado adquire um aspecto mais globular, com uma distribuição menos homogênea. Puderam ainda ser notados desarranjos do material citoplasmático no interior das células (Fig.20).

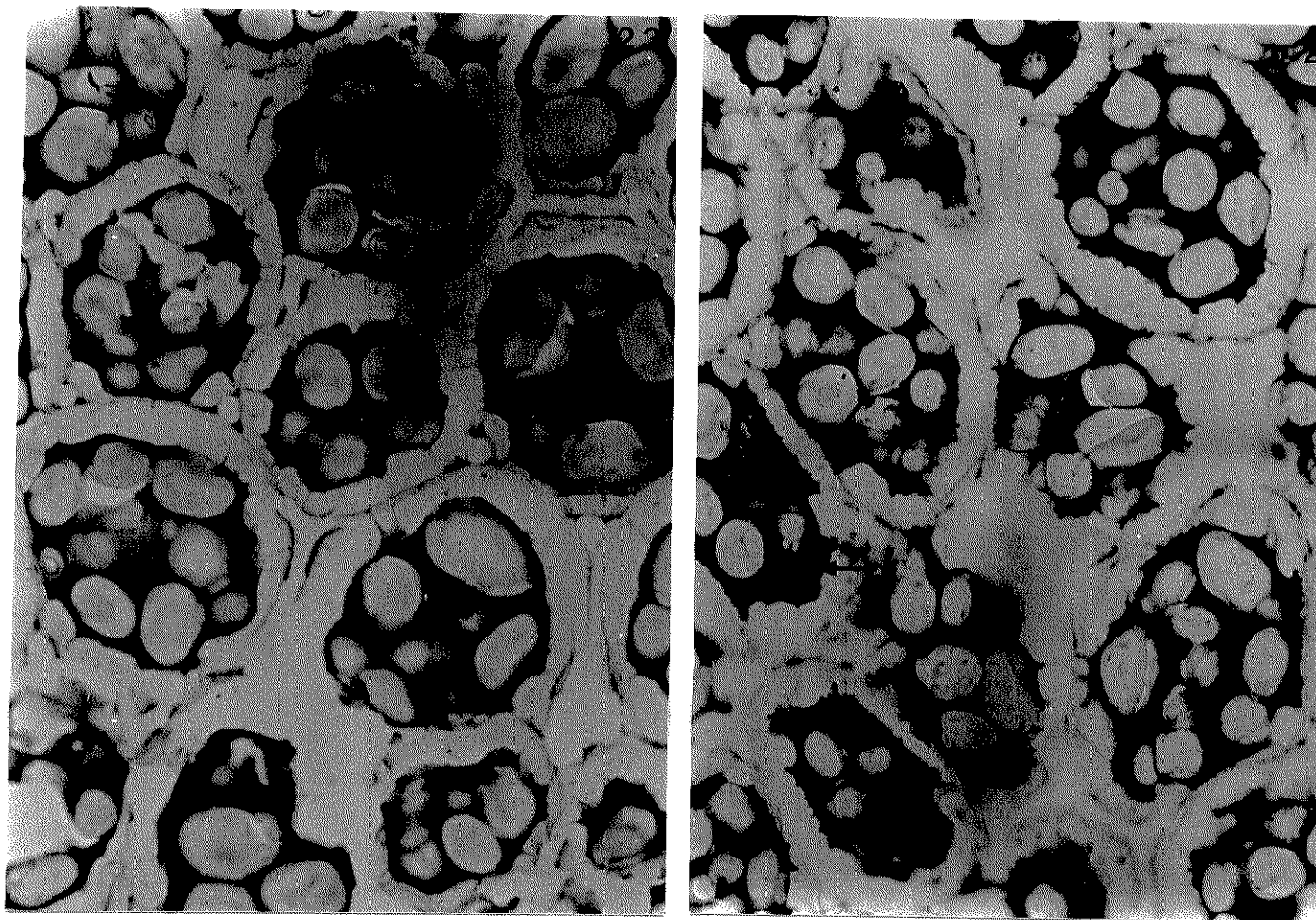
As alterações no material, a partir de 72 h de envelhecimento, se acentuaram, principalmente no que diz respeito ao desarranjo citoplasmático (Fig.21), culminando com profundas alterações que sugerem, inclusive, a perda de material corado nas sementes com 384 h de envelhecimento (Fig.22).

O uso do ferricianeto de potássio e cloreto férrico revelou, em todos os tempos analisados, uma coloração azul-esverdeada nos mesmos locais evidenciados pelo XP, com um ligeiro aumento na intensidade de coloração a partir de 144 h de envelhecimento. Da mesma forma, que nos métodos anteriores, os grãos citoplasmáticos não foram corados. O aumento no número destes grãos e a diminuição em seu tamanho tornaram-se mais evidentes com o uso deste método (Figs. 23 e 24).

Cortes submetidos à coloração pelo reativo de Schiff sem prévia oxidação pelo ácido periódico, praticamente não foram corados (Fig.25). Entretanto, os grãos citoplasmáticos não corados pelo AT e XP foram intensamente evidenciados por

Figs. 19 a 22 : Cortes longitudinais de cotilédones de *P. vulgaris* (Pv) em vários tempos de envelhecimento acelerado corados pelo XP a pH 2,6. As paredes celulares encontram-se pouco coradas. O conteúdo globular do citoplasma apresenta-se corado em vermelho, em contraste aos grãos XP-negativos. Aumento 420 X. **Fig. 19:** Pv 0h. Nota-se um padrão homogêneo de coloração e os citoplasmas apresentam-se integros. **Fig. 20:** Pv 72h. O material corado encontra-se menos íntegro e com aspecto mais globular em muitas células (↑). **Fig. 21:** Pv 144h. O padrão notado nas células com 72 horas de envelhecimento se acentua, aumentando as rupturas no material citoplasmático corado. **Fig. 22:** Pv 384h. O desarranjo do material citoplasmático corado atinge o seu grau máximo, com uma aparente redução na quantidade de material corado, além das rupturas notadas nos tempos anteriores.





Figs. 23 e 24 : Cortes de cotilédones de *P.vulgaris* (Pv) após redução pelo ferricianeto de potássio e cloreto férrico. As paredes celulares são pouco coradas, assim como os grãos presentes no citoplasma. Ao nível dos glóbulos, observa-se uma coloração azul-esverdeada e homogênea. Aumento: 420 X. **Fig. 23:** Pv 0 h. **Fig. 24:** Pv 384 h. Pode ser notado um aumento no número de grãos não corados e uma diminuição do seu tamanho (↑).

este método, quando o material foi oxidado pelo HIO_4 (Figs 26 a 28).

Além dos grãos citoplasmáticos, o método do PAS deixou bastante evidentes as paredes celulares, assim como o restante do conteúdo citoplasmático. Este conteúdo apresentou uma coloração menos intensa quando comparada à dos grãos de maior tamanho (Figs.26-28).

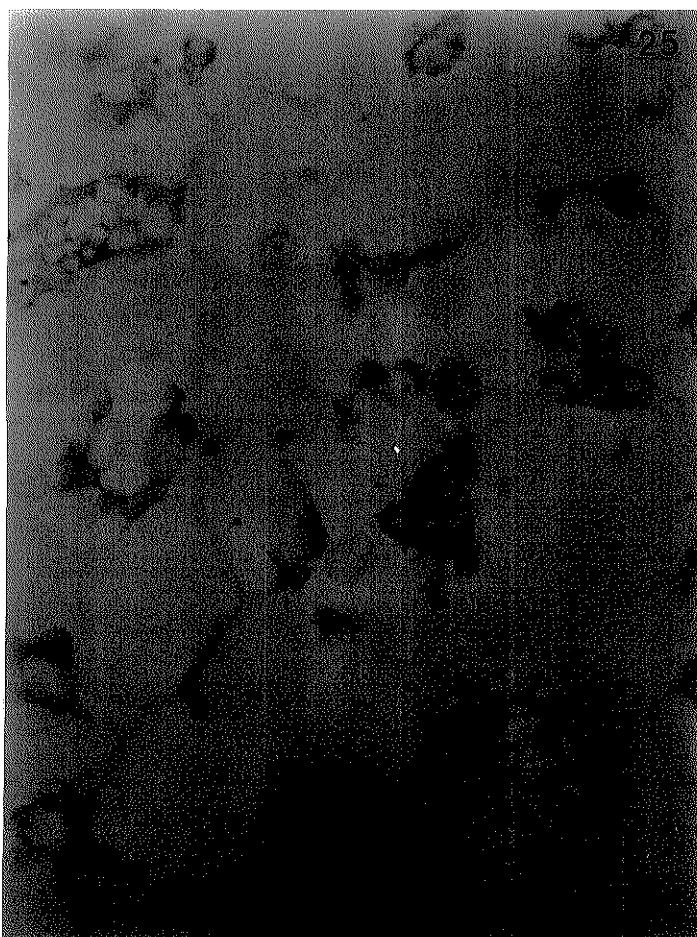
A análise dos materiais em microscópio de polarização revelou a birrefringência das paredes celulares e dos grãos PAS-positivos. Com o decorrer do envelhecimento, tornaram-se mais evidentes as alterações sofridas por estes grãos, quanto ao seu tamanho e número (Figs.29-32).

3.3.2. *Senna reticulata* (L.) Ait. (163) (Fig. 33)

Células coradas pelo AT a pH 4,0 apresentaram paredes celulares coradas e metacromáticas em todos os tempos analisados. O conteúdo citoplasmático foi corado em azul-esverdeado, com envoltórios mais azulados. Foram observados, ainda inúmeros grânulos de menor tamanho e esverdeados. Núcleos e nucléolos também apresentaram-se corados em azul. (Figs.33 a 36)

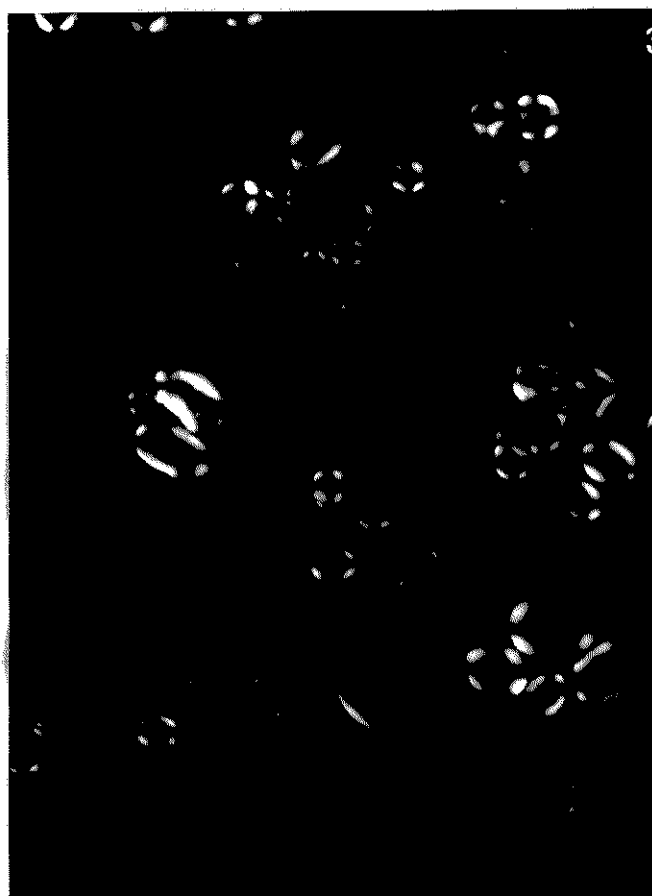
Cortes submetidos à impregnação pela prata, seguida de contracoloração pelo AT a pH 4,0, mostraram as paredes celulares coradas pelo AT e o conteúdo citoplasmático formado por inúmeros glóbulos que se impregnaram pela prata

Figs. 25 a 28 : Cortes de cotilédones de *P. vulgaris* (Pv) após método do PAS. Aumento: 420 X. **Fig. 25**: Controle. O material (não envelhecido) não sofreu oxidação prévia pelo ácido periódico. Praticamente não são notadas estruturas coradas. **Fig.s 26 a 28**: Podem ser visualizadas as paredes celulares, os grãos citoplasmáticos intensamente corados e, em menor intensidade, os glóbulos que apresentam um aspecto homogêneo. **Fig. 26**: Pv 0h. O material citoplasmático apresenta coloração intensa, salientando os grãos de maior tamanho. **Fig. 27**: Pv 96h. aspecto semelhante, com o material granular menos corado. Cortes tangenciais das paredes colocam em evidência inúmeros orifícios por onde passam os plasmosdesmos (▲). **Fig. 28**: Pv 384h. As modificações notadas nos tempos anteriores são salientadas. Notam-se grãos de menor tamanho e o restante do citoplasma menos corado.



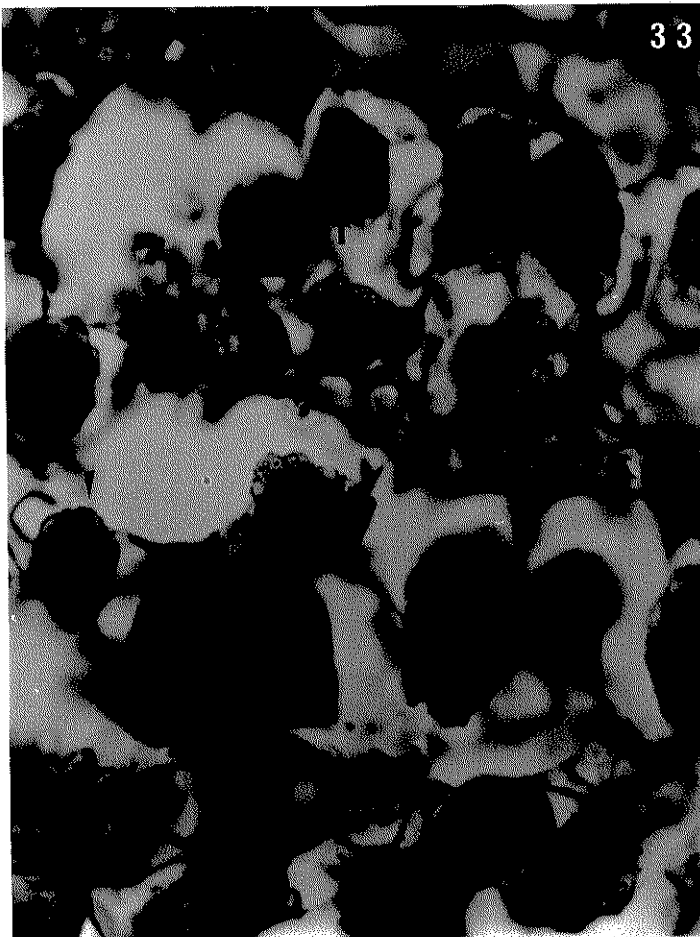
Figs. 29 a 32 : Cortes de cotilédones de *P. vulgaris* (Pv) em vários tempos de envelhecimento acelerado, observados em microscópio de polarização, com o polarizador e analisador cruzados. Nota-se a birrefringência das paredes celulares e o formato em cruz de malta dos grãos de amido. Fica evidente uma redução gradual no tamanho destes grãos, concomitante ao aumento da quantidade dos mesmos, processo que se inicia a partir de 72h de envelhecimento acelerado. Aumento: 420 X.

Fig. 29: Pv 0h; **Fig. 30:** Pv 72h; **Fig. 31:** Pv 96h; **Fig. 32:** Pv 384h.

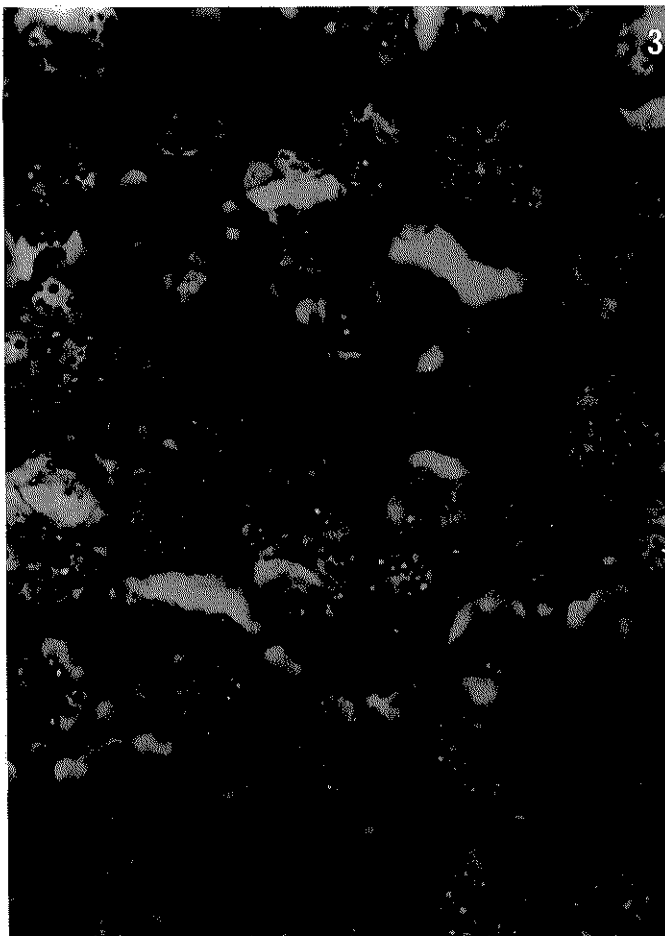


Figs. 33 a 36 : Cortes longitudinais de cotilédones de *S. reticulata* (Sr) corados pelo AT a pH 4,0. As paredes celulares apresentam-se coradas em tom arroxeado. O material citoplasmático apresenta-se azul-esverdeado, circundado por envoltório corado em azul (▲) e contendo inúmeros grânulos verdes. Nota-se o núcleo e nucléolo corados em azul (↑). Aumento: 1050 X. **Fig. 33**: Sr 0h; **Fig. 34**: Sr 96h; **Fig. 35**: Sr 192h; **Fig. 36**: Sr 384h.

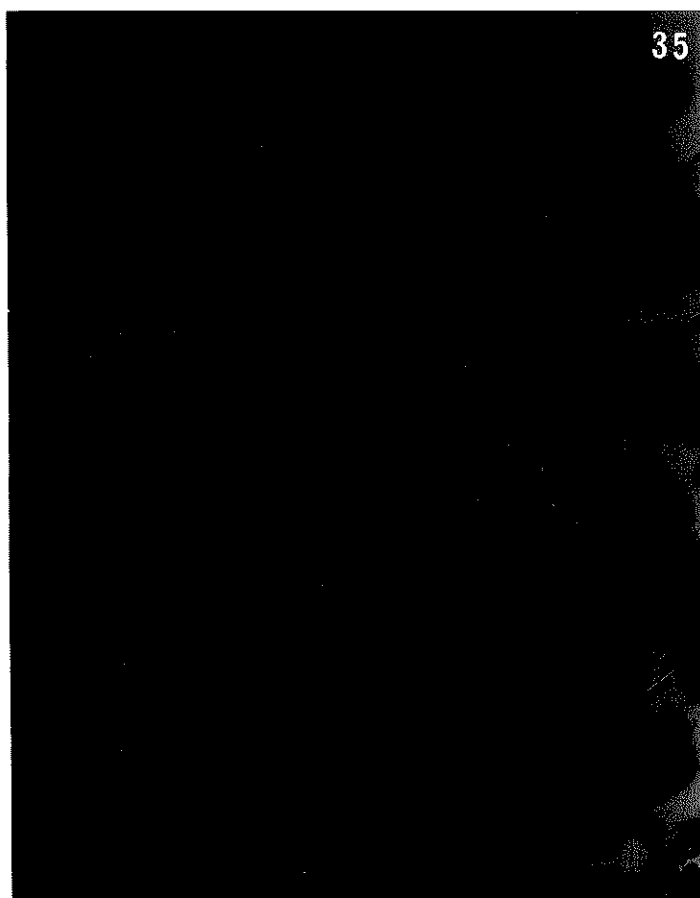
33



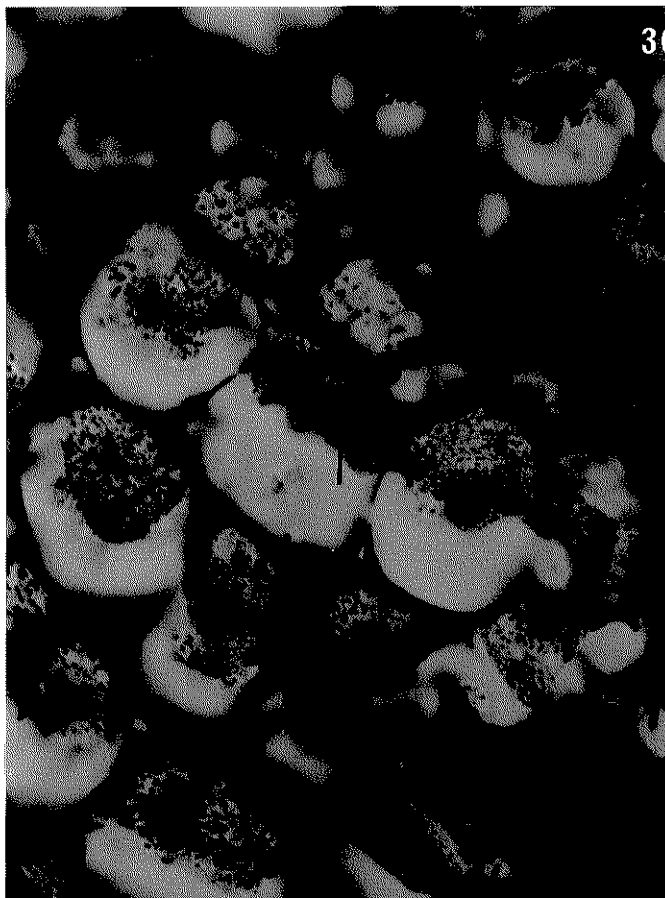
3



35



36

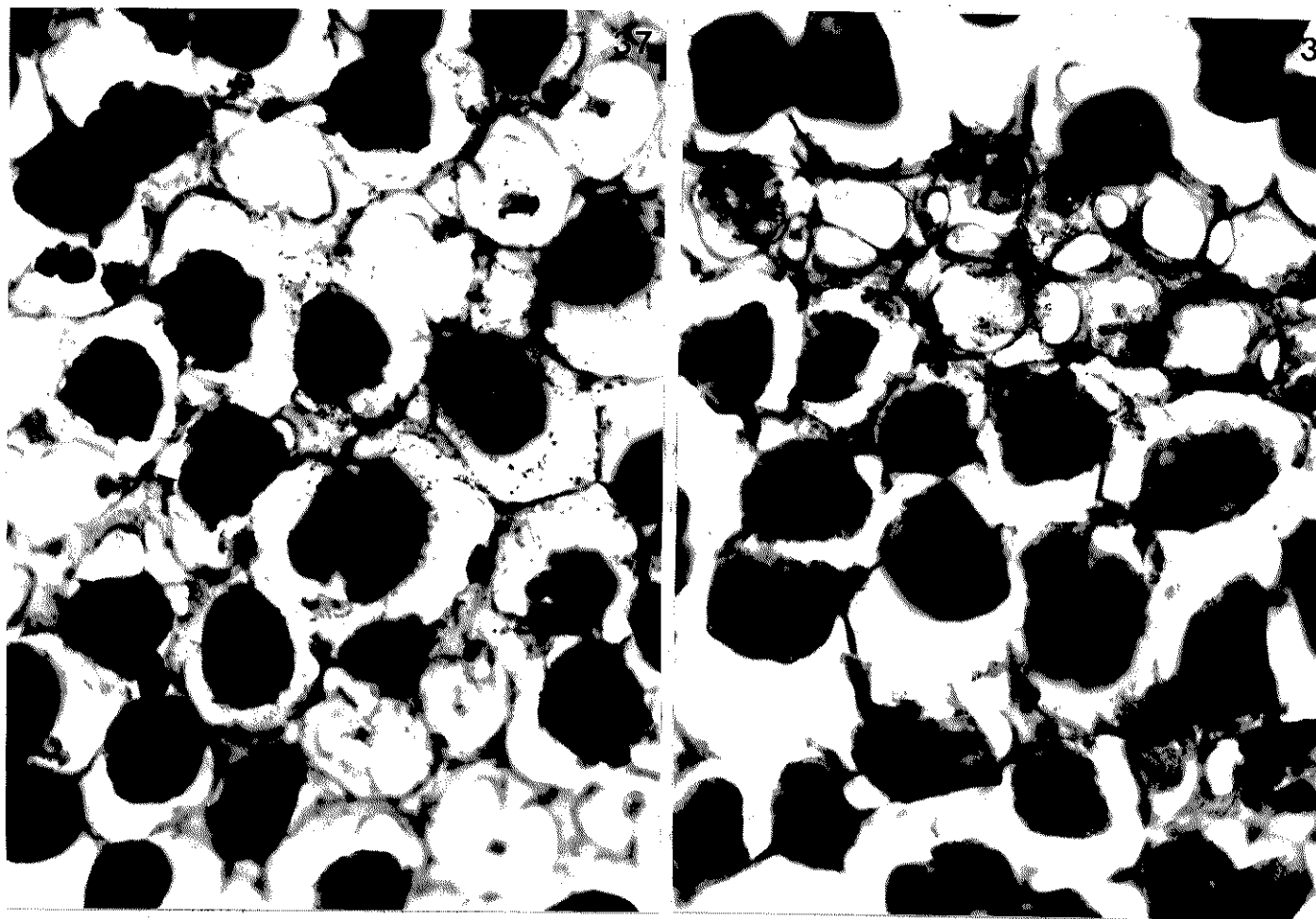


(Fig. 37). Com o avanço no tempo de envelhecimento acelerado observou-se um aumento no tamanho desses glóbulos intensamente impregnados (Fig. 38).

A impregnação pela prata não foi muito eficiente na detecção das paredes celulares, principalmente em sementes quiescentes ou com tempos menores de envelhecimento.

Em sementes quiescentes, o conteúdo citoplasmático impregnou-se de forma mais homogênea, apresentando algumas pontuações mais intensas. Os núcleos apresentaram-se castanhos e os nucléolos em negro, as células dos feixes de floema tiveram seu conteúdo citoplasmático menos impregnado do que as células do parênquima dos cotilédones (Fig.39). Após 384 h, o conteúdo citoplasmático tornou-se mais globular e heterogêneo, dificultando a visualização dos núcleos e nucléolos (Fig.40).

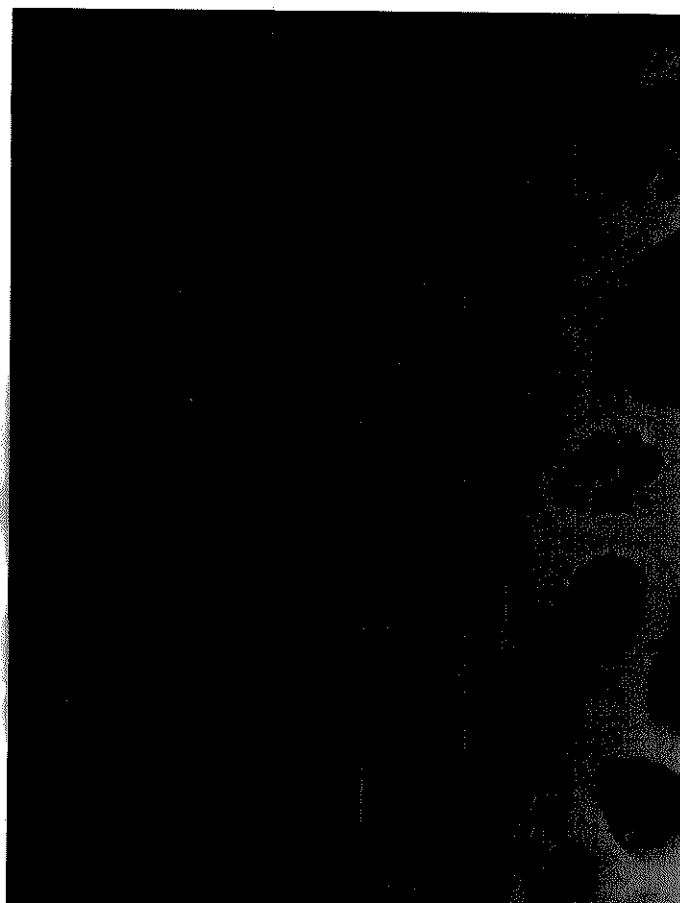
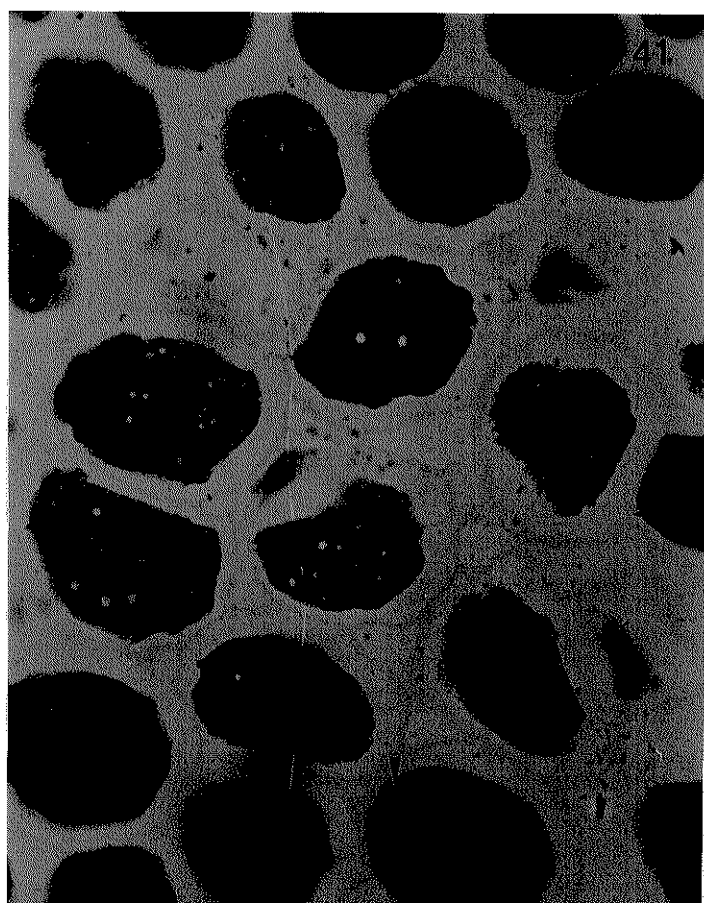
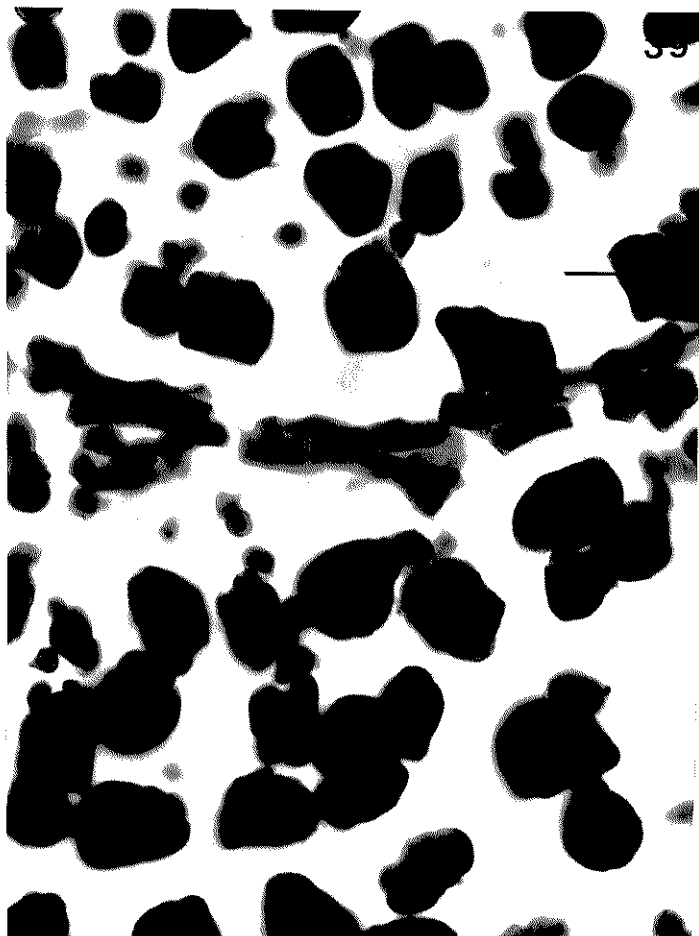
Nos cortes semi-finos as paredes celulares foram visualizadas mais facilmente, a despeito de sua baixa impregnação. Sementes quiescentes apresentaram citoplasma constituído por glóbulos impregnados de forma homogênea, cujos envoltórios foram corados pelo AT. Ocorrem dois tipos de pequenos grânulos no interior destes glóbulos: grânulos não impregnados pela prata e grânulos impregnados em negro, sendo estes últimos bem menos numerosos. Os núcleos apresentaram-se castanhos e os nucléolos em negro (Fig.41).



Figs. 37 e 38 : Cortes longitudinais de cotilédones de *S. reticulata* (Sr) submetidos à impregnação pela prata e contracolorados pelo AT a pH 4,0. Notam-se as paredes celulares mais coradas pelo AT e o conteúdo celular impregnado. Aumento: 1050 X. **Fig. 37:** Sr 0h. Material citoplasmático formando inúmeros glóbulos que se impregnam pela prata(). **Fig. 38:** Sr 384h. O tamanho dos glóbulos aumenta e a intensa impregnação continua evidente

Figs. 39 a 42 : Cortes de cotilédones de *S. reticulata* (Sr) submetidos à impregnação pela prata. Aumento: 1050 X.

Figs. 39-40: Cortes com 8 µm de espessura. **Fig. 39:** Sr 0h. O conteúdo citoplasmático apresenta-se em castanho intenso, com aspecto homogêneo e a presença de grânulos mais impregnados. Os núcleos e nucléolos, mais evidentes, podem ser vistos em diversas células (↑), em contraste à falta de impregnação ao nível de paredes celulares. Células do feixe vascular do floema aparecem em amarelo-acastanhado (F). **Fig. 40:** Sr 384h. As paredes celulares estão fracamente amareladas, o conteúdo citoplasmático apresenta-se mais globular e impregnado diferentemente, os nucléolos ainda são visualizados (↑). **Figs. 41 e 42:** Cortes com 0,2 µm de espessura. **Fig. 41:** Sr 0h. Os grãos citoplasmáticos apresentam seus envoltórios menos impregnados e diversos grânulos em negro (▲) ou não sensíveis ao método (▲). Núcleos e nucléolos também evidenciados (↑). **Fig. 42:** Sr 384h. A heterogeneidade da impregnação pode ser melhor notada do que na Fig. 40. O número de grãos negros aumenta, e aqueles não sensíveis à impregnação aparentemente estão menos abundantes. Torna-se difícil a observação de núcleos e nucléolos.



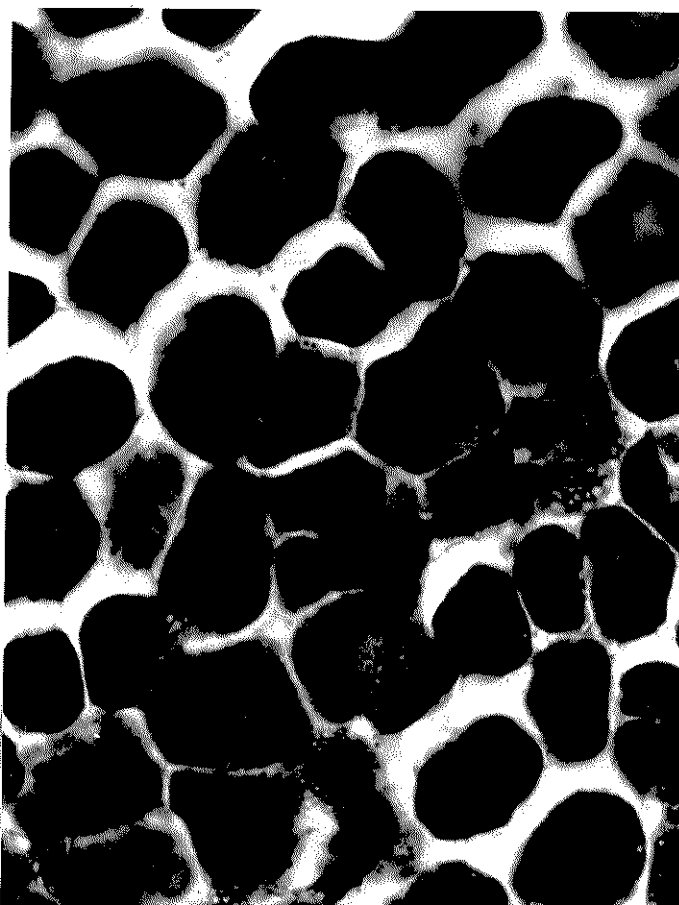
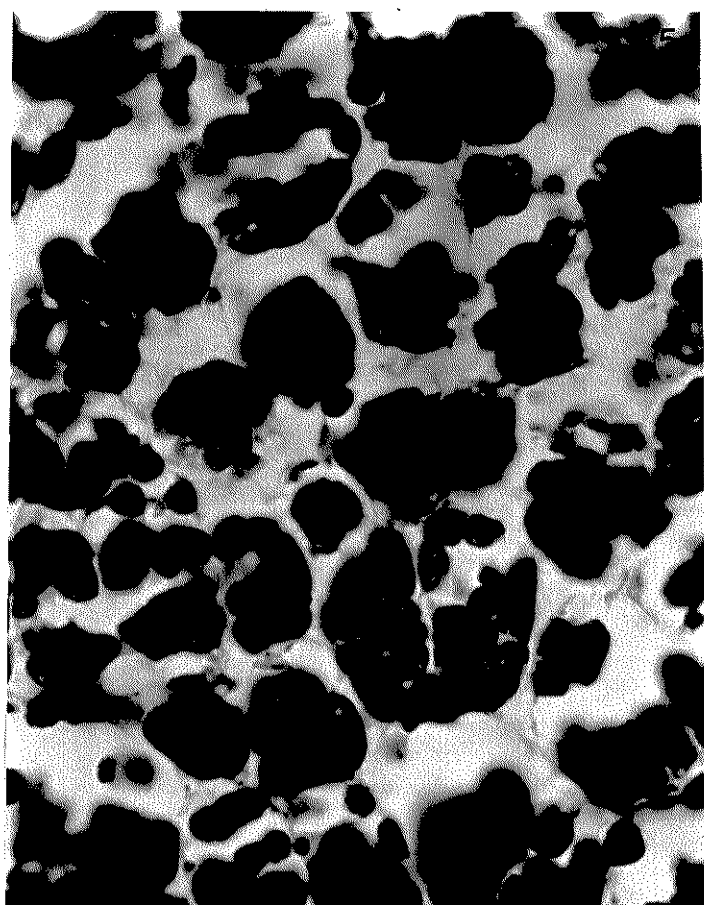
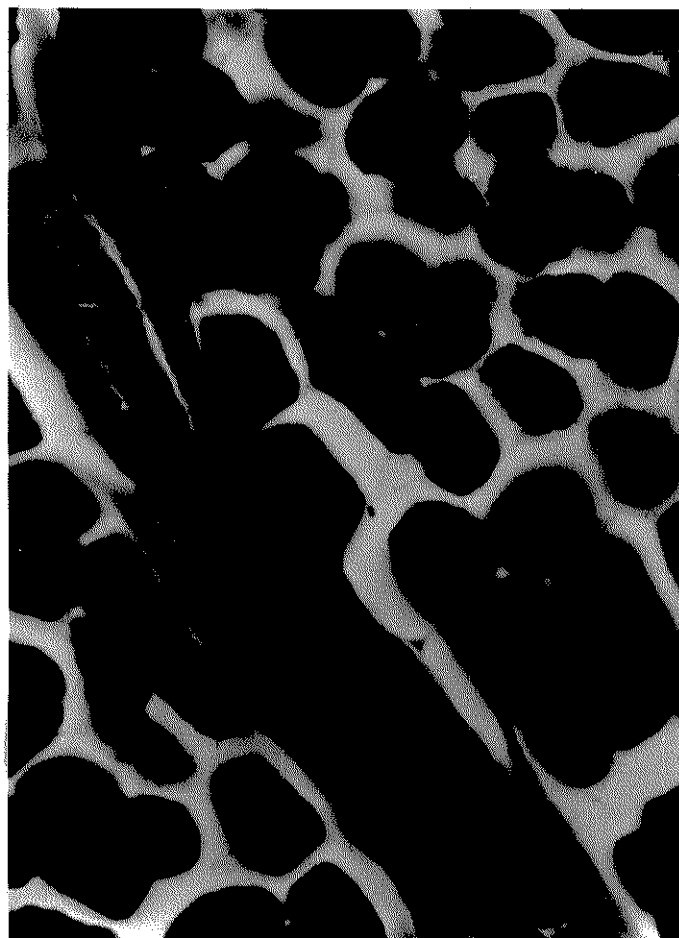
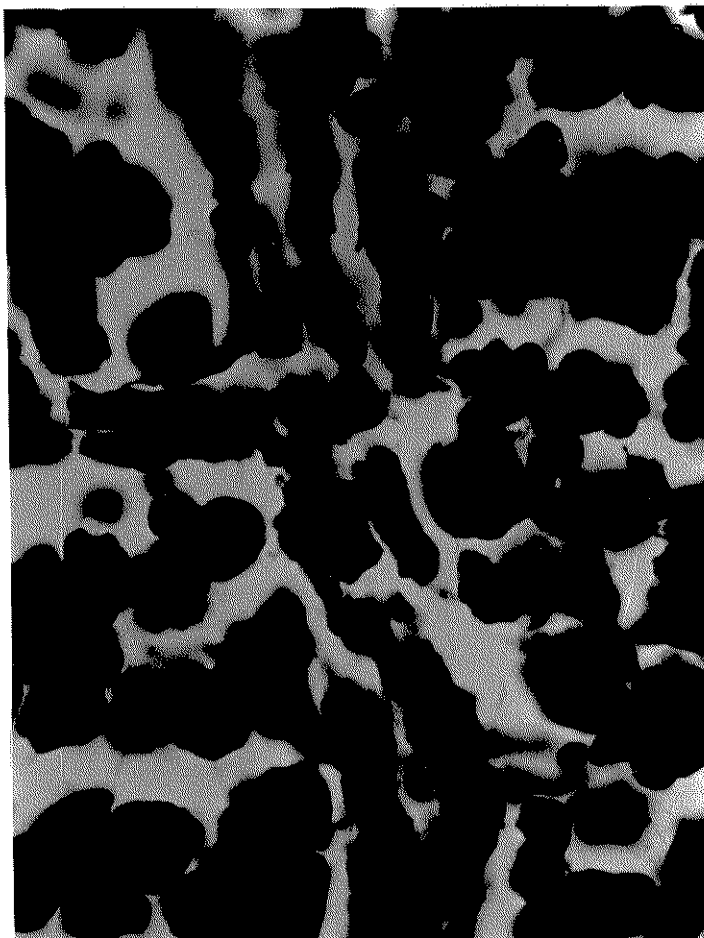
A partir de 144 h, podem ser notadas alterações ao nível dos glóbulos citoplasmáticos, que se tornam maiores, impregnados de forma mais intensa e heterogênea. Os pequenos grânulos detectados nas sementes quiescentes também se alteram com o envelhecimento. Os grânulos não impregnados parecem diminuir em número, enquanto que os demais tornam-se maiores e mais numerosos (Fig.42).

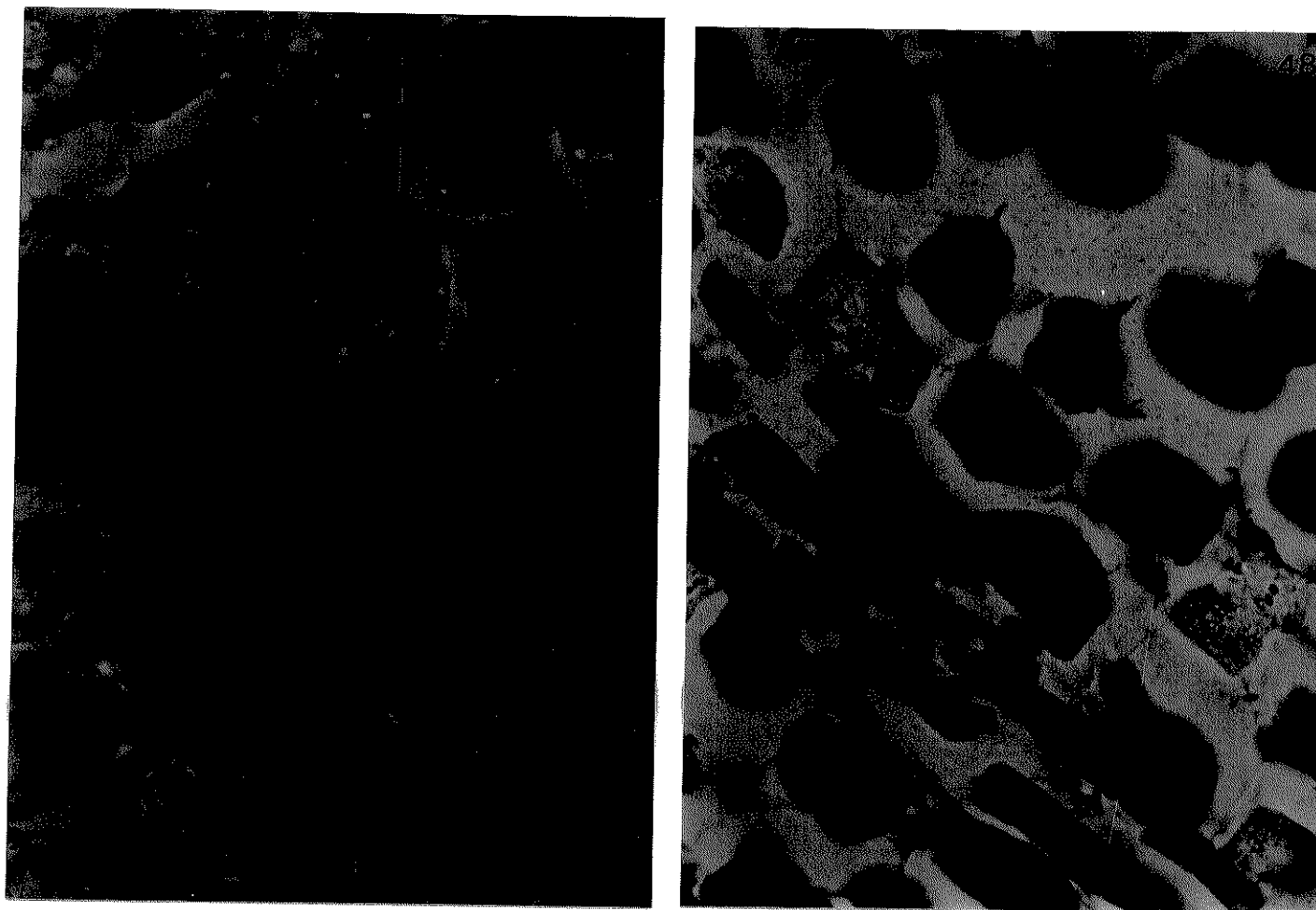
O padrão de coloração obtido pelo XP a pH 2,5 foi semelhante ao encontrado em *P.vulgaris*, ou seja: paredes celulares não coradas e um conteúdo intensamente vermelho.

Sementes de *S.reticulata* não envelhecidas apresentaram o material XP-positivo mais homogêneo, reforçando os resultados obtidos pela prata (Fig.43). Com o avanço do envelhecimento, este material torna-se mais globular, com uma aparente diminuição na intensidade da coloração. O aparecimento de grânulos não corados aumenta a partir de 144 h de envelhecimento (Figs.44-46). No interior dos vasos é detectada a presença de material XP-positivo com formato globular e aspecto homogêneo, mesmo nos tempos de envelhecimento mais prolongados (Fig.44).

O tratamento com ferricianeto de potássio e cloreto férrico revelou a presença de material azul-esverdeado no interior dos feixes vasculares do floema e, praticamente, nenhuma coloração ao nível das paredes celulares e de glóbulos citoplasmáticos, em todos os tempos analisados, exceto em 384 h de envelhecimento. Neste tempo, a maioria

Figs. 43 a 46 : Cortes longitudinais de cotilédones de *S. reticulata* (Sr) corados pelo XP a pH 2,6. As paredes celulares encontram-se pouco coradas, em contraste com o conteúdo citoplasmático, bastante corado. O aspecto deste material é mais homogêneo nas sementes quiescentes (**Fig. 43**) Com o aumento do tempo de envelhecimento acelerado o conteúdo citoplasmático passa a apresentar um aspecto mais grânular. Aumento: 1050 X. **Fig. 44**: Sr 72h; **Fig. 45**: Sr 192h ;**Fig. 46**: Sr 384h. Nota-se uma menor intensidade de coloração em relação aos tempos iniciais de envelhecimento. No interior dos vasos pode ser notado material de aspecto homogêneo e intensamente corado, com formato globular (**Figs. 43 e 44**).





Figs. 47 e 48 : Cortes de cotilédones de *S. reticulata* (Sr) após redução pelo ferricianeto de potássio e cloreto férrico. Aumento: 1050 X. **Fig. 47:** Sr 0 h. Nota-se a ausência de coloração em todas as células, exceto nas do feixe do floema (F), e uma leve coloração verde-azulada ao nível das paredes celulares e dos grânulos citoplasmáticos. **Fig. 48:** Sr 384 h. O conteúdo da maior parte das células corou-se em verde-azulado.

das células de reserva do parênquima passam a apresentar o mesmo padrão de coloração encontrado nas células do feixe vascular do floema (Figs. 47 e 48).

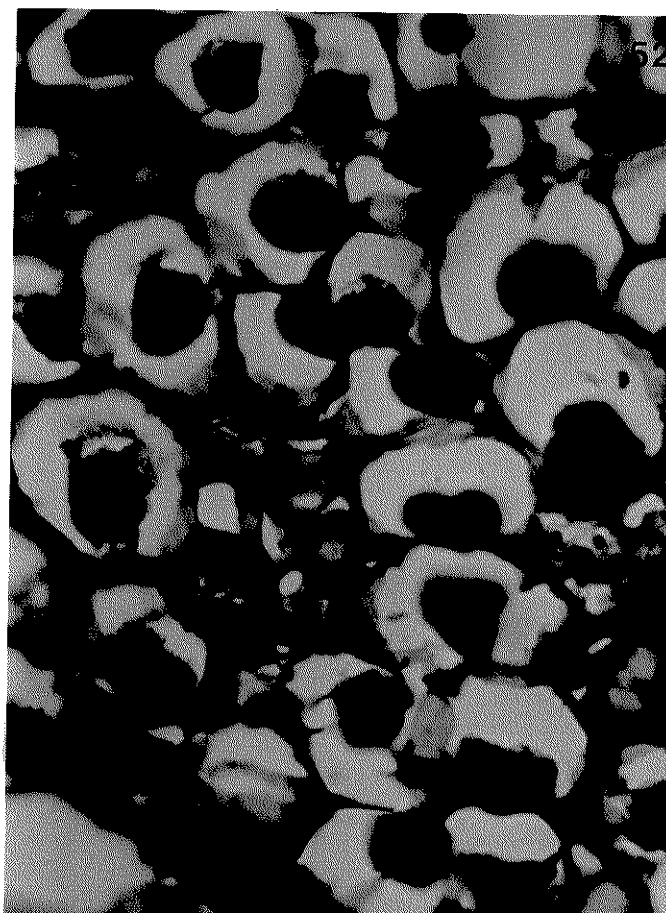
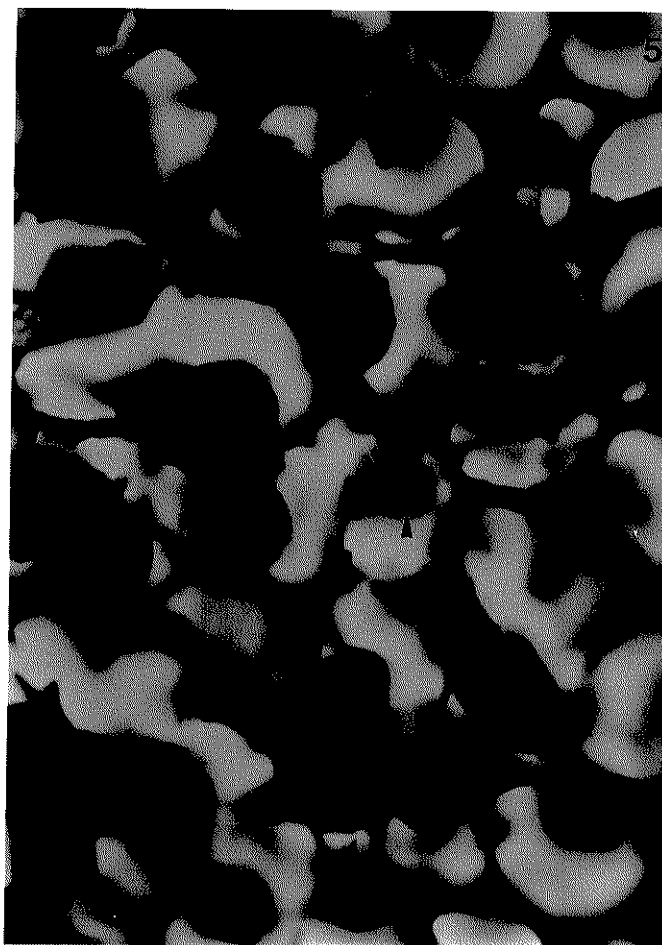
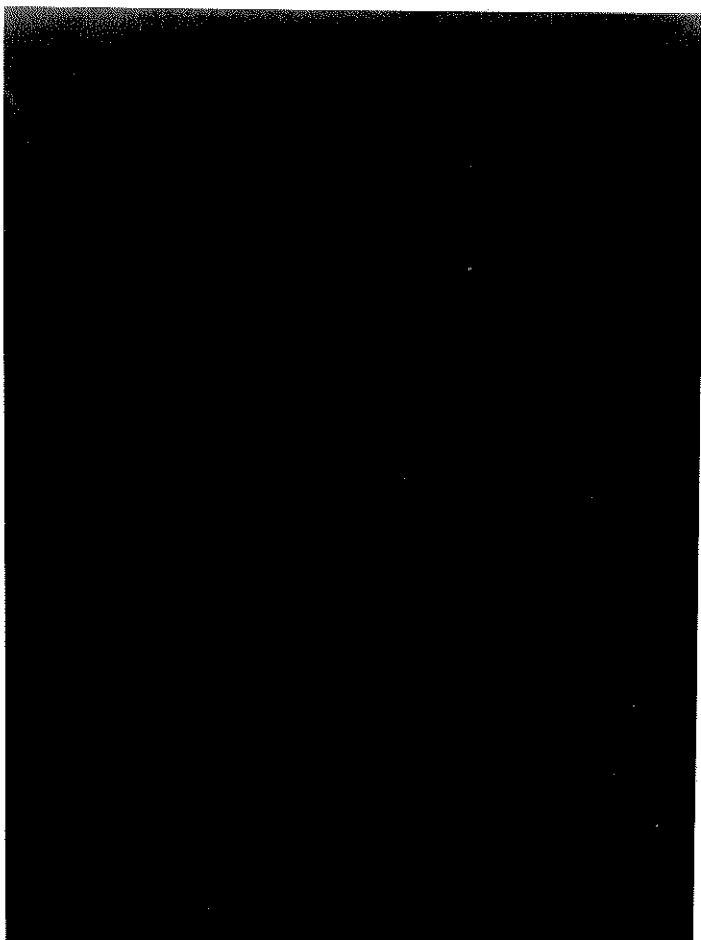
Cortes cotiledonares de *S. reticulata*, submetidos à coloração pelo reativo de Schiff, sem prévia oxidação pelo ácido periódico, praticamente não foram corados (Fig. 49). Foram evidenciados por este método as paredes celulares, o conteúdo citoplasmático, além de inúmeros e pequenos grânulos PAS-positivos de coloração mais intensa nas células de sementes quiescentes (Fig. 50). Com 96 h de envelhecimento observou-se um aumento no número desses grânulos (Fig. 51). A partir de 144 h, ficou evidente o aumento no tamanho sofrido por estes grânulos PAS-positivos (Fig. 52).

3.4. Número de grãos de amido por célula de *P. vulgaris*

A contagem do número de grãos de amido por célula confirmou o aumento dos mesmos revelado pelos métodos citoquímicos, durante o envelhecimento. Em sementes quiescentes o número médio de grãos por célula foi de 6,48. Este valor aumenta assintoticamente com o tempo de envelhecimento acelerado, tendendo a cerca de 12 grãos/ célula nos últimos tempos do tratamento.

De fato, convertidos em seus logaritmos, o número médio de grãos de amido apresenta uma significativa correlação com o tempo de envelhecimento ($r = 0,466$; $p < 0,001$; Fig. 53)

Fig.s 49 a 52 : Cortes longitudinais de cotilédones de *S. reticulata* (Sr) submetidas à reação do PAS. Aumento: 1050 X. **Fig. 49:** Controle. O material (não envelhecido) não sofreu oxidação prévia pelo ácido periódico, não apresentando afinidade pelo reativo de Schiff. **Fig. 50:** Sr 0h. Notam-se as paredes e o conteúdo citoplasmático corados em magenta, além da presença de alguns pequenos grânulos PAS-positivos de coloração intensa (▲). **Fig. 51:** Sr 96h. As estruturas evidenciadas no tempo 0 h se mantêm, mas o número de grânulos aumenta. **Fig. 52:** Sr 144h. Fica evidente o aumento em tamanho sofrido pelos grãos PAS-positivo a partir desse tempo.



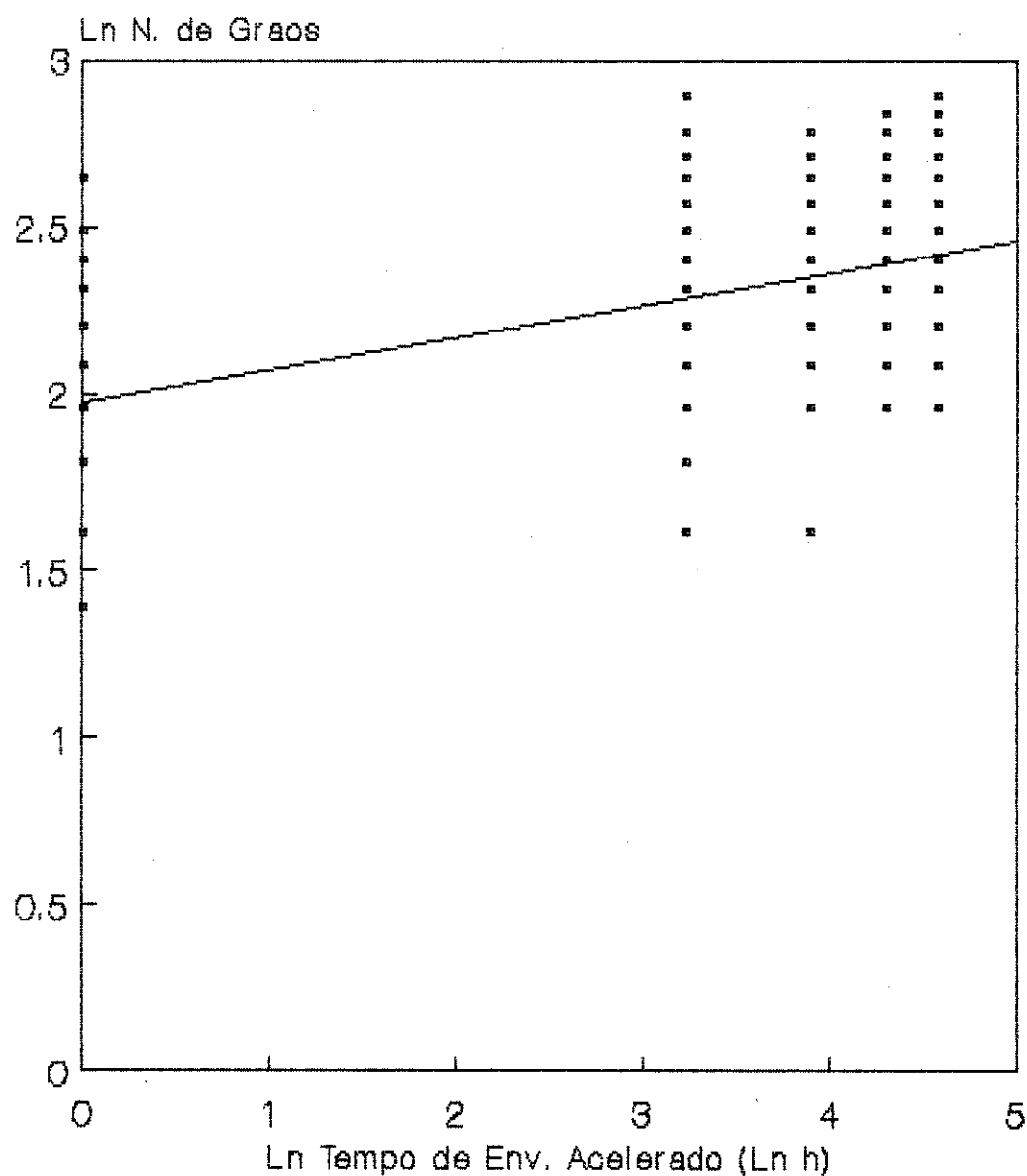


Fig.62 - Numero de Graos de Amido por Celula em Cotle-dones de P.vulgaris em Funcao do Tempo de En-velhecimento Acelerado (N=400; $r = 0,468$; $p < 0,001$)

Valores em Logaritmos Naturais (Ln)

3.5. Métodos Bioquímicos de análise

3.5.1. Dosagem de amido

Os resultados obtidos nas dosagens de amido em *P.vulgaris* encontram-se descritos na Tabela 4. Em sementes quiescentes, essa reserva representa cerca de 51% da massa de matéria fresca (PF) e cerca de 57% da massa de matéria seca (PS). Esses valores sofreram pequenas alterações durante o envelhecimento acelerado, no que diz respeito à massa de matéria seca, atingindo em 384 h 55%, o que não difere significativamente de Pv 0 h (Tabela 4; sobreposição dos intervalos de confiança a 5%).

Em *S.reticulata* foi detectada uma pequena quantidade de amido em sementes quiescentes, correspondendo a 5-6% de sua massa de matéria fresca ou seca. O teor de amido sofre oscilações durante o envelhecimento acelerado, atingido 7,8% da massa de matéria seca em 384 h, o que também não representa uma diferença significativa em relação às sementes quiescentes (Tabela 5).

3.5.2. Dosagem de Proteínas

As dosagens da proteína total de *S.reticulata*, em todos os tempos de envelhecimento analisados, encontram-se na tabela 6. Sementes quiescentes apresentam 6,4% de proteínas solúveis em NaOH 0,1N em relação a sua matéria seca, após

Tabela 4: Teor de amido em cotilédones de *P. vulgaris* sob vários tempos de envelhecimento acelerado (em mg de amido por g de massa seca). Estão indicados os limites inferiores e superiores dos intervalos de confiança a 5% (L.I. e L.S., respectivamente).

TEMPO DE ENVELHECIMENTO (h)	TEOR DE AMIDO (mg/g)	<u>INTERVALO DE CONFIANÇA</u>	
		L.I.	L.S.
0	574,09	418,29	711,24
24	432,78	274,10	562,86
48	548,35	389,26	685,96
72	710,28	536,14	868,06
96	519,99	383,09	641,52
144	441,68	253,93	591,29
192	522,08	352,97	664,50
384	555,58	409,54	685,26

Tabela 5: Teor de amido em cotilédones de *S. reticulata* sob vários tempos de envelhecimento acelerado (em mg de amido por g de massa seca). Estão indicados os limites inferiores e superiores dos intervalos de confiança a 5% (L.I. e L.S., respectivamente).

TEMPO DE ENVELHECIMENTO (h)	TEOR DE AMIDO (mg/g)	<u>INTERVALO DE CONFIANÇA</u>	
		L.I.	L.S.
0	56.65	46.09	75.49
24	94.67	82.10	122.94
48	132.47	122.20	167.55
72	59.04	38.03	85.15
96	92.74	77.04	122.56
144	65.24	49.16	89.46
192	82.34	52.89	118.85
384	78.01	54.63	109.65

384h de envelhecimento passam a apresentar 7,4% de proteína, o que não representa um aumento significativo desta reserva com o avanço do tempo de envelhecimento.

Os resultados da dosagem do material protéico solúvel em NaCl 0,2M encontram-se nas Tabela 7 e 8

Em *P.vulgaris*, esta fração protéica representa cerca de 36% da massa de matéria seca. Com o passar do tempo de envelhecimento, ocorreu um decréscimo do material proteico que se acentuou em 384 h, quando a semente apresentou 24% de proteína em relação à massa de matéria seca (Tabela 7), o que diferiu significativamente da concentração de proteína das sementes quiescentes (não sobreposição dos intervalos de confiança a 5%).

Sementes quiescentes de *S.reticulata* apresentaram 2,5% de proteínas solúveis em NaCl. Com o decorrer do tempo de envelhecimento há uma oscilação nos valores obtidos, em geral com valores próximos ou menores que no tempo inicial. Sementes de Sr 384 h apresentaram 2,1% de proteínas (Tabela 8), o que não diferiu da concentração nas sementes quiescentes.

Tabela 6: Teor de proteínas solúveis em NaOH em cotilédones de *S. reticulata* sob vários tempos de envelhecimento acelerado (em mg de proteína por g de massa seca). Estão indicados os limites inferiores e superiores dos intervalos de confiança a 5% (L.I. e L.S., respectivamente).

TEMPO DE ENVELHECIMENTO (h)	TEOR DE PROTEÍNA (mg/g)	<u>INTERVALO DE CONFIANÇA</u>	
		L.I.	L.S.
0	63.66	57.40	78.29
24	51.98	38.88	67.11
48	39.75	30.18	51.12
72	42.58	30.86	55.42
96	56.06	43.28	71.78
144	64.28	52.54	81.06
192	100.25	83.27	125.88
384	73.52	57.21	93.94

Tabela 7: Teor de proteínas solúveis em NaCl em cotilédones de *P. vulgaris* sob vários tempos de envelhecimento acelerado (em mg de proteína por g de massa seca). Estão indicados os limites inferiores e superiores dos intervalos de confiança a 5% (L.I. e L.S., respectivamente).

TEMPO DE ENVELHECIMENTO (h)	TEOR DE PROTEÍNA (mg/g)	<u>INTERVALO DE CONFIANÇA</u>	
		L.I.	L.S.
0	356.59	313.74	404.94
24	361.10	307.70	418.33
48	428.34	376.87	486.42
72	278.14	249.61	311.86
96	344.49	285.65	405.68
144	305.81	267.54	348.54
192	406.73	348.48	469.62
384	240.03	197.07	284.29

Tabela 8: Teor de proteínas solúveis em NaCl em cotilédones de *S. reticulata* sob vários tempos de envelhecimento acelerado (em mg de proteína por g de massa seca). Estão indicados os limites inferiores e superiores dos intervalos de confiança a 5% (L.I. e L.S., respectivamente).

TEMPO DE ENVELHECIMENTO (h)	TEOR DE PROTEÍNA (mg/g)	<u>INTERVALO DE CONFIANÇA</u>	
		L.I.	L.S.
0	25.00	22.06	30.90
24	12.88	6.91	17.90
48	17.27	11.75	22.83
72	22.32	18.01	28.25
96	22.90	16.59	29.81
144	14.09	7.86	19.44
192	35.76	28.01	45.61
384	21.20	12.89	28.73

3.5.3. Caracterização do material protéico

Os resultados da PAGE-SDS a 12,5%, contendo ou não tampão redutor das proteínas cotiledonares de *P.vulgaris* e *S.reticulata* solúveis em NaCl 0,2M, encontram-se nas Figuras 54 a 57.

Em todos os géis analisados o padrão de pesos moleculares encontra-se em 1, onde são detectadas 4 bandas distintas, sendo a primeira correspondente à fosforilase b (PM.97.400); a segunda refere-se à albumina bovina (PM.66.000); a terceira, ovalbumina (PM.45.000) e a quarta é a banda da anidrase carbônica (PM.29.000). A banda da soralbumina bovina pura encontra-se em 10 (exceto na Fig. 54).

As amostras de 2 a 9 referem-se às extrações das proteínas solúveis em solução salina de sementes envelhecidas por 0, 24, 48, 72, 96, 144, 192 e 384 h.

A eletroforese com tampão redutor do material protéico de *P.vulgaris* revelou um total de 19 bandas distintas, ao passo que quando foi usado tampão não redutor, apenas 13 bandas foram detectadas (Fig. 54 e 55).

Em todos os tempos analisados são notadas três bandas bem evidentes, com pesos moleculares variando entre 44-61.000. Outra banda de destaque localiza-se na região de 30.000. São observadas ainda algumas bandas com pesos moleculares variando entre 9-27.000.

Com o avanço no tempo de envelhecimento observa-se, de forma geral, uma diminuição no tamanho da banda de 61.000 e uma tendência de desaparecimento das bandas de 9-23.000. Pode-se detectar ainda o aparecimento, a partir de 24 h, de algumas bandas entre 69-80 kD (Fig. 54).

Em *P.vulgaris* com 144 h de envelhecimento acelerado houve a formação de uma banda com PM de 20 KD, tanto em tampão redutor como em tampão não redutor, e uma evidente diminuição das bandas de PM maiores que 66 KD. Nos tempos seguintes (192 e 384) essa banda de 20KD não pode ser notada (Fig. 54-55).

Em *S.reticulata*, a PAGE-SDS apresentou bandas bastante semelhantes com tampão redutor (10 bandas distintas) e, com tampão não redutor, foram detectadas 9 bandas (Figs. 56 e 57).

Com o envelhecimento observou-se a diminuição da intensidade de coloração de todas as bandas, culminando com o desaparecimento de algumas delas, como por exemplo a banda de 65.000 e aquelas com peso molecular entre 26.500 e 10.000 (Fig. 56).

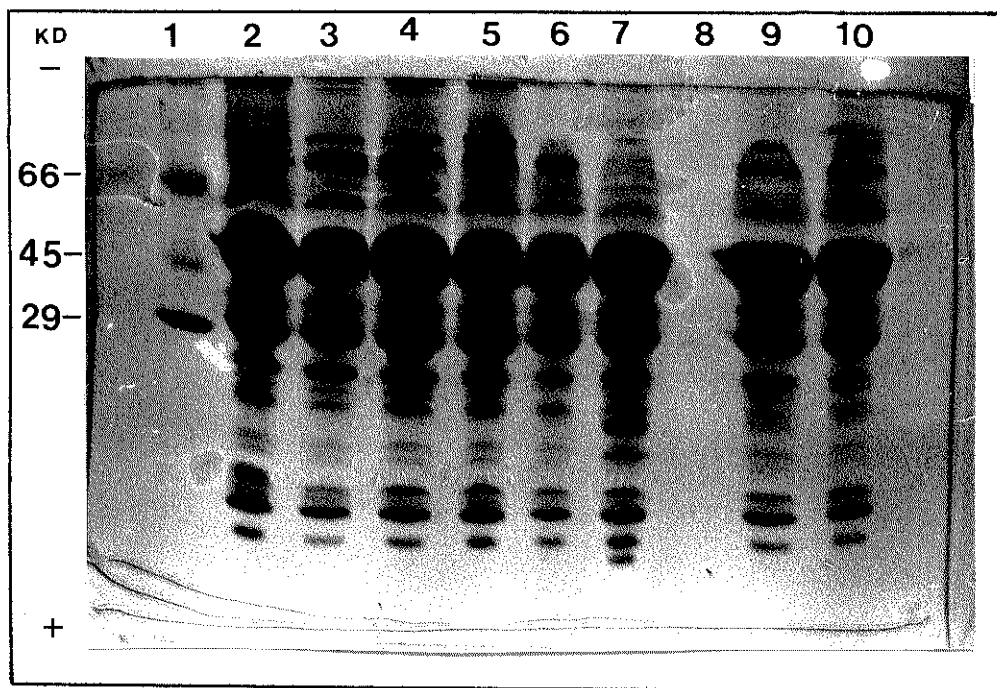


Fig. 54: SDS-PAGE (12,5% de acrilamida) com tampão redutor das amostras de proteínas de sementes de *P. vulgaris* solúveis em NaCl 0,2M. Padrão de pesos moleculares (1). Amostras das sementes submetidas a 0, 24, 48, 72, 96, 144, 192, 384 h de envelhecimento acelerado (2-10). Tampão de amostra (8). Condições de corrida: corrente constante de 25 mA, tensão: 100 V, durante 3h10min, temperatura ambiente. Coloração pelo Coomassie blue.

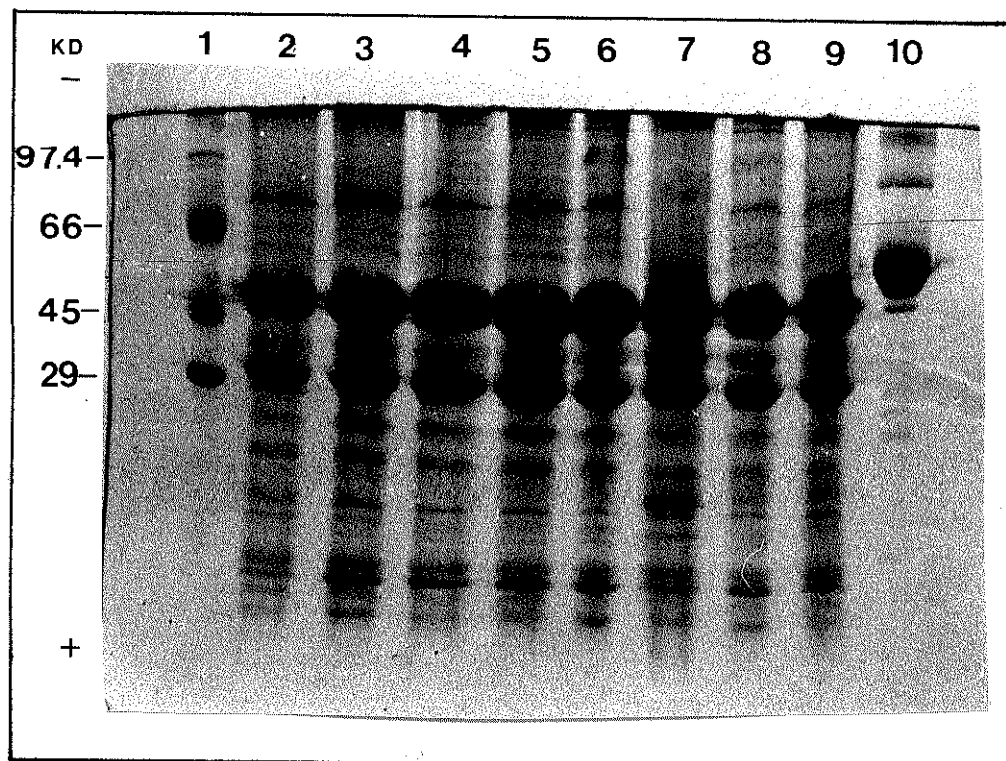


Fig. 55: SDS-PAGE (12,5% de acrilamida) com tampão não redutor das amostras de proteínas de sementes de *P. vulgaris* solúveis em NaCl 0,2M. Padrão de pesos moleculares (1). e BSA (10). Amostras das sementes submetidas a 0, 24, 48, 72, 96, 144, 192, 384 h de envelhecimento acelerado (2-9). Condições de corrida: corrente constante de 25 mA, tensão: 100 V, durante 3h, temperatura ambiente. Coloração pelo Coomassie blue.

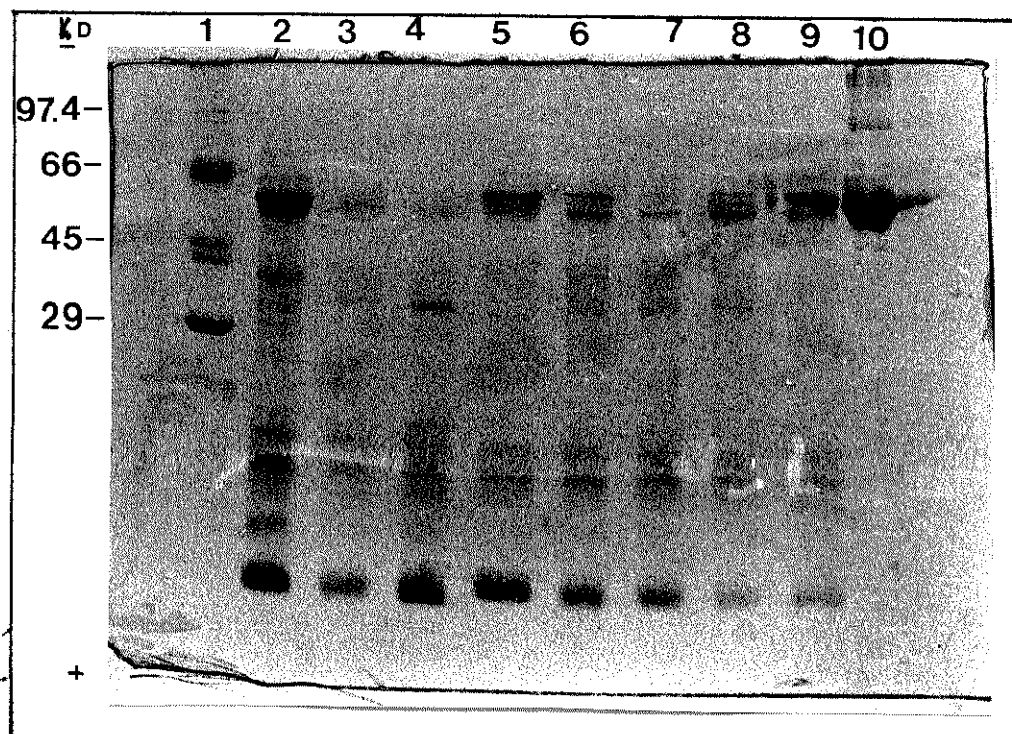


Fig. 56: SDS-PAGE (12,5% de acrilamida) com tampão redutor das amostras de proteínas de sementes de *S. reticulata* solúveis em NaCl 0,2M. Padrão de pesos moleculares (1). e BSA (10). Amostras das sementes submetidas a 0, 24, 48, 72, 96, 144, 192, 384 h de envelhecimento acelerado (2-9). Condições de corrida: corrente constante de 25 mA, tensão: 100 V, durante 3h10min, temperatura ambiente. Coloração pelo Coomassie blue.

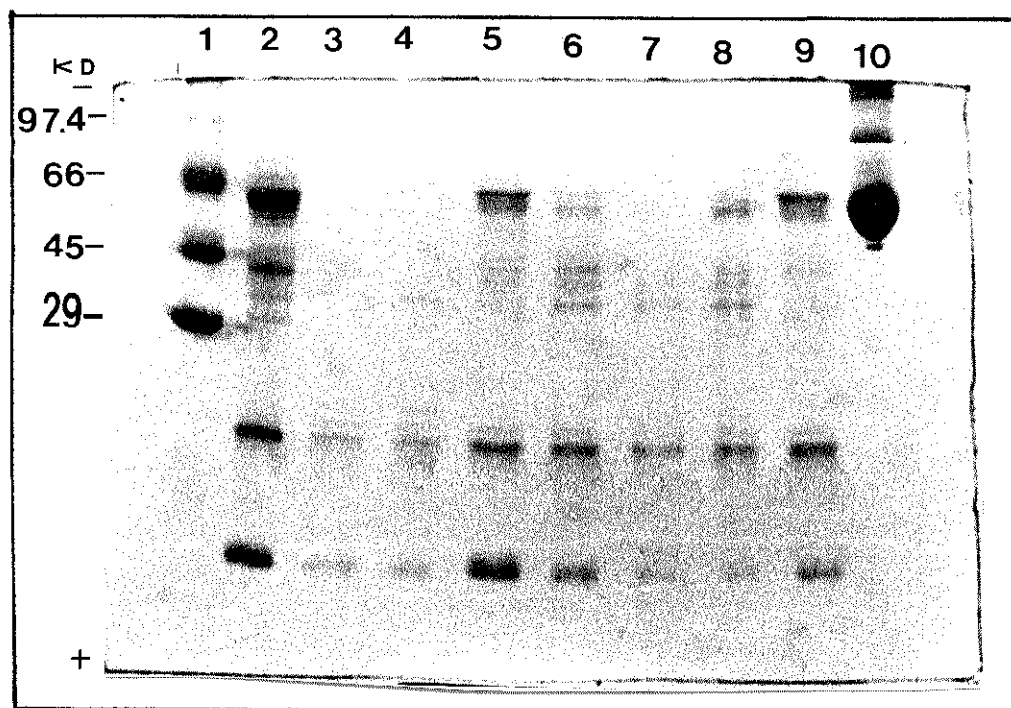


Fig. 57: SDS-PAGE (12,5% de acrilamida) com tampão não redutor das amostras de proteínas de sementes de *S. reticulata* solúveis em NaCl 0,2M. Padrão de pesos moleculares (1), e BSA (10). Amostras das sementes submetidas a 0, 24, 48, 72, 96, 144, 192, 384 h de envelhecimento acelerado (2-9). Condições de corrida: corrente constante de 25 mA, tensão: 100 V, durante 3h10min, temperatura ambiente. Coloração pelo Coomassie blue.

4. DISCUSSÃO

4.1. Germinação

As curvas de germinação de ambas as espécies mostraram o padrão geral de envelhecimento de sementes. Inicialmente verifica-se um atraso na germinação, normalmente associado à perda de vigor. Em uma segunda fase, observa-se uma redução no número de sementes que germinam, até que a viabilidade do lote se aproxime de 0% (HARRINGTON, 1972; VILLIERS, 1983).

De fato, o aumento no tempo médio de germinação (TMG) de *P. vulgaris*, com o tempo de envelhecimento acelerado, está de acordo com resultados obtidos com esta espécie sob diversas condições de envelhecimento (GRANGE, 1980; PANDEY, 1989a; 1989b). DELL'AQUILA (1987), demonstrou para sementes de trigo (*Triticum durum*) que o aumento no TMG com o envelhecimento está associado a alterações fisiológicas e bioquímicas, sendo a relação tão estreita que este autor recomenda a utilização do TMG como índice de qualidade de sementes.

Entre as alterações associadas ao atraso na germinação estão a perda de vigor, redução da taxa metabólica, danos nas membranas, alterações e degeneração das radículas e plântulas (HARRINGTON, 1972; GRANGE, 1980; DELL'AQUILA, 1987; PANDEY, 1989a; 1989b).

As primeiras 24 h de envelhecimento acelerado parecem ter o efeito oposto, aumentando a velocidade de germinação.

Tal resultado poderia ser explicado pela alta umidade a que são submetidas as sementes, levando a uma aceleração inicial da atividade das enzimas pré-existentes nas mesmas e seus processos metabólicos.

Também a perda de viabilidade das sementes de *P. vulgaris* seguiu o padrão geral descrito por HARRINGTON (1972): uma manutenção inicial da capacidade germinativa, seguida de uma redução acentuada a partir de um certo tempo de envelhecimento. A queda muito brusca na viabilidade do lote estudado com o avanço do envelhecimento reflete a sua grande homogeneidade.

Dados da literatura indicam que em *P. vulgaris* o tratamento das sementes a 42°C e 100% de umidade relativa, por 72 h, é suficiente para reduzir sua viabilidade (DELOUCHE & BASKIN, 1973; MAEDA et alii, 1982; LOPES, 1990). No entanto esta variedade de feijão não apresentou queda de viabilidade com 72 h de envelhecimento, nas condições citadas acima, e teve sua germinação totalmente inibida apenas com 384 h de envelhecimento. Apesar desses resultados serem aparentemente conflitantes, deve-se levar em consideração que já com 72 h ocorre um atraso na germinação, indicando redução de vigor dessas sementes.

S. reticulata mostrou-se mais resistente ao envelhecimento acelerado, sob todos os aspectos. O tempo médio de germinação desta espécie não mostra tendência a aumentar com

o tempo de envelhecimento, e a viabilidade só registra uma queda significativa com 384 h de envelhecimento.

Sendo *S. reticulata* uma espécie amazônica, tais resultados são compreensíveis. As condições do teste de envelhecimento acelerado estão próximas das condições que as sementes enfrentam em seu ambiente natural.

A população de sementes desta espécie mostrou ainda uma grande variância nos parâmetros de germinação, o que se manifesta na maior amplitude dos intervalos de confiança da viabilidade e TMG. Pela mesma razão, a queda de viabilidade com o tempo mostrou-se mais suave que em *P. vulgaris*.

Em ambas as espécies o crescimento anormal e as lesões na radícula indicam a perda do vigor, sendo sintomas do envelhecimento dessas sementes. Sementes inviáveis de feijão envelhecidas naturalmente também apresentaram tegumento mais ressecado e quebradiço confirmando os resultados obtidos por LOPES (1990).

4.2. Análise do material "in situ"

4.2.1. Radicais aniônicos e núcleo

O azul de toluidina é um corante básico que possui radicais NH_3^+ livres, sendo utilizado em colorações de materiais histológicos, em soluções cujas faixas de pH oscilam entre 2 a 11-12. A pH 4,0, é pequeno o número de radicais carboxila presentes nas proteínas que se encontram desproto-

nados. No entanto, neste pH, radicais fosfato, presentes nos ácidos nucleicos, e radicais sulfato e carboxila, presentes nos polissacarídeos ácidos, são corados pelo AT (LISON, 1960; PEARSE, 1961).

Uma outra característica do azul de toluidina é o fenômeno da metacromasia. A metacromasia é um evento que se caracteriza por um abaixamento no pico de absorção das soluções desse corante (hipocromismo), em concentrações maiores do que $10^{-4}M$, cujo pico de absorção é de 625nm e formação de um novo pico de absorção em comprimentos de onda menores (efeito hipsocrômico). Nos cortes, esse efeito ocorre devido a um aumento na disponibilidade de radicais aniônicos e maior proximidade dos mesmos no substrato, possibilitando a interação entre as moléculas planares do AT, sendo necessária uma maior energia para a excitação de seus elétrons (VIDAL, 1987).

As paredes celulares quando coradas pelo AT apresentam-se metacromáticas devido à presença de radicais aniônicos nas substâncias pécticas (LISON, 1960; PEARSE, 1961).

Sementes de *P.vulgaris* e *S.reticulata*, em todos os tempos de envelhecimento acelerado analisados apresentaram paredes celulares metacromáticas. Esta metacromasia aparentemente não se alterou durante todo o período analisado, sugerindo que o envelhecimento acelerado por no máximo 384 h, não promoveu a nível da parede, liberação de grupamentos aniônicos próximos como já foi descrito para a

germinação de sementes de *Glycine max* (CORTELAZZO & VIDAL, in press), esporos de *Cyathea delgadii* (RANDI et alii, in press) e durante a germinação de *Canavalia ensiformis* e *Canavalia gladiata* (CORTELAZZO, 1989) e sementes de feijão submetidas ao envelhecimento natural por 21 a 40 meses (LOPES, 1990).

Núcleos e nucléolos também foram corados pelo AT a pH 4,0, devido à presença de radicais fosfato no DNA nuclear e RNA nucleolar. Esse método mostrou-se eficiente para demonstrar as alterações nucleares decorrentes do envelhecimento acelerado, que se caracterizaram pela compactação cromatínica e degeneração do nucléolo.

A reação de Feulgen é uma reação específica para a detecção de DNA, tendo sido realizada com o objetivo de confirmar os resultados obtidos com o AT a pH 4,0 a nível nuclear. Esta reação envolve, em uma primeira etapa, a hidrólise ácida, que remove o RNA e as bases púricas do DNA. Com a formação do ácido apurínico, o material é tratado com o reativo de Schiff, tendo então seu grupo cromofórico restabelecido devido a presença dos radicais carbonila (MELLO & VIDAL, 1978).

Com o avanço de tempo de envelhecimento, em *P. vulgaris*, observou-se a compactação crescente da cromatina. Sementes inviáveis apresentaram núcleos com cromatina vacuolizada e núcleos picnóticos em maior número. Estas alterações nucleares vem sendo relacionadas com a morte celular de tecidos em

necrose (SANCHES-LUCAS, 1959). Esses fenótipos também foram detectados em meristema radicular de embriões de alface submetidos ao envelhecimento acelerado à 30°C e 13% de umidade por 4 semanas (VILLIERS, 1983), cotilédones de sementes de *Canavalia ensiformis* e *Canavalia gladiata* quando da sua abscisão na planta jovem (CORTELAZZO, 1989) e em sementes de *F. vulgaris* durante envelhecimento natural por 40 meses (LOPES, 1990).

Tecidos animais submetidos a vários tipos de estresse, tais como, choque térmico, ação de metais pesados, radiação gama e jejum também apresentaram alterações no grau de compactação cromatínica, fenômeno de vacuolização e presença de núcleos picnóticos (MELLO, 1989; DANTAS, 1990).

A impregnação pela prata é uma técnica que vem sendo amplamente utilizada na análise ultraestrutural e citoquímica de nucléolos em tecidos animais e vegetais (RISUENO et alii, 1976; 1982; BOURGEOIS et alii, 1979; HERNANDEZ-VERDUN, 1983). Entretanto, ainda não está bem estabelecida a correlação existente entre a deposição de prata e os componentes nucleolares envolvidos. Uma hipótese é de que os íons prata interagem com grupos carboxila de proteínas não histônicas (BOURGEOIS et alii, 1979) ou com proteínas fosforiladas presentes nas partículas de ribonucleoproteínas (MEDINA et alii, 1989). De qualquer modo, está bem estabelecido que a prata liga-se a dois tipos de proteínas não histônicas nos núcleos interfásicos: uma

associada com segmentos de DNA, da cromatina descondensada e outra associada com o precursor ribossomal (MEDINA et alii, 1986).

O método de impregnação pela prata não se mostrou tão específico para os nucléolos como ocorre em regiões meristemáticas de várias plantas (FERNANDEZ-GOMES et alii, 1983; MEDINA et alii, 1983; 1986; MARTIN et alii, 1989). Essa metodologia tem-se mostrado extremamente útil, inclusive na detecção de grânulos de rRNP (ribonucleoproteínas ribossomais) na matriz nuclear, o que denota sua especificidade para a região nucleolar, tanto ao nível de microscopia de luz quanto de microscopia eletrônica (MEDINA et alii, 1989). Além disso, o fixador utilizado e os tempos das diversas etapas deste método foram aqueles já estabelecidos pelo grupo de pesquisadores que desenvolveu esta metodologia (STOCKERT et alii, 1969; FERNANDEZ-GOMES et alii, 1969).

Os resultados obtidos, aparentemente conflitantes com o acima expostos, podem ser devido ao tipo de material presente nas sementes, com uma grande quantidade de radicais fosfato associados às proteínas de reserva ou mesmo presentes nos fitatos acumulados no citoplasma, o que poderia justificar a impregnação obtida nessa região (FERNANDEZ-GOMES, comunicação pessoal).

Cortes semi-finos de sementes de feijão, submetidas ao envelhecimento acelerado, revelaram uma aparente diminuição

no tamanho dos nucleólos, o que também foi detectado em células do eixo embrionário de sementes de alface (VILLIERS, 1983). Não foi possível detectar a presença dos nucleólos em cortes com 8 μ m de espessura, devido à forte impregnação do material citoplasmático.

Os nucleólos também foram detectados em cortes semi-finos de sementes quiescentes de *S. reticulata*, não sendo possível detectá-los após 384 h de envelhecimento, devido ao tamanho e aspecto dos corpos protéicos que dificultaram a identificação do núcleo. No entanto, a coloração pelo AT revelou nucléolos íntegros em todos os tempos analisados, demonstrando que a nível citoquímico essa organela parece não sofrer alterações decorrentes do envelhecimento até o tempo aqui analisado.

4.2.2. Polissacarídeos

Na reação do PAS, o ácido periódico oxida hidroxilas de carbonos vicinais de polissacarídeos neutros, rompendo a ligação entre os mesmos e produzindo 2 radicais carbonila (PEARSE, 1961) que se ligam ao reativo de Schiff através de ligações covalentes (MELLO & VIDAL, 1978).

Em *P. vulgaris*, os inúmeros grânulos de elevado tamanho, não corados pelo AT e XP, foram intensamente evidenciados pela reação do PAS, podendo-se concluir tratar-se de grãos de amido.

Um outro modo de se comprovar a natureza química desses grânulos PAS-positivos é através de sua análise ao microscópio de polarização. Nos grãos de amido, as moléculas de amilose e amilopectina dispõem-se de forma circular a partir de um centro de nucleação. Essa disposição faz com que esses grãos apresentem-se birrefringentes e com um aspecto característico de "cruz de malta" quando observados ao microscópio de polarização com analisador e polarizador cruzados (VIDAL & MELLO, 1987)

Também foi possível detectar a natureza polissacarídica desses grãos através do método de impregnação pela prata, uma vez que a redução dos íons Ag^+ e consequente precipitação de prata metálica (Ag^0) pode-se dar ao nível de radicais vic-glicóis (GALLYAS, 1970; VELICAN & VELICAN, 1972). Os grãos de amido apresentam-se mais impregnados na sua porção periférica em sementes quiescentes, possivelmente, devido a maior facilidade de penetração dos íons Ag^+ . O envelhecimento acarreta uma menor impregnação, aparentemente dificultando a penetração da prata.

A análise ao microscópio de polarização também veio confirmar a natureza química desses grânulos e o seu aumento em número e diminuição em tamanho com o avanço do tempo de envelhecimento acelerado.

No entanto a dosagem bioquímica não revelou um aumento significativo no teor dessa reserva com o envelhecimento acelerado, o que sugere que não ocorre síntese de amido du-

rante o processo de envelhecimento acelerado. Resultado semelhante foi encontrado para sementes de feijão envelhecidas naturalmente por 24 e 34 meses, sob condições de altas temperaturas e umidade relativa (LOPES, 1990).

Portanto, o aumento no número e diminuição no tamanho dos grãos de amido pode ser consequência da degradação de grãos maiores pela α -amilase em função da temperatura, produzindo grãos menores. Em cereais, os grãos maiores são hidrolisados mais rapidamente que os menores pela α -amilase à 65°C (MacGREGOR, 1983).

Em sementes quiescentes de *S. reticulata*, detectou-se um pequeno número de grânulos PAS-positivos não corados pelo AT e XP. Com o avanço no tempo de envelhecimento acelerado, observou-se um aumento no tamanho dos mesmos. O reduzido tamanho desses grãos dificultou a sua visualização ao microscópio de polarização e a contagem do seu número por célula, em todos os tempos de envelhecimento analisados.

A dosagem bioquímica do teor de amido presente nas sementes não revelou um aumento significativo dessa reserva com o avanço do tempo de envelhecimento. Assim como em feijão, parece não ocorrer, durante o período máximo de envelhecimento aqui analisado, síntese ou degradação de amido.

Portanto, uma provável explicação para o aumento no tamanho dos grãos de amido a partir de 144 h de envelhecimento seria a fusão dos grãos de pequeno tamanho, encontrados nos tempos anteriores, com a formação de grãos de maior tamanho,

uma vez que, aparentemente, ocorre uma diminuição no número desses grãos a partir desse tempo.

As paredes celulares também foram evidenciadas, em *P. vulgaris* e *S. reticulata*, pela reação do PAS devido à presença de celulose e pelo método de impregnação pela prata, revelando a presença nesta estrutura de radicais vic-glicóis, não só de celulose, mas também de hemicelulose (TAIZ, 1984). Em *P. vulgaris*, a partir de 144 h de envelhecimento, as paredes celulares mostraram uma menor susceptibilidade à impregnação, revelando uma menor disponibilidade de radicais vic-glicóis nessa estrutura.

4.2.3. Material Proteico

Xylidine Ponceau é um corante aniônico azóico que apresenta dois radicais sulfato. A pH 2,5 esses radicais encontram-se ionizados negativamente, ligando-se assim aos radicais catiônicos disponíveis (VIDAL, 1970). Esse corante vem sendo utilizado na detecção de proteínas totais, uma vez que, após o tratamento com enzimas proteolíticas, a coloração desaparece (CORTELAZZO, 1986; RANDI, 1987).

A coloração pelo XP demonstrou, em ambas as espécies analisadas, uma alteração no estado de agregação do material protéico e no seu padrão de distribuição, além de uma aparente redução dessa reserva, com o aumento do tempo de envelhecimento acelerado.

A análise bioquímica mostrou uma redução do conteúdo protéico em *P.vulgaris*, confirmando os resultados topoquímicos. Sementes de *S.reticulata*, submetidas a este tipo de estresse, não apresentaram uma diminuição significativa do seu conteúdo protéico, embora topoquimicamente verifique-se uma diminuição da coloração do material XP-positivo.

LOPES (1990), trabalhando com envelhecimento natural de sementes de *P.vulgaris*, verificou um padrão de alterações topoquímicas e bioquímicas semelhantes, para sementes envelhecidas naturalmente por 21 meses, sob condições de armazenamento com altas temperaturas e umidade relativa.

Os corpos protéicos contêm proteínas de estocagem, ácido fítico, cátions, RNAs e enzimas hidrolíticas, como a fosfatase, RNase, α e β -glicosidase, α -amilase e proteases, embora não se saiba ainda se essas enzimas estão ativas antes da germinação (FERNOLLET, 1978; LARKINS, 1981; MURRAY, 1984).

A redução verificada no conteúdo protéico em sementes envelhecidas sugere que enzimas proteolíticas estejam ativas, e esta atividade parece estar relacionada com o processo de envelhecimento devido à altas temperaturas e umidade, uma vez que, durante o envelhecimento acelerado, as sementes apresentam um aumento no seu teor de umidade e a água poderia promover uma ativação das mesmas. OSBORNE (1983) aponta, como um dos principais eventos do processo de envelhecimento em sementes, o rompimento das membranas dos

corpos protéicos com a liberação de enzimas proteolíticas. Essas enzimas podem então estar associadas ao processo de envelhecimento através da degradação de proteínas solúveis de membranas, nucleoproteínas, ribossomos e enzimas (CHING & SCHOOLCRAFT, 1968).

Uma forma de armazenamento de fósforo e outros íons nas sementes é na forma de ácido fítico (LOTT, 1980). O fitato pode estar mais concentrado nas porções periféricas dos corpos protéicos, uma vez que nesta região ocorre uma maior interação do AT_1 , que poderia estar interagindo com radicais fosfato não comprometidos com o material protéico.

Em ambas as espécies, os corpos protéicos também apresentaram-se corados pelo PAS, indicando a presença de glicoproteínas no seu interior.

A impregnação pela prata também veio confirmar a presença de glicoproteínas nessas sementes, uma vez que a redução dos íons Ag^+ e consequente precipitação de prata metálica (Ag^0), se dá ao nível de radicais vic-glicóis (GALLYAS, 1970; VELICAN & VELICAN, 1972). A forte impregnação também pode ser devida a presença de radicais fosfatos disponíveis nos fitatos e proteínas, que possibilitariam a redução da prata nesses locais.

Cortes semi-finos de cotilédones de sementes quiescentes e após 384h de envelhecimento, impregnados pela prata, mostram uma alteração no estado de agregação dos corpos protéicos em *S. reticulata*, sugerindo que ocorra uma fusão dos

mesmos com o aumento do tempo de envelhecimento, o que reforça a idéia de que haja um rompimento das membranas dos corpos protéicos com o envelhecimento.

Cotilédones de *P. vulgaris*, submetidos à impregnação pela prata, e incluídos em Epon, apresentaram alteração no padrão de impregnação. Materiais envelhecidos apresentaram-se mais impregnados, sugerindo que, com o envelhecimento, um maior número de radicais vic-glicóis esteja disponível.

A natureza oxidante ou redutora de um substrato pode ser indicada através do emprego de uma reação de oxido redução específica. A reação do ferricianeto férrico promove a oxidação de mono e polifenóis, grupos pirrol e indol, ácido ascórbico e lipídeos não saturados. Nesta reação ocorre a produção de um pigmento verde, denominado verde da Prússia, que é o ferrocianeto ferroso-férrico, e um precipitado branco que se apresenta como um "corpo" incolor que é o ferrocianeto ferroso (ADAMS, 1956 apud LISON, 1960).

O verde da Prússia é produzido espontaneamente em soluções de ferricianeto férrico ou devido à ação de redutores fracos presentes nos tecidos analisados, e não tem grande valor na interpretação dos resultados. A reação do ferricianeto férrico é considerada como positiva quando aparece o azul da Prússia (ferrocianeto férrico), devido à ação de redutores fortes presentes no tecido. O precipitado branco só é produzido quando os redutores são muito mais fortes, como tiosulfatos. No entanto esses redutores não são

facilmente encontrados em preparações histológicas (LISON, 1960).

A reação pelo ferricianeto férrico revelou a presença de redutores fracos no material protéico de sementes quiescentes de *P. vulgaris*. Após 144 h de envelhecimento acelerado observa-se um aumento na intensidade da coloração, sugerindo um aumento na capacidade redutora do material.

Em sementes de *S. reticulata* envelhecidas por 0, 24, 48, 72, 144 e 192 h, o uso da reação do ferricianeto férrico revelou a presença de material redutor fraco apenas no interior dos feixes vasculares do floema. Com 384h de envelhecimento, as células de reserva do parênquima e os feixes vasculares do floema contêm, no seu interior, substâncias de natureza redutora. Esse caráter redutor possivelmente pode ser devido ao ácido tânico presente nas células de reserva e que confere cor amarelada à semente. Com o envelhecimento, esse composto fenólico poderia se apresentar mais disponível para a reação com o ferricianeto.

A presença de material oxidado pelo ferricianeto férrico apenas no interior dos vasos do floema, em sementes quiescentes e envelhecidas por 0, 24, 48, 72, 144 e 192 h, pode ser devida a alterações de natureza oxido-redutora que o tanino ou as proteínas de reserva sofrem ao serem transportados para os vasos.

O primeiro passo para a degradação das proteínas de estocagem é a sua deaminação seguida pela clivagem das pontes

de dissulfeto (DERBYSHIRE et alii, 1976), promovendo assim a formação de regiões redutoras nas proteínas. Em sementes submetidas a períodos prolongados de envelhecimento, as proteínas de reserva poderiam estar sendo clivadas ainda no interior das células parenquimáticas, promovendo assim o aumento de substâncias redutoras nas células cotiledonares de reserva, sendo este efeito maior em *S. reticulata* que em *P. vulgaris*.

Em leguminosas, as principais proteínas de reservas pertencem à classe das globulinas, sendo solúveis em soluções salinas diluídas (OSBORNE & CAMPBELL, 1898). DANIELSSON (1949), trabalhando com 34 espécies de leguminosas pertencentes a 8 tribos diferentes, encontrou, com pouca variação, que todas as globulinas podem apresentar 2 coeficientes de sedimentação: 7S e 11S, que foram respectivamente denominadas vicilinas e leguminas, sendo as primeiras glicoproteínas. Essas frações são constituídas por diversas subunidades, cujos pesos moleculares variam entre 20.000 a 70.000 (MCLEESTER et alii, 1973; DERBYSHIRE et alii, 1976; FERNOLLET & MOSSE, 1983).

Sementes de *Phaseolus* spp. contêm entre 20 a 30% de proteínas, e, em média, 60% da proteína total é globulina (LARKINS, 1981), sendo que a proteína mais abundante é uma vicilina denominada faseolina, o que justifica a coloração dos corpos protéicos pela reação do PAS. As porções glicídicas dessas glicoproteínas é que estariam sendo

oxidadas e formando radicais carbonila que se ligariam ao reativo de Schiff.

A faseolina é constituída pelas globulinas G1 e G2. A fração G1 é formada por três tipos diferentes de polipeptídeos, com pesos moleculares de 43.000, 47.000 e 50.000 daltons ligados entre si por pontes dissulfeto, formando trímeros ou hexâmeros (PERNOLLET & MOSSE, 1983). A fração G2 contém três principais polipeptídeos com pesos moleculares de 30.000, 32.000 e 34.000 daltons (LARKINS, 1981).

Apesar de terem sido obtidos valores de peso molecular um pouco diferentes daqueles descritos na literatura, as frações G1 e G2 estão representadas nas eletroforeses pelas bandas de peso molecular de 61.000, 44.000 e 38.000 para a glicoproteína I, e a banda de peso molecular de 33.000 para a glicoproteína II.

A eletroforese com tampão não redutor mostrou um menor número de bandas, uma vez que, na ausência de 2-Mercaptoetanol, as pontes de dissulfeto não são reduzidas e as subunidades não se separam. Assim sendo, parte do material ficou retido, não entrando no gel, devido à sua concentração e ao elevado peso molecular dos polímeros. Essa eletroforese também indica que o envelhecimento não provocou ruptura de pontes S-S, uma vez que não ocorreu formação de novas bandas.

O aparecimento de novas bandas de baixo peso molecular (PM) em *P. vulgaris* com 144 h de envelhecimento e a

diminuição da coloração das bandas de alto peso molecular, sugerem uma degradação dessas proteínas a partir desse tempo. A não observação dessas bandas de menor FM nos tempos seguintes pode indicar que o processo de degradação é contínuo, com a formação de polipeptídeos cada vez menores, que não seriam mais visualizados no gel a 12,5% de acrilamida. Essa degradação, produz polipeptídeos com FM em torno de 20.000 daltons e desprovidos de pontes dissulfeto, uma vez que foram detectados tanto com tampão redutor como com tampão não redutor.

As eletroforeses vieram confirmar os resultados das análises citoquímicas e bioquímicas, revelando uma diminuição significativa do conteúdo protéico de sementes de feijão ao longo do processo de envelhecimento, através de uma diminuição na intensidade de coloração da maioria das bandas.

Como resposta à temperatura supraótima, células animais e vegetais respondem produzindo uma classe de proteínas denominada HSP, (Heat-shock proteins) e estão relacionadas com a aquisição de termotolerância (JINN et alii 1989, BRODL et alii, 1990; STICHER et alii, 1990). Elas são classificadas em três grupos, o primeiro com pesos moleculares maiores que 60.000, o segundo com pesos menores que 60.000 e maiores que 35.000 e um grupo com pesos moleculares menores que 35.000 (MASON-APPS et alii, 1990). A partir de 24 h de envelhecimento acelerado, observou-se o aparecimento de bandas finas com pesos moleculares variando entre 69-80.000

Pode-se supor que essas bandas sejam referentes ao grupo das HSP, com pesos moleculares superiores a 60.000 daltons.

Em sementes de *S. reticulata*, o conteúdo total de proteína foi dosado a fim de se determinar o seu percentual de globulinas. Sabe-se que *Senna alata*, espécie taxonomicamente relacionada, possui cerca de 15,4% de proteínas (UKHUN & IFEBIGH, 1988). Em *S. reticulata* a reserva protéica representa cerca de 6% da matéria seca da semente e a fração globulina cerca de 2%, o que corresponde a aproximadamente 40% do total de proteínas da semente.

As eletroforeses de sementes de *S. reticulata* revelaram uma diminuição do conteúdo protéico, a partir de 24 h de envelhecimento acelerado, através de uma diminuição na intensidade de coloração da maioria das bandas, culminando com o desaparecimento de pelo menos três delas. No caso das sementes envelhecidas, a redução observada no número de bandas sugere que as proteases estejam ativas nas sementes envelhecidas em condições de altas temperaturas e umidade relativa. As análises citoquímicas confirmaram esses resultados, embora as dosagens bioquímicas não tenham revelado uma redução tão significativa do conteúdo protéico.

Outro fator observado em *S. reticulata* foi a pequena diferença do número de bandas quando foi utilizado tampão redutor, sugerindo uma baixa quantidade de pontes dissulfeto nas proteínas solúveis em NaCl 0,2M dessa espécie.

5. CONCLUSões

1. Ambas as espécies apresentaram, com o avanço do tempo de envelhecimento redução na taxa de germinação. Sementes de *S. reticulata* mostraram-se mais resistentes ao envelhecimento acelerado, não apresentando perda total de viabilidade e nem um aumento significativo no tempo médio de germinação.

2. As paredes celulares apresentaram-se metacromáticas e esta metacromasia aparentemente não se alterou com o avanço do tempo de envelhecimento acelerado.

3. A impregnação pela prata revelou, em semente de ambas as espécies, uma diminuição na disponibilidade de radicais vic-glicóis, nas paredes celulares, e um aumento desses radicais no material protéico.

4. Sementes de *P. vulgaris* apresentaram compactação crescente da cromatina, núcleos picnóticos ou com cromatina vacuolizada em maior número, visualizados nas colorações pelo AT e Feulgen. Sementes de *S. reticulata* não apresentaram estas alterações na estrutura cromatínica e no volume nuclear até o tempo aqui analisado.

5. Os nucléolos revelaram uma aparente redução em tamanho em *P.vulgaris*, o que não foi detectado em sementes de *S.reticulata*.

6. Sementes de *P.vulgaris*, submetidas ao envelhecimento acelerado, apresentaram uma diminuição no tamanho dos grãos de amido e um aumento significativo em número, ao passo que aparentemente, sementes de *S.reticulata*, submetidas ao mesmo tratamento, apresentaram comportamento inverso, ou seja, diminuição em número e aumento em tamanho.

7. Nas duas espécies não se verificou aumento ou diminuição do teor de amido de seus cotilédones com o avanço do tempo de envelhecimento.

8. Em ambas as espécies foi detectada uma alteração no estado de agregação do material protéico e no seu padrão de distribuição, com aparente redução desta reserva, com o avanço do tempo de envelhecimento.

9. Sementes de *P.vulgaris* apresentaram uma redução do seu conteúdo protéico, ao passo que em sementes de *S.reticulata* não foi detectada uma diminuição significativa dessa reserva com o avanço do tempo de envelhecimento.

10. Sementes quiescentes de *P.vulgaris* revelaram pequena quantidade de redutores fracos, que parece sofrer um ligeiro aumento com o envelhecimento. Em sementes de *S.reticulata* a presença de material redutor fraco só é detectada nas células dos feixes do floema; À medida que o tempo de envelhecimento progride, as células de reserva também passam a apresentar substâncias de natureza redutora no seu interior.

11. Eletroforeses das frações albumina e globulinas de sementes *P.vulgaris* e *S.reticulata* mostraram uma redução na intensidade de coloração de certas bandas e desaparecimento de outras, com o avanço do tempo de envelhecimento acelerado. Essas alterações foram mais acentuadas em *S.reticulata* que em *P.vulgaris*

12. A análise eletroforética de sementes de *P.vulgaris* durante o envelhecimento acelerado, revelou a presença de um grupo de bandas que podem estar relacionadas com as HSP, o que não foi verificado em sementes de *S.reticulata* .

13. A nível citoquímico, portanto, ocorrem alguns padrões de alteração comuns, embora mais precocemente em *P.vulgaris* que em *S.reticulata*, e que estão de acordo com as observações de outros estudos, sugerindo a natureza universal de certos eventos relacionados ao envelhecimento e perda de viabilidade em sementes.

6. RESUMO

No presente trabalho, foram empregados vários métodos citoquímicos e bioquímicos de análises a fim de se verificar comparativamente as alterações celulares que ocorrem durante a perda de viabilidade de sementes de *P.vulgaris* e *S.reticulata*, submetidas a condições de envelhecimento acelerado em períodos crescentes de tempo. Ambas as espécies apresentaram redução na taxa de germinação, sendo que *S.reticulata* mostrou-se mais resistente ao envelhecimento acelerado. Sementes de *P.vulgaris* perderam sua capacidade germinativa com 384 h nas condições de alta temperatura e umidade relativa, o que não foi verificado em *S.reticulata*. Associadas a estes eventos foram detectadas, em ambas as espécies, alterações citoquímicas e bioquímicas. As paredes celulares apresentaram-se metacromáticas e esta metacromasia não se alterou. Com o envelhecimento, as paredes celulares mostraram uma menor disponibilidade de radicais glicídicos ao passo que no material protéico a presença desse radicais foi maior. Foi detectada uma alteração no estado de

agregação e no padrão de distribuição do material proteico. Eletroforeses das frações albumina e globulinas mostraram uma redução na intensidade de coloração de certas bandas e desaparecimento de outras, com o avanço do tempo de envelhecimento acelerado. Essas alterações foram mais acentuadas em *S. reticulata* que em *P. vulgaris*. Dosagens bioquímicas destas reservas, revelaram no entanto, uma redução significativa apenas em sementes de *P. vulgaris*. A coloração pelo XP mostrou uma redução da reserva protéica com o envelhecimento. Sementes quiescentes de *P. vulgaris* contêm uma pequena quantidade de redutores fracos, que apresentaram um pequeno aumento com o envelhecimento. Em *S. reticulata*, substâncias redutoras são encontradas apenas no floema, que com o envelhecimento passam a ocorrer por todo o cotilédone. A dosagem de amido não revelou alterações no teor desta reserva nas duas espécies com o avanço do envelhecimento. No entanto, verificou-se uma diminuição no tamanho e aumento em número dos grãos de amido em *P. vulgaris*. Em *S. reticulata*, ao contrário, parece ocorrer uma redução em número e aumento no tamanho destes grãos. Em *P. vulgaris* o envelhecimento acelerado levou a compactação crescente da cromatina, que se mostrou picnótica ou vacuolizada em sementes inviáveis, que também apresentaram uma aparente redução dos nucléolos. Nenhuma dessas alterações nucleares foi detectada em sementes de *S. reticulata* durante seu envelhecimento.

7. ABSTRACT

In this work we compared cytological and biochemical alterations during loss of viability of seeds of *P.vulgaris* and *S.reticulata*. Seeds were submitted to accelerated aging treatment during progressively larger time intervals, and both species suffered loss of viability under these conditions, but *S.reticulata* was more resistant. No seed of *P.vulgaris* germinated after 384 hours of accelerated aging, but seeds of *S.reticulata* did. Several cytological changes were detected during this aging process. Cell walls appear equally metachromatic after all the accelerated aging times, but showed a reduction in glycidic radicals. Protein bodies showed an increase in these radicals, and suffered morphological changes. Gel electrophoresis of albumins and globulins showed a decrease in intensity of some fractions and disappearance of others with the advance of aging. These alterations were more remarkable in *S.reticulata* than in *P.vulgaris*. Protein contents, however, decrease significantly only in *P.vulgaris* seeds. Xylidine-Ponceau

staining also revealed a decrease in protein contents. *P.vulgaris* quiescent seeds contain some weak reducing compounds, which suffer a slight increase during aging. These compounds are found in *S.reticulata*, only in the phloem of quiescent seeds, but spread over the entire cotyledon surface of aged seeds. Starch levels remained constant in both species, but in *P.vulgaris* starch granules became smaller and more numerous. On the other hand, *S.reticulata* showed fewer and larger starch granules with increasing accelerated aging time. Condensation of chromatin accompanied aging in *P.vulgaris*, while non-viable seeds presented picnotic nuclei and loss of nucleoli. None of these nuclear changes were observed in aged *S.reticulata* seeds.

B. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABDUL-BAKI, A. & ANDERSON, J. D. (1970). Viability and leaching of sugars from germinating barley. *Crop Sci.* **10**, 31-33.
- ADAMS, W. N. (1956) *apud* LISON, L. (1960). *Histochemie et citochemie animales*. Paris: Gauthier-Villars.
- AMABLE, R. A. & OBENDORF, R. L. (1986). Soybean seed respiration during simulated preharvest deterioration. *J. Exp. Bot.* **37**, 1364-1375.
- BERNSTAM, V. A. (1978). Heat effects on protein biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**, 25-46.
- BLOWERS, L. E., STORMONTH, D. A. & BRAY, C. M. (1980). Nucleic acid and protein syntesis and loss of vigour in germinating wheat embryos. *Planta* **150**, 19-25.
- BLUM, H., BEIER, H. & GROSS, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.

- BOURGEOIS, C. A., HERNANDEZ-VERDUN, D., HUBERT, J. & BOUTEILLE, M. (1979). Silver staining of NORs in electron microscopy. *Exp. Cell Res.* **123**, 449-452.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- BRODL, M. R., BELANGER, F. C. & TUAN-HUA, D. H. (1990). Heat Shock proteins are not required for the degradation of α -amylase mRNA and the delamellation of endoplasmic reticulum in heat-stressed barley aleurone cells. *Plant Physiol.* **92**, 1133-1141.
- CHEAH, K. S. E. & OSBORNE, D. J. (1978). DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. *Nature* **272**(13 april 1978), 593-599.
- CHING, T. M. & SCHOOLCRAFT, I. (1968). Physiological and chemical differences in aged seeds. *Crop Sci.* **8**, 407-409.
- CORTELAZZO, A. L. (1986). Proteínas Cotiledonares de Sojas: Detecção "in situ" e Mobilização Durante a Germinação [Tese de Mestrado]. (UNICAMP - Campinas, SP).

- CORTELAZZO, A. L. (1989). Caracterização topoquímica e bioquímica de sementes de *Canavalia ensiformis* DC. e *Canavalia gladiata* DC [Tese de Doutorado]. (UNICAMP - Campinas).
- CORTELAZZO, A. L. & VIDAL, B. C. (in press). Soybean seed proteins: detection "in situ" and mobilization during germination. *Revta brasil. Bot.*
- DANIELSSON, C. E. (1949). Seed globulines of the Gramineae and Leguminosae. *Biochem. J.* **44**, 387-400.
- DANTAS, M. M. (1990). Efeitos de choques de temperaturas sobre fenótipos nucleares de *Triatoma infestans* Klug, em condições de insetário da SUCEN de Mogi-Guaçu [Tese de Mestrado]. (UNICAMP).
- DELL'AQUILA, A. (1987). Mean germination time as a monitor of the seed ageing. *Plant Physiol. Biochem.* **25**, 761-768.
- DELOUCHE, J. C. (1968). Physiology of seed storage. *Corn and Sorghum Res.* **23**, 83-90.
- DELOUCHE, J. C. & BASKIN, C. C. (1973). Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Sci. Technol.* **1**, 427-452.

- DELOUCHE, J. C. & POTTS, H. C. (1974). *Programa de Sementes: Planejamento e Implantação*. Brasília: AGIFLAN.
- DERBYSHIRE, E., WRIGHT, D. J. & BOULTER, D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* **15**, 3-24.
- ELLIS, R. H. & ROBERTS, E. H. (1981). The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Sci. Technol.* **9**, 373-409.
- ELLIS, R. H., SIMON, G. & COVELL, S. (1987). The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes. *J. Exp. Bot.* **38**, 1033-1043.
- FERGUSON, J. M., TEKRONY, D. M. & EGLI, D. B. (1990). Changes during early soybean seed and axes deteriorations: I. Seed quality and mitochondrial respiration. *Crop Sci.* **30**, 175-179.
- FERNANDEZ-GOMEZ, M. E., STOCKERT, J. C., LOPEZ-SAEZ, J. F. & GIMENEZ-MARTIN, G. (1969). Staining plant cell nucleoli with AgNO_3 after formalin-hydroquinone fixation. *Stain Techn.* **44**, 48-50.

- FERNANDEZ-GOMEZ, M. E., SANCHEZ-FINA, M. A., RISUEÑO, M. C. & MEDINA, F. J. (1983). Differential staining of the nucleolar organizing region (NOR) and nucleolar components by a new silver technique in plants. *Cell Mol. Biol.* **29**, 181-187.
- GALLYAS, F. (1970). Silver staining of collagen and reticulin fibers of cerebral capillaries by means of physical development. *J. Microsc.* **91**, 119-124.
- GIDROL, X., NOUBHANI, A., MOCQUOT, B., FOURNIER, A. & PRADET, A. (1988). Effect of accelerated aging on protein synthesis in two legume seeds. *Plant Physiol. Biochem.* **26**, 281-288.
- GLAUERT, A. M. (1975). *Practical Methods in Electron Microscopy: Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens*. Amsterdam: North Holland Ed.
- GOMES, L. (1988). Contribuição ao Estudo de Proteínas Ligantes de Laminina Através de Anticorpos Monoclonais [Tese de Doutorado]. (Escola Paulista de Medicina - São Paulo).

- GRANGE, A. (1980). Vieillissement des graines de *Phaseolus vulgaris* (L.) var. contender: I. Effects sur la germination, la vigueur, la teneur en eau et la variation des formes d'azote. *Physiol. Vég.* **18**, 579-586.
- HARMAN, G. E. & MATTICK, L. R. (1976). Association of lipid oxidation with seed ageing and death. *Nature* **260**(25 march 1976), 323-324.
- HARRINGTON, J. F. (1972). Seed Storage and Longevity. In *Physiological Ecology*, 5: *Seed Biology*, vol. 3 (ed. T. T. Kozlowski), pp. 145-243. New York: Academic Press.
- HARTMAN, H. T. & KESTER, T. E. (1975). *Plant Propagation: Principles and Practices*, 3rd edn. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall.
- HERNANDEZ-VERDUN, D., Org. (1983). The nucleolar organizer regions. *Biol. Cell* **49**, 191-202. (Collective review)
- IRWIN, H. S. & BARNEBY, R. C. (1982). The American Cassiinae: A synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. *Mem. New York Bot. Garden* **35 part 2**, 455-918.

- JINN, T. L., YEH, Y. C., CHEN, Y. M. & LIN, C. Y. (1989). Stabilization of soluble proteins in vitro by heat shock protein-enriched ammonium sulfate fraction from soybean seedlings. *Plant Cell Physiol.* **30**, 463-469.
- KIERNAN, J. A. (1981). *Histological & Histochemical Methods: Theory and Practice*. London: Pergamon Press.
- LANGRIDGE, J. (1963). Biochemical aspects of temperature response. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **14**, 441-462.
- LARKINS, B. A. (1981). Seed Storage Proteins: Characterization and Biosynthesis. In *The Biochemistry of Plants*, vol. 6, pp. 449-489. New York: Academic Press.
- LEOPOLD, A. C. (1983). Aging and Senescence in Plant Development. In *CRC Series in Aging: Senescence in Plants* (ed. K. V. Thimann), pp. 1-12. Boca Raton: CRC Press.
- LEOPOLD, A. C. & MUSGRAVE, M. E. (1980). Respiratory pathways in aged soybean seeds. *Physiol. Plant.* **49**, 49-54.
- LILLIE, R. D. (1951) *apud* LISON, L. (1960). *Histochemie et citochemie animales*. Paris: Gauthier-Villars.

- LILLIE, R. D. (1954). *Histopathologie Technic and Practical Histochemistry*. New York: Blakiston.
- LISON, L. (1960). *Histochemie et citochemie animales*. Paris: Gauthier-Villars.
- LOPES, J. C. (1990). Germinação de Sementes de *Phaseolus vulgaris* [Tese de Doutorado]. (UNICAMP - Campinas).
- LOTT, G. N. A. (1980). Protein Bodies. In *The Biochemistry of Plants*, 1: *The Plant Cell* (ed. N. E. Toubert), pp. 589-623. New York: Academic Press.
- MacGREGOR, A. W. (1983). Cereal α -amylases: Synthesis and Action Pattern. In *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 20: *Seed Proteins* (ed. J. Dausssant, J. Mosse & J. Vaughan), pp. 1-34. London: Academic Press.
- MAEDA, J. A., ZINK, E. & ALMEIDA, L. D. A. (1982). Teste de vigor: envelhecimento rápido de sementes de feijão. *Anais da I Reunião de Pesquisa de Feijão* 1, 330-339.
- MAIA, V. (1979). *Técnica Histológica*, 2nd edn. São Paulo: Atheneu.

- MARTIN, M., DIAZ DE LA ESPINA, S. M. & MEDINA, F. J. (1989). Immunolocalization of DNA at nucleolar structural components in onion cells. *Chromosoma* **98**, 368-377.
- MASON-AFFS, S., CUMMINS, W. R. & FILION, W. G. (1990). The characterization of the heat-shock response in the arctic plant *Saxifraga cernua*. *Can. J. Bot.* **68**, 56-62.
- MAYER, A. M. & POLJAKOFF-MAYER, A. (1982). *The Germination of Seeds*, 3rd edn. New York: Pergamon Press.
- MCCREADY, R. M., GUGGOLZ, J., SILVEIRA, V. & OWENS, H. S. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. *Anal. Chemistry* **22**, 1156-1158.
- MCLEESTER, R. C., HALL, S. M., SUN, S. M. & BLISS, F. A. (1973). Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those of *Vicia faba*. *Phytochemistry* **2**, 85-93.
- McLUNG, J. R. (1967). *McLung's Handbook of Microscopical Technique*. New York: Harfner Publ.

- MEDINA, F. J., RISUENO, M. C., SANCHEZ-PINA & FERNANDEZ-GOMEZ, M. E. (1983). A study on nucleolar silver staining in plant cells: the role of argyrophilic proteins in nucleolar physiology. *Chromosoma* **88**, 149-155.
- MEDINA, F. J., SOLANILLA, E. L., SANCHEZ-PINA, M. A., FERNANDEZ-GOMEZ, M. E. & RISUENO, M. C. (1986). Cytological approach to the nucleolar functions detected by silver staining. *Chromosoma* **94**, 259-266.
- MEDINA, M. A., DIAZ DE LA ESPINA, S. M., MARTIN, M. & FERNANDEZ-GOMEZ, M. E. (1989). Intercromatin granules in plant nuclei. *Biol. Cell* **67**, 331-339.
- MELLO, M. L. S. (1989). Nuclear fuction and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. *Rev. Brasil. Genet.* **12**, 485-498.
- MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C. (1978). A reação de Feulgen. *Ciência e Cultura* **30**, 665-676.
- MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C., eds. (1980). *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo: Edgard Blucher.

- METIVIER, J. R. (1986). Dormência e germinação. In *Fisiologia Vegetal*, 2nd edn, vol. 2 (ed. M. G. Ferri), pp. 343-392. São Paulo: EPU.
- MURRAY, D. R. (1984). Accumulation of Seed Reserves of Nitrogen. In *Seed Physiology*, vol. 1 (ed. D. R. Murray), pp. 83-127. Sydney: Academic Press.
- OSBORNE, D. J. (1983). Senescence in Seeds. In *CRC Series in Aging: Senescence in Plants* (ed. K. V. Thimann), pp. 13-38. Boca Raton: CRC Press.
- OSBORNE, T. B. & CAMPBELL, G. E. (1898). Proteins of the soy bean (*Glycine hispida*). *J. Am. Chem. Soc.* **20**, 419-428.
- PANDEY, D. K. (1989a). Ageing of french bean seeds at ambient temperature in relation to vigour and viability. *Seed Sci. Technol.* **17**, 41-47.
- PANDEY, D. K. (1989b). Short duration accelerated ageing of french bean seeds in hot water. *Seed Sci. Technol.* **17**, 107-114.
- FARRISH, D. J. & LEOPOLD, A. C. (1978). On the mechanism of aging in soybean seeds. *Plant Physiol.* **61**, 365-368.

- PEARSE, A. G. E. (1961). *Histochemistry: theoretical and applied*, 2nd edn. London: J & A Churchill Ltd.
- PERNOLLET, J. C. (1978). Protein bodies of seeds: ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. *Phytochemistry* **17**, 1473-1480.
- PERNOLLET, J. C. & MOSSE, J. (1983). Structure and Location of Legume and Cereal Seed Storage Proteins. In *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 20: *Seed Proteins* (ed. J. Daussant, J. Mosse & J. Vaughan), pp. 155-192. London: Academic Press.
- PETRUZZELLI, L. & TARANTO, G. (1989). Wheat aging: the contribution of embryonic and non-embryonic lesions to loss of seed viability. *Physiol. Plant.* **76**, 289-294.
- POLICARD, A., BESSIES, A. & LOCQUIN, M. (1957). *Traite de Microscopie - Instruments et Techniques*. Paris: Masson et Cie.
- POWELL, A. A. & MATTHEWS, S. (1981). Association of phospholipid changes with early stages of seed ageing. *Ann. Bot.* **47**, 709-712.

- PRIESTLEY, D. A. (1986). Morphological Structural and Biochemical Changes Associated with Seed Ageing. In *Seed Ageing - Implication for Seed Storage and Persistence in The Soil* (ed. D. A. Priestley), pp. 125-195. Ithaca: Cornell Univ. Press.
- PRIESTLEY, D. A. & LEOPOLD, A. C. (1979). Absence of lipid oxidadation during accelerated aging of soybean seed. *Plant Physiol.* **63**, 726-729.
- PRIESTLEY, D. A. & LEOPOLD, A. C. (1983). Lipid changes during natural aging of soybean seeds. *Physiol. Plant.* **59**, 467-470.
- PRIESTLEY, D. A., McBRIDE, M. B. & LEOPOLD, C. (1980). Tocopherol and organic free radical levels in soybean seeds during natural and accelerated aging. *Plant Physiol.* **66**, 715-719.
- PUNTARULO, S. & BOVERIS, A. (1990). Effect of natural and accelerated aging on the hydroperoxide metabolism of soybean embryonic axes. *Plant Sci.* **68**, 27-32.
- RANDI, A. M. (1987). Aspectos fotomorfogênicos, bioquímicos e citoquímicos durante a germinação de esporos de *Cyathea delgadii* Sternb [Tese de Doutorado]. (UNICAMP).

- RANDI, A. M., VIDAL, B. C. & CORTELAZZO, A. L. (in press).
Citochemical aspects of rhizoids of *Ciathea delgatii*
during the germination. *Plant Cell Physiol.*
- RAO, N. K., ROBERTS, E. H. & ELLIS, R. H. (1988). A
comparison of quantitative effects of seed moisture
content and temperature on the accumulation of chromosome
damage and loss of seed viability in lettuce. *Ann. Bot.*
62, 245-248.
- RISUERO, M. C., ESPINA, S. M. D., FERNANDEZ-GOMEZ, M. E. &
GIMÉNEZ-MARTIN, G. (1976). Ultrastructural study of
nucleolar material during plant mitosis in the presence of
inhibitors of RNA synthesis. *J. Microscopie Biol. Cell.*
26, 5-18.
- RISUERO, M. C., MEDINA, F. J. & MORENO-DIAZ DE LA ESPINA, S.
(1982). Nucleolar fibrillar centres in plant meristematic
cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. *J. Cell Sci.* **58**, 313-330.
- ROBERTS, B. E. & OSBORNE, D. J. (1973). Protein synthesis
and loss of viability in rye embryos - The lability of
transferase enzymes during senescence. *Biochem. J.* **135**,
405-410.

- ROBERTS, E. H. (1972). Storage environment and the control of viability. In *Viability of Seeds* (ed. E. H. Roberts), pp. 14-58. London: Chapman and Hall.
- SANCHES-LUCAS, J. G. (1959). Modificaciones patologicas de las celulas y de los tejidos. In *Tratado de patologia general y anatomia patologica*, 7th edn, pp. 129-176. Barcelona: Labor.
- SCOTT JR., T. A. & MELVIN, E. H. (1953). Determination of dextran with anthrone. *Anal. Chemistry* **25**, 1656-1661.
- SHANNON, J. C. (1968). Procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels. *Res. Bul.* **842**, 1-8.
- SILVA, W. R. & DIAS, M. C. L. L. (1985). Interferência do teor de umidade das sementes de café na manutenção de sua qualidade fisiológica. *Pesq. Agropec. Bras.* **20**, 551-560.
- SIMON, E. W. (1974). Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytol.* **73**, 377-420.

- STEWART, R. R. C. & BEWLEY, J. D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* **65**, 245-248.
- STICHER, L., BISWAS, A. K., BUSH, D. S. & JONES, R. L. (1990). Heat shock inhibits α -amylase synthesis in barley aleurone without inhibiting the activity of endoplasmatic reticulum marker enzymes. *Plant Physiol.* **92**, 506-513.
- STOCKERT, J. C., FERNANDEZ-GOMEZ, M. E. & LOPEZ-SAEZ, J. F. (1969). Effect of fixation on silver impregnation of plant cells. *Stain Techn.* **44**, 239-242.
- TAIZ, L. (1984). Plant cell expansion: regulation of cell wall. Mechanical properties. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**, 585-657.
- THIMANN, K. V., ed. (1983). *CRC Series in Aging*, 5: *Senescence in Plants*, 2nd edn. Boca Raton, Flo.: CRC Press.
- TOOLE, V. K. (1973). Effects of light, temperature and their interactions on the germination of seeds. *Seed Sci. Technol.* **1**, 339-396.
- UKHUN, M. E. & IFEBIGH, E. O. (1988). Compositional chemistry of *Cassia alata* seeds. *Food Chem.* **30**, 205-210.

- VELICAN, C. & VELICAN, D. (1972). Silver Impregnation Techniques for the Histochemical Analysis of Basement Membranes and Reticular Fiber Networks. In *Techniques of Citochemical and Biophysical Morphology* (ed. D. Glick & R. M. Rosenbaum), pp. 143-190. New York: Willey Interscience.
- VIDAL, B. C. (1970). Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. *Ann. Histochem.* **15**, 289-296.
- VIDAL, B. C. (1977). Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Mol. Biol.* **22**, 45-64.
- VIDAL, B. C. (1987). Métodos em Biologia Celular. In *Biologia Celular*, 1st edn (ed. B. C. Vidal & M. L. S. Mello), pp. 5-39. Rio de Janeiro: Atheneu.
- VILLIERS, T. A. (1983). Ultrastructural Changes in Seed Dormancy and Senescence. In *CRC Series in Aging: Senescence in Plants* (ed. K. V. Thimann), pp. 38-66. Boca Raton: CRC Press.

WATKINSON, A. E. (1986). Plant Population Dynamics. In *Plant Ecology* (ed. M. J. Crawley), pp. 137-184. London: Blackwell.

WILSON, D. O. & Mc DONALD, M. B. (1986). The lipid peroxidation model of seed aging. *Seed Sci. Technol.* **14**, 269-300.

WOODSTOCK, L. W., FURMAN, K. & SOLOMOS, T. (1984). Changes in respiratory metabolism during aging in seeds and isolated axes of soybean. *Plant Cell Physiol.* **25**, 15-26.

ZINGALES, B. (1984). Analysis of protein by sodium dodecyl-sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. In *Genes and Antigens of Parasites* (ed. C. M. Morel), pp. 357-363. Rio de Janeiro: UNDP/World Bank/WHO/Fiocruz.