



CLAUDIA CRISTINA GARCIA MARTIN

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GLOBULINA, ALBUMINA E
LECTINA, E ANÁLISE DESTAS DURANTE A FORMAÇÃO E
GERMINAÇÃO DA SEMENTE DE TRÊS VARIEDADES
DE *Phaseolus vulgaris*.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Santoro

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Claudia Cristina Garcia
Martin
e aprovada pela Comissão Julgadora

Universidade Estadual de Campinas
Campinas-S.P.-1994



Ao meu grande amor,
Aos meus pais e toda a família
(Firinfirfin)
Aos amigos de todas as horas

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luiz G. Santoro, do Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade, ensinamentos, apoio e orientação durante a elaboração da tese.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro, extremamente valioso.

À EMBRAPA de Goiânia e ao Instituto Agrônomo de Campinas pelo fornecimento dos materiais vegetais.

Ao Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pelo utilização de aparelhos e auxílio técnico.

Aos Departamentos de Bioquímica, Genética e Fisiologia e Biofísica pela utilização dos equipamentos de laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal e da Secretaria de Pós-Graduação da SCPG-Biologia Vegetal pelo auxílio e colaboração.

Ao coordenador da SCPG-Biologia Vegetal, Prof. Dr. Carlos A. Joly, pelo profissionalismo e seriedade com que me auxiliou.

Aos professores da pré-banca pela análise e sugestões importantes e, principalmente pela solicitude com que me auxiliaram.

AGRADECIMENTOS ¶

SOMENTE PARA :As pessoas chegadas e da sala vip

À grande amiga Eliana por sempre acreditar em mim, pela co, por toda a alegria (risadas) e bom humor, pelos ensinamentos, pelo discernimento e seriedade no trabalho que foram muito importantes para mim e para a realização desta tese.

À amiga e companheira (sarrista) Angela pela paciência, amizade, compreensão e companhia (brejas) durante meus anos de Campinas.

Ao grande amigo e encorajador Ronaldo pela paciência, amizade, apoio e pelas conversas que sempre me auxiliaram.

A meus pais, Laudicéa e Anísio, pelo auxílio e apoio incondicional (Amo vocês).

Ao meu (imprescindível e insubstituível) namorado "Sílvio".

Aos amigos Alberto (Elemento), Agostinho, Çân, Claudinho, Cristine, Fernandinha, Fer, Giulio, Julieta, Jamil, Kátia, Leandro, Lúcia, Mara, Marluci, Pati (pelas fotos também), Sheila, Sílvia, Simoninha, Vera e Flávio, aos meninos e meninas da Genética, da Geo e da casa do Rato, pela paciência, apoio e amizade de todos (que às vezes sei que não era fácil), pela presença nas horas difíceis e nas divertidas principalmente (com e sem copo).

Às amigas inesquecíveis Cristiane e Gisela, pela companhia e apoio, pelo que muito me ensinaram e principalmente por me mostrarem um outro lado da vida (noites e dias).

A todos os anjos, arcanjos e espíritos superiores, que silenciosamente, mas profundamente, auxiliaram-me em mais uma conquista.

"A sensação mais gostosa que se pode ter em um universo,

onde os seres, pela sua unicidade, são todos solitários,
é a sensação de que outra pessoa sem querer,
sem nem bater, sem nem saber
entrou no seu EU,

nos seus sonhos mais secretos,
nas suas vontades, desejos, ideais de vida,
entrou de uma maneira tão sutil,
que talvez, enquanto voce viver,
nunca vai esquecer da alegria de saber
que a sua alma já não anda só,
apesar de ter seu caminho próprio."

Amegalthes

ÍNDICE

Abreviaturas	iv
Resumo	v
Summary	vi
 INTRODUÇÃO	 1
Família Leguminosae.....	1
<i>Phaseolus vulgaris</i>	1
Aspectos Gerais da Biologia das Sementes.....	2
Proteína de Reserva	3
Formação da Semente.....	3
Modificações Pós-traducionais	4
Germinação	6
Principais Proteínas	7
Globulina	7
Albumina	8
Lectina	9
 OBJETIVOS.....	 13
 MATERIAL E MÉTODOS	 14
Obtenção das Sementes	14
Preparação de Farinha.....	14
Eletroforese	14
Dosagem de Proteína Total	16
Análise Estatística	16
 CAPÍTULO- I- CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE RESERVA	 17
I-1-MATERIAIS E MÉTODOS	17
I-1.1-Separação de Albuminas e Globulinas.....	17
I-1.2-Determinação da Massa Molar Coluna Sephacryl-S200	17
I-1.3-Dosagem de Carboidratos	18

I-1.4-Separação e/ou Purificação de Lectinas	18
Coluna de Fetuína Sepharose 4B Ativada com CNBr.....	18
Preparo da Fetuína	19
Acoplamento da Fetuína à Sepharose	19
Preparação e Aplicação da Amostra.....	19
I-1.5-Proporção das Proteínas.....	20
I-1.6-Determinação da Atividade Hemaglutinante	21
 I-2-RESULTADOS.....	22
I-2.1-Proteína total.....	22
I-2.2-Albumina e Globulina.....	22
I-2.2.2-Massa Molar (M.M.)	22
I-2.2.3- Carboidratos	27
I-2.3-Lectinas : Isolamento e Purificação.....	27
I-2.3.1-Lectina Albumina	27
I-2.3.2-Lectina Globulina.....	28
I-2.3.3- Atividade Hemaglutinante	29
 I-3-DISCUSSÃO	31
I-3.1-Quantidade de Proteínas	31
I-3.2-Globulinas.....	31
I-3.3-Albuminas	32
I-3.4-Carboidratos	33
I-3.5-Lectinas.....	34
 CAPÍTULO-II--SEMENTE: FORMAÇÃO E GERMINAÇÃO.....	36
 II-1-MATERIAL E MÉTODOS.....	37
II-1.1-Obtenção e Germinação das Sementes.....	37
II-1.2-Coleta.....	37
Semente	37
Cotilédone	38
II-1.3-Análise	38
II-2-RESULTADOS	38
II-2.1-Análise de Sementes em formação.....	38
II-2.2-Análise de cotilédones em Sementes Germinantes.....	47

II-2.3-Acúmulo e degradação da faseolina durante a formação e germinação	47
II-3-DISCUSSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ABREVIATURAS

BSA-	Albumina de Soro Bovino
CNBr-	Brometo de Cianogênio
DTT-	Ditiotreitol
O.N.	Variedade de <i>Phaseolus vulgaris</i> -Ouro Negro
J.	Variedade de <i>Phaseolus vulgaris</i> -Jalo
N.	Variedade de <i>Phaseolus vulgaris</i> -Norh
M.M.	Massa Molar
R.E.	Retículo Endoplasmático
SDS-	Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED-	N,N,N,N'-tetrametil-etilenodiamina
Tris-	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U.H.-	Unidade Hemaglutinante

Resumo

No presente trabalho, sementes de *Phaseolus vulgaris* das variedades Norh, Jalo e Ouro Negro foram analisadas em vários aspectos: conteúdo de proteínas e carboidratos, frações protéicas (globulina, albumina e lectina), padrão eletroforético e atividade hemaglutinante para as frações lectinas. Além disso, a acumulação destas frações durante a maturação e germinação das sementes foram investigados.

A concentração de proteína total nas sementes variou de 20% (var. Ouro Negro) a 26% (var. Jalo e Norh). A concentração de globulina na fração protéica na semente variou de 48% (var. Jalo) a 72% (var. Norh), sendo que para a variedade Jalo esta foi de aproximadamente 60%. Por outro lado, as albuminas na fração protéica da semente nas variedades Jalo e Norh obtidas (aproxim. 11%) está na faixa encontrada na maioria das variedades cultivadas de *P. vulgaris*. Entretanto a concentração de albumina na variedade Ouro Negro foi mais elevado (17%). Foi observado que a faseolina representou a maior parte da globulina, enquanto que a lectina uma menor quantidade. Os valores de lectinas encontrados na fração globulina estão na faixa de 10% (var. Jalo) e 15% (var. Norh e Ouro Negro). A atividade biológica, verificada pelo teste de hemaglutinação, foi menor nas lectinas globulinas do que nas lectinas albuminas. Estas últimas, nas frações albuminas, representaram na variedade Jalo cerca de 15%, sendo que nas outras variedades os valores foram mais altos (aproxim. 40%).

Através da dosagem de carboidratos nas frações protéicas (albumina e globulina), foi verificado que as globulinas continham cerca de 3% destes compostos na molécula. Nas albuminas o conteúdo de carboidrato observado foi mais elevado do que nas globulinas. Assim, ambas as frações foram consideradas glicoproteínas.

Neste estudo foi investigado o perfil da globulina 7S (faseolina) por eletroforese. Pelos resultados foi encontrado que todas as faseolinas foram similares, sendo compostas por três subunidades principais que variaram entre 41 e 47 na Massa Molar, indicando que estas variedades são, quanto ao perfil eletroforético, semelhantes ao tipo bem caracterizado "Tendergreen".

Pelo estudo do desenvolvimento da semente foi verificado o acúmulo da principal fração da globulina, a faseolina (7S), sendo que esta apresentou uma relação linear de acumulação com o tempo nas três variedades estudadas. Por outro lado, a degradação desta proteína durante a germinação da semente foi diferente para as três variedades: apresentou um padrão linearmente correlacionado com o tempo na variedade Jalo e um padrão exponencial nas variedades Ouro Negro e Norh. Os resultados indicam que, além de já bem estabelecida globulina, as frações albuminas também podem ser consideradas proteínas de reserva.

Summary

Seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. Norh, Jalo and Ouro Negro were analyzed for several aspects: contents of total protein and protein fractions (albumins, globulins, lectins), electrophoretic banding patterns, carbohydrate content and haemagglutinating activity of the lectin fractions. In addition, the accumulation of these fractions during seed maturation and the mobilization during germination were also investigated.

The concentration of total protein in the seeds varied from 20% (cv. Ouro Negro) to 26% (cv. Jalo and cv. Norh). The globulin concentration in the seed protein fraction varied from a minimum of 48% (cv. Jalo) up to a maximum of 72% (cv. Norh), while that for cv. Jalo amounted up to approx. 60%. On the other hand, the albumin fraction in the seed protein of cv. Jalo and cv. Norh (approx. 11%) was found to be within the range found for the majority of the varieties cultivated all over the world. However this same concentration in cv. Ouro Negro was surprisingly elevated (17%). Irrespectively of the *Phaseolus* varieties, our study indicated that the main 7S globulin (Phaseolin), comprised over 70% of the total globulin fraction. It was also observed that a small part of this fraction was found to be comprised of lectins. The values ranged from approx. 10% (cv. Jalo), to approx. 15% (cv. Norh and cv. Ouro Negro). Interestingly, the amounts of albumin containing haemagglutinating activity were high in these varieties. Thus of the total albumin concentration in the cv. Jalo, at least 15% was considered to be lectin. These values were still higher for the other varieties (approx. 40%).

The investigation of the presence of carbohydrates in the protein fractions, indicated as expected that the globulins contained a minimum amount of 3% of carbohydrate in the molecule. However this same amount of carbohydrate in the albumin fractions was surprisingly higher than that observed for the globulins. Thus both fractions were found to be glycoproteins.

In this study was also investigated the structure of the 7S globulin in SDS-PAGE. The results indicated that all the phaseolins were similar in that they were all composed of at least three main subunits ranging in size from 41 to 47 kDa, indicating that these varieties belong to the well established group "Tendergreen".

Experiments designed to investigate the accumulation of the main 7S globulin in the seeds, during the seed development, have revealed a linear relationship of protein accumulation with time in the varieties studied. On the other hand, phaseolin degradation during seed germination was different in the 3 varieties: it was linearly correlated with time in cv. Jalo and it presented an exponential pattern in cv. Norh and cv. Ouro Negro. The results indicated that besides the well known globulin fractions the albumins can also be considered as storage proteins.

INTRODUÇÃO

Família Leguminosae

A família Leguminosae é uma das maiores entre as dicotiledôneas, com mais de 600 gêneros que reúnem mais de 13.000 espécies. São plantas de hábito muito variado, compreendendo desde ervas anuais ou perenes, trepadeiras, arbustos e subarbustos, até grandes árvores das matas tropicais. Vivem nos mais variados ambientes e diferentes latitudes, sendo encontradas em todo mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (JOLY, 1985).

Dentre as subfamílias que compõem a família das Leguminosas, a mais numerosa é a Papilionoideae. Pertencem a esta subfamília as tribos que fornecem a mais numerosa variedade de alimentos, principalmente através das sementes. Por conter a maioria dos gêneros de leguminosas de importância econômica, é considerada uma subfamília importante. Entre os diferentes gêneros desta subfamília podemos citar : *Phaseolus* (feijão), *Pisum* (ervilha), *Lens* (lentilha), *Vicia* (faba), *Cicer* (grão de bico), *Glycine* (soja), e plantas forrageiras como *Melilotus* (alfafa). As sementes das plantas cultivadas, utilizadas na alimentação, fornecem os aminoácidos não sintetizados pelos tecidos animais, como metionina e cisteína (JOLY, 1985).

Phaseolus vulgaris

Dentro do gênero *Phaseolus*, uma das espécies mais cultivadas e consumidas no Brasil é *Phaseolus vulgaris* L., constituindo uma fonte básica de proteínas vegetais através de sua semente. O feijoeiro é uma planta herbácea de crescimento determinado ou indeterminado, cujo ciclo vegetativo varia de 61 a 110 dias, (POMPEU, 1987). É originário, provavelmente, da região ocidental do México e Guatemala ([BURKART, 1941; MCBRYDE, 1947] apud BRÜCHER, 1988).

O feijão é um dos alimentos básicos de vários povos, principalmente o do Brasil. O Brasil é o maior produtor mundial de feijão com uma produção estimada, em 1992, de 5.154 toneladas em 1.000 ha com rendimento médio de 544 kg/ha (FAO, 1992). Em nosso país registra-se o mais elevado consumo anual per capita de feijão, ao redor de 21kg (POMPEU, 1987).

Este alimento constitui uma das principais fontes de proteína vegetal. O teor protéico encontrado nas sementes de *P. vulgaris* varia de 15 a 33%, sendo também um alimento energético com 341 cal/100g aproximadamente, correspondendo a 28,7 % da dieta dos brasileiros (SGARBIERI, 1987). Também é rico em várias vitaminas como B₁, B₂ e niacina

([ARRUDA, 1980] apud SGARBIERI, 1987). Variedades brasileiras, no geral, têm em sua composição um conteúdo de carboidratos variando de 55 a 65%, e de lipídeos entre 0,77 a 1,93% (MORAES & ANGELUCCI, 1971).

Pela sua importância, tanto econômica quanto nutricional, o feijão é um material de grande interesse para ser estudado. A avaliação bioquímica das variedades de *P. vulgaris*, que são cultivadas no país, é importante para fornecer informações sobre sua composição de proteínas e valor nutricional, o que poderia ser utilizado em projetos de melhoramento genético.

Aspectos Gerais da Biologia das Sementes

A semente, além de fornecer o material necessário para a formação de uma nova planta, também é utilizada como fonte de alimento. As proteínas de semente representam mais de 2/3 da dieta de proteínas utilizadas pelo homem, pelo menos nos países de baixa renda. Os cereais representam, na dieta humana, aproximadamente 55% e as leguminosas 15% das proteínas consumidas (PERNOLLET, 1985).

Estruturalmente, a semente madura representa um mosaico de vários tipos de tecidos diferenciados. O embrião tem um genoma diplóide híbrido; o nucelo, os integumentos e a parede do ovário apresentam um genótipo maternal diplóide, e possui um núcleo endospermático triplóide. No caso das leguminosas que não apresentam endosperma este é consumido durante a formação da semente enquanto os cotilédones vão sendo formados (LARKINS, 1981). A deposição das proteínas de reserva das sementes, nos seus diferentes tecidos, está estreitamente relacionada com a estrutura da semente (MÜLLER, 1983).

A formação de sementes em plantas é muito estudada (MILLERD, 1975; MÜLLER, 1983; LARKINS, 1981; BROWN *et al.*, 1982b; HIGGINS, 1984; CASEY, 1990; BEWLEY & MARCUS, 1990), uma vez que é nesta fase que ocorre um alto nível de síntese protéica, principalmente das denominadas proteínas de reserva. Através do acompanhamento do período de formação da semente é possível verificar o acúmulo das proteínas de reserva, bem como estudar a expressão e a regulação dos genes responsáveis pela síntese destas (CASEY, 1990). As proteínas de reserva são conhecidas por serem uma série polimórfica de moléculas, que podem ser codificadas por uma família de multigenes (MARKS & LARKINS, 1982; PERNOLLET & MOSSÉ, 1983).

Durante a fase de germinação estas proteínas de reserva são mobilizadas e seus catabólitos são utilizados no desenvolvimento da plântula (BEWLEY & GREENWOOD, 1990). Neste período, quando ocorre a hidrólise destas proteínas, ocorre também a supressão de sua síntese, com concomitante ativação de enzimas essenciais para a germinação e o desenvolvimento da planta ([KERMODE & BEWLEY, 1986] apud BEWLEY & GREENWOOD, 1990).

Proteínas de Reserva

As sementes são o principal órgão de estocagem dos produtos de reserva, sendo as proteínas uma das principais reservas em leguminosas. Pela definição proposta de proteínas de reserva, estas devem representar no mínimo 5% da quantidade de proteína que pode ser extraída da semente, e que são degradadas durante a germinação (DERBYSHIRE *et al.* 1976). Por representarem 80% dos compostos nitrogenados na semente, a principal função das proteínas de reserva é fornecer aminoácidos ou nitrogênio para a plântula (PERNOLLET, 1985).

Nas sementes, as proteínas de reserva são classificadas em 4 grandes grupos, baseados na sua solubilidade. Assim albuminas são solúveis em água; globulinas em soluções salinas diluídas; prolaminas solúveis em soluções alcoólicas e glutelinas que são solúveis em soluções diluídas de ácidos e bases (OSBORNE & CAMPBELL, 1898). A síntese de proteínas de reserva em sementes é um modelo para o estudo da expressão de genes na planta (GOLDBERG *et al.*, 1989; CASEY, 1990). Além disso o sincronismo da expressão de genes localizados em alguns loci de diferentes cromossomos, possibilita o estudo da regulação da expressão de famílias multigênicas durante o desenvolvimento da semente (PERNOLLET, 1985).

Formação da semente

De acordo com as revisões de CHRISPEELS *et al.* (1979) e de BOULTER (1981) está bem estabelecido que o processo de embriogênese é muito semelhante de uma leguminosa para outra. A formação da semente é dividida em 3 fases características; a divisão celular caracteriza a primeira fase, onde ocorrem modificações estruturais, formação de organelas, como o retículo endoplasmático, e onde há pouca deposição de proteínas (CRAIG *et al.*, 1979); a segunda fase é caracterizada pela expansão e pela intensa síntese protéica; a desidratação e a parada da síntese das proteínas de reserva caracterizam a terceira fase (GOLDBERG *et al.*, 1989).

Durante a deposição das proteínas de reserva, as diferentes classes apresentam diferentes taxas de síntese. Há 2 classes de proteínas predominantes em leguminosas: as globulinas (divididas em leguminas e vicilinas) e albuminas. As outras duas classes restantes (prolaminas e glutelinas) estão presentes, mas em pequena quantidade (HIGGINS, 1984). O início e as taxas de síntese das proteínas de reserva podem ser diferentes, como em *Pisum sativum*, onde há uma acumulação diferencial entre leguminas e vicilinas (MOSSÉ & PERNOLLET, 1983). A quantidade dos diferentes tipos de proteínas presentes nos cultivares, bem como sua síntese, vão depender do genótipo e das condições de cultivo (POMPEU, 1987). Podem depender ainda do estágio em que as sementes foram colhidas, como por exemplo,

antes de estarem completamente secas (MUTSCHLER *et al.*, 1980). O diferente conteúdo de proteínas das sementes cultivadas pode explicar a diferente composição de aminoácidos que possuem importância nutricional, como os sulfurados (MOSSÉ & BAUDET, 1983). Há diferentes taxas de síntese em *P. vulgaris*, para algumas proteínas, como a faseolina e lectina (CHAPPELL & CHRISPEELS, 1986).

Em *P. vulgaris*, embora variável, dependendo do cultivar ou das condições de crescimento, as proteínas de reserva começam a ser sintetizadas a partir do nono ao vigésimo dia após o florescimento, e atingem o máximo com 15 a 30 dias (HALL *et al.*, 1972; MUTSCHLER *et al.*, 1980).

Os corpúsculos protéicos armazenam proteínas de reserva e são constituídos de membranas formando organelas esféricas, com poucos micrômetros de diâmetro. O mecanismo de formação do corpúsculo inicia-se com a síntese dessas proteínas para o interior da membrana do retículo endoplasmático, e as proteínas possivelmente são transportadas via sistema de membranas até o corpúsculo protéico (CHRISPEELS, 1983 a ; 1983 b). As proteínas de reserva presentes na semente podem ser consideradas proteínas que são secretadas (MILLERD, 1975; CHRISPEELS, 1976). Estudos com mRNA de *Phaseolus* têm demonstrado que a faseolina é sintetizada neste sistema, e transportada para os corpúsculos protéicos da célula. Mesmo após sua síntese estas proteínas sofrem modificações pós-traducionais no retículo endoplasmático (MATTHEWS *et al.*, 1981).

Modificações pós-traducionais

Proteínas secretadas são conhecidas por serem sintetizadas como precursores, chamados de pré-proteína, com o N-terminal com sequências extras de 20-30 resíduos de aminoácidos denominados de "sequência sinal" (BLODEL & DOBBERTIN, 1975; PERLMAN & HALVORSON, 1983). Essa sequência possibilita a associação dos ribossomos ao retículo endoplasmático (R.E.) e, com isso, a entrada da cadeia nascente para o lúmen do R.E (VITALE *et al.*, 1993). A remoção do peptídeo sinal ocorre por co-tradução, isto é, no curso da tradução do RNA mensageiro sob a cadeia polipeptídica. Outro evento pós-tradução pode acontecer logo que a cadeia polipeptídica é formada. A sequência pode ser cortada e perder um polipeptídeo conectivo, ou seja, há a eliminação de um N ou um C terminal. Neste caso a forma precursora é chamada pró-proteína e resulta no processamento das pré-proteínas. No caso de proteínas secretadas, o primeiro precursor é então chamado pré-próproteína (BOLLINI & CHRISPEELS, 1979). A faseolina é sintetizada como uma pré-proteína (SLIGHTOM *et al.*, 1983).

Além dessas modificações, envolvendo peptídeos de ligação e modificações químicas das cadeias laterais dos aminoácidos, também pode ocorrer glicosilação das proteínas de reserva, como é o caso da faseolina e lectina (CHAPPELL & CHRISPEELS, 1986). O último passo

da síntese protéica é a associação entre subunidades de proteínas multiméricas, as quais podem envolver um rearranjo da estrutura tridimensional e também uma modificação pós-transcricional (SALESSE *et al.*, 1975).

Leguminosas têm maior taxa de síntese e mais cópias de mRNA das proteínas de reserva do que os cereais. O número de espécies de mRNA para globulina é maior do que para prolaminas, com tradução mais eficiente nos cotilédones de leguminosas. A quantidade de mRNAs extraídos de diferentes estádios de desenvolvimento se reflete na acumulação das proteínas de estocagem nos tecidos de reserva, existindo uma relação direta entre a quantidade de mRNA e as taxas de síntese de diferentes proteínas (GATEHOUSE *et al.*, 1982; GREENE, 1983; RAHMAN *et al.*, 1983). EVANS *et al.* (1984) mostraram que o grau de transcrição de genes específicos *in vitro* por núcleos isolados de cotilédones de *Pisum sativum* (ervilha), corresponde aos níveis de mRNA e isso pode ser uma evidência de um controle transcricional da expressão dos genes das proteínas de reserva. A síntese de mRNAs dessas proteínas começa muito cedo e eles se acumulam com o início da embriogênese ou com a formação do endosperma (EVANS *et al.*, 1984). Durante a fase de desidratação, ocorre a parada da síntese de mRNA das proteínas de reserva, o que é observado para várias espécies durante a última fase de formação da semente (GREENE, 1983). A diminuição e término da acumulação das proteínas de reservas não pode ser explicado pela ausência de mRNA viáveis para a síntese, encontrados na fase final da maturação. Além disso durante o início da embebição estes mRNA são ativados. Uma explicação proposta para este fato é a diminuição da quantidade de ribossomos ativos, havendo então, desproporção entre o número de mRNA e ribossomos, ou seja, a tradução diminui e pára por falta de ribossomos (GATEHOUSE *et al.*, 1982; PERNOLLET, 1985).

No começo da formação dos tecidos de reserva e no início da síntese das proteínas de reserva, as sementes apresentam altas taxas de transcrição (BOULTER, 1981; MOSSÉ & PERNOLLET, 1983). A ocorrência de sequências de intervalos ou introns, as quais precisam ser cortadas antes da tradução, foi demonstrada por SUN *et al.* (1981) e SLIGHTOM (1983) em feijão para o gene da faseolina.

O acompanhamento do desenvolvimento da semente pode fornecer informações sobre a época da síntese das proteínas de reserva para futura análise dos fatores genéticos envolvidos nos processos de síntese. As taxas diferenciais de síntese protéica, encontradas em várias espécies de *P. vulgaris* (MUTSCHLER *et al.*, 1980), demonstram a importância de se acompanhar e estudar melhor estes eventos.

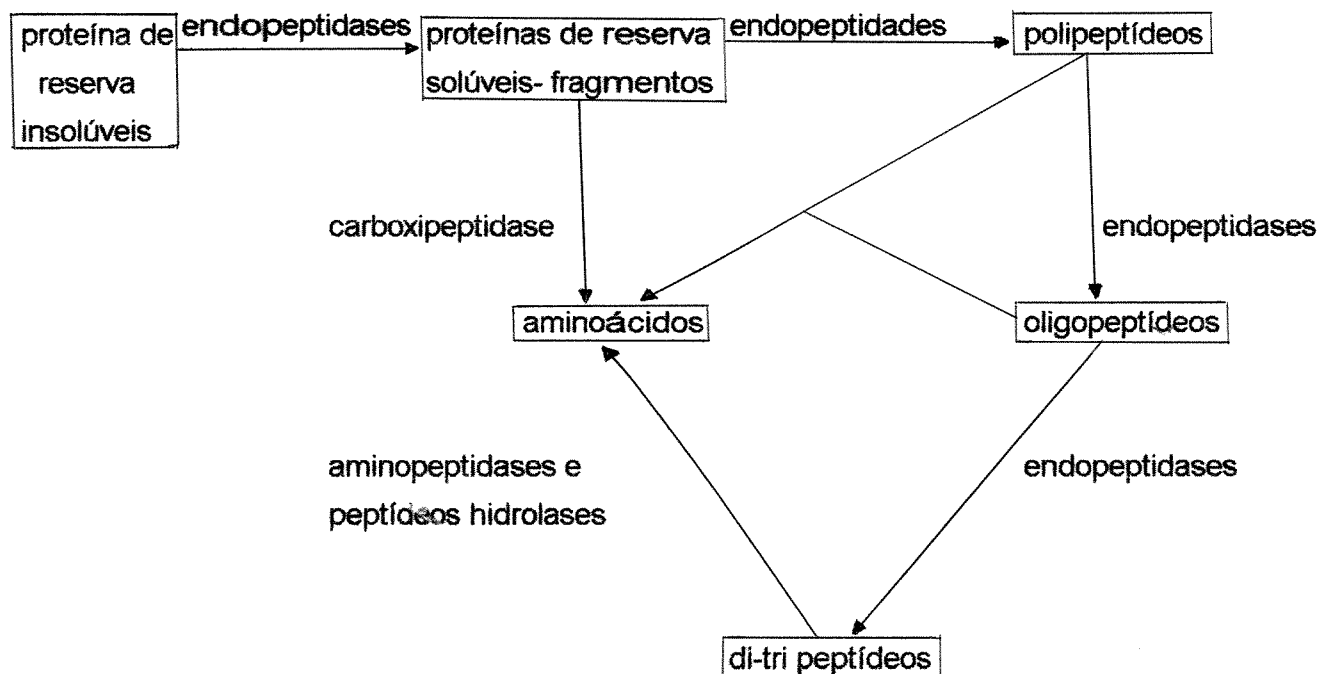
Germinação

A partir da germinação, o embrião da semente pode dar origem a uma nova planta. A semente é formada por células somáticas, capazes de se regenerar em cultura e que possuem um completo conjunto de genes da planta. A formação do embrião dentro da semente parece ser um processo independente, sem interrelação com os tecidos da semente, tendo em vista que não foi observado nenhum sinal partindo dos tecidos adjacentes que interferisse no seu desenvolvimento (GOLDBERG *et al.*, 1989).

Durante a embebição da semente, os mRNA residuais das proteínas de reservas são degradados. Um novo conjunto de mRNA é necessário para a germinação, incluindo o mRNA das enzimas proteolíticas que vão atuar neste processo ([KERMODE & BEWLEY, 1986] apud BEWLEY & GREENWOOD, 1990)

As principais enzimas envolvidas na hidrólise das proteínas de reserva são exopeptidases e endopeptidases. Pela ação das endopeptidases, que expõem as sequências carboxiterminais, as exopeptidases agem. Exopeptidases são as enzimas que agem quebrando os aminoácidos terminais das cadeias polipeptídicas. (BEWLEY & GREENWOOD, 1990).

Esquema da ação da endopeptidases e exopeptidases



A globulina parece ser hidrolisada entre o 6º e 8º dia de germinação (MÜNTZ *et al.*, 1985). Foi encontrada uma enzima específica que hidrolisa globulina em *Vicia faba* (YU &

GREENWOOD, 1994), sugerindo que pode haver enzimas específicas para as diferentes frações protéicas (HARRIS & CHRISPEELS, 1975). Em alguns casos a albumina foi a primeira fração a ser degradada (YOULE & HUANG, 1978). Ambas, globulina e albumina podem ser consideradas proteínas de reserva.

Através do estudo dos processos fisiológicos durante a formação e a germinação de sementes, pode-se obter informações importantes sobre a síntese e a degradação das proteínas de reserva. Para se estudar as frações protéicas a nível fisiológico é necessário que estas sejam bem caracterizadas individualmente, tanto física quanto quimicamente.

Principais Proteínas

As globulinas e albuminas, bem como um pequeno grupo bem característico de proteínas denominadas de lectinas, são as principais proteínas em leguminosas. A caracterização de proteínas individuais de semente é a base fundamental para o estudo básico e aplicado de proteínas de leguminosas, e para o entendimento de suas expressões genéticas diferenciais (MILLERD, 1975).

Globulina

Na maioria das leguminosas, as proteínas de reserva constituem-se de globulinas, ocorrendo em diferentes porcentagens nas diferentes espécies. Em *Phaseolus* correspondem a 50 a 70% da proteína solúvel da semente (ROMERO *et al.*, 1975; MA & BLISS, 1978). As globulinas se dividem em dois grupos, as vicilinas e as faseolinas que apresentam diferentes coeficientes de sedimentação: 7S e 11S, respectivamente (DERBYSHIRE *et al.*, 1976). A principal fração na globulina de *P. vulgaris* é a faseolina (MOSSÉ & PERNOLLET, 1983), uma vicilina presente em grandes quantidades no feijão, variando de 40 a 60%, conforme a variedade.

A faseolina é glicosilada, contendo aproximadamente de 3 a 5% de carboidratos (SUN & HALL, 1975). As subunidades da faseolina têm M.M. entre 45 e 51 kg/mol, e apresentam heterogenia de carga (HALL *et al.*, 1977; BOLLINI & VITALE, 1981; BROWN *et al.*, 1981a).

BROWN *et al.* (1981; 1982) identificaram 3 tipos eletroforéticos principais de faseolina, que são aceitos como padrões e que levam o nome das variedades em que foram definidos: "Tendergreen" ("T"), "Sanilac" ("S") e "Contender" ("C"). O tipo "Tendergreen" ("T") possui 3 bandas maiores e 1 menor em eletroforese unidimensional e 5 polipeptídeos em eletroforese bidimensional. "Sanilac" ("S") contém 5 bandas maiores e uma menor, e "Contender" ("C") tem 6 bandas maiores e uma menor em eletroforese unidimensional. Em eletroforese bidimensional, ambos apresentam 8 polipeptídeos. A faseolina nestes padrões ainda é

dividida em 3 subunidades: α , com M.M. entre 51 a 48,5 kg/mol, β , M.M. entre 48 e 47 kg/mol, e δ , com M.M. entre 46 e 45 kg/mol. A faseolina é codificada por uma família multigênica ou de genes agrupados, consistindo de aproximadamente 7 genes para o tipo "T", 8 genes para o tipo "S" e 9 genes para o tipo "C". O tipo "Contender" parece ser um tipo intermediário entre "T" e "S", com algumas subunidades semelhantes a "T" ou a "S" na M.M. e no ponto isoelétrico. Estes principais tipos ou padrões possuem uma distribuição geográfica de acordo com suas origens de domesticação das culturas (GEPTS, 1988).

A maioria das diferenças nas M.M. entre as subunidades da faseolina, parece ser resultado de modificações co e pós-transcricionais (HIGGINS, 1984). Estas modificações podem ser a clivagem de peptídeos sinais durante a síntese da proteína no retículo endoplasmático, e a sua glicosilação ainda nesta organela (BOLLINI *et al.*, 1983; LIOI & BOLLINI, 1984).

Por estar presente na semente de *P. vulgaris* em quantidade considerável, a faseolina, pode ser utilizada como marcador evolutivo. Sendo a faseolina codificada por uma pequena família de genes extremamente relacionados, estes podem ter sido originados de sucessivas duplicações a partir de um único gene ancestral. Por análise eletroforética, pode-se detectar as mudanças fenotípicas, como M.M. e ponto isoelétrico resultantes de divergência genotípica. Isto pode ser utilizado como ferramenta para análise das relações evolutivas entre os tipos de faseolina e, por extensão, entre os cultivares que as possuem (GEPTS, 1988).

Há poucos estudos sobre a caracterização da faseolina em cultivares brasileiros, sendo necessário uma avaliação dos principais tipos de faseolina que ocorrem nos nossos cultivares. Através deste estudo, poderão ser avaliados os prováveis processos de domesticação dos cultivares de *Phaseolus* no país.

Albumina

Por muito tempo se acreditava que a fração albumina fosse constituída somente de proteínas metabólicas ou enzimas (DANIELSON, 1956). Em estudos posteriores observou-se que as albuminas seriam, também, proteínas de reservas, podendo servir como fonte de nitrogênio para a plântula durante a germinação (BEEVERS & POULSON, 1972; BASHA & BEEVERS, 1975; YOULE & HUANG, 1978). As albuminas são depositadas em sementes de leguminosas como as outras proteínas de reserva, durante a maturação da semente (HILL & BREIDENBACH, 1974 a; 1974b; PATE & FLINN, 1973), e podem ser uma das primeiras proteínas a serem degradadas durante a germinação (YOULE & HUANG, 1978).

Assim como algumas frações protéicas (globulina), a albumina é uma fração com características antagônicas na semente. É, ao mesmo tempo, uma fração de importância

nutricional e que apresenta alguns componentes de baixa digestibilidade (SGARBIERI, 1987), e a presença de lectinas, uma proteína tóxica *in natura* (PUSZTAI & WATT, 1974). Uma das grandes diferenças entre as globulinas e as albuminas está presente nos níveis de aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) importantes do ponto de vista nutricional (CARRASCO *et al.*, 1978; SGARBIERI *et al.*, 1982). Estes aminoácidos estão presentes em quantidades maiores na fração albumina do que na fração globulina (YOULE & HUANG, 1978; PASQUALINI *et al.*, 1991). Como em geral as leguminosas apresentam uma deficiência em aminoácidos sulfurados, as albuminas podem ser um importante fator a ser considerado em plantas cultivadas, escolhidas para melhoramento (MURRAY, 1979; 1984). Há estudos que demonstram esta preocupação, por desenvolverem novas técnicas para a introdução de genes de albuminas em cultivares de *P. vulgaris* que apresentam menor conteúdo dessa proteína (ARAGÃO *et al.*, 1992). A presença da albumina em várias sementes e, às vezes, em altas concentrações, pode sugerir que esta seja uma importante proteína de reserva (YOULE & HUANG, 1978).

Um estudo da fração albumina foi realizado para as variedades "Tendergreen" e "Sanilac", sendo propostos tipos eletroforéticos padrões para esta fração, como os sugeridos para a faseolina. A albumina do tipo "Tendergreen" ("T") apresenta 3 bandas principais em gel unidimensional, com M.M. de 36,5; 35,5 e 33,5 além de alguns polipeptídeos de M.M. menor que 22 kg/mol. O tipo "Sanilac"("S") apresenta M.M. de 41; 38; 35,5; 36,5; 29 e 25 kg/mol.

Há uma divisão das albuminas pelo coeficiente de sedimentação em vários gêneros de leguminosas. O tipo 2S é muito estudado e utilizado em estudos taxonômicos em algumas plantas, evidenciando a estabilidade genética desta fração (PRZYBYLSKA *et al.*, 1992).

Ao contrário da globulina, a fração albumina é pouco estudada em relação à caracterização físico-química. Há necessidade de se conhecer mais sobre esta fração para melhor entender seu papel fisiológico na semente. Estudos de caracterização físico-química desta fração nas variedades brasileiras de *P. vulgaris*, podem revelar bons cultivares para o melhoramento genético.

Lectina

As lectinas são proteínas e/ou glicoproteínas, de natureza não imunoglobulínicas, capazes de reconhecimento específico e ligações covalentes com parte do carboidrato, sem alteração da estrutura covalente de qualquer dos reconhecidos grupos glicosil (KOCOUREK & HOREJSI, 1983). Elas foram descritas pela primeira vez há mais de cem anos por STILLMARK ([1888,1889] apud ETZLER, 1985) e foram denominadas, a princípio, de hemaglutininas por ELFASTRAND ([1898] apud PUSZTAI, 1991) e posteriormente de lectinas (BOYD *et al.*, 1954), do latim "*legere*" (meio de seleção).

As lectinas estão presentes em plantas, animais e microorganismos, podendo variar nas suas especificidades a carboidratos, no tamanho molecular, na composição de aminoácidos, nos cofatores e na estrutura quaternária, além da alta heterogeneidade da estrutura química e física (GOLDSTEIN & HAYES, 1978). É uma proteína presente nas leguminosas em geral (VODKIN, 1981; VITALE *et al.*, 1984) e em não leguminosas (STINISSEN *et al.*, 1985). A presença dessas proteínas numa grande variedade de organismos já denota sua importância. São foco de interesse, pois têm aplicações em diversas áreas, que vão desde auxiliar em estudos taxonômicos (ROUGÉ & RISLER, 1990; MOREIRA *et al.*, 1993) até estudos da biologia molecular de genes (OSBORNE & BLISS, 1985). Apesar desta fração estar sendo estudada há mais de cem anos e por ser um grupo de proteínas heterogêneo, ainda são desenvolvidos estudos de caracterização de novas lectinas (CHAWLA *et al.*, 1993; KAMEMURA *et al.*, 1993).

As funções propostas para as lectinas são muitas e variadas, tais como: transporte e armazenamento de carboidratos (BOYD, 1954), proteínas de reserva (HOWARD, 1972), estimulação da divisão celular (KAUSS & GLASER, 1974), extensão da parede celular (WEBER & NEUMANN, 1980), proteção contra patógenos (TALBOT & ETZLER, 1978; CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991) e atuação na relação simbiótica leguminosa-*Rhizobium* (BOHLOOL, 1974; DAZZO & BRILL, 1978). Neste último caso, a lectina mostrou ser essencial ao reconhecimento *Rhizobium*-leguminosa em *Trifolium repens* (trevo), sendo aceita como um fator de reconhecimento entre as células da raiz e o *Rhizobium trifolii*, antes da infecção (DAZZO & BRILL, 1978). Outra função inclui a proteção dada pela lectina nas plantas contra os insetos predadores, devido a capacidade desta proteína em se ligar às vilosidades intestinais, provocando perturbações gastrointestinais, levando estes a não mais se alimentarem destas plantas (PUSZTAI & WATT, 1974; JANZEN *et al.*, 1976). Foi detectada a presença de lectinas em *Heliantus tuberosus* também durante a quebra de dormência (GRIFFAUT *et al.*, 1990). Em estudos recentes (COSTA & RICARDO, 1994) foi observada uma mudança na quantidade de glicopeptídeos ligados a concanavalina-A, presentes em raízes de *Lupinus albus*, crescidas em cultura de tecidos, durante a formação de calus e nodulação, atribuindo-se, para as lectinas uma possível função fisiológica na planta, sendo neste caso uma proteína constituinte de membrana.

As lectinas de semente de leguminosas estão principalmente localizadas nos cotilédones, sendo encontradas em pequenas quantidades nos embriões. Os níveis de lectinas variam, dependendo do estágio de desenvolvimento das sementes e do órgãos em que são encontradas: podem estar ausentes no embrião e presentes durante os estágios tardios da maturação (CHAPPELL & CHRISPEELS, 1986; WALLING *et al.*, 1986). Há estudos que demonstram os corpúsculos protéicos como localização primária das lectinas nas células dos cotilédones. Neste caso, a lectina foi considerada uma proteína de reserva na semente

(BOLLINI & CHRISPEELS, 1978). Em outras dicotiledôneas como *Datura stramonios*, através de métodos imunocitoquímicos (KILPATRICK *et al.*, 1979), foi verificado que as lectinas podem ocorrer predominantemente em outros tecidos da semente como a casca e a epiderme, sendo que nestas estruturas, elas aparecem associadas à parede celular (BOWLES *et al.*, 1976; BROEKAERT *et al.*, 1988).

As lectinas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (BOLLINI & CHRISPEELS, 1979; CHRISPEELS *et al.*, 1982). Não está inteiramente claro como as lectinas são transportadas para os corpúsculos protéicos para depósito, e parece que antes de atingirem os corpúsculos são primeiramente transportadas para o complexo de Golgi, onde são glicosiladas (CHRISPEELS, 1983 a; 1983 b). De fato, a orientação do complexo de Golgi nestas sementes é tal que as vesículas de secreção desta organela estão em locais muito próximos dos corpúsculos protéicos (PUSZTAI, 1991).

A lectina presente nas sementes de *P. vulgaris* é denominada de fitohemaglutinina (PHA). Esta lectina é caracterizada por sua M.M. entre 30 e 36 kg/mol e por causar hemaglutinação, a principal característica que a distingue de outras glicoproteínas, como a faseolina. Existem 5 isoformas da PHA, de diferentes combinações de 2 subunidades, PHA-E (aglutina eritrócitos) e PHA-L (aglutina leucócitos), formando tetrâmeros (GOLDSTEIN & HAYES, 1978). As duas subunidades são codificados por 2 genes semelhantes, *dlec1* e *dlec2* que codificam PHA-E e PHA-L, respectivamente ([HOLFFMAN & DONALDSON, 1985] apud CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991).

Abaixo um modelo das 5 isoformas, sendo A, PHA-E, e B, PHA-L



A diversidade em estrutura e distribuição das lectinas encontradas entre diferentes famílias de plantas, bem como em diferentes tecidos da mesma planta, pode indicar que diferentes lectinas adaptaram-se à várias funções características, durante a evolução (ETZLER, 1985).

A lectina foi evidenciada em *P. vulgaris*, nas frações albumina e globulina, em variedades européias (PUSZTAI & WATT, 1974, MANEN & MIÉGE, 1977). Há necessidade de se estudar as lectinas presentes nestas frações, principalmente na fração albumina que é pouco estudada, para variedades brasileiras. A caracterização físico-química da lectina em cultivares brasileiros, bem como a evidência de sua atividade biológica nas plantas, pode levar à utilização destas como elementos de proteção contra pragas e a um melhor entendimento de

suas funções dentro da planta. Entre cultivares brasileiros de *P. vulgaris*, encontra-se a presença de plantas susceptíveis à nodulação, e como as lectinas podem estar envolvidas neste processo, pesquisas sobre a presença destas proteínas nestes cultivares e sua influência na nodulação, deverão ser realizadas.

OBJETIVOS

Através deste trabalho pretende-se atingir dois objetivos:

- 1- Caracterizar as diferentes frações protéicas, albuminas, globulinas e lectinas de sementes quiescentes de três variedades de *Phaseolus vulgaris*.
 - 2- Detectar e analisar estas proteínas durante a formação e a germinação nas três variedades de *Phaseolus vulgaris*.
-

MATERIAL E MÉTODOS

Os métodos comuns utilizados em todos os experimentos são descritos abaixo. Os experimentos com metodologia específica serão descritos separadamente nos capítulos seguintes.

Obtenção das Sementes

Sementes de *Phaseolus vulgaris* foram fornecidas pela EMBRAPA-Goiânia (variedades Norh e Ouro Negro) e pelo IAC-Instituto Agronômico de Campinas (variedade Jalo). Estes materiais apresentam diferença quanto a capacidade de nodulação. A variedade Norh não tem capacidade de nodulação, enquanto que as variedades Jalo e Ouro Negro apresentam alta capacidade.

As sementes foram germinadas em rolos de papel de filtro com água destilada, em câmaras de germinação a 25°C. As plântulas foram transplantadas para vasos com vermiculita e foram fornecidos os nutrientes necessários para seu desenvolvimento normal, aplicando-se 250 ml de solução nutritiva de HOAGLAND (HOAGLAND & Arnon, 1950), duas vezes por semana. As plantas cresceram em casa de vegetação à temperatura e luminosidade ambiente. O cultivo das plantas foi realizado para a obtenção de sementes, que constituiu o material básico utilizado nos experimentos.

Preparação de farinha

Após a remoção da testa, os cotilédones foram moídos em moinho de bola por 5 minutos e a farinha obtida foi passada em peneira de malha fina (0,185 mm² de malha). Para livrar a farinha de lipídeos esta ficou sob agitação em hexano ou acetona (10 ml/g) por uma noite em temperatura ambiente. Em seguida a farinha foi filtrada em filtro de papel e lavada com éter (2 ml/g), em capela, deixada secar por 2h e armazenada em frascos hermeticamente fechados em dessecador. Este material foi utilizado nas análises bioquímicas.

Eletroforese

Foi utilizado gel de poliacrilamida no sistema vertical (8.3cm x 10.4cm), com espessura de 1,5mm, com corrente contínua, adaptado de LAEMMLI (1970), utilizando o aparelho de mini-gel da Hoefer modelo S-250.

Em todos os casos foi empregada eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS/ 2%) em sistema de gel descontínuo, com gel de resolução na concentração de 13% de poliacrilamida e gel de empacotamento a 6%.

As soluções estoque utilizadas na preparação dos géis foram as seguintes:

- Solução A: 34g de acrilamida e 0,3g de bis-acrilamida em 100 ml de água destilada;
- Solução B: 7,5g de acrilamida e 0,11g de bis-acrilamida em 25 ml de água destilada;
- Tampão do gel de resolução: Tris-HCl 1M pH 8,8;
- Tampão do gel de empacotamento: Tris-HCl 1M pH 6,8;
- Solução de SDS 10%;
- TEMED;
- Persulfato de amônio 10%.

Os géis de resolução foram preparados utilizando-se os seguintes volumes das soluções estoque:

Solução	Volume (ml)
Tampão de resolução	4,80
Água destilada	2,70
Solução A	4,80
Solução de SDS 10%	0,15
TEMED	0,05
Persulfato de Amônio 10%	0,05

Após a polimerização foi colocado o gel de empacotamento, sobre o gel de resolução, na seguinte composição:

Solução	Volume (ml)
Tampão de empacotamento	0,63
Água destilada	3,26
Solução B	1,00
Solução de SDS	0,05
TEMED	0,05
Persulfato de Amônio 10%	0,05

O tampão de corrida foi Tris-glicina 0,025M, pH 8,3; contendo 0,1% de SDS. Azul de bromofenol foi diluído no tampão de corrida e aplicado na parte superior do gel, sendo usado

como marcador de corrida. As amostras foram aplicadas num volume não superior a 15µl. A corrida foi feita a 15 °C, a 12,5 mA por gel, até que a frente de azul de bromofenol atingisse a extremidade inferior do gel, sendo o tempo médio da corrida de 2h.

As amostras foram dissolvidas em tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7, contendo 2% de SDS e 1% de β-mercaptoetanol, sendo a desnaturação feita em banho-maria fervente por dez minutos.

A concentração para o preparo das amostras para as proteínas albumina, globulina e lectina purificadas, foi de 4mg/ml de tampão (acima citado) e a concentração para amostras utilizando a farinha total foi de 20mg/ml. Após a calibração das proteínas estudadas, com proteínas de M.M. conhecidas, foi utilizada como amostra padrão o perfil de proteínas totais da variedade Goiano precoce (CHAGAS, 1993), também calibradas anteriormente.

As proteínas foram fixadas e coradas no gel com uma solução de 2g de Coomassie Brilliant Blue G-250, 225 ml de metanol, 225 ml de água destilada e 50 ml de ácido acético (1:1:4,5) por uma noite. A solução descorante utilizada foi metanol, água destilada e ácido acético, na proporção de 1:8:3,5.

Dosagem de proteína total

As proteínas totais foram extraídas a partir de 20mg de farinha com 5ml de NaOH 0,02% por 30 minutos. Em seguida o material foi centrifugado a 3.000 xg e retirado o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso com o mesmo volume e centrifugado novamente. Os sobrenadantes das duas extrações foram misturados, e a partir deste foram feitas as dosagens segundo o método de BRADFORD (1976).

Para fazer a curva padrão utilizou-se BSA (Sigma) em diferentes concentrações dentro de um intervalo de 10-100 µg de proteína. As dosagens foram realizadas em espectrofotômetro (Micronal-B 390) a 595nm. Os resultados foram constituídos pela média de pelo menos três dosagens.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância, e à comparação de médias feitas pelo teste de TUKEY (5% de significância) (Snedecor & Cochran, 1967). As diferentes letras representam valores estatisticamente diferentes.

CAPÍTULO- I

CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE RESERVA

A caracterização de proteínas individuais de sementes é de fundamental importância para o estudo básico e aplicado de proteínas de leguminosas, e para o entendimento de suas expressões genéticas diferenciais (MILLERD, 1975). As principais proteínas de reserva da semente de leguminosas, albumina, globulina e lectinas, foram caracterizadas nas três variedades de *Phaseolus vulgaris* estudadas.

I.1-MATERIAL E MÉTODOS

I.1.1- Separação de Albuminas e Globulinas

As proteínas foram extraídas com tampão borato 0,05M com NaCl 0.5M pH 8, a partir da farinha (1g /10ml).

A base para a separação das albuminas e globulinas foi sua diferença de solubilidade, sendo as albuminas solúveis em água e as globulinas em soluções salinas. Após a diálise com água destilada, as proteínas foram centrifugadas (27.000 xg), sendo o precipitado (globulinas) ressuspenso em água destilada, congelado e liofilizado. O sobrenadante (albuminas) foi congelado e liofilizado, sendo solubilizado em água destilada, centrifugado e liofilizado novamente para que as albuminas fossem purificadas. As duas frações foram submetidas à eletroforese. Para as quantificações das frações protéicas assim obtidas, estas foram pesadas e os resultados apresentados em relação ao peso da farinha e à proteína total da semente.

I.1.2-Determinação da Massa Molar -Coluna Sephacryl -S200

Foi utilizada a filtração em coluna Sephacryl S200-HR (83,2 cm de altura e 2,6 cm de diâmetro) na determinação da M.M. (kg/mol) das frações albumina e globulina nativas. A coluna foi montada segundo as instruções do fabricante (Pharmacia).

A coluna foi equilibrada com tampão Tris -HCl 50mM pH 8 / KCl 50mM / glicerol 10%/ DTT 1mM , tendo sido calibrada com proteínas padrão do Kit da Sigma (MW GF-200), indicadas na tabela abaixo:

Proteínas/Concentração	M.M.(Kg/mol)
Azul de Dextrano	2.000
β -amilase-4mg/ml	200
Álcool desidrogenase-5mg/ml	150
Albumina de Soro Bovino-BSA-10mg/ml	66
Anidrase carbônica-3mg/ml	29
Citocromo-C-2mg/ml	12,4

A coluna foi equilibrada com tampão Tris 0,05M pH 7,5 /ácido acético 0.025M /NaCl 0.1M, e amostras (5ml) de albuminas ou globulinas totais, diluídas neste mesmo tampão (1,66mg/ml) e resolvidas com fluxo de 0,7ml/min. Foram coletadas 60 frações de 3,7 ml, que foram lidas em espectrofotômetro (Micronal B-390) a 280nm.

I.1.3-Dosagem de Carboidratos

A dosagem de carboidratos totais, nas frações albuminas e globulinas, foi realizada pelo método de antrona (UMBREIT *et al.*, 1972). As absorbâncias obtidas foram comparadas com uma curva padrão de glicose nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 mg/ml. Os resultados foram expressos como a média de 3 repetições para cada amostra .

I.1.4-Separação e/ ou Purificação de Lectinas

-Coluna de Fetuína-Sepharose 4B Ativada com CNBr

A separação e/ou purificação de lectina das sementes foi baseada na propriedade dessas proteínas em se ligarem especificamente a carboidratos e/ou a glicoproteínas.

Neste caso foi utilizada uma coluna de afinidade de Sepharose ligada a uma glicoproteína (fetuína) para realizar a separação das lectinas das frações albuminas e globulinas das três variedades estudadas.

-Preparo da fetuína

A glicoproteína fetuína foi isolada a partir do soro de feto bovino. Um volume de soro fetal de bezerro foi misturado com dois volumes de solução de acetato de zinco 0,03 M / etanol 28.3% (v/v) a pH 6,4, e agitado a -5°C por 16h. A mistura foi centrifugada e o sedimento descartado. Foi adicionado etanol ao sobrenadante para elevar a concentração de 19 para 25% e acetato de bário para uma concentração final de 0,02M (5,11g/l) e o pH 6,7. A mistura foi mantida a -5 °C por duas horas e, então, centrifugada. O sedimento foi descartado.

Ao sobrenadante foi adicionado etanol para elevar a concentração de 25 para 40% e foi mantida a -10 °C por 16h. Esta solução foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado. O sedimento (fetuína) foi ressuscitado em citrato de sódio 0,05M e dialisado contra água destilada, congelado e liofilizado.

-Acoplamento da Fetuína à Sepharose

Foram pesados 4g de Sepharose-4B ativada com CNBr (Pharmacia) e lavados com HCl 1mM (200ml/g de Sepharose) por 3 dias (para cada g de Sepharose obtêm-se 3,5 vezes o volume do gel). O gel foi filtrado e lavado com tampão de acoplamento (NaHCO₃ 0,1M, pH 8,3, com NaCl 0,5M) várias vezes.

A fetuína (200 mg) foi solubilizada em tampão de acoplamento e centrifugada a 27000xg por 20 minutos. Descartou-se o sedimento.

A suspensão de gel foi então misturada lentamente com a solução de fetuína, sem agitador magnético, por 4h e depois filtrada. Em seguida foi lavada com Tris-glicina 0,2M pH 8 várias vezes, medindo-se depois o volume em proveta (após sedimentação do gel). Foram obtidos 14ml de gel que foram colocados numa coluna (seringa de 20 ml).

A coluna foi lavada com o tampão de acoplamento seguido de tampão acetato de sódio 0,1M pH 4, contendo NaCl 0,5M; tampão de acoplamento; tampão Tris 0,05M pH 8 / ácido acético 0,025M / NaCl 0,1M, CaCl₂ 75 mM, MnCl 90 µM, 0,1% NaN₃ (tampão I); tampão Gly 0,05M pH 3 / HCl 7mM / NaCl 0,5M (tampão II) e equilibrada com tampão I (tampão de equilíbrio).

-Preparação e Aplicação da Amostra

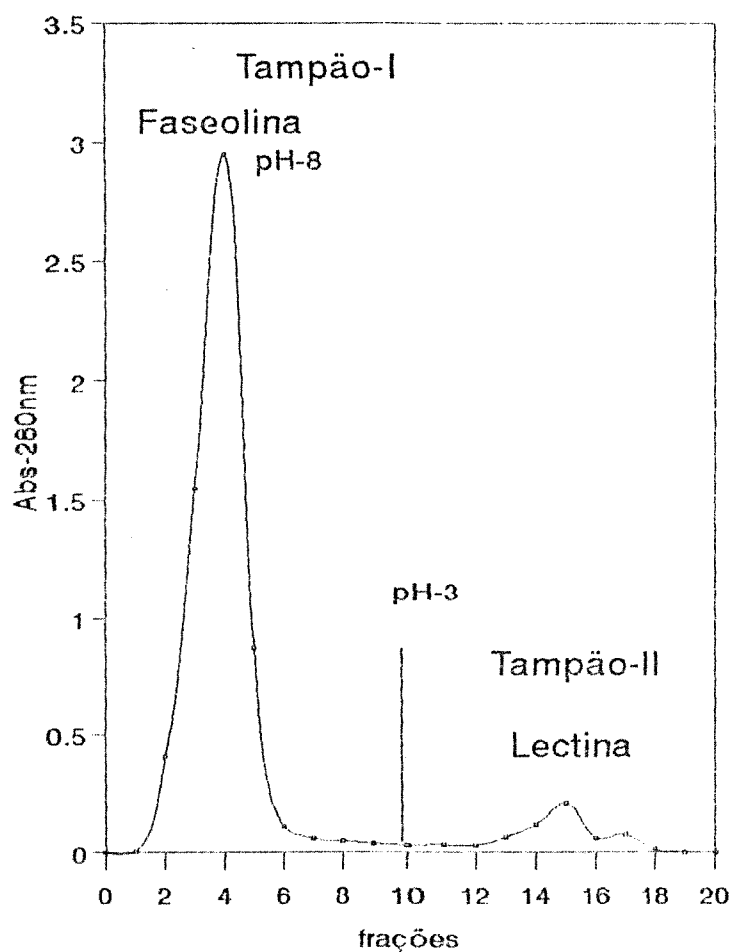
Foram utilizados 50 mg de albumina ou de globulina das três variedades de feijão, que foram dissolvidos em 2ml de tampão I. A eluição das proteínas que não se ligaram à coluna, foi feita com 45 ml de tampão I. Em seguida as proteínas que se ligaram à coluna foram

eluídas com 45 ml de tampão II . Após estes procedimentos, a coluna foi lavada com 2 ml de uréia 8M e foi equilibrada com o tampão I.

Foram coletadas 20 frações de 4,5ml (fluxo = 60ml/h) e lidas em espectrofotômetro Micronal B390 a 280nm. A figura abaixo, ilustra o padrão de eluição da coluna de fetúina-Sefarose-4B, para purificação das lectinas, eluídas com pH 8 e pH 3 .

I.1.5-Proporção das Proteínas

A determinação das proporções das proteínas foi realizada através dos géis das frações albumina, globulina e lectina das 3 variedades estudadas. Foram realizadas análises dos géis por densitômetro Ultroscan XL laser modelo 2222-020 (Pharmacia).



I.1.6-Determinação da Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi detectada segundo o método de GRANT *et al.* (1983).

O sangue utilizado para o teste foi o de coelho. Foi retirado com agulha descartável de um animal não imunizado criado em biotério. Foram coletados 5ml de sangue e colocados em um recipiente contendo "pérolas de vidro" que evitam a coagulação, por causarem desfibrinação do plasma sanguíneo.

As hemácias para o teste foram preparadas a partir da lavagem com tampão fosfato 0.004M pH 7, contendo 0.9% de NaCl, seguida de centrifugação do sangue, sendo o sedimento as hemácias puras. O sangue (5ml) foi lavado 3 vezes no tampão acima. Em cada lavagem, o material era centrifugado (1.000 xg) e o sedimento ressuspendido até ser completada a lavagem.

Os eritrócitos foram tripsinizados em uma solução do tampão fosfato de sódio contendo 4% de hemácias e 0,1% de tripsina. Esta solução foi deixada em banho-maria por 1h a 27 °C. Após este procedimento a solução de eritrócitos foi lavada novamente para a retirada do hemolisado e do excesso de tripsina. O sedimento de hemácias foi ressuspendido ao volume inicial de 5ml com o mesmo tampão da lavagem, para se efetuar os testes de hemaglutinação.

As amostras de lectinas foram dissolvidas no tampão fosfato de sódio pH 7 na concentração de 2mg/ml.

Para este teste foi utilizada uma placa de plástico (Sterilin) com 96 poços redondos, sendo usados 24 orifícios para o teste de hemaglutinação. A diluição das amostras de lectinas foi feita com um microdiluidor (Dynatech), com capacidade de diluição de 25 µl. Através do microdiluidor foi possível diluir a amostra inicial de 50 µl da amostra (na concentração 1:1) no 1º orifício até o 24º orifício, onde em cada um havia 25 µl de tampão fosfato (0,04M) de sódio (0,9%) pH 7. Após efetuadas as diluições, foram adicionados em todos os orifícios 25 µl da solução de hemácias.

Após 30 minutos em temperatura ambiente, foram observadas amostras dos testes em microscópio ótico (40x), para se determinar o ponto em que não havia mais aglutinação das hemácias (grau de aglutinação). A lectina globulina da variedade Jalo foi utilizada como padrão para a definição da unidade de hemaglutinação (U.H.), pois é muito semelhante no padrão eletroforético à variedade Goiano, e apresenta atividade hemaglutinante semelhante a variedades já estudadas (SANTORO, 1988). Uma unidade de hemaglutinação é definida como a menor quantidade da amostra necessária para causar aglutinação sob condições experimentais. A atividade hemaglutinante é expressa em unidade hemaglutinante por mg da amostra.

I-2-RESULTADOS

I-2.1-Proteína total

Os resultados das dosagens de proteínas totais na semente seca, mostraram que houve diferença significativa entre as 3 variedades (Jalo, Norh e Ouro Negro). Jalo e Norh mostraram conteúdos semelhantes, e maiores que Ouro Negro.(TAB-1)

TABELA-1- Conteúdo (%) de proteína total nas sementes das 3 variedades de *Phaseolus vulgaris*.

	var.Jalo	var. Norh	var.Ouro Negro
Prot. totais(%)	26.08 ± 2,8 ^{b*}	26.45 ± 1,72 ^{b*}	20.63 ± 1,5 ^{a*}

*-Valores médios de 3 repetições, com erro padrão. Comparação de médias pelo teste de TUKEY, DMS=5.23

I-2.2-Albumina e Globulina

I-2.2.1-Separação

As duas frações foram separadas a partir da farinha total. Foi obtida a proporção das albuminas e globulinas na semente seca e também a porcentagem destas na fração protéica total (TAB-2).

Foi observado que a porcentagem de albuminas, na fração protéica e e na semente seca, foi semelhante para as variedades Jalo e Norh e maior em Ouro Negro. Para as globulinas em relação à semente, Jalo e Ouro Negro apresentaram um conteúdo menor que Norh, mas em relação à fração protéica houve uma diferença significativa entre todos: Jalo<Ouro Negro<Norh (TAB-2).

A partir das eletroforeses, foi obtido o perfil das proteínas totais bem como das albuminas, globulinas e lectinas para as 3 variedades (ver item -Lectinas).

I-2.2.2-Massa Molar

As variedades Jalo Norh e Ouro Negro apresentaram proteínas de alta M.M., na faixa de 80 kg/mol, 3 bandas fortes e maiores na faixa mediana do gel com M.M. entre 47 e 41, e bandas de M.M. menor, entre o meio e o final da faixa do gel, variando entre 37 a 17 kg/mol. A variedade. Jalo apresentou uma definição maior das bandas, assim como um maior número

delas. Norh e Ouro Negro apresentaram um perfil com diferenças marcantes como uma banda intensa de M.M. baixa (26 kg/mol) em O.N.. Estas duas últimas são mais semelhantes entre si do que com Jalo no perfil eletroforético.

TABELA-2-Conteúdo (%) de albumina e globulina na fração protéica total para as 3 variedades.

Variedade	Albumina		Globulina	
	% na fração protéica	% na semente	%na fração protéica	% na semente
Jalo	10,94 ± 0,58 ^{a*}	2,86 ± 0,24 ^{a*}	47,83 ± 1,88 ^{a*}	12,75 ± 0,49 ^{a*}
Norh	10,83 ± 0,94 ^{a*}	2,86 ± 0,12 ^{a*}	72,39 ± 3,47 ^{c*}	19,15 ± 0,91 ^{b*}
Ouro Negro	17,77 ± 0,36 ^{b*}	3,60 ± 0,076 ^{b*}	61,80 ± 1,14 ^{b*}	12,61 ± 0,23 ^{a*}

*-Valores médios de 3 repetições, com erro padrão. Comparação de médias pelo teste de TUKEY, DMS-0,43 (Alb/sem); 1,74 (Alb/prot); -2,67 (Glob/sem).; 8,57 (Glob-prot.).

A principal fração das globulinas, a faseolina, apresentou diferentes padrões para as variedades, sendo que, Jalo e Ouro Negro e Norh apresentaram 3 bandas evidentes que provavelmente são subunidades. A faseolina da variedade Jalo apresentou para a subunidade α M.M. de 47 kg/mol; para β 44 kg/mol e para δ 42 kg/mol. (FIG-1-Faixa 6 e 7). Ouro Negro apresentou três subunidades da faseolina (α , β e δ), respectivamente com M.M. de 46; 43 e 41 kg/mol (FIG-2-Faixa 6 e 7). A variedade Norh mostrou na fração faseolina três subunidades α (46 kg/mol), β (44 kg/mol) e δ (42 kg/mol) (FIG-3- Faixa 6 e 7).

As albuminas também apresentaram diferentes perfis eletroforéticos. Albumina da variedade Jalo apresentou 4 bandas (M.M. 36 ; 35 ; 31 e 30 kg/mol) na porção mediana do gel, apresentando também nesta fração, M.M. maiores (91; 89 e 83 kg/mol) e menores (21; 19 e 17 kg/mol) M.M. (FIG-1-Faixa 3). Norh apresentou aparentemente, apenas uma banda acentuada na porção central do gel (38 kg/mol), uma banda forte na porção inicial (58 kg/mol) e uma na porção final (19 kg/mol) (FIG-2-Faixa 3). Albumina da variedade Ouro Negro mostrou 7 bandas principais, com altas (aproximadamente 85 kg/mol), médias (35 ; 33 ; 31 kg/mol) e baixas M.M (28 e 20 kg/mol) (FIG-3-Faixa 3).

Lectina das duas frações (albumina e globulina) foi purificada a partir das frações puras, e a partir do gel foi obtida a M.M. para as lectinas albuminas e globulinas de cada variedade de *Phaseolus vulgaris* (Jalo, Norh e Ouro Negro).

Lectina albumina da variedade Jalo mostrou, através de eletroforese, bandas medianas de M.M. de 37; 35; 32 e 30, principalmente. Lectina globulina da variedade Jalo mostrou ter M.M. entre 32 e 27 (FIG-1-Faixa 4 e 8).

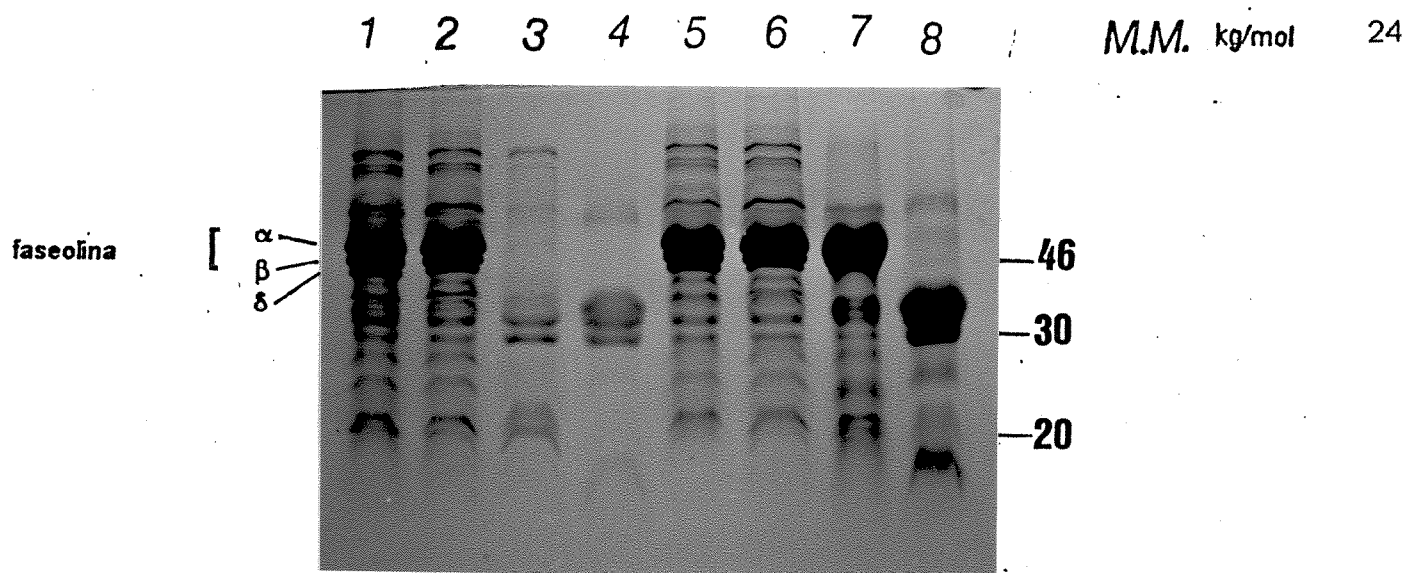


FIGURA-1-Gel desnaturante das frações protéicas da semente seca- variedade Jalo. Faixa: 1- e 5-padrão de proteína total -variedade Goiano-; 2 e 6-proteína total; 3-albumina purificada; 4- lectina albumina purificada; 7- globulina purificada; 8-lectina globulina purificada.

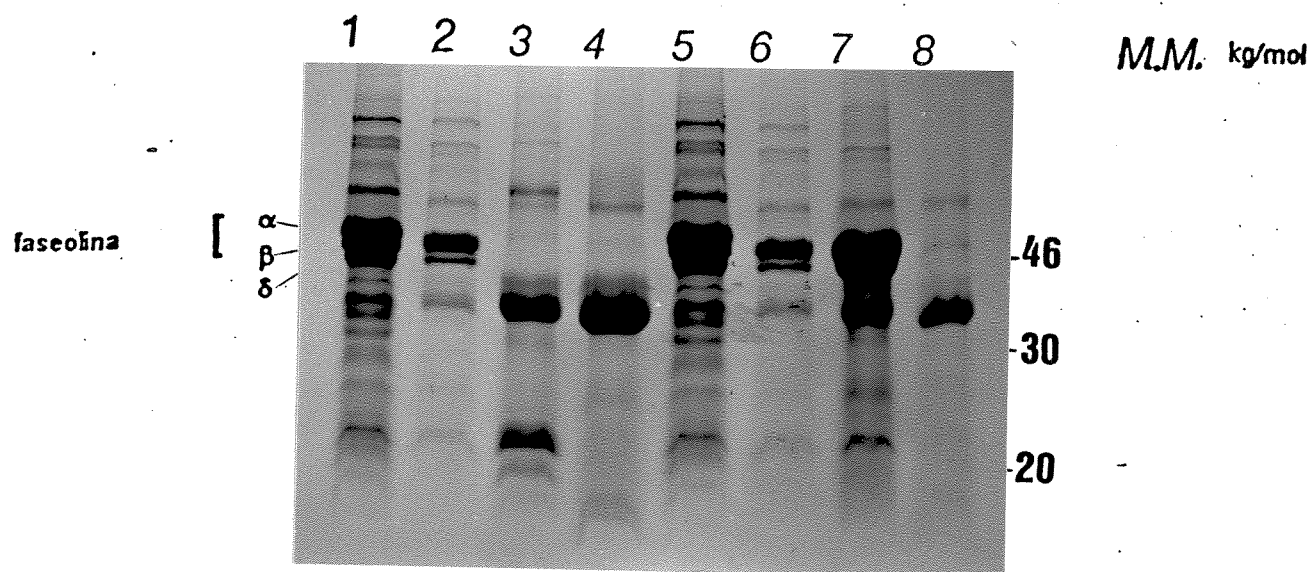


FIGURA-2-Gel desnaturante das frações protéicas da semente seca- variedade Norh. Faixa:-1 e 5-padrão de proteína total- variedade Goiano; 2 e 6-proteína total; 3-albumina purificada; 4-lectina albumina purificada; 7-globulina purificada; 8-lectina globulina .

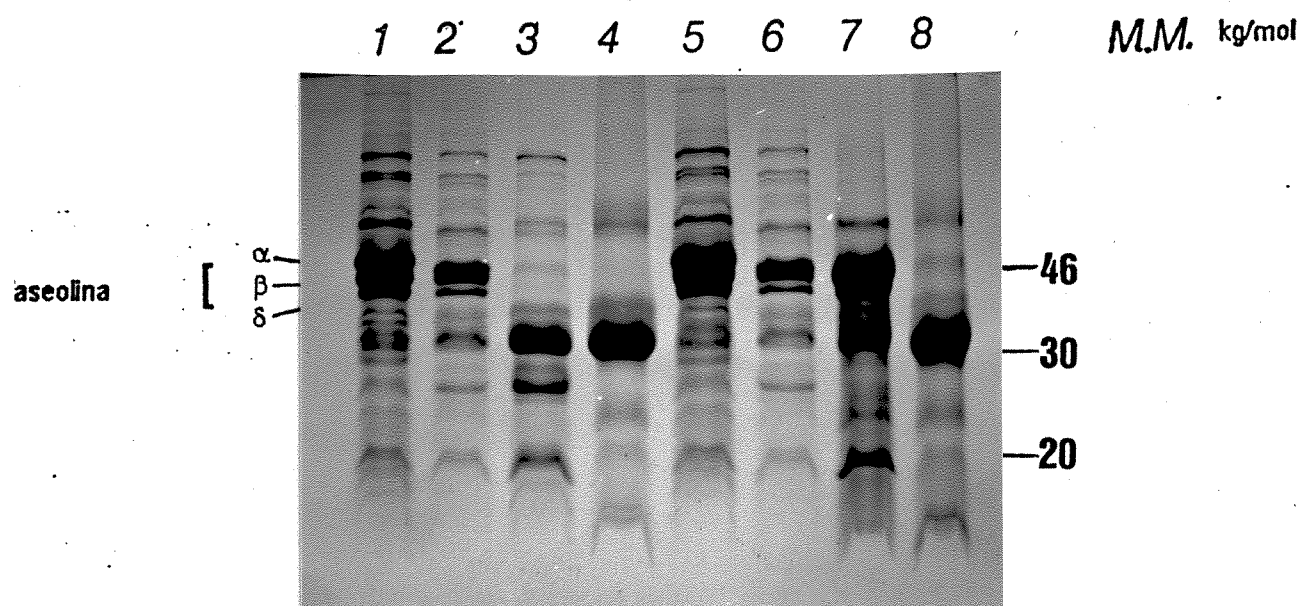


FIGURA-3-Gel desnaturante das frações protéicas da semente seca- variedade Ouro Negro. Faixa: -1 e 5 -padrão de proteína total-variedade Goiano; 2 e 6-proteína total; 3-albumina purificada; 4-lectina albumina purificada; 7-globulina purificada; 8-lectina globulina purificada.

As lectinas da variedade Norh apresentaram para a lectina albumina uma M.M. ao redor de 38 para sua principal banda, sendo que mostrou uma banda de M.M. de 57 também evidente. A lectina globulina da variedade Norh apresentou uma M.M. de 36 kg/mol, em sua principal banda (FIG-2-Faixa 4 e 8).

A lectina albumina da variedade Ouro Negro correspondeu a uma banda forte, aparentemente sem subunidades definidas, com M.M. de 35 kg/mol. Esta lectina também apresenta uma proteína com uma banda mais fraca de M.M. alta (57 kg/mol). Lectina globulina para esta variedade apresentou também uma banda bem acentuada e correspondeu a M.M. de 33 (FIG-3-Faixa 4 e 8).

Pelos dados de M.M. obtidos nas eletroforeses desnaturantes e aqueles de proteína nativas em Sephacryl-G200, pode-se esperar uma provável proporção das subunidades das frações de albuminas e globulinas para as 3 variedades de feijão (TAB-3).

TABELA-3- M.M. (kg/mol) das moléculas desnaturadas e nativas das principais bandas de albuminas e globulinas das 3 variedades e também as proporções esperadas das moléculas desnaturadas nas moléculas nativas (desnaturante-SDS-PAGE; nativa-Sephacryl S-200).

	M.M. (kg/mol)- moléculas desnaturadas	M.M.(kg/mol)- moléculas nativas	Proporção das moléculas desnaturadas
Albumina-Jalo	35 / 33 / 31 /30	122,86	$\cong 1:1:1:1$
Albumina-Norh	38	142,83	$\cong 4$
Albumina-Ouro Negro	35 / 33 / 31	149,80	$\cong 2:1:1$
Globulina-Jalo (faseolina)	47 / 44 / 42	202,37	$\cong 2: 2:1$
Globulina-Norh (faseolina)	46 / 43 / 41	193,12	$\cong 2:2:1$
Globulina-Ouro Negro (faseolina)	46 / 44 / 42	183,12	$\cong 2:2:1$

I-2.2.3-Carboidratos

As dosagens de carboidratos ligados às frações protéicas foram realizadas para as albuminas e globulinas purificadas.

TABELA-4-Conteúdo de carboidratos totais na fração albumina e globulina das três variedades de *Phaseolus vulgaris*.

	var. Jalo	var. Norh	var. Ouro Negro
Albumina(%)	6,2 ± 0,08 ^{a*}	6,7 ± 0,49 ^{a*}	9,8 ± 0,66 ^{b*}
Globulina(%)	2,78 ± 0,45 ^{a*}	3,32 ± 0,34 ^{a*}	2,97 ± 0,04 ^{a*}

*-Valores médios de 3 repetições, com erro padrão. Comparação de médias pelo teste de TUKEY; DMS- 1,20 (Alb)

Foi observado um alto conteúdo de carboidratos ligados às albuminas nas três variedades, principalmente para Ouro Negro. Não foi encontrada diferença significativa ao se comparar o conteúdo de carboidratos das frações globulinas, nas três variedades.

I-2.3-Lectinas : Isolamento e Purificação

Como resultados no item anterior, foi feita a detecção das lectinas albuminas e globulinas através de eletroforese em meio desnaturante, a partir das amostras purificadas da coluna de fetuína-Sepharose-4B ativada (FIG 1,2 e 3). Comparando-as com as albuminas e globulinas purificadas e as proteínas totais, foram evidenciadas suas localizações e possíveis subunidades (TAB 3). O conteúdo das lectinas foi obtido a partir das albuminas e das globulinas totais por densitometria (TAB 5 e 6).

I-2.3.1-Lectina Albumina

A variedade Ouro Negro apresentou uma diferença significativa no conteúdo de algumas frações, sendo que apresentou maior porcentagem tanto para a albumina na proteína total como para albumina na semente. Do mesmo modo para a quantidade de lectina albumina na semente O.N. mostrou os maiores valores. Jalo apresentou o menor conteúdo de lectina albumina total (TAB-5).

TABELA-5-Conteúdo (%) das albuminas e lectinas albuminas da semente e em relação à proteína total dos 3 cultivares de *Phaseolus vulgaris*.

	var.Jalo	var.Norh	var.Ouro Negro
Albumina -semente(%)	2,86 ^{a*}	2,86 ^{a*}	3,60 ^{b*}
Lectina Albumina-semente(%)	0,43	1,20	1,20
Albumina-Prot.total(%)	10,94 ^{a*}	10,83 ^{a*}	17,77 ^{b*}
Lectina Albumina-Prot.total(%)	1,66	4,57	5,91

*-Valores médios de 3 repetições, com erro padrão. Comparação de médias pelo teste de TUKEY; DMS- 0,43 (Alb/sem); 1,74 (Alb/prot.)

I-2.3.2-Lectina Globulina-

A purificação das lectinas globulinas foi feita pela coluna de afinidade mencionada, a partir da fração globulina das variedades estudadas. A identificação das subunidades das lectinas globulinas foi feita por eletroforese, sendo também esperado que algumas bandas com as mesmas M.M. da fração globulina fossem lectina (FIG-1, 2 e 3).

Pode-se observar que o conteúdo de globulina e lectina globulina em relação à proteína total, foi maior para as variedades Norh e Ouro Negro, diferindo significativamente da variedade Jalo. Mas, em relação à semente, Norh apresentou os maiores conteúdos tanto para a globulina quanto para a lectina globulina (TAB 6).

TABELA-6-Conteúdo (%) de globulina e lectina globulina na semente e em relação à proteína total, para as três variedades de *Phaseolus vulgaris*.

	var.Jalo	var.Norh	var.Ouro Negro
Globulina-semente(%)	12,75 ^{a*}	19,15 ^{b*}	12,61 ^{a*}
Lectina Glob-Semente(%)	1,28	2,81	2,00
Globulina-Prot.total (%)	47,83 ^{a*}	72,39 ^{c*}	61,8 ^{b*}
Lectina Globulina-Prot.total(%)	4,82	10,62	9,84

*-Valores médios de 3 repetições, com erro padrão. Comparação de médias pelo teste de TUKEY; DMS- 2,67 (Glob/sem.); 8,57 (Glob/prot.)

Pelas TABELAS-1, 2, 5 e 6, foi observado que a variedade Norh apresentou elevado conteúdo de lectina total das duas frações, o maior conteúdo de globulina e também o maior conteúdo protéico na semente seca. A diferença mais marcante para esta variedade foi o alto conteúdo de lectina na fração albumina correspondendo a 42% desta fração, enquanto que

para as outras variedades, esta fração não foi superior a 33%. Comparando-o com Jalo, que apresentou conteúdo de proteínas totais semelhante (TAB-1), não foi observada diferença significativa no conteúdo das albuminas (TAB-2). Jalo apresentou o menor conteúdo de lectinas nas duas frações protéicas. O conteúdo de carboidrato das frações protéicas foi semelhante para as variedades Jalo e Norh (TAB-4).

Já em relação à variedade Ouro Negro, com quantidades menores de proteínas na semente seca, foi obtida uma diferença significativa na fração albumina, com conteúdo maior do que as outras variedades. Quanto à globulina, foi semelhante a Jalo na semente e em relação à proteína total apresentou-se diferente de Jalo e Norh. Esta variedade apresentou um conteúdo de lectina albumina e lectina globulina, bem próximo aos obtidos para Norh.

I-2.3.3- Atividade Hemaglutinante

A atividade biológica das lectinas, medida através do teste hemaglutinante, apresentou marcante diferença para as lectinas albuminas e lectinas globulinas.

Foi utilizado como padrão para o cálculo das unidades hemaglutinantes a lectina globulina de Jalo, sendo que uma U.H. correspondeu a 0,056 µg/ml. A determinação do grau de hemaglutinação foi obtido através de microscópio óptico. Pela FIG-4 pode-se observar os diferentes graus de hemaglutinação.

TABELA-7- Unidades hemaglutinantes obtidas para as lectinas globulinas e lectinas albuminas, das variedades Jalo, Norh e Ouro Negro (O.N.).

Lectina	U.H.
Globulina-Jalo	1,000
Globulina-Norh	2.230,000
Globulina-O.N.	8.900,000
Albumina-Jalo	0,045
Albumina-Norh	725,000
Albumina-O.N.	93,000

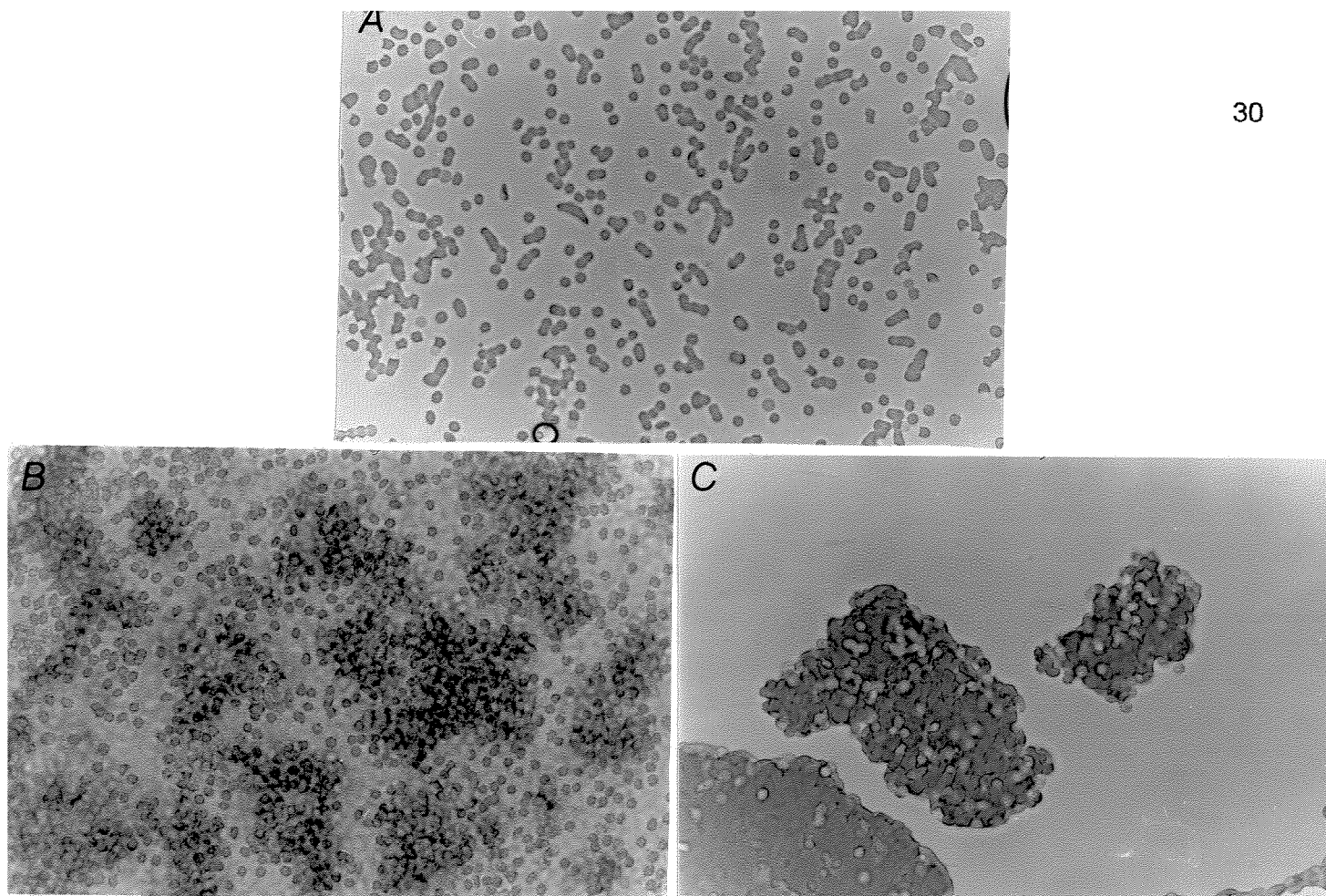


FIGURA-4- A-hemácias sem aglutinação; B-hemácias parcialmente hemaglutinadas; C-hemácias totalmente hemaglutinadas.

As lectinas globulinas das variedades Norh e Ouro Negro apresentaram as mais altas U.H., ou seja, houve a necessidade de uma maior quantidade destas proteínas para causar hemaglutinação, e por isso elas podem ser consideradas menos tóxicas do que as lectina albuminas.

A U.H. obtida para as lectinas albuminas foi mais baixa principalmente para a lectina albumina de Jalo. A lectina albumina de Norh apresentou U.H. maior do que a verificada em Ouro Negro. A lectina albumina e globulina da variedade Jalo apresentou valores mais baixos de U.H. do que as outras variedades.

Como estas lectinas tiveram menores U.H. do que as lectinas globulinas, elas necessitam de uma quantidade pequena para causar hemaglutinação, possuindo uma maior atividade biológica.

I-3-DISCUSSÃO

I-3.1- Quantidade de proteínas

O conteúdo de proteínas nas sementes secas das três variedades estudadas, ficou entre 20 e 26% (TAB-1), estando dentro da faixa normalmente encontrada para cultivares brasileiros, entre 19 e 34% (SGARBIERI, 1987).

As principais proteínas de reserva de sementes (globulina e albumina), apresentam diferentes solubilidades, sendo as globulinas solúveis em soluções salinas e as albuminas em água (OSBORNE, 1898). Esta diferente solubilidade foi a base para a separação das frações. A purificação das albuminas e globulinas foi um passo importante, pois estas seriam utilizadas para posterior purificação das lectinas.

Em sementes de *Phaseolus*, a globulina é a fração mais abundante e pode corresponder de 50 a 75% da proteína total (ISHINO & ORTEGA, 1975; ROMERO *et al.*, 1975; MA & BLISS, 1978). A fração globulina nas variedades estudadas representou a maior parte (40 a 70%) da proteína total extraída das sementes. Esta fração é a mais abundante nas leguminosas ocorrendo em diferentes proporções nas várias espécies, como *Pisum* 60 a 80% (SCHROEDER, 1982), e *Vicia* 60 a 90% (MCLEESTER *et al.*, 1973; PASQUALINI *et al.*, 1991), por exemplo.

As albuminas estão presentes em *Phaseolus* e, em algumas variedades estudadas deste gênero, variam entre 11 e 19% do peso das sementes (MA & BLISS, 1978). Pelos dados obtidos, a porcentagem das albuminas entre 10 e 17%, concordam com esses valores. A presença desta fração em algumas espécies de leguminosas pode chegar a 50% da semente, como em algumas variedades de *Pisum sativum* (MURRAY & VAIRINHOS, 1982). Está presente, também em grande quantidade, em *Ricinus communis* (40%) (YOLE & HUANG, 1978) e em algumas variedades de *Vicia faba* (38%) (PASQUALINI *et al.*, 1991).

A diferença na quantidade de proteína e na proporção das principais frações observada para os três cultivares, demonstra a grande variação encontrada em *Phaseolus*.

I-3.2-Globulinas

É conhecido que a faseolina, que é uma vicilina, é a principal fração das globulinas de feijão. Pode apresentar subunidades de M.M. entre 45 e 51 kg/mol, que se associam dando origem a uma forma protomérica de $\cong 163$ kg/mol (ERSLAND *et al.*, 1983). Como a faseolina apresenta padrões eletroforéticos bem definidos pela literatura, as variedades estudadas foram comparadas a estes padrões e inseridos em um deles. As variedades estudadas apresentaram uma pequena variação nos limites de M.M. estando na faixa de 47 e 41 kg/mol.

A faseolina das 3 variedades apresentaram 3 bandas maiores (α , β e δ) em gel de uma dimensão, podendo ser caracterizada como do tipo "Tendergreen" (M.M. 51, 48, 46) e uma banda menor de 45 kg/mol. A variedade Jalo foi a que apresentou as maiores M.M. em relação às três subunidades da faseolina (47, 44 e 42 kg/mol), em relação a Norh (46, 43 e 41 kg/mol) e Ouro Negro (46, 44 e 42-kg/mol).

GEPTS *et al.* (1986) mostraram que os cultivares brasileiros apresentam principalmente o tipo "T" como padrão. Pelos resultados obtidos para as três variedades estudadas, o padrão encontrado parece ser o "T". Entretanto é necessário um estudo mais amplo dos padrões para faseolina nos cultivares brasileiros, para se obter o padrão exato que predomina no Brasil e, através dos dados obtidos, inferir sobre as formas de domesticação de *Phaseolus vulgaris* no país.

Na família das leguminosas, várias espécies como *Pisum sativum* e *Glicine max*, apresentam globulinas contendo frações como a faseolina, mas tendo denominações e apresentando coeficientes de sedimentação diferentes. *Pisum sativum* apresenta subunidades com M.M. de aproximadamente 70 e 33 kg/mol, e componentes menores de M.M. 17, 14 e 12 para a fração vicilina e para a sua fração característica, denominada de convicilina, contém uma subunidade de 70 kg/mol distinto da fração vicilina (CROY *et al.*, 1980). Estas subunidades de *Pisum* quando comparados com os de *Phaseolus*, principalmente com a fração vicilina, apresentam diferentes M.M., sendo entre 70 e 33 kg/mol em *Pisum* (CROY *et al.*, 1980) e entre 51 e 45 kgmol em *Phaseolus* (ERSLAND *et al.*, 1983), apresentando variações conforme as espécies e variedades. A vicilina em *Glicine max* é denominada de conglícinina, apresentando subunidades α e α' de M.M. 57 e β de 42 (THANH & SHIBASAKI, 1978), sendo parecido em *Phaseolus*, que apresenta estas subunidades também, mas difere em M.M. (BROWN *et al.*, 1982). *Vigna unguiculata* apresenta a fração globulina 7S, mas diferente de *Phaseolus*, com M.M. entre 54 e 52 kg/mol (CARRASCO *et al.*, 1978).

A molécula nativa dos materiais em estudo mostrou valores de M.M. próximas das já estudadas (163 kg/mol) (SUN *et al.*, 1978a), mas um pouco maiores, entre 183 e 202 kg/mol. Estas moléculas podem estar arrançadas em uma forma trimérica para a forma nativa, pois foram observadas 3 subunidades compondo a faseolina, porém maiores investigações sobre a forma da molécula nativa são necessárias.

I-3.3-Albuminas

As albuminas das variedades Jalo, Norh e Ouro Negro diferiram em seus perfis nos géis mas suas M.M. estiveram na mesma faixa de valores para as principais bandas, variando de 38 a 30 kg/mol. As principais bandas variaram em seus perfis apresentando bandas fortes

com uma subunidade de M.M. 38 kg/mol em Norh, com 3 subunidades diferentes (35, 33 e 31 kg/mol) em O.N., ou com 4 subunidades diferentes em Jalo (36, 35, 31 e 30 kg/mol).

Assim como para faseolina foram propostos padrões para a fração albumina (Brown *et al.*, 1981b; 1982) podendo ser do tipo "Tendergreen" ("T") ou "Sanilac" ("S") conforme a composição e M.M. de suas subunidades. "Tendergreen" ("T") apresenta 3 bandas principais em gel de uma dimensão, com M.M. de 36; 35 e 33 além de alguns polipeptídeos de M.M. menor que 22 kg/mol, denominada de "T". O tipo "Sanilac" ("S") apresenta M.M. de 41; 38; 35; 36; 29 e 25 kg/mol, sendo a subunidade de 38 kg/mol uma banda de intensa coloração. Pela comparação com estes padrões, é sugerido que a albumina da variedade Ouro Negro possa ser do tipo "Tendergreen", pois apresenta as 3 bandas principais, além de uma subunidade próxima a M.M. 28 kg/mol. Observando a fração albumina das variedades Jalo e Norh, foi possível sugerir que essas podem ser do tipo "Sanilac", pois esta última apresenta 4 bandas principais na fração albumina. Na variedade Jalo as 4 subunidades são bem evidentes para a albumina. A variedade Norh apresentou uma banda intensamente corada e a presença de duas bandas menores sugerem que esta variedade seria do tipo "Sanilac". Talvez seja necessário um estudo maior desta fração, para se verificar se estes padrões são válidos para os cultivares brasileiros, pois estes só foram verificados em cultivares europeus (BROWN *et al.*, 1982)

Para a subfamília Papilionioideae foi observada a ocorrência frequente de alguns polipeptídeos para as albuminas de M.M. de 34, 35, 25 e 23, sendo predominante em *Pisum sativum* (MURRAY & VAIRINHOS, 1982), *Vigna unculata* (MURRAY *et al.*, 1983), *Cicer arietinum* (VAIRINHOS & MURRAY, 1982) e em *Vicia faba* (PASQUALLINI *et al.*, 1991). Outras duas subunidades, de 91 e 56 kg/mol, foram encontradas constantes em variedades de *Vicia faba*.

A composição das M.M. das moléculas nativas foi proposta anteriormente nas variedades a partir do perfil das albuminas apresentado nos géis desnaturantes. Pelos dados obtidos para a fração albumina de *Phaseolus*, diferentes padrões foram observados entre as variedades, podendo auxiliar no entendimento de sua estrutura e demonstrar a diversidade que esta fração pode ter dentro da tribo Phaseolae.

I-3.4-Carboidratos

A dosagem de carboidratos presentes nas albuminas e nas globulinas mostrou que ambas são glicosiladas. As globulinas podem conter de 3 a 5% de carboidrato em suas moléculas (SUN & HALL, 1975), e as globulinas estudadas apresentaram de 2,7 a 3,3%. A faseolina é uma fração glicosilada representando a maior parte do carboidrato presente nesta fração e também pode ser um dos responsáveis pela heterogeneidade da M.M. das subunidades da molécula desta fração (PAAREN *et al.*, 1987).

O conteúdo de carboidratos nas frações albuminas foi de 2 a 3 vezes maior do que o das globulinas. Uma possível explicação do alto conteúdo encontrado nas albuminas pode ser a presença de enzimas glicosiladas (α -galactosidase), pois a albumina já foi considerada uma fração enzimática da semente (BAUMGARTNER & CHRISPEELS, 1976). Uma outra proposição seria o alto conteúdo de lectinas nesta fração, que em *Phaseolus* são glicoproteínas, podendo conter de 5 a 10% de carboidrato na molécula (SHARON & LIS, 1990; KAMEMURA *et al.*, 1993) e que apresentam sítios de ligação para carboidratos específicos (BECKER *et al.*, 1976). As lectinas também podem apresentar enzimas glicosiladas, como uma α -manosidase encontrada em *P. vulgaris* ([PAUS & STEEN, 1978] apud LIENER *et al.*, 1986). Como este último caso, lectina com papel enzimático é raro, é mais provável que o alto conteúdo de carboidratos seja das lectinas presentes nestas frações.

Pela presença de carboidrato nas duas frações, estas foram consideradas glicoproteínas neste estudo.

I-3.5-Lectinas

A função fisiológica das lectinas não está bem estabelecida, exceto para poucos casos, como a participação no processo de reconhecimento na raiz entre *Rhizobium*-leguminosa (DAZZO & HRABAK, 1981). Detectar a presença das lectinas na semente pode ser importante, pois nesta, a quantidade de lectina pode ser maior e poderia ser obtido material para produzir anticorpo, o que possibilitaria estudar a presença das lectinas na raiz e posteriormente, verificar seu papel na interação *Rhizobium*-leguminosa.

As lectinas são encontradas tanto nas albuminas como nas globulinas (MANEN & MIÈGE, 1977), apresentando diferentes solubilidades, como as frações onde estão presentes. As lectinas podem representar na semente de 2 a 10% da proteína total da semente, em subfamílias de leguminosas (LIENER, 1976; MA & BLISS, 1978). No caso das variedades estudadas as lectinas apresentaram valores de até 15% da proteína total da semente sendo um valor alto para *P. vulgaris*, sendo que esta classe de proteína representou nas albuminas uma porção maior dentro da fração do que nas globulinas. A quantidade de lectina encontrada em várias subfamílias de leguminosas varia, como em *Canavalia ensiformis* (Con A) que é de 2 a 3%, e em *Glycine max* 1 a 1,5% (LIS & SHARON, 1973). As M.M. das lectinas encontradas nas variedades estudadas neste trabalho, estão na faixa de 29 a 38 kg/mol, próximo a faixa de 30 e 34 kg/mol encontrada em outros estudos com *Phaseolus* (GOLDSTEIN & HAYES, 1978; SUN *et al.*, 1978 b; VITALE *et al.*, 1985). As lectinas de *P. vulgaris* apresentam-se na forma de um tetrâmero contendo 2 subunidades; uma denominada E (aglutina eritrócitos) e a outra L (têm propriedades mitogênicas em linfócitos), em diferentes combinações, sendo possível agrupá-las em 5 formas tetraméricas (PUSZTAI & WATT, 1974;

BOLLINI & CHRISPEELS 1978; LIS & SHARON, 1986). As lectinas de leguminosas apresentam grande heterogeneidade em sua forma e M.M.. Podem ter uma estrutura de tetrâmeros, como a lectina de *Phaseolus*, *Glycine max*, *Dolichos biflorus* e *Canavalia ensiformis* de M.M. aproximada de 25 kg/mol, com as subunidades unidas não-covalentemente por associação de monômeros, ou como um dímero, como na tribo *Vicia*, com associação de subunidades α (M.M. 20 kg/mol) e β (5 kg/mol) (ROUGÉ & RISLER, 1990)

Pesquisas recentes (KAMEMURA *et al.*, 1993) encontraram lectinas diferentes na variedade Great Northern de *P. vulgaris*, apresentando 2 diferentes tipos de lectinas denominadas, como GNL-1, com 3 subunidades(α , β e δ) que apresentam M.M. de 34, 37 e 39 ; e GNL-2, também com 3 subunidades (α' , β' e δ') e mesma M.M., diferindo na composição de carboidrato, em M.M. nativa (145 e 175 kg/mol) e na capacidade mitogênica. A M.M. das variedades estudadas apresentam valores semelhantes, mas diferem por não apresentarem 3 subunidades evidentes. Estas lectinas demonstram a diversidade encontrada nos cultivares de *Phaseolus*, sendo um campo vasto para pesquisas futuras.

Uma característica encontrada nas lectinas que as diferenciam de outras frações é a sua capacidade de aglutinar eritrócitos. O material isolado a partir da coluna de Sepharose das albuminas e globulinas foi testado para esta característica, o que comprovaria que esta fração era lectina. A partir do teste realizado para as 3 variedades, a hemaglutinação foi evidente em todas, podendo, portanto, serem consideradas lectinas.

Alta atividade hemaglutinante de lectina foi encontrada nas variedades "Tendergreen", "Sanilac". Por outro lado, o estrato protéico da variedade "Pinto III" não apresentou atividade hemaglutinante, e também não foi verificada a presença de lectina (PUSZTAI *et al.*, 1979; BROWN *et al.*, 1981a). A ausência de lectina no cultivar "Pinto III" pode ser devido a fatores genéticos, como deleções no gene estrutural, ou a mutação estrutural ou regulatória do loci (BROWN *et al.*, 1981a). A ausência da hemaglutinação, também é encontrada em aproximadamente 10% de *P. vulgaris* selvagens e cultivados ([Brücher, 1968] apud BROWN *et al.*, 1981a).

No presente trabalho as lectinas albuminas apresentaram uma maior atividade aglutinante do que as lectinas globulinas. Dados sobre a presença das lectinas nas duas frações e testes de hemaglutinação são escassos na literatura. PUSZTAI & WATT (1974), MANEN & MIÈGE (1977) isolaram as lectinas das duas frações, mas não realizaram teste de hemaglutinação para verificar sua atividade biológica. A presença na fração albumina de Norh de uma maior quantidade de lectina (42%), demonstra que esta pode compor uma fração tóxica dentro das albuminas já que esta *in natura* pode ter efeitos tóxicos. As variedades Jalo e Ouro Negro apresentaram na fração albumina o conteúdo de 15% e 33% respectivamente de lectina, nesta fração.

Na variedade Jalo a fração lectina albumina apresentou a maior toxidez no teste de hemaglutinação, demonstrando uma alta atividade biológica. Pelo teste de hemaglutinação a variedade Ouro Negro apresentou a maior quantidade de lectina na semente (15,46%) e apresentou uma atividade hemaglutinante muito baixa na fração globulina e relativamente alta na fração albumina, podendo haver um balanço entre estas duas frações. Já a variedade Norh mostrou que a fração lectina apresenta baixa toxicidade, pois tanto na fração albumina quanto na fração globulina a lectina mostrou baixa atividade biológica para a proteína crua. Na variedade Jalo foi verificado que pode haver uma relação entre a alta toxicidade, apresentada nas duas frações e a pequena presença na semente (15%). No entanto são necessários estudos mais profundos em relação a fatores anti-nutricionais presentes na semente.

As variedades estudadas apresentaram diferentes conteúdos e atividades biológicas de lectinas. Jalo apresentou a lectina albumina com 4 bandas com M.M. variando entre 37 e 30 (FIG- 1-Faixa 4), já em Norh (FIG- 2-Faixa 4) foi observado apenas uma banda principal (38 kg/mol). Ouro Negro (FIG- 3-Faixa 4) também apresentou para lectina albumina uma banda forte com M.M. de aproximadamente 35 kg/mol. A lectina globulina em Jalo (FIG- 1-Faixa 8) apresentou M.M. entre 32 e 27 kg/mol, em Norh uma banda principal de 36 kg/mol (FIG- 2-Faixa 8) e em Ouro Negro mostrou uma banda forte de M.M. 33 kg/mol (FIG-3-Faixa 8). Como a atividade é dada pela conformação da molécula, pode ser que isto seja uma explicação para as diferentes atividades encontradas. A diferença encontrada entre os cultivares que apresentam facilidade de nodulação, Jalo e Ouro Negro, e a variedade (Norh) que não apresenta nodulação, foi a diferença no perfil das lectinas. Um estudo a nível molecular é necessário para evidenciar se estas lectinas de diferentes padrões, tem um papel na nodulação como o verificado para *Trifolii repens* (DAZZO & HRABAK, 1981).

CAPÍTULO- II

SEMENTE: FORMAÇÃO E GERMINAÇÃO

A formação da semente e a germinação, são eventos importantes que acontecem em plantas superiores. O estudo bioquímico destes períodos pode auxiliar na compreensão de processos fisiológicos e fornecer materiais biológicos interessantes para estudos genéticos. Foi realizado o acompanhamento destas duas fases, através de métodos bioquímicos, em três variedades de *Phaseolus vulgaris*, para se observar os perfis eletroforéticos característicos de cada variedade.

II-1-MATERIAL E MÉTODOS

II-1.1-Obtenção e Germinação das Sementes

O plantio das sementes, bem como a manutenção das plantas, foram feitos para se obter sementes imaturas em vários estádios de desenvolvimento. A partir destas foi possível acompanhar a formação das proteínas de reserva, durante a formação do grão.

A germinação das sementes foi realizada em caixas plásticas (11,5cm x 11,5cm- Gerbox), utilizando algodão como substrato. Durante a germinação foram coletados os cotilédones, em vários estádios, para a análise da utilização das proteínas de reserva pela plântula.

II-1.2-Coletas

Sementes

Para cada variedade, todas as vagens de várias idades foram coletadas da planta. As sementes, foram retiradas das vagens, pesadas e separadas em estádios de desenvolvimento de acordo com a massa fresca (CHAPPELL & CHRISPEELS, 1986) e cor (RACUSEN & FOOTE, 1973). As sementes foram coletadas em 17 estádios, em diferentes períodos após o

florescimento que, em média, foi de 1 mês e meio após o plantio das plântulas. A primeira amostra correspondeu a 3 dias após o florescimento e a última, a 35 dias após o florescimento, variando de acordo com o tempo de maturação de cada variedade.

Após a pesagem, as sementes foram congeladas e liofilizadas. Obteve-se o peso seco após a liofilização. As sementes foram trituradas em mortar para a preparação da farinha (ver métodos gerais), e esta utilizada para as dosagens de proteínas e a preparação das amostras para as eletroforeses.

Cotilédones

Os cotilédones foram coletados de sementes em germinação em vários dias (1 a 12 dias) levando-se em conta a morfologia externa para auxiliar na separação. Estes eram pesados, congelados, liofilizados e pesados novamente para obter-se a massa seca. Efetuou-se o preparo da farinha, que foi utilizada para as dosagens de proteínas e para a análise eletroforética.

II-1.3- Análise

As análises, tanto das sementes como dos cotilédones nos vários estádios de desenvolvimento, foram feitas pela dosagem de proteínas totais e eletroforeses como descrito anteriormente. A mesma quantidade de farinha total foi utilizada nas eletroforeses das três variedades.

II-2-RESULTADOS

II-2.1 -Análise de Sementes em Formação

Os diferentes estádios de desenvolvimento das sementes coletadas foram estabelecidos através da massa fresca das mesmas (FIG 5, 7 e 9) e pela cor (TAB-8), principalmente nos últimos estádios. Houve uma variação no tempo de amadurecimento de cada variedade: Jalo apresentou um período aproximado de 41 dias após o início do florescimento até a coleta da semente seca, Ouro Negro, 35 dias, e Norh, 30 dias.

A partir de cada estágio, foram realizadas dosagens de proteínas totais e análises eletroforéticas para a observação das modificações destas nas sementes durante seu desenvolvimento. Esses dados (FIG- 5, 7 e 9) mostram a variação de massa fresca entre os estádios, bem como, de proteína total por semente, comprovando a separação feita para os diferentes estádios. Foi observado que a quantidade de proteína por semente, em cada variedade, foi diferente, pois as massas das sementes variaram. Quanto à massa seca, a

semente da variedade Jalo apresenta o dobro da massa da variedade Norh, apesar destas duas apresentarem a mesma porcentagem de proteína proporcionalmente. Ouro Negro apresentou 35% a menos de proteína que Jalo e 22% a mais em relação ao Norh. As variedades Jalo e Ouro Negro não apresentaram uma grande diferença na massa seca.

TABELA-8-Cor das sementes de acordo com os estádios, em 3 variedades de *P. vulgaris*.

	var. Jalo	var. Norh	var. Ouro Negro
I	verde	verde	verde
II	.*	.*	verde
III	verde	verde	verde
IV	verde	verde	verde claro
V	verde claro	verde	verde claro
VI	verde claro	verde	verde claro
VII	verde claro	verde claro/ com halo laranja	verde claro
VIII	verde amarelado	verde claro/com halo laranja	verde claro
IX	creme	.*	verde claro/ com halo roxo claro
X	creme	.*	verde claro/ com halo roxo
XI	.*	bege /com halo laranja	roxo claro/com halo roxo
XII	.*	bege/ com halo laranja	roxo claro/ com halo roxo
XIII	bege	rosa claro/ com halo rosa	.*
XIV	bege	rosa claro/ com halo rosa escuro	roxo escuro
XV	marrom claro	.*	.*
XVII	.*	rosa escuro	.*
seco	marrom claro	avermelhado	preto

* Material não coletado

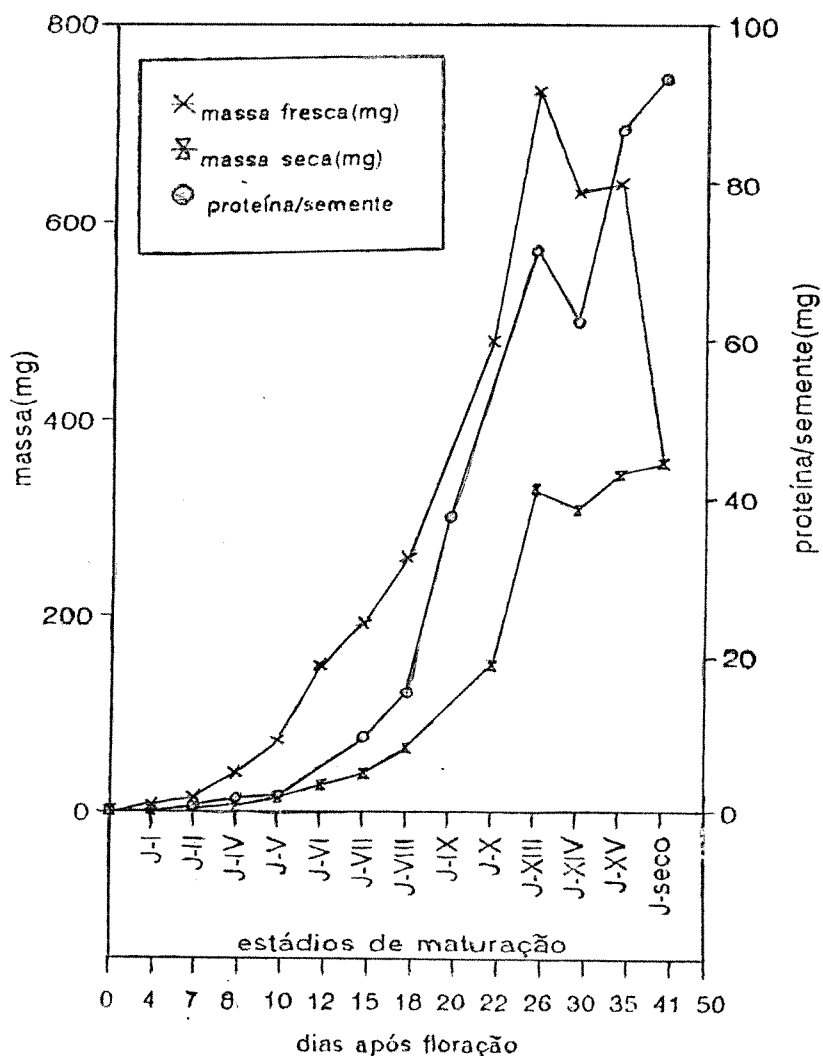


FIGURA-5- Massa fresca e seca e quantidade de proteína, em semente da variedade Jalo, nos vários estádios de maturação.

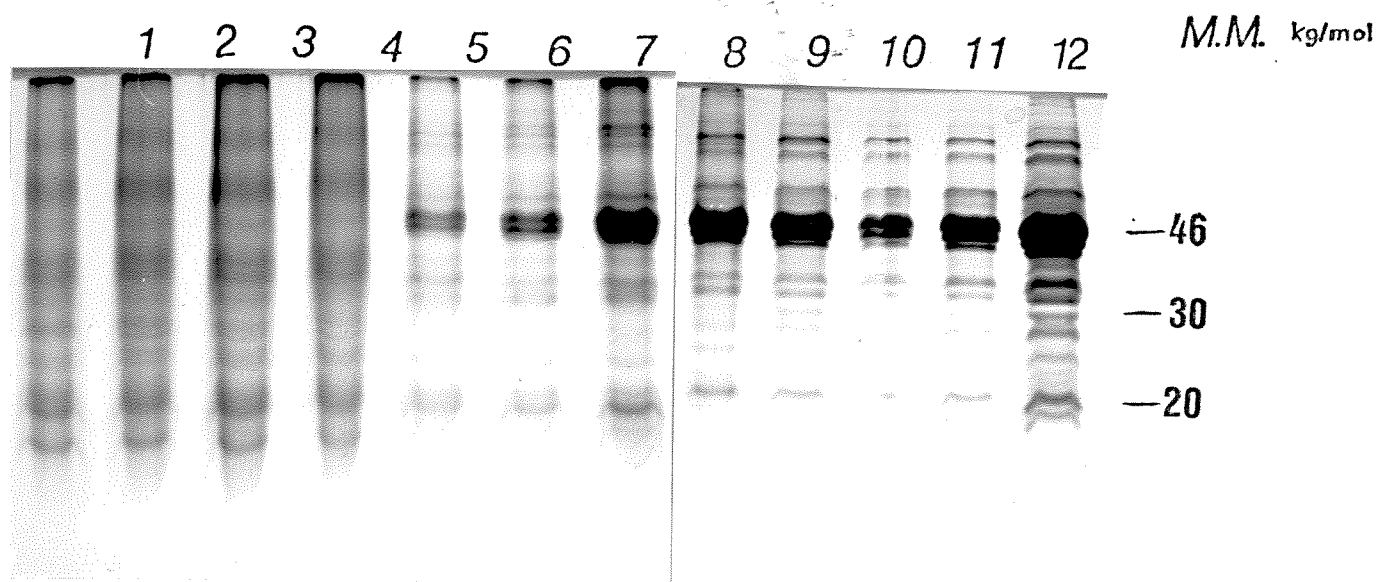


FIGURA -6- Gel desnaturante de amostras de farinha total, da variedade Jalo, em vários estádios de maturação. Faixa-1- estágio I; 2- estágio III; 3- estágio IV; 4- estágio V; 5- estágio VI; 6- estágio VII; 7- estágio VIII; 8- estágio IX; 9- estágio XIII; 10- estágio XIV; 11- estágio XV; 12-semente seca.

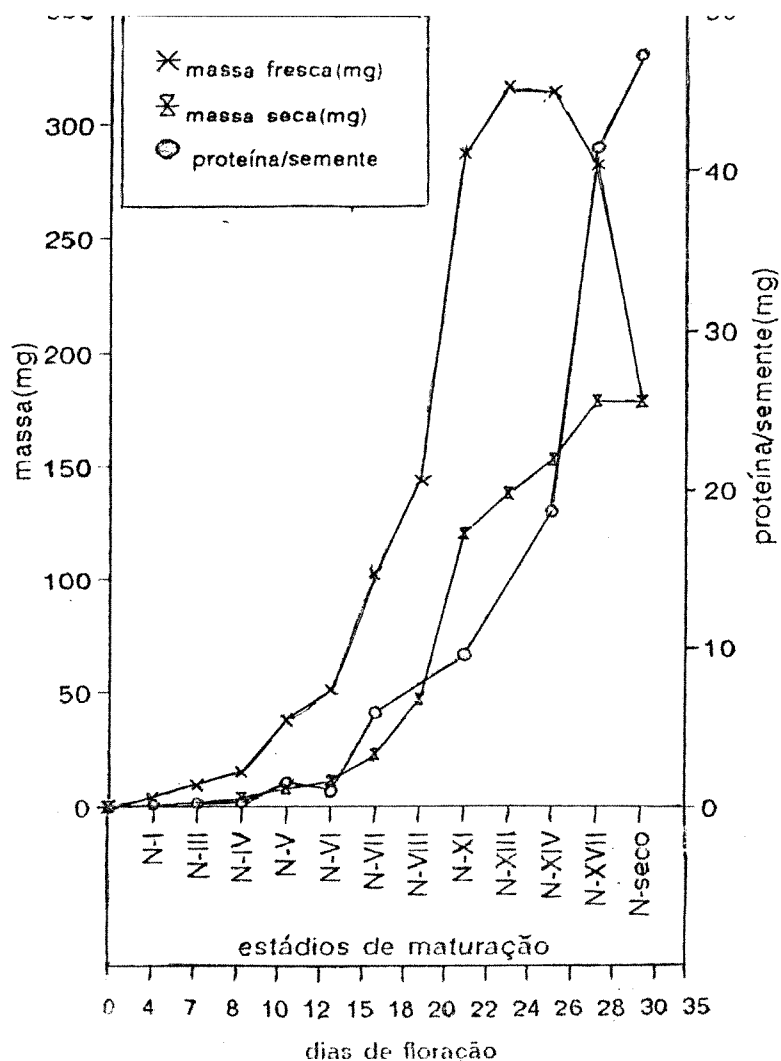


FIGURA-7-Massa fresca e seca, e quantidade de proteína em sementes da variedade Norh, em vários estádios de maturação.

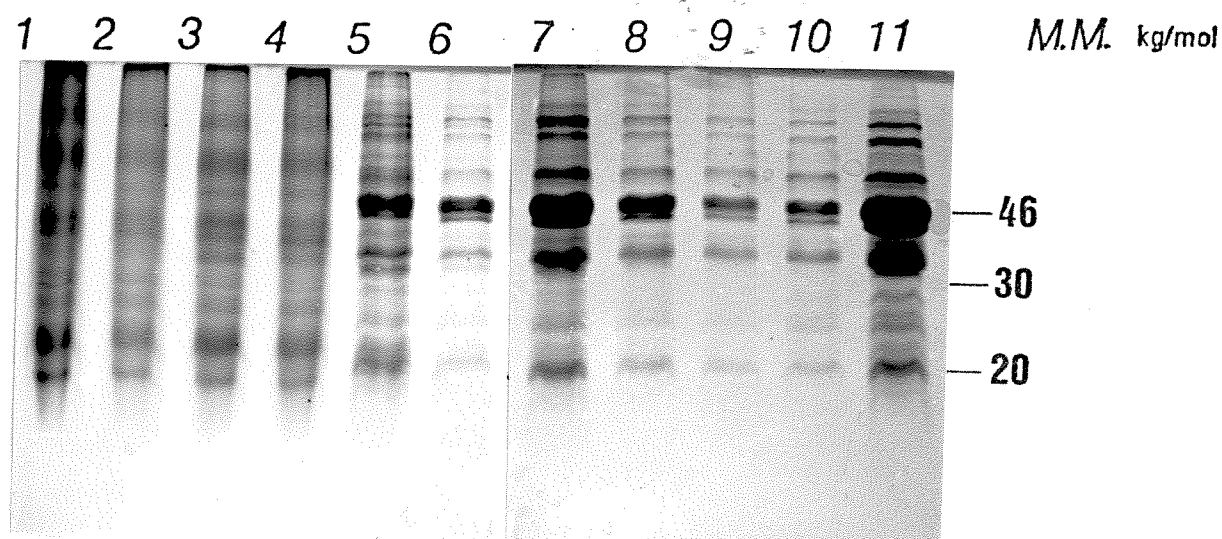


FIGURA-8- Gel desnaturante de amostras de farinha total da variedade Norh, em vários estádios de maturação . Faixa-1- estágio I; 2- estágio III; 3- estágio IV; 4- estágio V; 5- estágio VI; 6- estágio VII; 7- estágio VIII, 8- estágio XII; 9- estágio XIII, 10- estágio XIV; 11- semente seca.

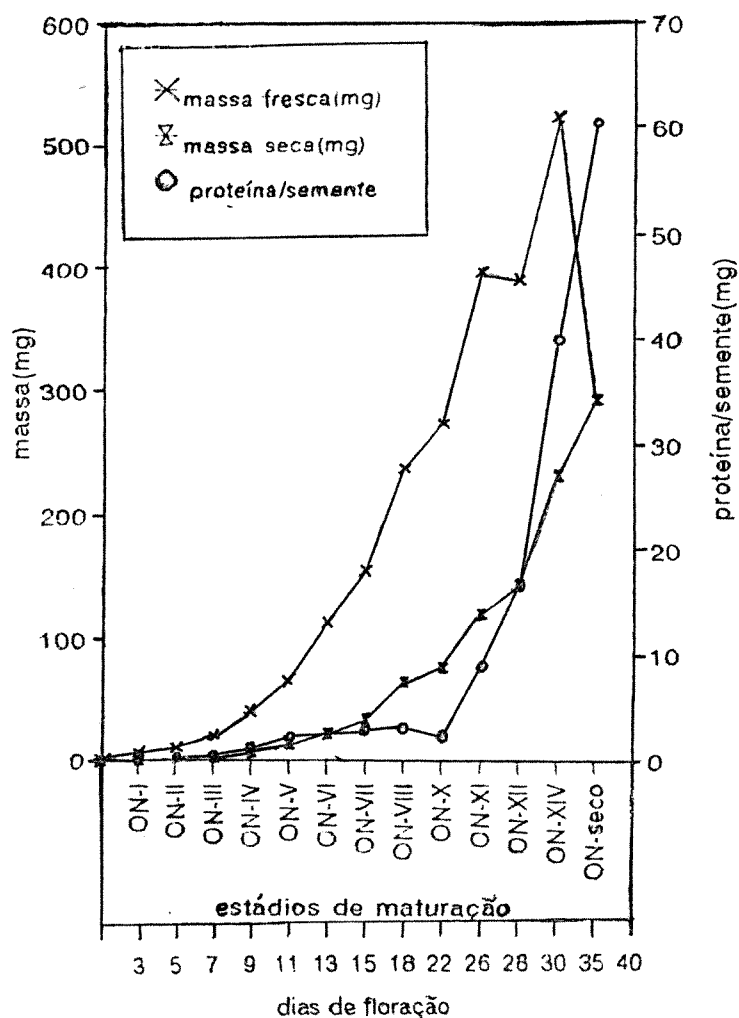


FIGURA-9- Massa fresca e seca, e quantidade de proteína, em sementes da variedade Ouro Negro, em vários estádios de maturação da semente.

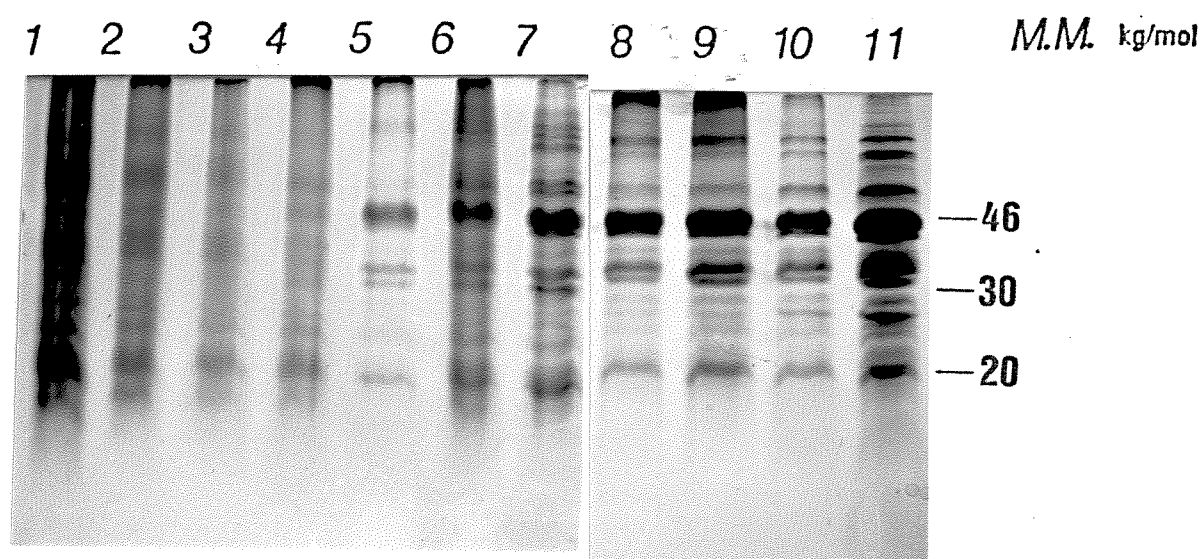


FIGURA-10- Gel desnatante de amostras de farinha total da variedade Ouro Negro, em vários estádios de maturação. Faixa-1- estágio I; 2- estágio III; 3- estágio IV; 4- estágio V; 5- estágio VII; 6- estágio VIII; 7- estágio X; 8- estágio XI; 9- estágio XII; 10- estágio XIV; 11-semente seca.

Através de eletroforeses para cada estágio, foi possível observar a síntese das principais proteínas (faseolina, albumina e lectina), bem como a deposição destas nas sementes para as 3 variedades de *Phaseolus* estudadas. (FIG- 6, 8 e 10).

Durante os diferentes estádios de desenvolvimento das sementes da variedade Jalo, a deposição das proteínas de reserva foi claramente observada nas eletroforeses das frações (FIG 6).

Nos estádios iniciais as bandas são fracas e sem definição, mas já no estágio VI $\pm$ 15 dias após a floração) é marcante a definição da fração faseolina (M.M. 47, 44 e 42 kg/mol). A partir deste e nos estádios subseqüentes as bandas das frações albuminas (M.M. 36; 35; 31 e 30 kg/mol) e lectinas tornaram-se mais acentuadas.

Na variedade Norh, as bandas também são tênues nos estádios iniciais e vão se acentuando posteriormente nas fases de desenvolvimento mais avançadas (FIG-8). Em Norh, também é possível observar a formação das principais proteínas de reserva da semente (faseolina, lectinas e albuminas), a partir do estágio VI (15 dias A.F.). A faseolina está presente neste estágio com as 3 bandas já bem definidas, α , β e δ com M.M. 46, 43 e 41 kg/mol respectivamente. Algumas bandas de maior M.M. são evidentes nas fases iniciais, assim como outras de menores, como a lectina albumina (M.M.38 kg/mol), lectina globulina (M.M. 36 kg/mol) e albuminas (M.M. 38 e 18 kg/mol).

Nos quatro primeiros estádios da variedade Ouro Negro foi possível observar bandas indefinidas, sendo estas mais evidentes em estádios mais tardios como o estágio VII. Neste último, são evidentes a faseolina (M.M. 46, 44 e 42 kg/mol) e a lectina albumina (M.M. 33 kg/mol).

A formação das bandas de menores e maiores intensidades de coloração, ocorrem durante todo o período de formação da semente. A definição do perfil eletroforético da semente seca da variedade O.N. está presente nos últimos estádios coletados, principalmente na passagem do estágio XIII para o estágio XIV, onde se tornou mais acentuada a banda de 26 kg/mol, demonstrando que, ainda neste estágio, está ocorrendo deposição de proteínas. Assim como esta banda, outras também foram se tornando evidentes durante o desenvolvimento da semente (M.M. 52 e 19 kg/mol) (FIG- 10).

A presença no gel, já nos estádios iniciais, da faseolina e lectina nas variedades estudadas, pode indicar sua síntese nos estádios iniciais. A presença de bandas a partir de um determinado estágio sugere que esta proteína foi sintetizada nesta fase ou na anterior. Em todas as variedades foi observado que a composição de proteínas presentes na semente madura só foi definida nas sementes coletadas nos últimos estádios.

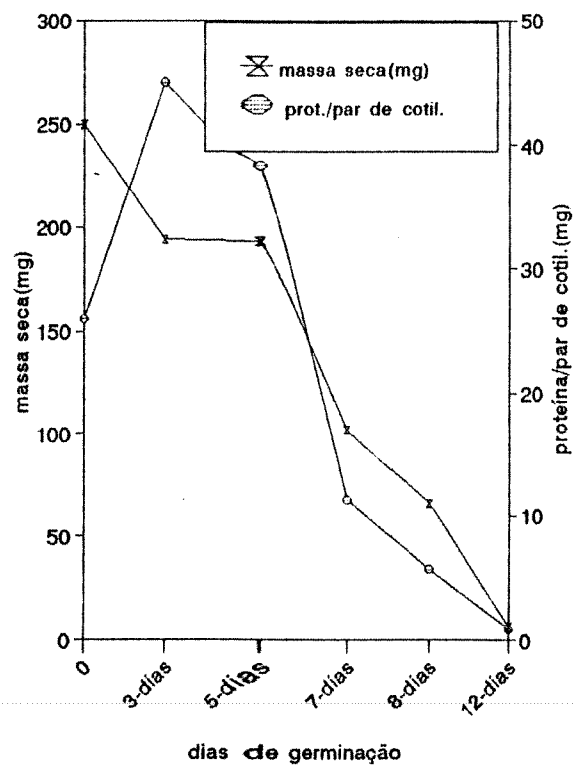


FIGURA-11- Massa seca e quantidade de proteínas/par de cotilédones nas sementes da variedade Jalo durante a germinação.

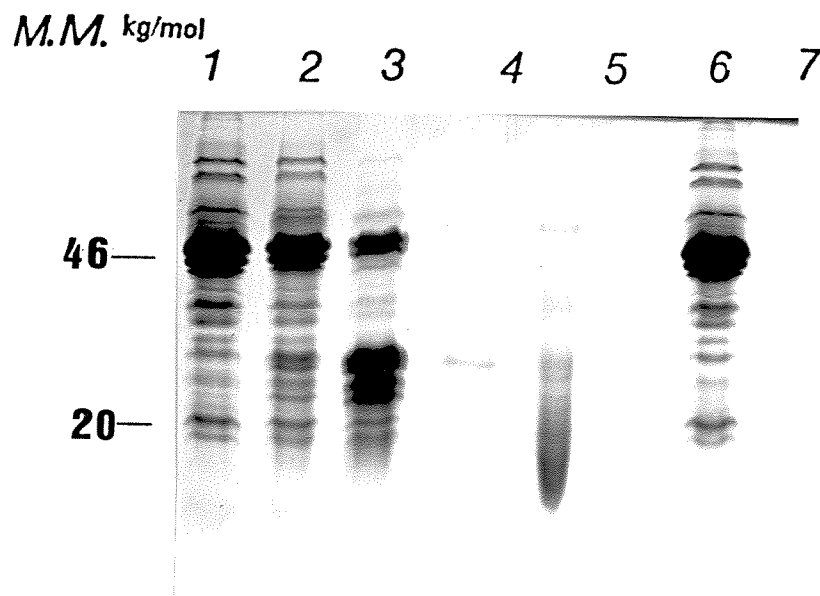


FIGURA-12-Gel desnaturante de amostras de cotilédones de sementes durante a germinação, da variedade Jalo. Faixa :-1 e 7-proteína total (semente seca); 2-cotilédone após ± 3 dias de embebição; 3-cotilédone com ± 5 dias de embebição; 4-cotilédone com ± 7 dias de embebição; 5-cotilédone com ± 8 dias de embebição; 6-cotilédone com ± 12 dias de embebição.

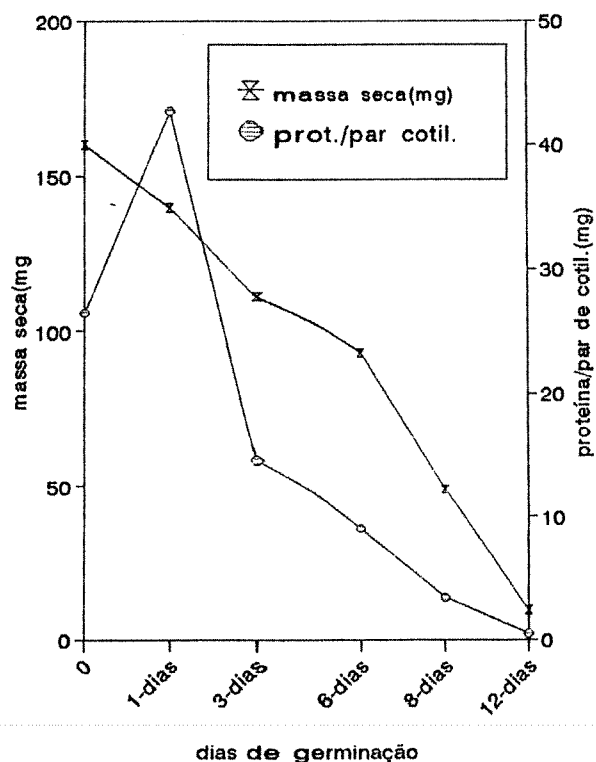


FIGURA-13- Massa seca e quantidade de proteína/par de cotilédone nas sementes, da variedade Norh durante a germinação.

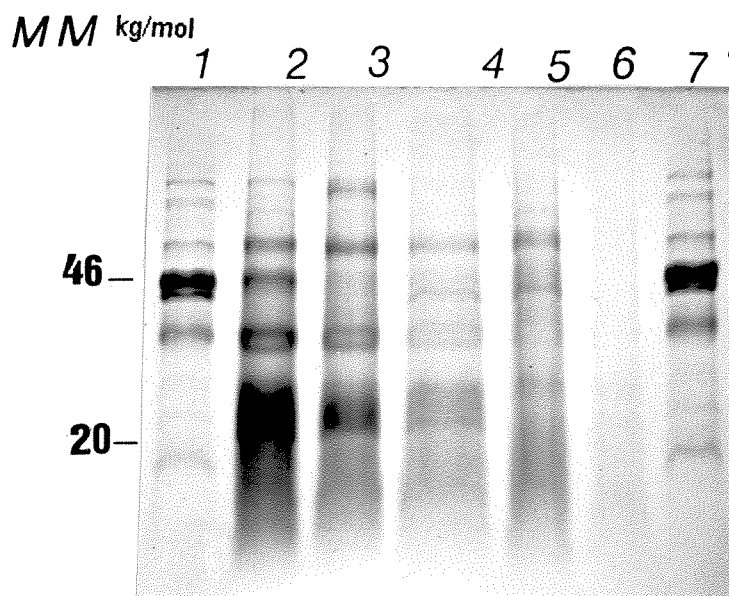


FIGURA-14- Gel desnaturante de amostras de cotilédones de sementes durante a germinação, da variedade Norh. Faixa- 1-e 7-proteína total (semente seca); 2-cotilédone com $\pm$ 1 dia de embebição; 3-cotilédone com $\pm$ 3 dias de embebição; 4-cotilédone com $\pm$ 6 dias de embebição ; 5-cotilédone com $\pm$ 8 dias de embebição; 6-cotilédone com $\pm$ 12 dias de embebição.

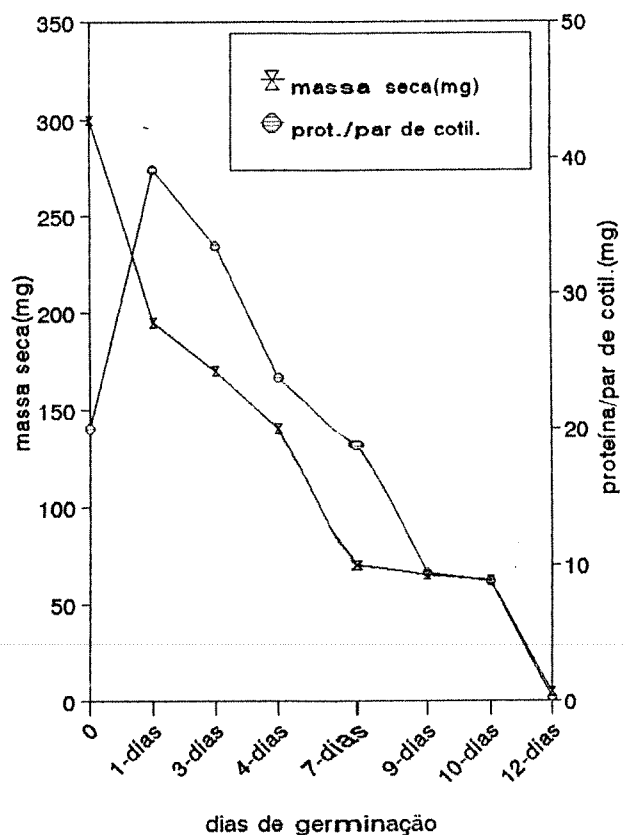


FIGURA-15- Massa seca e quantidade de proteína/ par de cotilédones nas sementes da variedade Ouro Negro durante a germinação.

M.M. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
kg/mol

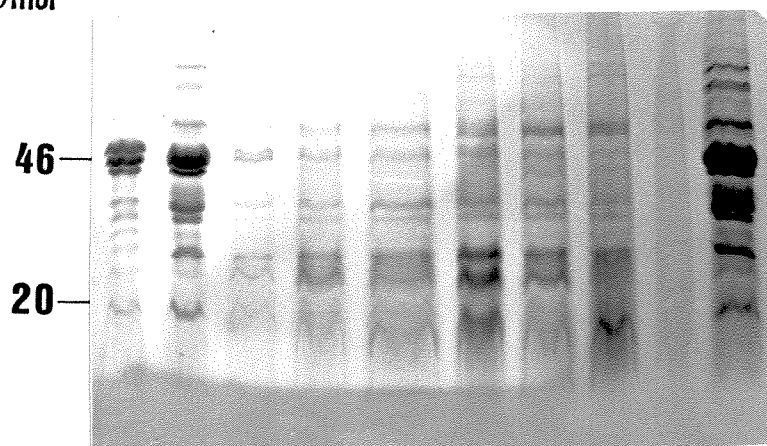


FIGURA-16-Gel desnaturante de amostras dos cotilédones de sementes durante a germinação, da variedade Ouro Negro. Faixa:-1-padrão Goiano-semente seca ;2- e 10- proteína total (semente seca). 3-cotilédones com ± 1 dia de embebição; 4-cotilédones com ± 3 dias de embebição; 5-cotilédones com ± 4 dias de embebição; 6-cotilédones com ± 7 dias de embebição ; 7-cotilédones com ± 9 dias de embebição; 8-cotilédones com ± 10 dias de embebição; 9-cotilédones com ± 12 dias de embebição.

II-2.2-Análise de Cotilédones em Sementes Germinando

Cotilédones foram coletados em diferentes períodos durante a germinação das sementes e foram utilizados para dosagens e análise por eletroforese (FIG 11,12,13,14,15 e 16).

Pelas FIGURAS 11, 13 e 15 foi possível observar a diminuição em massa seca dos cotilédones das 3 variedades. No final do período de amostragem a quantidade de proteína foi praticamente zero em todas as variedades.

Nas análises eletroforéticas de todas as variedades foi possível observar a degradação das proteínas já nos primeiros dias (1, 3 e 4 dias) de germinação, com a degradação de proteínas de maior M.M. e aparecimento de outras com menor M.M., em torno de 25 kg/mol. Na variedade Jalo proteínas de M.M. 47, 44 e 42 kg/mol (faseolina) desaparecem nos primeiros dias de embebição (FIG- 12).

Em Norh o primeiro estágio (1 dia) coletado já apresentou grande degradação, e o desaparecimento das principais bandas (M.M. 46, 43 e 41 kg/mol) foram evidentes. Na última fase coletada as proteínas desaparecem por completo (FIG -13 E 14).

Os cotilédones de Ouro Negro também apresentaram a degradação das suas principais bandas (M.M. 46, 44 e 41 kg/mol), com a deposição de proteínas nas faixas de menor M.M. no gel (FIG 15 e 16).

Nos últimos estágios de todas as variedades, há uma hidrólise total das proteínas. (FIG-12, 14 e 16).

II-2.3- Acúmulo e degradação da faseolina durante a formação e germinação de sementes

A faseolina para as 3 variedades, durante a deposição das proteínas de reserva, apresentou um acúmulo, evidenciado pelos géis (FIG 12, 14 E 16). Através de densitometria foi possível obter as porcentagens da faseolina nos géis de cada estágio, e por estes resultados foi possível construir uma curva de deposição da faseolina (FIG- 17), que ocorre nas 3 variedades estudadas.

Aparentemente os padrões que refletem o acúmulo da faseolina durante a formação da semente foram semelhantes nas 3 variedades estudadas. Assim, foi verificado que o acúmulo máximo dessa proteína ocorre no estágios iniciais da formação da semente. Há, entretanto uma pequena diferença com relação à variedade Jalo na qual o máximo da acumulação da faseolina ocorre ao redor do estágio X (FIG- 17).

Também por densitometria foi proposto uma curva de degradação da faseolina nos cotilédones de sementes durante a germinação (FIG 18) nas 3 variedades. Foi verificado que a degradação da faseolina na variedade Jalo foi aparentemente linear com o tempo (dias). Entretanto, o mesmo não foi verificado para as variedades Norh e O.N.. Nesses casos, a degradação da faseolina parece ocorrer de maneira exponencial em relação aos estádios de germinação da semente. Verificou-se também que, enquanto a quantidade de faseolina das sementes da variedade Norh foi aparentemente nula ao redor de 6 dias após a germinação, o mesmo não acontece com as outras variedades. Nestas, após este estágio, a faseolina ainda está presente nos cotilédones. Assim, foi observado que ao redor do sétimo dia, as sementes da variedade Jalo já não continham mais esta proteína, enquanto que no caso da variedade Ouro Negro, isto só ocorre no nono dia após a germinação (FIG 18).

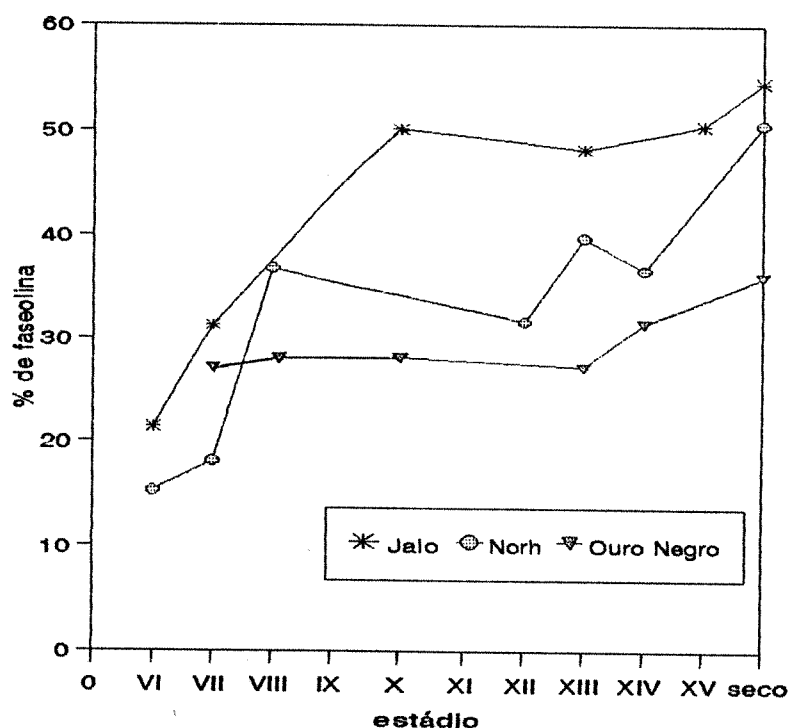


FIGURA-17-Acúmulo da faseolina para 3 variedades de *Phaseolus vulgaris*, durante a formação das sementes.

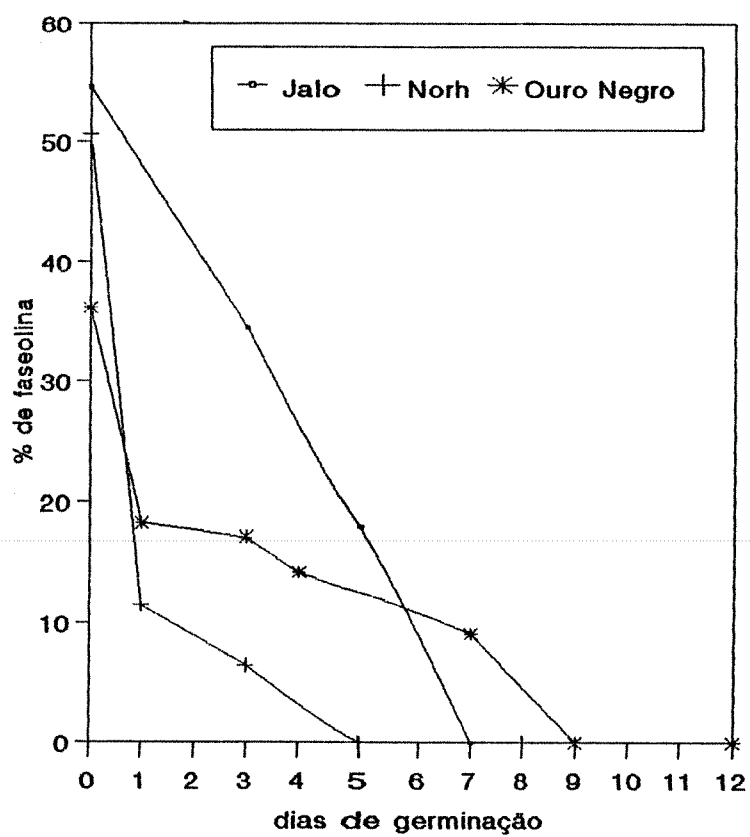


Figura-18- Degradação da faseolina nos cotilédones das 3 variedades de *Phaseolus vulgaris*, durante a germinação das sementes.

II-3-DISCUSSÃO

A formação da semente, bem como a germinação, fazem parte do ciclo de vida da planta. Estudando estes dois eventos na semente, do ponto de vista físico-químico e bioquímico, foram verificadas modificações ao longo do seu desenvolvimento.

As principais fases da formação da semente são a divisão celular, a expansão celular e a maturação da semente. Estas 3 fases são sempre encontradas nas leguminosas (DURE, 1975). Durante a primeira fase, pouca proteína de reserva é acumulada, mas legumina tem sido detectada neste período. Porém, não está ainda bem estabelecido se a acumulação da mesma ocorre durante a divisão ou em células que não estão em divisão (DOMONEY *et al.*, 1980). Neste período, ocorrem somente modificações estruturais, sendo observado um gradiente de vacuolização da epiderme nas células do parênquima. Nesta fase também há o desenvolvimento de organelas, como o retículo endoplasmático e as vesículas (CRAIG *et al.*, 1979; BAUMGARTNER *et al.*, 1980).

Além da expansão celular, a segunda fase da formação da semente é caracterizada pela síntese protéica, quando ocorre um aumento rápido das proteínas de reserva (pico de síntese) (MUTSCHLER *et al.*, 1980). Uma proliferação rápida de retículo endoplasmático foi também verificada nesta fase, em *Phaseolus* (ÖPICK, 1968), pois as proteínas são sintetizadas nestas organelas e transportadas para os corpúsculos protéicos, local de armazenamento nos cotilédones. Há estudos que demonstram que, durante a expansão celular, ocorre um aumento proporcional na massa fresca, acompanhado pelo acúmulo de proteínas nos cotilédones (LOEWENBERG, 1955; SUN *et al.*, 1978 b). Durante a síntese de proteínas, pode haver períodos onde determinadas proteínas são sintetizadas, como foi verificado em *Vigna unguiculata* (CARRASCO *et al.*, 1978). Nesta espécie, a fração de globulinas apresentou uma acumulação diferencial das suas subunidades.

No presente trabalho, a primeira fase, caracterizada pela divisão celular, correspondeu aproximadamente aos estádios iniciais denominados de I ao V em cada variedade. Nas FIG 5, 7 e 9 foi possível verificar, nesta fase, um aumento constante, porém lento, da massa fresca, bem como a diminuição na porcentagem da umidade.

A segunda fase foi evidente nas 3 variedades e ocorre aproximadamente entre os estádios VI ao XII. Foi observado também, aumento rápido da massa fresca e perda de umidade (FIG- 5, 7 e 9). Através de eletroforese (FIG-6, 8 e 10), foi possível distinguir esta fase, sendo observado claramente o aparecimento das principais proteínas de reserva de *Phaseolus*, como a faseolina, as albuminas e as lectinas nas 3 variedades. Também houve variação no acúmulo de proteínas. A variedade Jalo provavelmente tem seu pico de acúmulo entre os estádios XII e o XIII, onde há o maior aumento na quantidade de proteína. Nas variedades Norh e Ouro Negro, provavelmente o pico de síntese ocorra entre os estádios VIII

e XIV e entre X e XIV, respectivamente. O aparecimento de bandas ao longo dos estádios da segunda fase, sugere um sistema de controle fino de síntese, apresentando uma síntese diferencial de proteínas durante o desenvolvimento da semente.

A qualidade e o conteúdo de proteínas na semente dependem do período (início e término) e da taxa de síntese protéica. Como há proteínas de reserva que se acumulam mais que outras, foi sugerido que pode haver diferenças genotípicas de controle de síntese e acumulação (MUTSCHLER *et al.*, 1980). A faseolina em relação à lectina tem uma acumulação preferencial em *Phaseolus*. Neste gênero, a globulina representa grande parte da proteína de reserva, podendo haver diferenças na taxa de acumulação desta proteína, determinadas por diferentes genótipos (MUTSCHLER & BLISS, 1977; MUTSCHLER *et al.*, 1980; OSBORN *et al.*, 1988). Isto é observado também para *Pisum sativum* (THOMPSON *et al.*, 1978; DOMONEY & CASEY, 1987)).

A faseolina, neste estudo, foi acompanhada durante a formação da semente através de densitometria. Seu acúmulo foi semelhante nas 3 variedades, apesar destas apresentarem quantidades diferentes desta proteína. Entre os estádios VII e XIV, a faseolina se acumula nas 3 variedades (FIG- 17), sendo que a subunidade δ mostrou uma deposição, pelo menos no início, mais lenta (Fig- 6, 8 e 10). O acúmulo da faseolina também foi acompanhado em variedades européias de *P. vulgaris* (CHAPPELL & CHRISPEELS, 1986), apresentando pequenas diferenças nas taxas de acúmulo em relação às variedades estudadas neste trabalho.

Quando se compara o padrão de crescimento das sementes em massa com o padrão do acúmulo de faseolina, verifica-se que este processo ocorre durante a segunda fase do desenvolvimento da semente (Fig- 5, 7 e 9). O pico da síntese da faseolina parece ocorrer, nas três variedades estudadas, no estádio VIII (MUTSCHLER *et al.*, 1980), sendo observado o seu acúmulo até os estádios finais. Na análise eletroforética das variedades Jalo, Norh e Ouro Negro, foi observada a presença de bandas na interface entre o gel de empilhamento e o gel de corrida, desaparecendo nos últimos estádios obtidos. Por esta observação é possível supor que são proteínas de grande M.M., pois não passavam através da malha do gel. Proteínas de M.M. maiores têm sido identificadas como proteínas precursoras, que sofrem ação de proteases ou glicosilações durante a fase de síntese (BAUMGARTNER & CHRISPEELS, 1976; BOLLINI & CHRISPEELS, 1978). Estas formas precursoras foram encontradas em *Phaseolus vulgaris* (BOLLINI & CHRISPEELS, 1979), *Vicia faba* (HEMPERLY *et al.*, 1982) e *Ricinus communis* (ROBERTS & LORD, 1981) para a fração lectina. Em *Pisum sativum* a presença de prováveis precursores de algumas albuminas também foi observada (DOMONEY & CASEY, 1987). Pode também haver formas precursoras, que sofrem modificações (glicosilações), dando origem a polipeptídeos glicosilados (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991). No caso de faseolina e lectina, que são proteínas cuja síntese envolve uma préproteína, tais formas precursoras são bem caracterizadas (MANSFIELD *et al.*, 1988).

Na fase final de maturação da semente, ocorre pouca síntese de proteína e também uma grande perda de umidade, característica desta fase (BEWLEY & MARCUS, 1990). Neste trabalho, foi possível identificar esta fase pela baixa umidade, pequeno aumento de massa seca e pequeno aumento no conteúdo de proteína. A comparação das análises eletroforéticas dos últimos estádios das 3 variedades revelou uma diferença na intensidade das bandas. Isto demonstra que houve deposição de proteínas ainda nos últimos estádios coletados, antes da maturação ocorrer completamente, resultando na semente seca. Na literatura foram observados, para algumas variedades de *Phaseolus*, períodos de acumulação de proteínas distintas, como por exemplo o término de acumulação da faseolina na semente, que se estende até o período final de dissecação (WALBOT, 1971; MUTSCHLER *et al.*, 1980).

O acompanhamento da germinação de sementes das variedades Jalo, Norh e Ouro Negro, através dos géis, demonstrou a utilização das proteínas de reserva, que foram possivelmente hidrolisadas para o crescimento da plântula. Após a embebição, as proteínas são degradadas fornecendo aminoácidos e amidas para a síntese de enzimas e proteínas estruturais necessárias para o crescimento e estabelecimento da plântula (DAVIES & CHAPMAN, 1980). Através de eletroforese, foi observada esta degradação, evidenciada na amostra dos cotilédones após ± 12 dias de embebição onde não se observam proteínas no gel. Durante a degradação houve um acúmulo de proteínas da parte inferior dos géis. Isto indica a ação de enzimas do tipo exopeptidase e endopeptidase, que atuam na germinação (BEWLEY & GREENWOOD, 1990). Como foi observada uma acumulação de proteínas com M.M. de aproximadamente 25 kg/mol logo nas fases iniciais, e uma concomitante degradação da faseolina, estas proteínas podem ser resultado da clivagem da faseolina. Estudos anteriores (SANTORO, 1988; CHAGAS, 1993), demonstraram *in vitro* a degradação da faseolina pela tripsina (uma endopeptidase) resultando no mesmo padrão de M.M. observado nas variedades aqui estudadas. Supõe-se, portanto, que uma endopeptidase, com especificidade parecida com a da tripsina esteja envolvida no processo de hidrólise nestas variedades. É necessário ampliar os estudos das enzimas envolvidas nos processos de germinação para entender melhor este processo. Possivelmente, exopeptidases também estão envolvidas nos processos de degradação total das proteínas de reserva dos cotilédones agindo depois das endopeptidases.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a faseolina, nas variedades estudadas, foi uma das primeiras proteínas de reserva a serem degradadas durante a germinação, resultando em polipeptídeos menores. Em *Pisum sativum* (BASHA & BEEVERS, 1975) a degradação da fração globulina também ocorre mais rapidamente do que a das frações albuminas e lectinas. Cisteína proteinase, encontrada em *Vicia faba*, é uma enzima específica para globulina que participa da hidrólise inicial, e parece ter um papel crucial na mobilização das proteínas de reservas da semente (YU & GREENWOOD, 1994). A presença dessas enzimas específicas pode variar de espécie para espécie, de acordo com as proteínas

de reserva. *Sorgum vulgare*, por exemplo, que contém glutelina e prolamina como principais proteínas de reserva, e portanto ricas em aspartato e glutamato, possui alta atividade de proteinases ácidas que hidrolisam ligações peptídicas entre os grupos α -carboxil destes polipeptídeos (GARG & VIRUPAKSHA, 1970). A presença de várias enzimas hidrolíticas nos corpúsculos protéicos, como α -manosidases e N-acetil- β -glucosaminases, que hidrolizam respectivamente manose e resíduos de glucosaminas (glicoproteínas de reservas) já foram evidenciadas (HARRIS & CHRISPEELS, 1975).

A faseolina mostrou ser degradada no início da germinação, conforme FIG-18, sendo a hidrólise distinta nos diferentes materiais estudados. Aparentemente, a degradação do tipo exponencial, verificada nas variedades Ouro Negro e Norh, segue uma cinética típica de reações de hidrólise protéica que normalmente tem sido verificada *in vitro*, como no caso da degradação da caseína por tripsina (SANTORO, 1988). Por outro lado, a cinética de degradação apresentada pela faseolina na variedade Jalo foi linear com o tempo. Isto pode indicar que não necessariamente os mesmos sistemas enzimáticos estejam envolvidos na degradação desta proteína. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que estas diferenças encontradas na cinética de degradação estejam relacionadas com diferenças na estrutura da molécula da faseolina nas variedades Jalo, Norh e Ouro Negro.

Medicago sativa contém uma albumina (2S) que é degradada já durante a embebição (COUTER & BEWLEY, 1990). Isto também acontece em *Ricinus communis*, sendo a albumina (2S) degradada antes da fração globulina (YOULE & HUANG, 1978). Nestes dois casos, a albumina foi considerada uma proteína de reserva pelo fato de ter sido utilizada durante a germinação, o que também ocorreu nas variedades estudadas neste trabalho.

A observação das mudanças do perfil de proteínas nas eletroforeses, durante a germinação das semente nas variedades estudadas, mostrou que em torno de 12 dias, todas as proteínas de reserva são hidrolizadas. Em *Vicia faba*, o tempo da hidrólise das proteínas de reserva, foi semelhante (LICHTENFELD *et al.*, 1979).

O isolamento e caracterização das proteínas de reserva, realizados no início do trabalho (Cap-I) foram essenciais para os estudos fisiológicos de sua acumulação durante o desenvolvimento das sementes ou utilização durante a germinação. A caracterização auxiliou na identificação das frações globulina (faseolina), albumina e lectina, durante os processos de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, F.L.; GROSSI DE SA, M.F.; ALMEIDA, E.R.; GANGER, E. S. & RECH, E.L., 1992. "Particle bombardment-mediated transient expression of Brazil nut methionine rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.)". **Plant Molec. Biol.** **20**: 357-359.
- BASHA, S.M.M. & BEEVERS, L. 1975. "The development of proteolytic activity and protein degradation during the germination of *Pisum sativum* L.". **Planta** **124**: 77-87.
- BAUMGARTNER, B. & CHRISPEELS, M.J., 1976. "Partial characterization of a protease which inhibits the major endopeptidases present in the cotyledons of mung beans". **Plant Physiol.** **58**: 1-6.
- BAUMGARTNER, B.; TOKUYASU, K.T. & CHRISPEELS, M.J., 1980. "Immunocytochemical localization of reserve protein in the endoplasmic reticulum of developing bean (*Phaseolus vulgaris*) cotyledons". **Planta** **150**: 419-425.
- BECKER, J.W.; REEKE, G.N.; CUNNINGHAM, B.A. & EDELMAN, G.M. 1976. "New evidence on the location of the saccharide-binding site of concanavalin A". **Nature (London)** **259**: 406-409.
- BEEVERS, L. & POULSON, R., 1972. "Protein synthesis in cotyledons of *Pisum sativum* L. I. Changes in cell-free amino acid incorporation capacity during seed development and maturation". **Plant Physiol.** **49**: 476-481.
- BEWLEY, J.D. & MARCUS, A., 1990. "Gene expression in seed development and germination". **Prog. Nucl. Acid Res.** **38**: 165-193.
- BEWLEY, J.D. & GREENWOOD, J.S., 1990. "Protein storage and utilization in seeds". In: Plant physiology, biochemistry and molecular biology.. David T. Dennis and David H. Turpin eds. Longman Scientific & Technical. Essex-England pp-456-469.

- BLODEL, G. & DOBBERTIN, B. 1975. "Transfer of protein across membrane. I. Presence of proteolytically and unprocessed nascent immoglobulin light chain on membrane bound ribosomes of murine myeloma. "J. Cell Biol. 67:835-851.
- BOHLOOL, B.B. & SCHMIDT, E.L., 1974. "Lectins: a possible basis for specificity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis". **Science** 185: 269-271.
- BOLLINI, R. & CHRISPEELS, M.J., 1978. "Characterization and subcellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L.". **Planta** 142: 291-298.
- BOLLINI, R. & CHRISPEELS, M.J., 1979. "The rough endoplasmic reticulum is the site of reserve protein synthesis in developing *Phaseolus vulgaris* cotyledons". **Planta** 146: 487-501
- BOLLINI, R. & VITALE, A., 1981. "Genetic variability in charge microheterogeneity and polypeptide composition of phaseolin, the major protein of *Phaseolus vulgaris*; and peptide maps of its three major subunits". **Physiol. Plant.** 52: 96-100.
- BOLLINI, R.; VITALE, A. & CHRISPEELS, M.J., 1983. "In vivo and in vitro processing of seed storage protein in the endoplasmic reticulum: evidence for two glycosylation steps". **J. Cell Biol.** 96: 999-1007.
- BOULTER, D. 1981 "Biochemistry of storage protein synthesis and deposition in developing legume seed." **Adv. Bot. Res.** 9: 1-31.
- BOWLES, D.J.; SCHNARRENBARGER, C. & KAUSS, H., 1976. "Lectins as components of mitochondria from *Ricinus communis*". **Biochem. J.** 160: 375-382.
- BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E., 1954. "Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectin". **J. Immunol.**, 73: 226-231
- 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.
- BROEKAERT, W.F.; LAMBRECHETS, D.; VERBELEN, J.P. & PEUMANS, W. J., 1988. "*Datura stramonium* agglutinin". **Plant Physiol.** 86: 569-574.

- BROWN, J.W.S.; MA, Y.; BLISS, F.A. & HALL, T.C., 1981a. "Genetic variation in the subunits of globulin-1 storage protein of french bean". **Theor. Appl. Genet.** **59**: 83-88.
- BROWN, J.W.S.; OSBORN, T.C.; BLISS, F.A. & HALL, T.C., 1981b. "Genetic variation in the subunits of globulin-2 and albumin seed proteins of french bean". **Theor. Appl. Genet.** **60**: 245-250.
- BROWN, J.W.S.; OSBORN, T.C.; BLISS, F.A. & HALL, T.C., 1982a. "Bean Lectins. Part- I : Relationships between agglutinating activity and electrophoretic variation in the lectin-containing G2/albumin seed proteins of french bean (*Phaseolus vulgaris* L.)". **Theor. Appl. Genet.** **62**: 263-271
-
- BROWN, J.W.S.; ERSLAND, D.R. & HALL, T.C., 1982 b. "Molecular aspects of storage protein synthesis during seed development". In: The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination. A.A. Khan eds Elsevier Biomedical Press pp 3-23.
- BRÜCKER, H. 1988. "The wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in South America" In: Genetic resources of *Phaseolus* beans ". P. Gepts (eds). Kluwer Academic Publishers pp-185-214.
- CARRASCO, J.F.; CROY, R.; DERBYSHIRE, E. & BOULTER, D., 1978. "The isolation and characterization of the major polypeptides of the seed globulin of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and their sequential synthesis in developing seeds". **J. Exp. Bot.** **29**: 309-323.
- CASEY, R., 1990. " Regulation of gene expression during development". In: Plant physiology, biochemistry and molecular biology. pp-16-27. David T. Dennis and David H. Turpin eds. Longman Scientific & Technical. Essex-England.
- CHAGAS, E.P., 1993. "Identificação e caracterização parcial de albuminas e globulinas de três cultivares brasileiros de *Phaseolus vulgaris*". Tese de Mestrado-Universidade Estadual de Campinas -Campinas-São Paulo.

- CHAPPELL, J. & CHISPEELS, M.J., 1986. "Transcriptional and posttranscriptional control of phaseolin and phytohemagglutinin gene expression in developing cotyledons of *Phaseolus vulgaris*". **Plant Physiol.** **81**: 50-54.
- CHAWLA, D.; ANIMASHAUN, T.; HUGHES, R.C.; HARRIS, A. & AITKEN, A., 1993. "Bowringia mildbraedii agglutinin: polypeptide composition, primary structure and homology with other legume lectins". **Biochim. Biophys. Acta** **1202**: 38-46.
- CHRISPEELS, M.J. 1976. "Biosynthesis, intracellular and secretion of extracellular macromolecules." **Ann. Rev. Plant Physiol.** **27**: 19-38
- CHRISPEELS, M.J., 1983 a. "Incorporation of fucose into the carbohydrate moiety of phytohemagglutinin in developing *Phaseolus vulgaris* cotyledons". **Planta**, **157**: 454-461.
- CHRISPEELS, M.J., 1983 b. "The Golgi apparatus mediates the transport of phytohemagglutinin to the protein bodies". **Planta**, **158**: 140-151.
- CHRISPEELS, M.J. & RAIKHEL, N.V., 1991. "Lectins, lectin genes, and their role in plant defense". **Plant Cell** **3**: 1-19.
- CHRISPEELS, M.J.; BOLLINI, R. & HARRIS, N. 1979 "Biosynthesis, accumulation and catabolism of reserve proteins in legume seeds" **Ber. Dtsch. Bot. Ges.** **92**: 535-551.
- CHRISPEELS, M.J.; HIGGINS, T.J.V.; CRAIG, S. & SPENCER, D., 1982. "The role the reticulum in the synthesis of reserve proteins and the kinetics of their transport to protein bodies in developing pea cotyledons". **J. Cell Biol.** **93**: 5-14.
- COSTA, J. & RICARDO, C.P.P., 1994. "Changes in the composition of ConA-binding glycopeptides from *Lupinus albus* root membranes induced by nodulation and callus formation". **Plant Physiol. Biochem.** **32**(2): 295-302.
- COULTER, K.M. & BEWLEY, J.D., 1990. "Characterization of a small sulfur-rich storage albumin in seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L.)". **J. Exp. Bot.** **41**(233): 1541-1547.

- CRAIG, S.; GOODCHILD, D.J. & HARDHAM, A.R., 1979. "Structural aspects of protein accumulation in developing pea cotyledons. I- Qualitative and quantitative changes in parenchyma cell vacuoles ". **Aust. J. Plant Physiol.** **6**: 81-98.
- CROY, R.R.D.; GATEHOUSE, J.A.; TYLER, M. & BOULTER, D., 1980. "The purification and characterization of a third storage protein (convicilin) from the seed of pea (*Pisum sativum* L.)". **Biochem. J.** **191**: 509-516.
- DANIELSON, C.E., 1956. "Plant Proteins". **Ann. Rev. Plant Physiol.** **7**: 215-236.
- DAZZO, F.B. & BRILL, W.J., 1978. "Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the *Rhizobium*-clover symbiosis". **Plant Physiol.** **62**: 18-21.
-
- DAZZO, F.B. & HRABAK, E.M., 1981. "Presence of Trifoliin A, a *Rhizobium*-binding lectin, in clover root exudate". **J. Supram. Struct. Cell. Biochem.** **16**: 133-138.
- DAVIES, H.V. & CHAPMAN, J.M., 1980. "The control of food mobilization in seeds of *Cucumis sativus* L. III- the control of protein degradation". **Planta** **149**: 288-291.
- DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J. & BOULTER, D., 1976. "Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds". **Phytochemistry** **15**:3-24.
- DOMONEY, C.; DAVIES, D.R. & CASEY, R., 1980. "The initiation of legumin synthesis in immature embryos of *Pisum sativum* L. grown *in vivo* and *in vitro*". **Planta** **149**: 454-460.
- DOMONEY, C. & CASEY, R., 1987. "Changes in legumin messenger RNAs throughout seed development in *Pisum sativum* L.". **Planta** **170**: 562-566.
- DURE, L.S., 1975. "Seed formation". **Ann. Rev. Plant Physiol.** **26**: 259-278.
- ERSLAND, D.R.; BROWN, J.W.S.; CASSEY, R. & HALL, T.C., 1983. "The storage proteins of *Phaseolus vulgaris* L. *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. In : Seed protein, biochemistry, genetics, nutritive value. Gosttschalk, W. & Müller, H. P. (eds). Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers London. pp-355-375

ETZELER, M.E., 1985. "Plant lectins: molecular and biological aspects". **Ann. Rev. Plant Physiol.** **36**: 209-234.

ETZLER, M. 1986. "Distribution and function of plant lectins". *In* :The lectins; properties, functions and applications in biology and medicine. Liener, I.E.; Sharon, N. and Goldstein, I.J. eds. Academic Press, Inc, Orlando, Florida, USA pp-371-435.

EVANS, I.M.; GATEHOUSE, J.A.; CROY, R.R.D. & BOULTER, D., 1984. "Regulation of the transcription of storage-protein mRNA in nuclei isolated from developing pea (*Pisum sativum* L.) cotyledons." **Planta** **160**:559-568.

F.A.O. 1992. Yearbook Production **46**: 108

GARG, G.K. & VIRUPAKSHA, T.K., 1970. "Acid protease from germinated sorghum-2-Substrate specificity with synthetic peptides and ribonuclease-A". **Europ. J. Biochem.** **17**: 13-18.

GATEHOUSE, J.A.; EVANS, I.M.; BROWN, D.; CROY, R.R.D. & BOULTER, D. 1982. "Control of storage-protein synthesis during seed development in pea (*Pisum sativum* L.)." **Biochem. J.** **208**: 119-127.

GEPTS, P., 1988. "Phaseolin as an evolutionary marker". *In*: Genetic resources of *Phaseolus* beans ". P. Gepts (eds). Kluwers Academic Publishers pp-215-241.

GEPTS, P; OSBORN, T.C.; RASHKA, K. & BLISS, F.A., 1986. " Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication". **Econ. Bot.** **40**(4): 451-468.

GOLDBERG, R.B., 1986. "Regulation of plant gene expression". **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.** **314**: 367-384.

GOLDBERG, R.B.; BARKER, S.J. & PEREZ-GRAU, L., 1989. "Regulation of gene expression during plant embryogenesis". **Cell** **56**: 149-180.

- GOLDSTEIN, I.J. & HAYES, C.E., 1978. "The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals". **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** **35**: 127-340.
- GRANT, G; MORE, L.J., MCKENZIE, N.H. & PUSZTAI, A., 1983. "The effecting on the haemagglutinating. Activity and nutritional properties of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds". **J. Sci. Food Agric.** **33**: 1324-1326.
- GREENE, F.C. 1983. "Expression of storage protein genes in developing wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds. Correlation of RNA accumulation and protein synthesis." **Plant Physiol.** **71**: 40-46.
- GRIFFAUT, B.; GUILTAT, C. & GUILLOT, J., 1990. "In vitro breaking of dormancy in Jerusalem artichoke tuber buds promoted by two N-acetyl hexosamines. Effect on lectin content". **Plant Physiol. Biochem.** **28**(6): 683-689.
- HALL, T.C.; MCLEESTER, R.C. & BLISS, F.A., 1972. "Electrophoretic analysis of protein changes during the development of the french bean fruit". **Phytochemistry** **11**: 647-649.
- HALL, T.C.; MCLEESTER, R.C. & BLISS, F.A., 1977. "Equal expression of the maternal and paternal alleles for polypeptide subunits of the major storage protein of the bean *Phaseolus vulgaris* L. ". **Plant Physiol.** **59**: 1122-1124.
- HARRIS, N. & CHRISPEELS, M.J., 1975. "Histochemical and biochemical observation on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germinating mung beans". **Plant Physiol.** **56**: 292-299.
- HEMPERLY, J.J.; MOSTOV, K.E. & CUNNINGHAM, B.A., 1982. "In vitro translation and processing of a precursor of fasvin, a lectin isolated from *Vicia faba*". **J. Biol. Chem.** **257**: 7903-7909.
- HIGGINS, T.J.V., 1984. "Synthesis and regulation of major proteins in seeds". **Ann. Rev. Plant Physiol.** **35**: 191-221.
- HILL, J.E. & BREIDENBACH, R.W. 1974a. "Proteins of soybean seeds. I- Isolation and characterization of the major components". **Plant Physiol.** **53**: 742-746.

- HILL, J.E. & BREIDENBACH, R.W. 1974b. "Proteins of soybean seeds.II- Accummulation of major protein components during seed development and maturation". **Plant Physiol.** **53**: 747-751.
- HOGLAND, D.R. & ARNON, D.I. 1950. "The water culture method for growing plants without soil." **Calif. Exp. Sta. Circ.** **347**.
- HOWARD, I. K.; SAGE, H. J. & HORTON, C. B., 1972."Studies on the appearance and location of hemagglutinins from a common lentil during the life cycle of the plant". **Arch. Biochem. Biophys.**,**149**: 323-326.
- ISHINO, K & ORTEGA, M.L., 1975."Fractionation and characterization of major reserve proteins from seeds of *Phaseolus vulgaris*". **J. Agri. Food Chem.** **23**:529-533.
- JANZEN, D.H.; JUSTER, H.B. & LIENER, I.E., 1976. "Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle". **Science** **192**: 795-796.
- JOLY, A.B.,1985. "Angiospermae" *In*:Botânica. Introdução à taxonomia vegetal . Aylthon B. Joly ed. Ed. Nacional . São Paulo pp: 219-740..
- KAMEMURA, K.; FURUICHI, Y; UMEKAWA, H. & TAKAHASHI, T. 1993. "Purification and characterization of novel lectins from Great Northern bean, *Phaseolus vulgaris* L.". **Biochem. Biophy. Acta** **1158**: 181-186.
- KAUSS, H. & GLASER, G. 1974."Cabohydrate binding proteins from plant cell walls and their possible involvement in extensin growth". **FEBS Lett.**, **45**: 304-30.
- KOCOUREK,J. & HOREJSI V., 1983. *In* : Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Bog-Hansen, T.C. & Spengler,G.A. eds ., Walter de Gruyter, Berlin and New York pp 3-6.
- LAEMMLI, U.K.1970. "Cleavage of strutural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." **Nature** **227**:680-685.
- LARKINS, B.A., 1981. "Seed storage proteins characterization and biosynthesis". *In*: The biochemistry of plants. P.K. Stumpf, E.E. Conn ed. Academic Press. New York **6**: 449-489.

- LEE, K.H.; JONES, R.A.; DALBY, A. & TSAI, C.Y. 1976. "Genetic regulation of storage protein content in maize endosperm." **Biochem. Genet.** **14**:641-650
- LICHTENFELD, C.; MANTEUFFEL, R. AND MÜNTZ, K.; NEUMANN, D.; SCHOLZ, G. & WEBER, E., 1979. "Protein degradation and proteolytic activities in germinating field beans (*Vicia faba* L. var minor)". **Biochem. Physiol. Pflanzen.** **174**: 255-274.
- LIENER, I., 1976. "Phytohemagglutinins (phytolectins)". **Ann. Rev. Plant Physiol.** **27**: 291-319.
-
- LIENER, I.E., 1986. "Nutritional significance of lectins in diet". In *The Lectins*, I. E. Liener, N. Sharon, and I. J. Goldstein, eds. Academic Press Inc. -San Diego. pp 527-552.
- LIOI, L. & BOLLINI, R., 1984. "Contribution of processing events to the molecular heterogeneity of four banding types of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L.". **Plant Molec. Biol.** **3**: 345-353.
- LIS, H. & SHARON, N. 1973. "The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins)". **Ann. Rev. Biochem.** **42**: 541-574.
- LIS, H. & SHARON, N., 1981. "Lectins in higher plant" In *The biochemistry of plant. Proteins and nucleic acids*, (ed. A. Marcus). New York Academic Press Inc **6**: 371-447
- LIS, H. & SHARON, N., 1986. "Lectins as molecules and as tools". **Ann. Rev. Biochem.**, **55**:35-67.
- LOEWENBERG, J.R., 1955. "The development of bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.)". **Plant Physiol.** **30**: 244-250.
- MA, Y. & BLISS, F.A. 1978. "Seed protein of common bean." **Crop Sci.** **18**:431-437.
- MADISON, J.T.; THOMPSON, J.F. & MUENSTER, A.E. 1981. "Turnover of storage protein in seeds of soya bean and pea". **Ann. Bot.** **47**: 65-73.

- MANEN, J.F. & D MIÈGE, M.N., 1977. "Purification et caractérisation des lectines isolées dans les albumines et les globulines". **Physiol. Végét.** **15**(1): 163-173.
- MANSFIELD, M.A.; PEAMANS W.J. & RAIKHEL, N.V., 1988. "Wheat-germ agglutinin is synthesized as a glycosylated precursor ". **Planta** **173**: 482-489.
- MARKS, M. D. & LARKINS, B.A. 1982. "Analysis of sequence microheterogeneity among zein messenger RNAs ". **J. Biol. Chem.** **257**:9976-9983.
- MATTHEWS, R.C.; BROWN, J.W.S. & HALL, T.C., 1981. "Bean seed protein (phaseolin) mRNA is translated to yield glycosylated polypeptides *Xenopus oocytes*". **Nature** **294**: 175-176.
- MCLEESTER, R.C.; HALL, T.C.; SUN, S.M. & BLISS, F.A., 1973. "Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those from *Vicia faba*". **Phytochemistry** **2**:85-93.
- MILLERD, A. 1975. "Biochemistry of legume seed proteins." **Ann. Rev. Plant Physiol.** **26**:53-72.
- MILLERD, A; SIMON, M. & STERN, H., 1971. "Legumin synthesis in developing cotyledons of *Vicia faba* L. ". **Plant Physiol.** **48**: 419-466.
- MORAES, R.M. & ANGELUCCI, E. 1971. "Chemical composition and amino acid contents of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*). " **J. Food Sci.** **36**: 493-494.
- MOREIRA, R.A.; CORDEIRO, E.F.; CAVADA, B.S.; NUNES, E.P.; FERNANDES, A.G. & OLIVEIRA, J.T.A., 1993. "Plant seed lectin. A possible marker for chemotaxonomy of the genus *Canavalia*". **R. Bras. Fisiol. Veg.** **5**(2): 127-132.
- MOSSÉ, J. & PERNOLLET, J.C. 1983. "Storage proteins of legume seeds." *In* Chemistry and Biochemistry of Legumes, S.K.Arora, ed., Edwards Arnold Publishers, London pp:111-193.
- MOSSÉ, J. & BAUDET, J. 1983. "Crude protein content and amino-acid composition of seeds: variability and correlation. " **Qual. Plant Foods Hum. Nutr.** **32**:225-245.

- MÜLLER, H.P., 1983. "The genetic control of seed protein production in legumes". In: Seed protein, biochemistry, genetics, nutritive value. Gosttschalk, W. & Müller, H. P. (edts) Martinus Nijkoff/Dr. Junk Publishers London. pp-309-356.
- MÜNTZ, K.; BASSÜNER, R.; LICHTENFELD, C.; SCHAOLZ, G. & WEBER, E., 1985. "Proteolytic cleavage of storage proteins during embryogenesis and germination of legume seed". **Physiol. Végét.** **23**(1): 75-94.
- MURRAY, D. R., 1979. "A storage role for albumins in pea cotyledons". **Plant Cell Environ.** **2**:223-226.
- MURRAY, D.R. & VAIRINHOS, F., 1982. "Albumins from pea seeds are distinct from vicilin". **Z. Pflanzenphysiol.** **106**: 465-468.
- MURRAY, D.R.; MACKENZIE, K. F.; VAIRINHOS, F.; PEOPLES, M.B.; ATKINS, C.A. & PATE, J.S., 1983. "Electrophoretic studies of the seed proteins of cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. ". **Z. Pflanzenphysiol.** **109**: 363-370.
- MUTSCHLER, M.A. & BLISS, F.A. 1977. "Immunoelectrophoretic measurement of G1 content in developing and germinating bean seed". **Plant Physiol.** **59**: 21-
- MUTSCHLER, M.A.; BLISS, F.A. & HALL, T.C., 1980. "Variation in accumulation of seed storage protein among genotypes of *Phaseolus vulgaris* L.". **Plant Physiol.** **65**: 627-630.
- OSBORN, T.C. & BLISS, F.A., 1985. "Effects of genetically removing lectin seed protein on horticultural and seed characteristics of common bean". **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** **110**(4): 484-488.
- OSBORN, T.C.; BUROW, M. & BLISS, F.A., 1988. "Purification and characterization of arcelin seed protein from common bean". **Plant Physiol.** **86**: 399-405.
- OSBORNE, T.B. & CAMPBELL, G.F., 1898. "The proteins of potato". **J. Am. Chem. Soc.** **20**:419
- ÖPIK, H., 1968. "Development of cotyledon cell structure in ripening *Phaseolus vulgaris* seeds". **J. Exp. Bot.** **19**: 64-76.

- PAAREN, H.C.; SLIGHTOM, J.L.; HALL, T.C.; INGLIS, A.S. & BLAGROVE, R.L., 1987. "Purification of a seed glycoprotein: N-terminal and deglycosylation analysis of phaseolin". **Phytochemistry** **26**: 335-343.
- PATE, J.S. & FLINN, A.M., 1973. "Carbon and nitrogen transfer from vegetative organs to ripening seeds of field pea (*Pisum arvense* L.) ". **J. Exp. Bot.** **24**: 1090-1099.
- PASQUALINI, S.; LLUCH, C. & ANTONIELLI, M., 1991. "Seed storage in several genetic lines of *Vicia faba*". **Plant Physiol. Biochem.** **29** (5): 507-515.
-
- PERLMAN, D. & HALVORSON, H.O. 1983. "A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides." **J. Mol. Biol.** **167**:391-409
- PERNOLLET, J.C. 1985. "Biosynthesis and accumulation of storage proteins in seeds". **Physiol. Végét.** **23**(1): 45-59.
- PERNOLLET, J.C. & MOSSÉ, J., 1983. "Caractérisation des corpuscule protéiques de l'albumen des caryopses de Céréales par micro-analyse élémentaire associé à la microscopie électronique à balayage." **C. R. Acad. Sc.** **290**, série D: 267-270.
- POMPEU, A.S. 1987. "Melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)." *In* Feijão : fatores de produção e qualidade., coord. Bulisani, E. A. ed. Fundação Cargil, Campinas -S.P. -Brasil pp-3-28.
- PRZYBYLSKA, J.; MANTEUFFEL, R. & BISBY, F., 1992. "Immunological investigation on distribution of the 2S albumin in the leguminosae (Papilionoideae)". **Biochem. System. Ecol.** **20**: 639-655.
- PUSZTAI, A. 1991. "Plant lectins" .Cambridge University Press, pp 3-263.
- PUSZTAI, A; CLARK, E.M.W.; KING, T. P. & STEWART, J.C., 1979. "Nutritional evaluation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) : chemical composition, lectin content and nutritional value of selected cultivars". **J. Food Agric.** **30**: 843-848

- PUSZTAI, A. & WATT, W.B. 1974. "Isolectins of *Phaseolus vulgaris*: a comprehensive study of fractionation ". **Biochem. Biophys. Acta** **365**: 57-71.
- RACUSEN, D. & FOOTE, M., 1973. " Glycoprotein II in developing and germinating bean seeds". **Can. J. Bot.** **51**: 495-497.
- RAHMAN,S.; SHEWRY,P.R.; FORDE,B.G.; KREIS ,M. & MIFLIN,B.J. 1983. "Nutritional control of storage-protein synthesis in developing grain of barley(*Hordeum vulgare* L.)." **Planta** **159**:366-372.
- ROBERTS, L.M. & LORD, J.M., 1981. "The synthesis of *Ricinus communis* agglutinin". **Eur. J. Biochem.** **119**: 31-41.
-
- ROMERO, J.; SUN, S.M.;MCLEESTER, R.C.;BLISS, F.A. & HALL, T.C. 1975. "Heritable variation of polypeptide subunit of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris* L. ." **Plant Physiol.** **56**:776-779.
- ROUGÉ, P. & RISLER, J.L., 1990. "Evidence for internal sequence homologies in Leguminosae lectins: phylogenetical implications". **Biochem. System. Ecol.** **18**(1): 29-37.
- SANTORO, L.G. 1988. "Nutritional utilization by monogastric animals of glicoprotein II (Phaseolin), the major 7S protein from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *In vivo* and *in vitro* degradation of glicoprotein II by rat intestinal proteases". Tese de Doutorado. University of Aberdeen, Scotland.
- SALESSE,R.; CASTAING,M.; PERNOLLET,J.C. & GARNIER,J. 1975. "Association-dependent active folding of alpha and beta subunits of lutropin (luteinizing hormone)." **J. Mol. Biol.** **95**:483-496.
- SCHROEDER, H.E., 1982. "Quantitative studies on the cotyledonary proteins in the genus *Pisum*". **J. Sci. Food Agric.** **33**:623-633.
- SGARBIERI, V.C. 1987. "Composição e valor nutritivo do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)." *In* Feijão : fatores de produção e qualidade. pp-259-326, cord. Bulisani, E. A. ed. Fundação Cargil Campinas -S.P. -Brasil.

- SGARBIERI, V.C.; ANTUNES, P.L. & JUNQUEIRA, R.G., 1982. "Algumas propriedades físico-químicas e nutricionais das proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) var. Rosinha G2". **Cien. Tecnol. Aliment.** **2**: 1-20.
- SHARON, N. & LIS, H., 1990. "Legume lectins- a large family of homologous proteins". **FASEB J.** **4**: 3198-3208.
- SLIGHTOM, J.L.; SUN, S.M. & HALL, T.C. 1983. "Complete nucleotide sequence of a French bean storage protein gene: phaseolin." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **80**:1897-1901.
- SOAVE, C. & SALAMINI, F. 1983. "Genetic organization and regulation of maize storage proteins." In: Seed Proteins. J. Daussant, J. Mossé and J. Vaughan, ed. Academic Press, London pp:205-218.
- STINISSEN, H.M.; CHRISPEELS, M.J. & PEUMANS, W.J., 1985. "Biosynthesis of lectins in roots of germinating and adult cereal plants". **Planta** **164**: 278-286.
- SUN, S.M. & HALL, T.C., 1975. "Solubility characteristics of globulins from *Phaseolus vulgaris* in regard to their isolation and characterization". **J. Agric. Food. Chem.** **23**: 184-189.
- SUN, S.-M.M.; BUCHBINDER, B.U. & HALL, T.C., 1975. "Cell-free synthesis of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris* L.". **Plant Physiol.** **56**: 780-785.
- SUN, S. M.; SLIGHTOM, J.L. & HALL, T.C. 1981. "Intervening sequences in a plant gene: comparison of the partial sequence of cDNA of French bean phaseolin." **Nature** **289**:37-41
- SUN, S.M.; MCLEESTER, R.C., BLISS, F.A. & HALL, T.C., 1978a. "Reversible and irreversible dissociation of globulins from *Phaseolus vulgaris* seed". **J.Biol. Chem.** **249**: 2118-2120.
- SUN, S.M.; MUTSCHLER, M.A.; BLISS, F.A. & HALL, T.C., 1978b. "Protein synthesis and accumulation in bean cotyledons during growth". **Plant Physiol.** **61**: 918-923.

- TALBOT, C.F. & ETZLER, M.E., 1978. "Development and distribution of *Dolichos biflorus* lectin as measured by radioimmunoassay". **Plant Physiol.** **61**: 847-850.
- THANH, V.H. & SHIBASAKI, K., 1978. "Major protein of soybean seeds. Subunit structure of β -conglitin". **J. Agr. Food Chem.** **26**: 692-695.
- TIERNEY, M.L.; BRAY, E.A.; ALLEN, R.D.; MA, Y.; DRONG, R.F.; SLIGTOM, J. & BEACHY, R.N., 1987. "Isolation and characterization of a genomic clone encoding the β subunit of β conglitin". **Planta** **172**: 356-363 .
- THOMPSON, J.A.; SHROEDER, H.E.; & DUDMAN, W.F., 1978. "Cotyledonary storage proteins in *Pisum sativum* V.. Further studies on molecular heterogeneity in the vicilin series of holoproteins". **Aust. J. Plant Physiol.** **5**: 263-280.
- UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H. & STAFFER, J.F. 1972. "Manometric and chemical estimation of metabolites and enzymes systems." . *In*: Manometric and biochemical techniques.. Burgess Publishing Company , Minneapolis **13** , pp. 260-262.
- VAIRINHOS, F. & MURRAY, D.R., 1982. "Changes in polypeptide composition during seed development in chickpea, *Cicer arietinum* L. ". **Z. Pflanzenphysiol.** **106**: 447-452.
- VITALE, A.; CERIOTTI, A.; BOLLINI, R. & CHRISPEELS, M.J., 1984. "Biosynthesis and processing of phytohemagglutinin in developing bean cotyledons". **Eur. J. Biochem FEBS.** **141**: 97-104
- VITALE, A.; CERIOTTI, A. & BOLLINI, R., 1985. "Molecular analysis of phytohemagglutinin-defective cultivar of *Phaseolus vulgaris* L.". **Planta** **166**: 201-207.
- VODKIN, L. O., 1981. "Isolation and characterization of messenger RNAs for seed lectin and Kunitz trypsin inhibitor in soybeans". **Plant Physiol.** **68**: 766-771.
- WALBOT, V., 1971. "RNA metabolism during embryo development and germination of *Phaseolus vulgaris*". **Develop. Biol.** **26**: 369-379.

- WALLING, L.; DREWA, G. N. & GOLDBERG, R.B., 1986. "Transcriptional and post-transcriptional regulation of soybean seed protein mRNA levels". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **83**: 2123-2127.
- WEBER, E. & NEUMANN, D., 1980. "Protein bodies, storage organelles in plant seeds". **Biochem. Physiol. Pflanzen**. **175**: 279-306.
- YOULE, R.J. & HUANG, A.H.C., 1978. "Albumin storage proteins in the protein bodies of castor bean". **Plant Physiol.** **61**: 13-16.
- YU, W.J. & GREENWOOD, J.S., 1994. "Purification and characterization of a cysteine proteinase involved in globulin hydrolysis in germinated *Vicia faba* L.". **J. Exp. Bot.** **45** (271): 261-268.