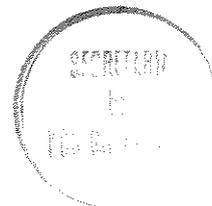


CARACTERIZAÇÃO TOPOQUÍMICA E BIOQUÍMICA
DE SEMENTES DE Canavalia ensiformis DC e
Canavalia gladiata DC.

ANGELO LUIZ CORTELAZZO



Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo candidato e aprovada pela comissão julgadora.

CARACTERIZAÇÃO TOPOQUÍMICA E BIOQUÍMICA DE SEMENTES DE
Canavalia ensiformis DC e Canavalia gladiata DC.

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

Orientador: Prof. Dr. Benedito de Campos Vidal

CAMPINAS

1989

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Dedico este trabalho a
meus pais, Bruno e
Izolina e a todos os
meus amigos.

AGRADECIMENTOS :

Ao Prof.Dr. Benedicto de Campos Vidal, meu orientador desde 1980, por seu exemplo de dedicação à ciência, de quem sou admirador e amigo e a quem devo grande parte de minha formação;

A Profa.Dra. Sonia M.C. Dietrich pelas inúmeras e valiosas sugestões feitas após a leitura do manuscrito deste trabalho, pela forma amigável com que sempre me recebeu e por suas lições quanto ao procedimento científico;

Ao Prof.Dr. Ladaslav Sodek pelos seus ensinamentos em bioquímica, pela amizade e colaboração com que tem me honrado nestes últimos anos, participando de várias etapas de minha formação e pelas valiosas sugestões feitas após a leitura do manuscrito deste trabalho;

A Profa.Dra. Maria de Fátima A. Pereira, pelas sugestões oferecidas após a análise prévia deste trabalho, pela cooperação como Chefe do Depto. de Fisiologia Vegetal para a utilização das instalações do mesmo e pela forma amigável com que vem me distinguindo nos últimos anos;

Ao Prof.Dr. Edson R. Pimentel, companheiro de Depto. mas principalmente o amigo de todas as horas, pela leitura prévia e sugestões oferecidas ao presente trabalho, bem como pelos ensinamentos e auxílios nas eletroforeses;

A Profa.Dra. Maria Luiza S. Mello, por ter contribuído para a minha formação sempre de maneira amigável e incentivadora, desde minha época de graduação;

A Profa.Dra. Maria Lúcia F. Wada, Sra. Vera Lucia P.F. Gumerato e Srta.Carmem S. Zickel pela paciência com que fizeram uma leitura crítica de boa parte do manuscrito deste trabalho e por sua grande amizade que muito me envaldece e sem dúvida contribuiu para o término do presente trabalho;

A Profa.Dra.Tereza C. Cavalcanti, não só pelas dosagens e caracterizações dos lipídios, pelas quais também agradeço ao Sr. Fernando Guimarães e aos Laboratórios de Bioquímica do CAISM e da Fac.Engenharia de Alimentos da UNICAMP, mas também pelas suas valiosas sugestões e pela amizade demonstrada;

Ao Sr. Homero F. Gumerato, meu grande amigo e a quem muito devo, principalmente pelo amparo nas análises estatísticas, sempre fornecendo valiosas sugestões;

A Srta. Cristiana N. Begnami, minha grande incentivadora e amiga, que contribuiu de forma muito positiva, acreditando sempre em mim, inclusive nos piores momentos;

A Profa.Dra. M.A. Heidi Dolder, companheira de trabalho e amiga, por estar sempre disposta a cooperar, inclusive na redação do Abstract deste trabalho;

A Profa.Dra.Shirlei M. Recco-Pimentel e Sr. Marco Antonio Randi, pela compreensão, carinho e amizade demonstrados em todos os momentos, acreditando sempre;

A Profa.Dra.Laurecir Gomes, que conheço há pouco tempo mas que muito me auxiliou nas eletroforeses, cooperando de forma amiga e segura;

Ao Depto. de Fisiologia Vegetal e ao Depto. de Biologia Celular do I.B. - UNICAMP, por possibilitarem a realização do presente trabalho, contando sempre com o apoio e amizade de todos os seus membros. Um abraço especial à Dna.Irma, Sebastiana e Maria Ap.Cunha;

Ao Fundo de Apoio à Pesquisa (FAP) da UNICAMP, que através de auxílio financeiro possibilitou a realização de parte deste trabalho;

Ao Prof.Dr.Adão J. Cardoso por ter contribuído para reforçar a minha crença na importância do ensino, sempre com grande confiança e amizade;

A Srta. Márcia Alessandra Cavalaro e Sr. Phileno Pinge Filho pela dedicação e amizade com que me auxiliaram em diversas etapas da montagem do presente trabalho;

Aos meus amigos Urara Kawazoe, Estela S.Rosseto, Carlos A. Joly, Sílvia Miotto, Elenice Ferrari, Beatriz Dockedal, José Antonio N.Silva, Roberto Vilarta, Mara Ap.Lucio e Dulce M. Daltro, pelo apoio nos mais diversos momentos;

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho e que por parcialidade de minha parte foram esquecidos, minhas desculpas e meus agradecimentos.

Í N D I C E :

1. Introdução.....	01
Objetivos.....	10
2. Materiais e métodos.....	12
2.1. Caracterização geral.....	12
2.2. Fixação.....	14
2.3. Processamento pós-fixação.....	14
2.4. Métodos citoquímicos de análise.....	15
2.4.1. Azul de toluidina a pH 4,0 (AT) para a detecção de radicais aniônicos e meta- cromasia.....	15
2.4.2. Xylidine Ponceau a pH 2,5 (XP) para a detecção de radicais catiônicos.....	15
2.4.3. Reação de Feulgen para DNA.....	16
2.4.4. Método do PAS para a detecção de polis- sacarídeos e glicoproteínas.....	16
2.5. Cálculo das áreas e volumes de grãos de amido...17	
2.6. Medições dos retardos ópticos.....	19
2.7. Métodos bioquímicos de análise.....	20
2.7.1. Extração, dosagem e caracterização de ácidos graxos dos lipídios.....	20
2.7.2. Dosagem de amido.....	22
2.7.3. Extração e purificação de proteínas em cotilédones de sementes quiescentes.....	25
2.7.4. Dosagem do material protéico.....	26

2.7.5. Caracterização do material protéico.....	30
2.8. Hemaglutinações.....	33
3. Resultados.....	34
3.1. Caracterização geral.....	34
3.2. Coloração com azul de toluidina a pH4,0.....	39
3.3. Coloração com xylidine Ponceau a pH 2,5.....	41
3.4. Reação de Feulgen.....	47
3.5. Coloração pelo PAS.....	50
3.6. Áreas e volumes dos grãos de amido.....	54
3.7. Microscopia de polarização.....	64
3.8. Extração, dosagem e caracterização de ácidos graxos dos lipídios.....	68
3.9. Dosagem de amido.....	70
3.10. Dosagem de proteínas.....	77
3.11. Eletroforeses.....	86
3.12. Hemaglutinações.....	91
3.13. Visão geral das dosagens bioquímicas.....	91
4. Discussão.....	94
4.1. Paredes celulares.....	94
4.2. Material protéico.....	99
4.3. Amido.....	106
4.4. Lipídios.....	109
4.5. Material nuclear.....	111
5. Conclusões.....	112
6. Resumo.....	115
7. Abstract.....	117
8. Referências Bibliográficas.....	119

1. INTRODUÇÃO:

O gênero Canavalia DC. pertence à tribo Phaseoleae da subfamília Faboideae (Papilionoideae) da família Leguminosae (POLHILL & RAVEN, 1981). Evidências fósseis sugerem que ele se diferenciou dos demais gêneros da tribo provavelmente a partir do Cretáceo (BERRY, 1916). Este gênero conta atualmente com 50 espécies, com representantes nas zonas tropicais e subtropicais dos dois hemisférios, sendo que dessas espécies, 25 são nativas do continente americano (PIPER, 1925; SAUER, 1964).

O número de cromossomos no gênero é $2n = 22$ como em vários outros gêneros de Phaseoleae. Esse valor foi reportado para C. ensiformis (KAWAKAMI, 1930), C. gladiata (COVAS, 1949), C. lineata (JINNO, 1956), C. maritima (MIEGE,

1960), C. plagiosperma (SIMMONDS, 1954) e C. sp, provavelmente C. virosa (RILEY, 1960).

O fruto de Canavalia é um legume. é seco, deiscente e bivalvo, zigomorfo, alargado e comprimido; possui falsos septos transversais e membranosos entre as sementes (BURKAT, 1943).

No Brasil, C. ensiformis (L.) DC. e C. gladiata (Jacq.) DC. são espécies exóticas, de provável origem asiática. São cultivadas em alguns países, principalmente para a alimentação com seu legume imaturo. C. ensiformis é uma planta anual e rasteira mas pode, em condições favoráveis, produzir frutos durante vários anos consecutivos. C. gladiata é perene, apesar de que com o passar do tempo sua produção de frutos tende a diminuir. é normalmente cultivada tutorada pois nessa condição sua produtividade aumenta. Essas espécies são também bastante utilizadas como forrageiras, com destaque para C. ensiformis que é cultivada inclusive junto a culturas de café e banana (TEIXEIRA-MENDES, 1940; GEMTCHÓJNICOV, 1976).

Em certas regiões da Argentina, C. gladiata é cultivada como planta ornamental, fornecendo áreas sombreadas, produção elevada de flores róseo-arroxeadas e muitas vagens que chegam a atingir mais de 50 cm de comprimento (BURKAT, 1943). Em alguns países, C. ensiformis é utilizada em torrefações, substituindo o café; em outros locais, suas sementes são consumidas maduras. Apresenta também importância industrial para a obtenção de urease dentre outras subs-

tâncias, uma vez que suas sementes apresentam grande quantidade dessa enzima (GRANICK, 1937). Outra proteína abundante em Canavalia é a lectina Concanavalina A, que pode representar 2,5% do total protéico da semente o que também justifica seu aproveitamento industrial para a extração dessa metaloproteína (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982).

Como qualquer leguminosa, Canavalia também vive em simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, que se instalam em suas raízes formando regiões denominadas nódulos. Devido a isso são também cultivadas para a adubação do solo, principalmente para o suprimento de nitrogênio (GEMTCHÚJNICOV, 1976).

Em leguminosas, a maior parte das proteínas de reserva existentes pertencem à classe das globulinas, que são solúveis em soluções salinas diluídas (OSBORNE & CAMPBELL, 1898). Estudos de DANIELSSON (1949) em 34 espécies de legumes, de 8 tribos diferentes, das quais 29 espécies da subfamília Faboideae, revelaram que, com poucas exceções, todas as globulinas contém 2 coeficientes de sedimentação característicos: aproximadamente 7S e 11S, chamadas respectivamente de vicilinas e leguminas. Estas proteínas apresentam diversas sub-unidades, com pesos moleculares que variam em geral de 20.000 a 70.000 (BAILEY & BOULTER, 1972; WRIGHT & BOULTER, 1972; McLEESTER et alii, 1973; DERBYSHIRE et alii, 1976).

A solubilidade dessas proteínas é diferente, sendo que as vicilinas são mais solúveis que as leguminas em

soluções salinas mais diluídas. Análises químicas revelam um conteúdo médio em torno de 18% de Nitrogênio (N), 0,42% de Enxofre (S) e ponto isoelétrico (pI) em torno de 4,8 para leguminas e 17% de N, 0,18% de S e $pI \sim 5,5$ para vicilinas. Outra característica comum a essas proteínas, é um maior conteúdo de lisina e menor quantidade de triptofano e ácido glutâmico nas vicilinas.

As leguminas e as vicilinas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER), com a participação da partícula reconhecedora do sinal (LEWIN, 1982). Sofrem modificações pós-traducionais já a partir das cisternas do RER, de onde seguem para o Aparelho de Golgi e deste para vacúolos que recebem a denominação de corpos protéicos (EREKENTUMER et alii, 1982; PERNOLLET, 1982).

Em C. ensiformis e C. gladiata, a proteína mais abundante é denominada canavalina, uma proteína da fração 7S. A canavalina forma um produto cristalizável quando tratada com tripsina. Sua análise cristalográfica com raios-X revela que ela é formada por três pares idênticos de sub-unidades similares, mas não idênticas (SMITH et alii, 1982). SAMMOUR et alii (1984) purificaram canavalina da fração 7S de C. ensiformis e demonstraram sua homologia com a vicilina de ervilha. Além disso, a análise do gel eletroforético e das propriedades imunológicas das proteínas de C. ensiformis e C. gladiata não apresentaram diferenças na canavalina, que produz duas bandas eletroforéticas com P.M. 48.000 e 24.000 (YAMAUCHI & MINAMIKAWA, 1986; 1987).

Outra proteína que aparece em grande quantidade em *C. ensiformis* e *C. gladiata* é a concanavalina A (ConA), uma metaloproteína que contém 0,023% de manganês (SUMNER et alii, 1938).

A síntese de canavalina e ConA se inicia 30 dias após o florescimento. Até esse período, quando as sementes de *C. gladiata* apresentam cerca de 1,8 g de peso fresco, há pouca globulina (YAMAUCHI & MINAMIKAWA, 1986). A acumulação de canavalina cessa aos 50 dias após o florescimento enquanto que a ConA só para de ser acumulada quando a maturação se completa, aos 80-85 dias após o florescimento. Essa diferença é regulada pela síntese de RNA mensageiro (YAMAUCHI & MINAMIKAWA, 1987). Diferenças temporais na expressão gênica foram também observadas em outros legumes, como ervilha e soja (GATEHOUSE et alii, 1982; CHANDLER et alii, 1984; MEINKE et alii, 1981; WALLING et alii, 1986).

A formação da ConA é feita a partir de um precursor denominado pró-ConA e envolve o RER e Golgi. Ela requer a presença de um oligossacarídeo rico em manose, presente na pró-ConA. O processo envolve clivagens proteolíticas que eliminam também a fração glicídica, transposição e ligação peptídica (CARRINGTON et alii, 1985; HERMAN et alii, 1985; BOWLES et alii, 1986; CHRISPEELS et alii, 1986). Outras proteínas formadoras dos corpos protéicos que envolvem o transporte de um precursor do RER para o Golgi com o envolvimento de enzimas proteolíticas também já foram descritos (HIGGINS et alii, 1983; CHRISPEELS et alii, 1982). A

porção glicídica da ConA, poderia estar envolvida no reconhecimento das enzimas para a clivagem. Esse processamento ocorreria já ao nível do corpo protéico (FAYE & CHRISPEELS, 1987).

Quando a glicosilação das proteínas de reserva é inibida por tunicamicina, ocorre pouco transporte de Pró-ConA do RER e do Golgi para os corpos protéicos. Entretanto, a tunicamicina não inibe o transporte de canavalina, pois esta não é glicosilada. FAYE & CHRISPEELS (1987) sugerem ser este um indício de que o transporte de glicoproteínas em plantas é dependente da presença de glicanas.

Outro fato relevante observado em C. ensiformis é o de que cerca de 3,5 a 5% do peso seco de sua semente é constituído pelo amino ácido não protéico L-canavanina (ácido 2-amino-4-guanidinooxi-butanóico) o qual é encontrado em centenas de leguminosas e tem estrutura próxima a da L-arginina. Seu pK é 7,01, bem abaixo portanto do pK da L-arginina (pH = 12,48). Assim, a substituição de um pelo outro pode provocar alterações conformacionais na estrutura tridimensional da proteína (ROSENTHAL et alii, 1987).

Existem organismos que são canavanina resistentes, pois seu RNA transportador reconhece apenas a L-arginina e portanto não incorpora significativamente a L-canavanina em sua síntese protéica. Outros entretanto, como muitos insetos predadores de sementes, não possuem essa resistência. Assim, como grande parte do conteúdo de canavanina é consumida logo no início da germinação, existem sugestões

para relacioná-la com a defesa contra herbívoros (JANZEN, 1981; ROSENTHAL et alii, 1987).

Canavalia possui ainda uma série de poliaminas, das quais duas não são usuais: a canavalmina ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$) até agora só encontrada nesse gênero e a sym-homospermidina ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$) a qual é encontrada também em certas bactérias, plantas inferiores e superiores e até em certos vertebrados (FUJIHARA et alii, 1982). A canavalmina pode representar até 1,4 $\mu\text{mol}/10\text{g}$ de peso fresco (PF) em C. gladiata e 2 $\mu\text{mol}/10\text{g}$ PF em C. ensiformis. Além disso, Canavalia contém putrecina ($\sim 0,2$ $\mu\text{mol}/10\text{g}$ PF), cadaverina (1-2 $\mu\text{mol}/10\text{g}$ PF), espermidina (2-3,5 $\mu\text{mol}/10\text{g}$ PF), sym-homospermidina ($\sim 1,3$ $\mu\text{mol}/10\text{g}$ PF) e espermina ($\sim 0,5$ $\mu\text{mol}/10\text{g}$ PF). O amino ácido canavanina é um dos precursores para a biossíntese dessas poliaminas (FUJIHARA et alii, 1986).

Pelos dados apresentados anteriormente pode ser observado o grande número de trabalhos referentes a formação e desenvolvimento de sementes e a composição de seu material de reserva, principalmente nas espécies de maior valor econômico, enquanto que os estudos sobre a degradação desses compostos durante a germinação, são relativamente pouco numerosos e parciais.

Em geral, os corpúsculos protéicos se modificam logo nos primeiros dias da germinação, com a autólise das proteínas de reserva e os vacúolos normalmente se fundem, dando origem a um vacúolo central (PERNOLLET, 1982).

Em Vigna unguiculata, a hidrólise das proteínas de reserva se inicia após a fusão de vesículas citoplasmáticas com os corpos protéicos (HARRIS et alii, 1975). VAN DER WILDEN et alii (1980) relatam que em Vigna radiata as enzimas proteolíticas estariam presentes no interior dos corpos protéicos das sementes maduras e, devido a isso, esses corpos estariam envolvidos por membrana e teriam papel semelhante a lisossomos, no decorrer da germinação. Apesar de antagônicos esses achados não são obrigatoriamente excludentes, uma vez que para a degradação, poderia haver a ativação de enzimas do próprio corpo protéico e a ação de enzimas de lisossomos primários pré-existentes, ou sintetizados após a embebição.

BAUMGARTNER et alii (1978) demonstraram que uma protease específica de proteínas de reserva é sintetizada no citoplasma no início da germinação de Vigna, sendo posteriormente transportada desse local para o interior dos corpos protéicos.

De qualquer modo, os corpos protéicos não podem ser considerados como simples reservatórios de material rico em nitrogênio, mas teriam um papel relevante na regulação do fornecimento dessa reserva para a plântula (PERNOLLET, 1982), através do transporte desse material, total ou parcialmente degradado. A esse respeito, na maioria das vezes não é demonstrado se o produto da hidrólise é formado por amino ácidos, ou peptídeos (ASHTON, 1976). Em Glycine max, nos primeiros dias de germinação foram detectadas "in situ"

alterações morfológicas e quantitativas no conteúdo protéico de suas células cotiledonares. Durante esse período, foi encontrado material protéico no interior das células dos vasos, enquanto esse conteúdo diminuía nas demais células do cotilédone, sugerindo um transporte da reserva protéica na forma de polipeptídeos (CORTELAZZO & VIDAL, 1988a).

O amido também é uma forma de reserva bastante comum em sementes de leguminosas podendo atingir mais de 50% do peso seco em *Pisum* sp e *Vicia faba*. O tamanho e formato dos grãos de amido variam bastante entre as espécies (HALMER, 1985).

Em geral o acúmulo de amido se inicia concomitante ao acúmulo de albuminas e se estende até depois que é iniciado o amadurecimento do fruto (PATE, 1975). A degradação do amido é feita pela α -amilase que normalmente existe em pequena quantidade nas sementes maduras. Entretanto, no início da germinação essa quantidade é aumentada. Em alguns casos, há também um incremento na quantidade de fosforilase e β -amilase (VAN ONCKELEN et alii, 1977).

O local em que se inicia a degradação do amido para a mobilização e/ou produção de ATP, varia bastante entre as diversas espécies de leguminosas. Em muitas delas, o início da degradação se dá na porção adaxial do cotilédone, em outras, na porção abaxial e existem ainda espécies em que os primeiros grãos de amido metabolizados se encontram nos tecidos centrais do cotilédone (BEWLEY & BLACK, 1978).

Uma vez que as informações sobre a mobilização e degradação das reservas de sementes durante a germinação ainda se encontram com inúmeros aspectos controversos; que C. ensiformis e C. gladiata são espécies pouco exigentes em termos de qualidade do solo e umidade, apresentando crescimento rápido e boa produtividade; que seus legumes são consumidos quando imaturos pois ao amadurecerem apresentam os inconvenientes já apontados quanto a algumas substâncias armazenadas; que devido a isso C. ensiformis e C. gladiata apresentam grande potencial econômico, quer seja para seu consumo como alimento, quer seja na indústria farmacêutica e médica, o presente trabalho teve como principal objetivo estudar a degradação do material de reserva dessas sementes, desde seu estado quiescente até a abscisão dos cotilédones da planta jovem, através de métodos citoquímicos, citofísicos e bioquímicos de análise.

Para atingir esse objetivo, procedeu-se à:

1. Caracterização topoquímica do material de reserva em cotilédones e eixos embrionários dessas sementes;
2. Acompanhamento "in situ" das alterações morfológicas e quantitativas do material de reserva dessas sementes durante a germinação, até a abscisão dos cotilédones;
3. Observação de possíveis alterações na polaridade das paredes celulares e no estado de agregação de seus biopolímeros formadores, relacionando esses eventos com o processo de mobilização das reservas;

4. Caracterização e dosagem bioquímica das reservas existentes ao nível dos cotilédones das sementes dessas espécies;
5. Verificação das alterações no conteúdo das principais reservas desde o início da germinação até a abscisão dos cotilédones através de dosagens bioquímicas das mesmas e de eletroforeses do material protéico em gel de poliacrilamida-SDS;
6. Verificação e comparação do poder hemaglutinante do material protéico, ao nível do extrato bruto e das subfrações de albuminas, globulinas e vicilinas, em diferentes condições;
7. Comparação dos resultados obtidos nas observações "in situ" com aqueles obtidos nas dosagens bioquímicas;
8. Procedeu-se ainda a análise crítica do método de dosagem de proteínas em função dos tipos de proteínas existentes nas sementes das duas espécies analisadas.

2. MATERIAIS E METODOS:

Foram utilizadas sementes de Canavalia ensiformis, antes e após 7, 14 e 21 dias de embebição e sementes de Canavalia gladiata, antes e após 7, 14, 21 e 28 dias de embebição.

2.1. Caracterização geral:

As sementes quiescentes foram caracterizadas em seus aspectos gerais, como peso fresco, peso seco e volume. A obtenção do peso fresco foi efetuada em balança analítica com 4 casas decimais, realizando-se 50 repetições para cada uma das espécies utilizadas. A seguir, os materiais permaneceram durante 48 horas em estufa com circulação de ar, a

80°C, sendo então deixados em dessecador até a estabilização de seu peso. O teor de água das sementes, foi calculado a partir da fórmula:

$$\frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso fresco}} \times 100$$

A estimativa do volume das sementes foi feita a partir de 50 medições de seus três eixos ortogonais, feita com o auxílio de um paquímetro, sendo então aplicada a equação: $V = (\pi/6).A.B.C$, onde V é o valor do volume, em mm^3 ; $\pi = 3,14$; A = maior eixo; B = eixo médio; C = menor eixo (MELLO & VIDAL, 1980).

Lotes com 50 sementes foram então colocados para a germinação em vermiculita a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas e regados com água destilada, a fim de ser determinado o período de abscisão dos cotilédones.

A partir dos resultados obtidos, 4 lotes de C. ensiformis e 5 lotes de C. gladiata com 50 sementes cada foram colocados para a germinação nas mesmas condições anteriormente descritas. A cada 7 dias, um dos lotes de cada espécie foi retirado sendo o material utilizado para a fixação e inclusão em parafina e para as extrações e dosagens bioquímicas. Cada um deles foi identificado com as iniciais das espécies seguidas do tempo de embebição. Assim, Ce0d e Cg0d se referem a sementes quiescentes de C. ensiformis e C. gladiata respectivamente e Ce7d, Ce14d e Ce21d; Cg7d, Cg14d, Cg21d e Cg28d se referem ao material analisado após os diversos tempos de embebição.

Durante as coletas foi determinado o peso fresco dos cotilédones, da parte aérea e das raízes das plantas. Além disso, procedeu-se também à medição do comprimento (em mm) da parte aérea das mesmas.

2.2. Fixação:

Cotilédones e eixos embrionários ou raízes dos materiais nos diversos tempos utilizados foram submetidos a dois processos de fixação:

2.2.1. Fixação em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de potássio 0,1 M a pH 7,0 e glutaraldeído a 10% durante 48 horas a 5°C (KIERNAN, 1981), seguindo-se várias lavagens em água destilada, durante 15 min.

2.2.2. Fixação em etanol a 100% durante 48 horas a 5° C (LISON, 1953).

2.3. Processamento pós-fixação:

Após a fixação, quando necessário, os materiais foram desidratados em soluções de etanol com concentrações crescentes (de 70 a 100%), diafanizados em xilol durante 15 min e óleo de cedro durante 14 dias (POLICARD et alii, 1957).

Os materiais assim processados foram incluídos em parafina e seccionados em micrótomo R.Jung-Heidelberg, em cortes com 8 μ m de espessura.

2.4. Métodos citoquímicos de análise:

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

Procedeu-se à coloração pelo AT em tampão McIlvaine a pH 4,0, durante 15 min a temperatura ambiente, seguindo-se 3 banhos rápidos em água destilada, secagem ao ar, diafanização em xilol durante 10 min e montagem em bálsamo do Canadá (VIDAL, 1977).

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

Os materiais foram corados durante 15 min a temperatura ambiente com solução aquosa de ácido acético a 3% e xylidine Ponceau 0,1%, pH 2,5, seguindo-se lavagem em ácido acético a 3% durante 30 min, água destilada (5 min), desidratação em etanol a 95% e 100% (5 min cada), diafanização em xilol durante 10 min e posterior montagem em bálsamo do Canadá (VIDAL, 1970).

Como controle desse método, os cortes de materiais fixados em etanol a 100% foram submetidos a digestão

pela pepsina (2 mg/ml em solução de HCl a pH 1,6), por 3 horas, a 37°C. Após esse período, os materiais foram lavados em água, corados com xylidine Ponceau e montados em bálsamo do Canadá, como descrito no parágrafo anterior.

2.4.3. Reação de Feulgen para DNA:

Os cortes de materiais fixados em etanol, foram submetidos a hidrólise em HCl 4 N durante 1h30min a temperatura ambiente, lavados em água, imersos em Reativo de Schiff (LILLIE, 1954) durante 40 min, lavados 3 X (5 min cada) em água sulfurosa (18 partes de água destilada, 1 parte de HCl 1 N e 1 parte de metabissulfito de sódio a 10%), desidratados em etanol 95% e 100% (2 min cada), diafanizados em xilol durante 10 min e montados em bálsamo do Canadá (NELLO & VIDAL, 1980).

2.4.4. Método do PAS para a detecção de polissacarídeos e glicoproteínas:

Os cortes foram oxidados durante 10 min em ácido periódico a 0,05%, lavados em água, imersos em reativo de Schiff (LILLIE, 1954) durante 8 min, lavados em água sulfurosa, desidratados em bateria de etanol com concentrações crescentes até 100%, sendo a seguir diafanizados em xilol durante 10 min e montados em bálsamo do Canadá (MAIA, 1979).

Como controle desse método, lâminas contendo os materiais analisados foram imersas em Reativo de Schiff sem terem sido oxidadas pelo ácido periódico, procedendo-se as demais etapas desse método como descrito no parágrafo anterior.

2.5. Cálculo das áreas e volumes de grãos de amido:

Os materiais submetidos ao método do PAS foram utilizados para a estimativa da área e volume dos grãos de amido, individualmente e por célula.

Inicialmente, procedeu-se à contagem do número de grãos de amido em 40 células de campos aleatórios, de Ce0d, Ce7d Ce14d e Ce21d; Cg0d, Cg7d, Cg14d, Cg21d e Cg28d. Os valores obtidos foram submetidos a análise exploratória de dados e descritos segundo o diagrama esquemático de Tukey (1977).

A partir da análise exploratória foram escolhidas células contendo determinado número de grãos, representando os 50% da população mais próximos da mediana, ou seja, 1º quartil, mediana e 2º quartil.

Escolheu-se a seguir, um múltiplo inteiro do m.m.c. (mínimo múltiplo comum) dentre os valores do número de grãos encontrados por célula, a fim de se calcular o tamanho da amostra (n) no qual fosse obtido um erro máximo de 5% nas estimativas de área e volume dos grãos, ao nível de 1% de probabilidade, segundo a equação:

$$n = \frac{z^2 \cdot Sx^2}{e^2}$$

onde z é obtido a partir da tabela normal (x) ao nível de $P = 0,01$; Sx^2 = desvio padrão; e = erro em %; n = tamanho da amostra.

Desta forma, foram estimadas as áreas e os volumes de 360 grãos de amido por tempo e espécie utilizados. Estas estimativas foram efetuadas medindo-se o eixo maior e o eixo menor de cada grão, utilizando-se um microscópio Zeiss, com objetiva Plan 40X e ocular JENA K15X. Os valores obtidos nas medições dos eixos, foram transformados em μm , após determinação da correspondência das unidades da ocular com uma lâmina milimetrada, obtendo-se a seguinte relação: 57,5 unidades da ocular = 10 μm na lâmina.

Após a transformação para μm , as áreas de cada grão foram estimadas através da equação:

$$A = \pi' \cdot (a/4 + b/4)^2$$

onde A = área estimada em μm^2 ; $\pi' = 3,14$; a = maior eixo; b = menor eixo.

A seguir, foram estimados os valores dos volumes de cada grão, através da equação:

$$V = (\pi'/6) \cdot A \cdot B \cdot C$$

onde V = volume estimado em μm^3 ; $\pi' = 3,14$; A = maior eixo; $B = C$ = menor eixo (MELLO & VIDAL, 1980).

Os valores obtidos para as áreas e volumes dos grãos de amido foram normalizados segundo a função: $\log 5 +$ valores obtidos (BOX & JENKINS, 1976). Procedeu-se

então à análise de variância com dois fatores, utilizando-se o teste de Tukey para contraste entre duas médias de tratamentos (GOMES, 1982), sendo: $\Delta = q.s/\sqrt{r}$, onde q é o valor da amplitude total estudentizada ao nível de 1% de probabilidade; s é a estimativa do desvio padrão residual e r é o número de repetições.

As áreas e os volumes do conteúdo total de amido por célula foram estimadas em 72 células de cada tempo e material utilizados. Estes valores foram obtidos através da soma das áreas e volumes dos grãos de amido existentes, na população determinada pela análise exploratória referida anteriormente. Após a normalização dos dados segundo a função: $\log 5 +$ valores obtidos, realizou-se a análise de variância com 2 fatores e teste de Tukey, como efetuado para o cálculo da área e volume por grão de amido.

Foram ainda realizadas medições dos dois eixos ortogonais em 40 células de Ce0d e Cg0d nas mesmas condições já descritas, para a estimativa da área e do volume das células cotiledonares.

2.6. Medições dos retardos ópticos:

Os retardos ópticos foram obtidos a partir de material desparafinado, imerso em água, glicerol puro ou nujol por um mínimo de 2 horas (VIDAL, 1964).

As medições foram realizadas em microscópio de polarização Zeiss, utilizando-se compensador giratório $\lambda/4$ e

luz monocromática amarela ($\lambda = 589 \text{ nm}$). Foram realizadas 20 medições dos retardos ópticos em paredes de células cotiledonares das sementes de C. gladiata e C. ensiformis nos mesmos tempos utilizados nos métodos citoquímicos de análise, ou seja: 0, 7, 14 e 21 dias de germinação, além de 28 dias para C. gladiata.

Os resultados das diversas medições foram transformados segundo a função: $\sqrt{\text{retardos}}$ (BOX & JENKINS, 1976) e submetidos a análise de variância com dois fatores. Para a comparação, foi realizado o teste de Tukey para contraste entre duas médias de tratamentos (GOMES, 1982), sendo $\Delta = q \cdot s/\sqrt{r}$, onde q é o valor da amplitude total estudentizada ao nível de 1% de probabilidade; s é a estimativa do desvio padrão residual e r é o número de repetições de cada tratamento.

2.7. Métodos bioquímicos de análise:

2.7.1. Extração, dosagem e caracterização de ácidos graxos dos lipídios:

Foram utilizadas 5 gramas de farinha de cotilédones (2 repetições cada) de C. ensiformis e C. gladiata a partir de sementes colhidas em março de 1988 e estocadas sob refrigeração em frascos âmbar. A extração dos lipídios foi feita segundo método de BLIGH & DYER (1959). A dosagem dos lipídios totais foi realizada em termos de porcentagem, relativa ao peso fresco e peso seco.

O óleo foi saponificado e esterificado para a obtenção dos metil-ésteres segundo HARTMAN & LAGO (1973). A separação dos ésteres metílicos foi feita a partir da injeção de 1 µl dos ácidos graxos metilados em cromatógrafo a gás CG-37 acoplado a um integrador processador CG mod.200, com coluna de metal com 2.500 mm X 3,17 mm (1/8") contendo como fase estacionária FFAP (poli-etilenoglicol ácido nitrotereftálico) a 10% e como suporte, chromosorb W-sílica. A temperatura da análise variou de 200 a 230°C a uma velocidade programada de 2 C/min, permanecendo por mais 30 min a 230 C. A velocidade do papel foi de 1 mm/min, dos gases N₂ e H₂ foi de 0,5 ml/s e do ar sintético, 3,3 ml/s. Os ácidos graxos foram identificados comparando-se os cromatogramas obtidos com padrões existentes, baseados nos tempos de retenção de vários ácidos graxos conhecidos (Sigma).

Foi também calculado o índice de peróxidos para os lipídios presentes nas duas espécies, a partir da mistura de 0,5 g de óleo obtido, com 30 ml de solução 3:1 v/v de ácido acético glacial e clorofórmio. Após homogeneização, foi adicionado 0,5 ml de uma solução aquosa saturada de iodeto de potássio, sob agitação vigorosa e após 1 min, adicionados de uma só vez 50 ml de água deionizada, fervida e fria. Após agitação, foi misturado 1 ml de solução aquosa de amido a 1%. A mistura obtida foi titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,01 N, até o desaparecimento da cor azul obtida.

O índice de peróxidos foi calculado segundo a equação:

$$IP = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 1.000}{g}$$

g

onde: IP = índice de peróxidos em mEq/kg de lipídios; Va = volume da amostra; Vb = volume do branco da reação; N = normalidade do tiosulfato de sódio; g = gramas de óleo utilizadas (AOAC Official Method 28023 e 28024, 1970, com modificações em relação à quantidade de amostra e volume de solventes).

2.7.2. Dosagem de amido:

Para as dosagens de amido, foram utilizados cotilédones de sementes quiescentes e eixos embrionários de Ce0d e Cg0d, folhas cotiledonares e raízes de Ce7d, Ce14d e Ce21d; Cg7d, Cg14d, Cg21d e Cg28d.

Foram utilizadas 3 amostras com 0,1 g dos materiais, obtidos após moagem para Ce0d e Cg0d, ou após maceração para os demais tempos analisados.

Os materiais foram colocados em 30 ml de uma mistura de metanol, clorofórmio e água (MCA) na proporção de 12:5:3 v/v segundo adaptação de SHANNON (1968). Após homogeneização em Polytron, quando necessário, procedeu-se à centrifugação durante 10 min a 2.000 rpm em centrífugador de mesa Excelsa 3 (FANEM Ltda.). Os precipitados foram ressuspendidos em 20 ml de MCA e novamente centrifugados nas mesmas condições.

Após as centrifugações, os sobrenadantes foram descartados e o precipitado foi ressuspendido com ácido perclórico a 30% (PCA), segundo método de McCREADY et alii (1950). Foram feitas duas extrações com 10 ml de PCA.

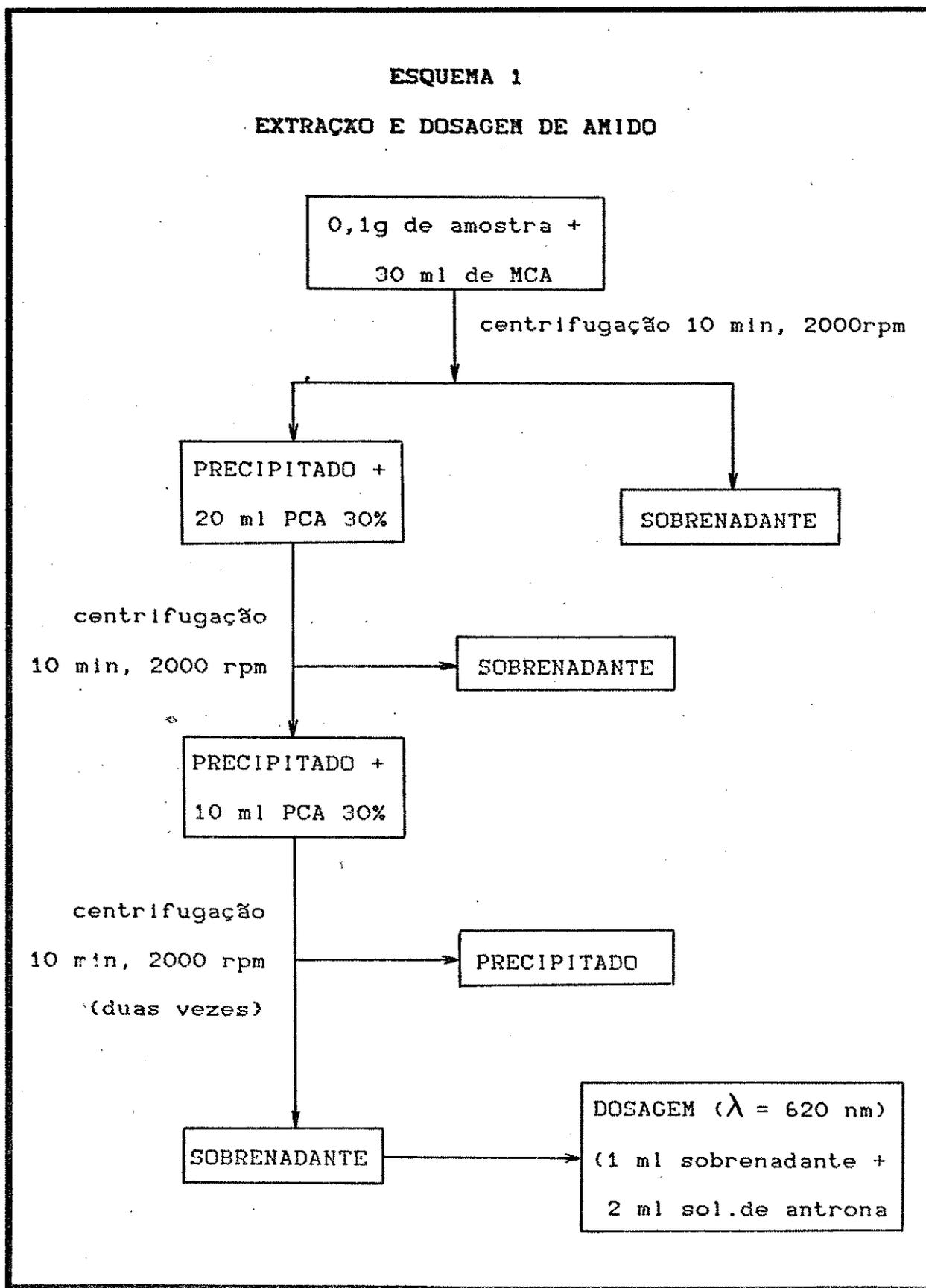
As dosagens de amido foram realizadas utilizando-se o reagente de antrona, obtido a partir da mistura de 200 mg de antrona (Sigma) em 100 ml de ácido sulfúrico a 95% (McCREADY et alii, 1950). Alíquotas de 1 ml de cada extrato foram acrescidas de 2 ml do reagente de antrona em tubos de ensaio. Após agitação, os tubos foram aquecidos e mantidos durante 5 min em água fervente (SCOTT & MELVIN, 1953).

Para as diluições necessárias utilizou-se água destilada. As leituras das absorbâncias foram feitas em 620 nm (Esquema 1).

Os cálculos para as dosagens foram feitos utilizando-se a reta padrão obtida a partir de soluções aquosas com 10, 30, 50, 70 e 100 µg de glicose por mililitro. Os valores encontrados nas amostras foram multiplicados pelo fator 0,9 para a conversão a amido, segundo McCREADY et alii (1950).

Os valores obtidos nas dosagens, foram comparados com a mediana do número de grãos de amido por célula em cada espécie e tempo analisados, fazendo-se a relação existente entre os mesmos, através de análise de regressão desses dados.

ESQUEMA 1
EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE AMIDO



2.7.3. Extração e purificação de proteínas em cotilédones de sementes quiescentes:

Para a obtenção do extrato protéico total, foi utilizado 1 g de farinha de cotilédones de *C. ensiformis* e *C. gladiata* obtido após moagem. Essa massa foi colocada em 20 ml de NaOH 0,1 N. A seguir, os materiais foram centrifugados durante 15 min a 2.000 rpm em centrifugador de mesa Excelsa 3. Os precipitados foram ressuspensos e novamente centrifugados mais duas vezes, nas mesmas condições. Os precipitados foram então descartados e aos sobrenadantes foi adicionado ácido perclórico (PCA) de forma a ser obtida uma concentração final de 5% de PCA. As soluções obtidas foram colocadas em banho-maria a 90°C durante 15 min e novamente centrifugadas durante 15 min a 2.000 rpm. Os sobrenadantes e precipitados foram recolhidos separadamente e estocados a -20°C (Esquema 2).

A obtenção das sub-frações de albuminas, leguminas e vicilinas foi feita a partir de 2 gramas de farinha de cotilédones de *C. ensiformis* e *C. gladiata* obtidos como descrito no parágrafo anterior. A essa farinha, foram adicionados 50 ml de NaCl 1 M em tampão fosfato 0,05 M a pH 7,4. A seguir, os materiais foram centrifugados durante 15 min a 2.000 rpm. Os precipitados foram ressuspensos em 50 ml de NaCl e novamente centrifugados nas mesmas condições. Os precipitados obtidos foram descartados e os sobrenadantes foram dialisados em água destilada, com 3 trocas diárias durante

4 dias, sob refrigeração. Cada amostra foi então centrifugada durante 15 min a 2.000 rpm. O sobrenadante de cada uma das espécies foi recolhido e denominado fração albumina.

O precipitado foi ressuspenso em 30 ml de NaCl 0,2 M, tendo seu pH ajustado para 7,4 com NaHCO_3 1 M. A seguir, o pH foi levado até 4,7 com solução de ácido acético 1 M e o material foi novamente centrifugado durante 15 min a 2.000 rpm. O precipitado foi recolhido e denominado fração legumina.

O sobrenadante foi dialisado em água destilada, com 3 trocas diárias durante 4 dias, sob refrigeração. Após esse período, o material foi centrifugado durante 15 min a 2.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi recolhido e denominado fração vicilina.

A fração albumina obtida, foi precipitada com ácido perclórico a 5% (concentração final) durante 15 min a 90°C , sendo então centrifugada por 15 min a 2.000 rpm. O sobrenadante foi descartado (Esquema 3).

Os quatro precipitados recolhidos para cada espécie, ou seja: fração protéica total, fração legumina, fração vicilina e fração albumina, foram liofilizados em liofilizador da Edwards do Brasil, a -40°C durante 16 horas.

2.7.4. Dosagem do material protéico:

As dosagens do material protéico foram feitas pelo método do Coomassie Blue (BRADFORD, 1976).

Para as dosagens, foi preparada uma solução contendo 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma - B-1131) em 50 ml de etanol 95%. A esta solução, foram acrescentados 100 ml de ácido ortofosfórico a 85% completando-se o volume para 1 litro com água destilada.

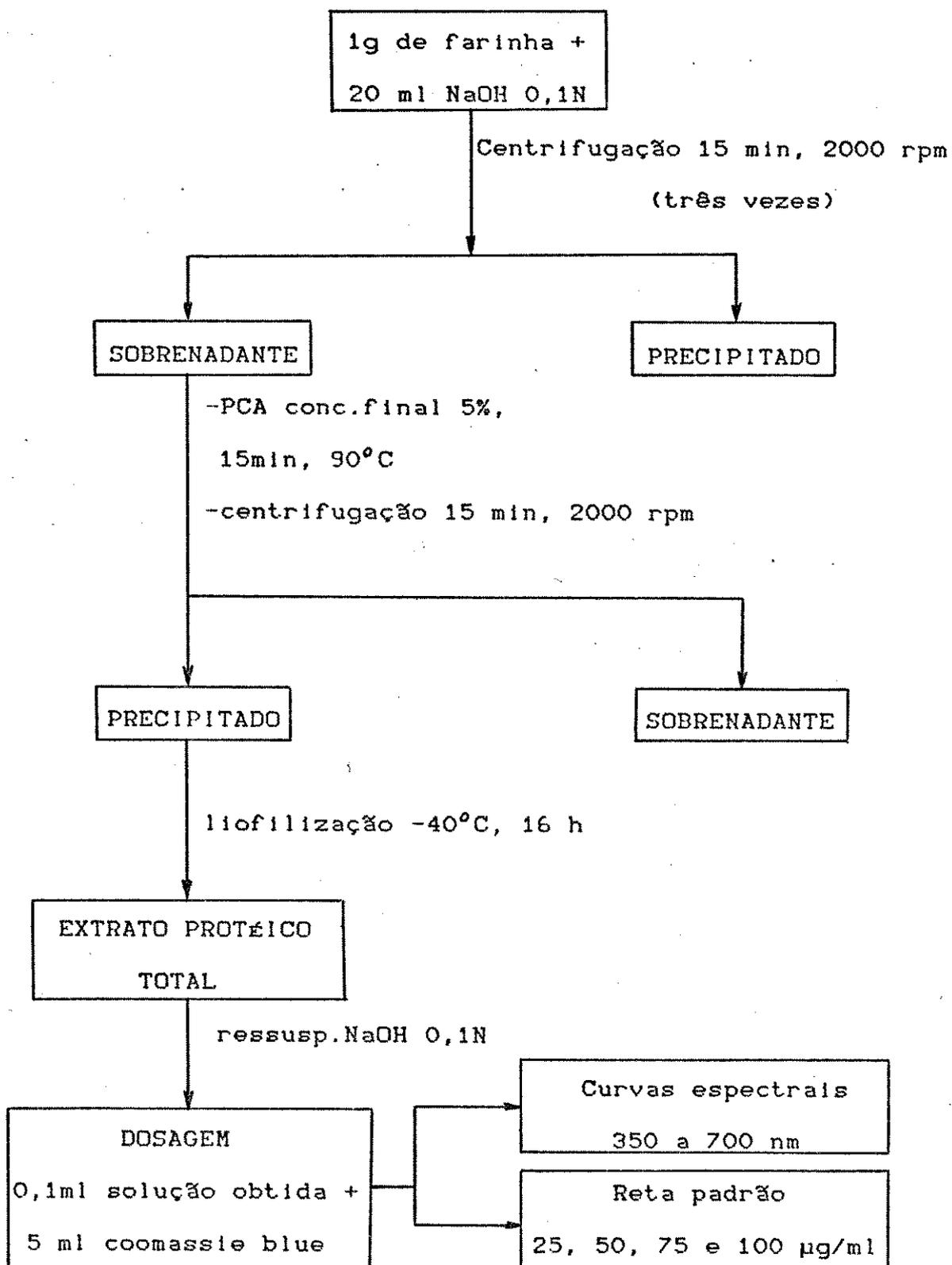
Amostras contendo 5 e 10 mg da fração protéica total e de cada uma das frações de globulina liofilizadas, foram ressuspensas em 10 ml de NaOH 0,1N. Alíquotas de 0,1 ml foram retiradas e a elas foram adicionados 5 ml do reagente, com três repetições para cada amostra. Após 2 min, procedeu-se à construção das curvas espectrais dessas soluções, de 350 a 700 nm, para a determinação do pico de absorção das mesmas.

Como controle comparativo, preparou-se uma solução a 1 mg/ml de soroalbumina bovina (BSA, Sigma) em NaOH 0,1 N. A alíquotas contendo 0,1 ml dessa solução e 0,05 ml da solução + 0,05 ml de NaOH 0,1N foram adicionados 5 ml do reagente e construídas curvas espectrais nas mesmas condições já descritas.

Com as medições das absorbâncias no comprimento de onda correspondente ao pico de absorção, foram construídas retas padrão para este método de dosagem, a partir das mesmas soluções utilizadas, preparando-se ainda soluções com concentrações de 2,5 e 7,5 mg em 10 ml de NaOH 0,1 N. Assim, as retas padrão apresentaram sempre quatro pontos determinados, ou seja: 25, 50, 75 e 100 µg de proteína em 0,1 ml de solução (Esquema 2 e 3).

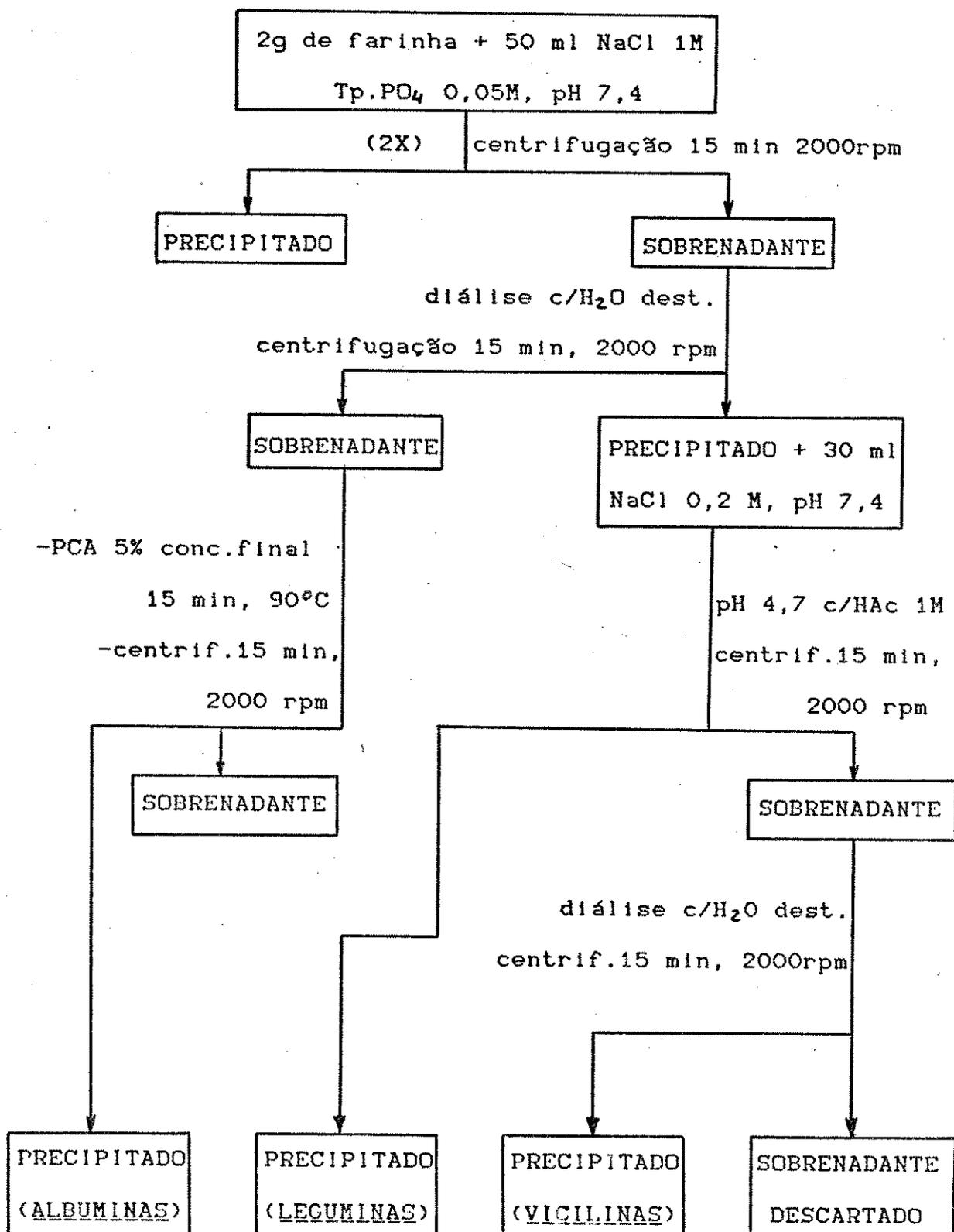
ESQUENA 2

OBTENÇÃO E DOSAGEM DO EXTRATO PROTÉICO TOTAL



ESQUENA 3

OBTENÇÃO DE ALBUMINAS, LEGUMINAS E VICILINAS



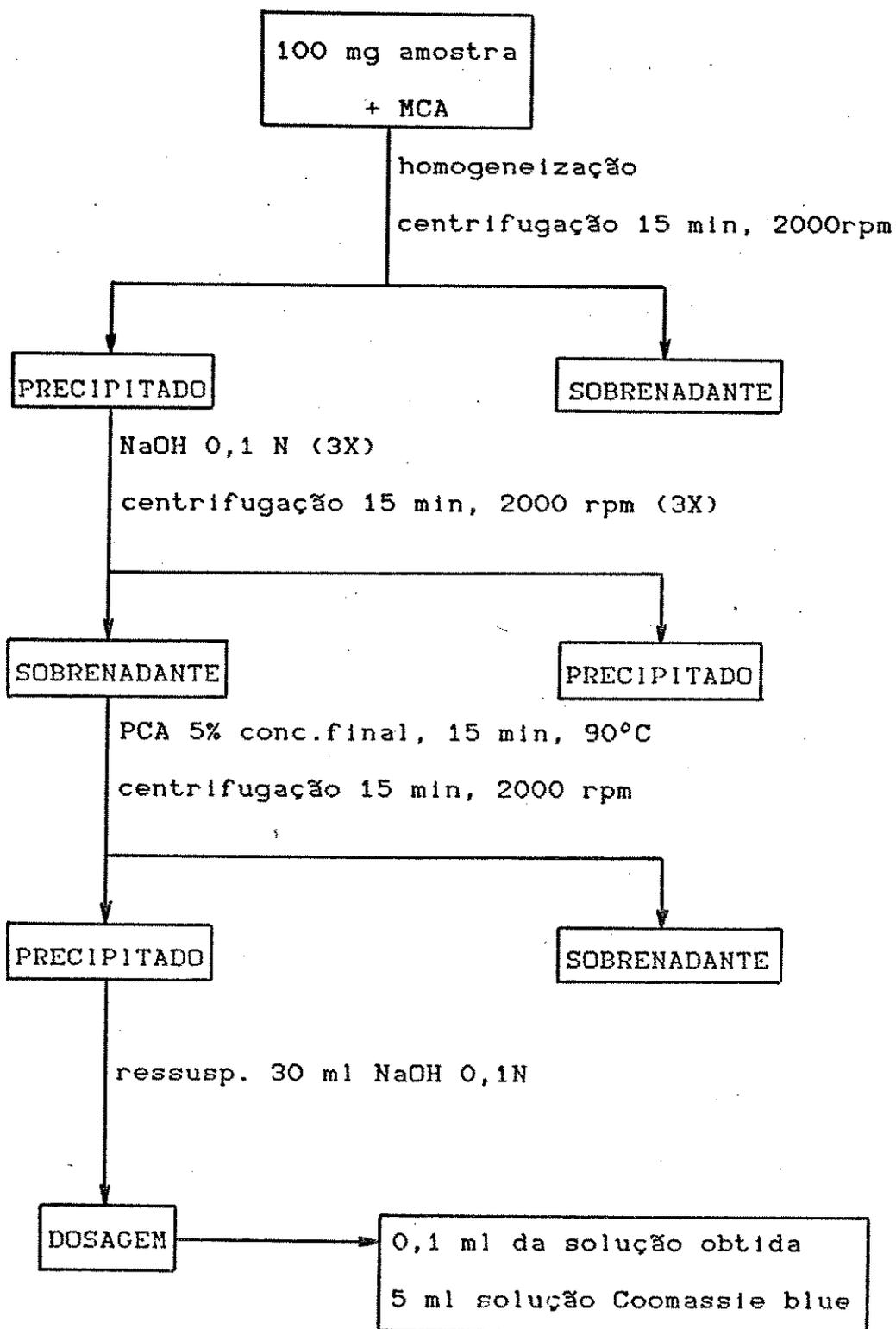
Amostras contendo 100 mg de cotilédones e eixos embrionários de sementes quiescentes de *C. ensiformis* e *C. gladiata* ou cotilédones e raízes dessas espécies nos diversos tempos utilizados, foram macerados e homogeneizados em MCA como já descrito em 2.7.2. Após centrifugação durante 15 min a 2.000 rpm, os precipitados obtidos foram ressuspêndidos 3 vezes em 5 ml de NaOH 0,1 N e centrifugados nas mesmas condições. Cada fração foi então precipitada com um volume de ácido perclórico para tornar a solução a 5% em termos de PCA. As soluções foram então deixadas durante 15 min em banho-maria a 90°C e posteriormente centrifugadas durante 15 min a 2.000 rpm. Os sobrenadantes foram guardados a -20° C. Os materiais precipitados foram ressuspêndidos em 30 ml de NaOH 0,1 N.

Alíquotas de 0,1 ml das soluções obtidas foram adicionadas a 5 ml da solução de Coomassie blue. Foram realizadas 3 repetições para cada amostra. As absorbâncias foram lidas após 2 min, no comprimento de onda determinado pelas curvas espectrais (Esquema 4).

2.7.5. Caracterização do material protéico

Os materiais utilizados para as dosagens protéicas foram também submetidos à eletroforeses em gel de poliacrilamida com SDS, segundo ZINGALES (1984).

ESQUEMA 4:
DOSAGEM DOS MATERIAIS PROTÉICOS



Inicialmente foram aplicados 60 μg do extrato total e 30 μg de cada uma das sub-frações obtidas na purificação (albuminas, leguminas e vicilinas) de *C. ensiformis* em gel de poli-acrilamida a 6%, preparadas em tampão não redutor (Tampão Tris-HCl 62 mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 10%; EDTA 10 mM e azul de bromofenol 0,01%) ou em tampão redutor (Tampão não redutor + 2 mercaptoetanol 0,2%). Após a realização dessa eletroforese foram então aplicados 60 μg do extrato total e 30 μg de cada uma das sub-frações obtidas na purificação, de *C. ensiformis* e *C. gladiata* em gel de poli-acrilamida a 10%, preparadas em tampão redutor. Antes da aplicação, nos dois casos, as amostras foram fervidas durante 3 minutos. O tampão utilizado nas eletroforeses foi Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1% (GOMES, 1988). Para cada placa foram aplicados 25 mA e 100 V (Fonte AUJE, da Auje Ind. Eletro-eletrônica Ltda). Padrões de peso molecular (Sigma) contendo miosina (PM = 205.000), b-galactosidase (PM = 116.000), fosforilase b (PM = 97.400), albumina bovina (PM = 66.000), ovalbumina (PM = 45.000) e anidrase carbônica (PM = 29.000) foram analisados em paralelo. Além disso, utilizou-se separadamente 10 μg de albumina bovina e 10 μg de Concanavalina A.

A coloração dos diversos géis após a corrida, foi feita utilizando-se Coomassie blue R-250 a 0,2%. Para a descoloração utilizou-se solução contendo metanol a 50% e ácido acético a 10%. Os géis foram então deixados por pelo menos 2 dias em solução aquosa de glicerol a 3% e metanol a

30% sob refrigeração (BLUM et alii, 1987) e posteriormente fotografados.

2.8. Hemaglutinações:

Foram realizadas hemaglutinações "in situ" e "in vitro" a 20°C ou 37°C com todos os materiais utilizados nas análises citoquímicas e bioquímicas.

Para as hemaglutinações "in vitro" procedeu-se à mistura de 10 µl das soluções de proteínas obtidas no ítem 2.7.4 e 10 µl de uma suspensão de hemácias de coelho previamente fixadas e tripsinizadas (VIDAL & PIMENTEL, 1985), em lâminas histológicas. O poder hemaglutinante das sub-frações de albuminas e globulinas foi testado a partir de 10 µl de soluções a 1 mg/ml dessas proteínas. Como controle comparativo utilizou-se 10 µl de solução de ConA na mesma concentração. Após agitação suave as misturas foram colocadas a 20°C ou 37°C durante 5 min e imediatamente observadas em microscópio.

As hemaglutinações "in situ" foram realizadas a partir dos cortes obtidos após microtomia e desparafinização (vide ítem 2.3). As lâminas foram imersas na solução de hemácias a 20°C ou 37°C sob agitação suave e após 15 min nessas condições, foram observadas em microscópio.

3. RESULTADOS:

3.1. Caracterização geral:

As sementes de Canavalia ensiformis e Canavalia gladiata utilizadas apresentaram índice de germinação em torno de 100% em todos os experimentos realizados. A caracterização geral dessas sementes, contendo inclusive os valores de comprimento do eixo maior, médio e menor, do volume, do peso seco e do peso fresco, encontram-se descritos na Tabela 1. Pode-se notar que a primeira é cerca de 5,3 vezes menor que a segunda em termos de volume e 3,3 vezes menor em termos de peso.

A protrusão da radícula se deu entre 40 e 60 horas após o início da embebição para a germinação. Após 7

TABELA 1: Caracterização das sementes quiescentes de Canavalia ensiformis e Canavalia gladiata:

Descrição	<u>C. ensiformis</u>	<u>C. gladiata</u>
Cor da Casca	branca	magenta
Eixo maior (mm)	19,36±0,88	40,46±1,93
Eixo médio (mm)	13,02±0,61	20,46±1,13
Eixo menor (mm)	9,30±0,66	14,97±0,47
Volume (cm ³)	1,23±0,128	6,50±0,636
Peso fresco (PF)(g)	1,48±0,156	4,95±0,61
Peso seco (PS)(g)	1,33±0,159	4,49±0,419
PF cotilédones (g)	1,469±0,16	4,926±0,6
PF eixo embrionário(g)	0,0109±0,002	0,0240±0,004
PS cotilédones (g)	1,320±0,16	4,468±0,4
PS eixo embrionário(g)	0,0099±0,002	0,0220±0,004
Teor de água (%)	10,3%	9,3%

Os valores representam a média de 50 medições.

dias de embebição, a parte aérea de Ce7d apresentou 0,5 cm de comprimento, atingindo 34,5 cm em Ce21d. Em Cg7d esse valor também foi de 0,5 cm, chegando a 122,8 cm em Cg 28d (Tabela 2). As plântulas apresentaram seu primeiro par de folhas opostas e ovaladas e a partir deste, folhas alternas e trifolioladas.

A abscisão dos cotilédones de C. ensiformis ocorreu entre o 20º e o 22º de embebição nas 50 plantas analisadas. Em C. gladiata esse fenômeno teve início a partir do 27º dia, estendendo-se até o 31º dia.

Após a embebição, os pesos fresco e seco dos cotilédones sofreram grandes alterações e encontram-se descritos na Tabela 3. Como esperado, os pesos frescos sofreram um aumento acentuado após a embebição sendo 128% maiores em Ce7d e 116% maiores em Cg7d. Após o 14º dia de embebição, há um acentuado decréscimo os valores dos pesos frescos das duas espécies (Tabela 3). Pode-se notar ainda que no período analisado há maior redução do peso seco, que passa de 1,32g em Ce0d para 0,11g em Ce21d (diminuição de 92%). Em Cg0d o peso seco de 4,47g é reduzido para 0,21g em Cg28d (diminuição de 95%). Além disso, a maior redução para o peso seco se deu a partir do 7º dia de germinação, tanto em C. ensiformis quanto em C. gladiata (Tabela 3).

TABELA 2: Comprimento da parte aérea de C. ensiformis e
C. gladiata:

Tempo	<u>C. ensiformis</u>	<u>C. gladiata</u>
0 dias	0,00	0,00
7 dias	0,5±0,4	0,5±0,3
14 dias	18,7±1,7	22,0±3,1
21 dias	34,5±5,5	91,6±4,2
28 dias	55,2±6,8	122,8±12,5
35 dias	69,8±9,3	173,4±20,7

Os valores representam a média de 50 medições

TABELA 3: Medidas do peso fresco e peso seco em cotilédones de C. ensiformis e C. gladiata nos diversos tempos de embebição utilizados

Tempo	Peso fresco(PF)	(%)	Peso seco(PS)	(%)
Ce0d	1,47±0,16	(100%)	1,32±0,16	(100%)
Ce7d	3,36±0,40	(229%)	1,04±0,16	(79%)
Ce14d	3,20±0,40	(217%)	0,30±0,05	(23%)
Ce21d	0,83±0,12	(56%)	0,11±0,01	(8%)
Cg0d	4,93±0,61	(100%)	4,47±0,42	(100%)
Cg7d	10,63±1,02	(216%)	3,44±0,41	(77%)
Cg14d	9,15±1,01	(186%)	1,13±0,20	(25%)
Cg21d	3,53±0,40	(72%)	0,75±0,09	(17%)
Cg28d	1,84±0,28	(37%)	0,21±0,03	(5%)

Os valores referentes aos pesos são dados em gramas e representam a média de 50 medições.

3.2. Coloração com azul de toluidina a pH 4,0:

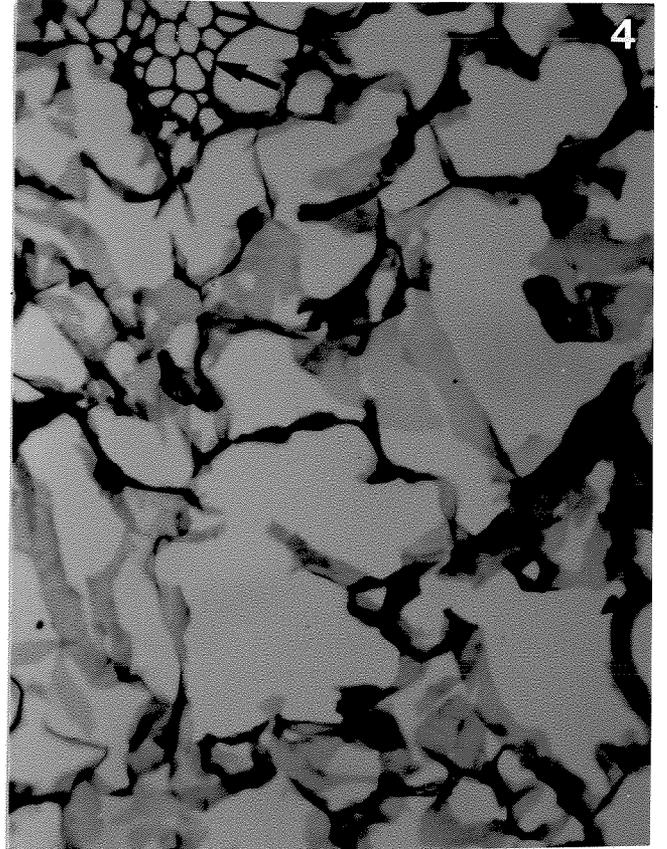
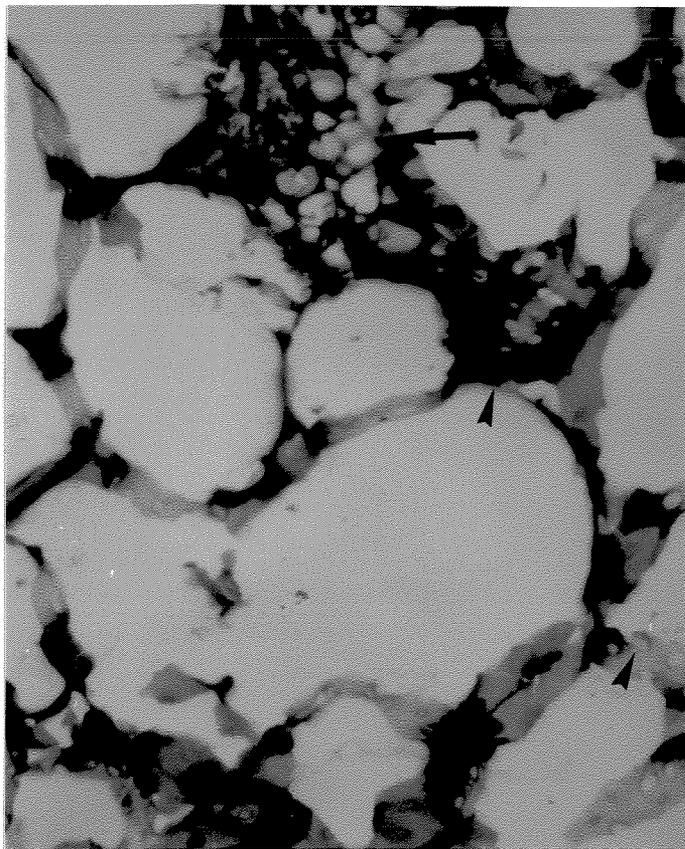
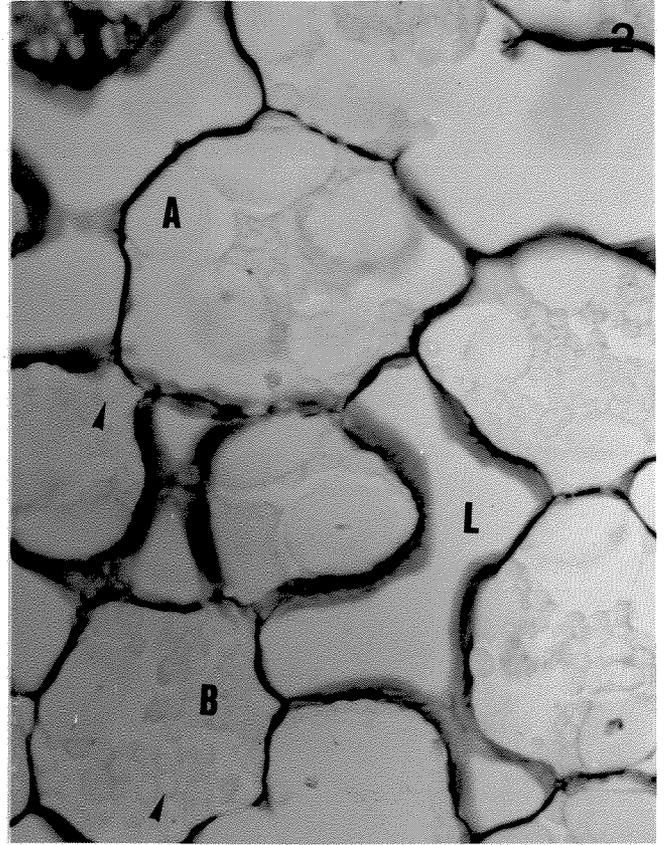
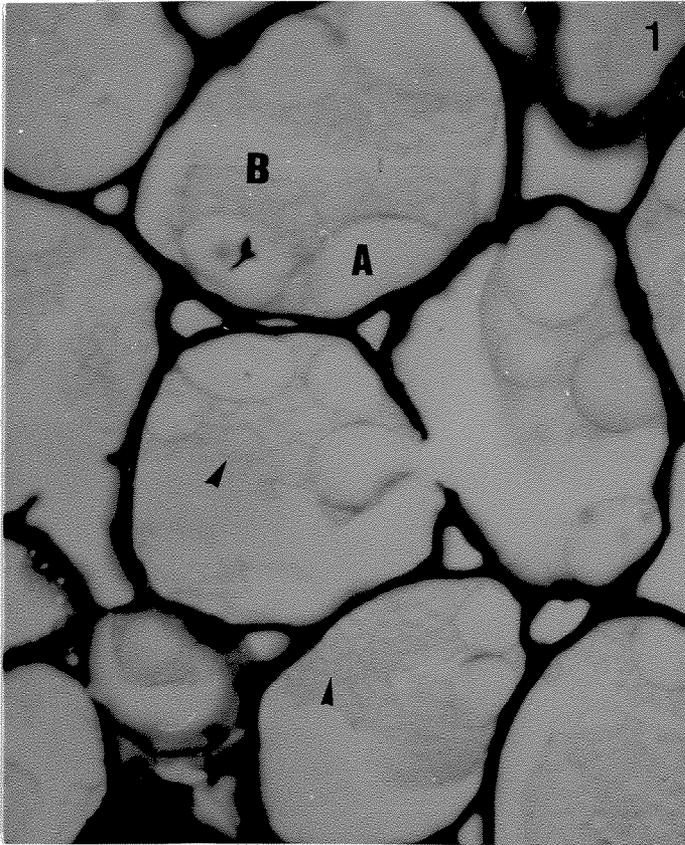
Os cortes de cotilédones de sementes quiescentes de C. ensiformis corados pelo azul de toluidina revelaram o formato arredondado de suas células, em contraste com a forma mais irregular das células de C. gladiata, aparentemente menores e guardando entre si um menor contacto que as primeiras, o que acarreta a formação de inúmeras lacunas (Fig.1 e 2).

As paredes celulares das células cotiledonares coradas pelo AT apresentaram-se metacromáticas. No interior das células foram notados grãos de elevado tamanho, não corados, além de inúmeros glóbulos fracamente corados e ortocromáticos, com envoltórios corados em azul (Fig. 1 e 2).

Em cortes tangenciais das paredes celulares, pôde-se notar a presença de inúmeros espaços circulares de grande tamanho e não corados pelo AT. Esses espaços foram detectados em todos os materiais e tempos analisados.

A metacromasia das paredes celulares foi mais acentuada nos cortes dos cotilédones após a embebição, aumentando com o decorrer da germinação e atingindo um grau máximo aos 21 dias em C. ensiformis e 28 dias em C. gladiata, quando ocorreu a abscisão dos mesmos. Nesses tempos as células cotiledonares apresentaram-se mais irregulares e com inúmeras paredes celulares rompidas. A partir do 7º dia após a embebição foi notada a presença de feixes de células menores, espalhados por todo o cotilédone, com paredes celulares

Fig.1-4; Cortes de cotilédones de Canavalia corados pelo AT. Podem ser notadas as paredes celulares metacromáticas. Aumento: 460 X. **Fig.1;** Semente quiescente de C. ensiformis. Nota-se um formato celular arredondado e um conteúdo citoplasmático formado por grãos não corados (A) e grânulos fracamente corados e ortocromáticos (B), com envoltórios corados em azul (▲). **Fig.2;** Semente quiescente de C. gladiata. As estruturas citoplasmáticas presentes são semelhantes às da Fig.1. O formato celular é mais irregular, com lacunas entre as células (L). **Fig.3;** Cotilédone de C. ensiformis com 21 dias de germinação. As paredes celulares apresentam-se mais metacromáticas, com alguns rompimentos e possuem inúmeros poros não corados (▲). Nota-se ainda um feixe de células com paredes ortocromáticas (↑). **Fig.4;** Cotilédone de C. gladiata com 28 dias de germinação. As paredes celulares também apresentam-se mais metacromáticas, irregulares e rompidas. O feixe de células com paredes ortocromáticas também pode ser visualizado (↑).



mais espessas e ortocromáticas. O conteúdo citoplasmático foi diminuindo à medida que o tempo avançou, não sendo notado praticamente nenhum material corado nos cotilédones com mais idade (Fig.3 e 4).

Núcleos e nucléolos também foram corados pelo AT em azul-esverdeado. Os núcleos em Ce0d e Cg0d apresentaram um formato ovóide enquanto que, os nucléolos, mais arredondados, se coraram mais intensamente (Fig. 5 e 6).

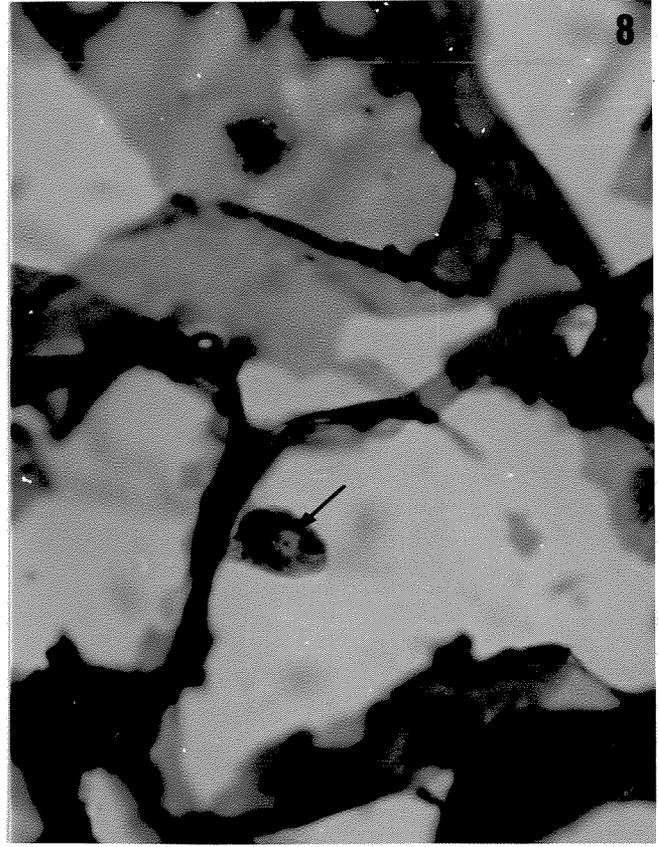
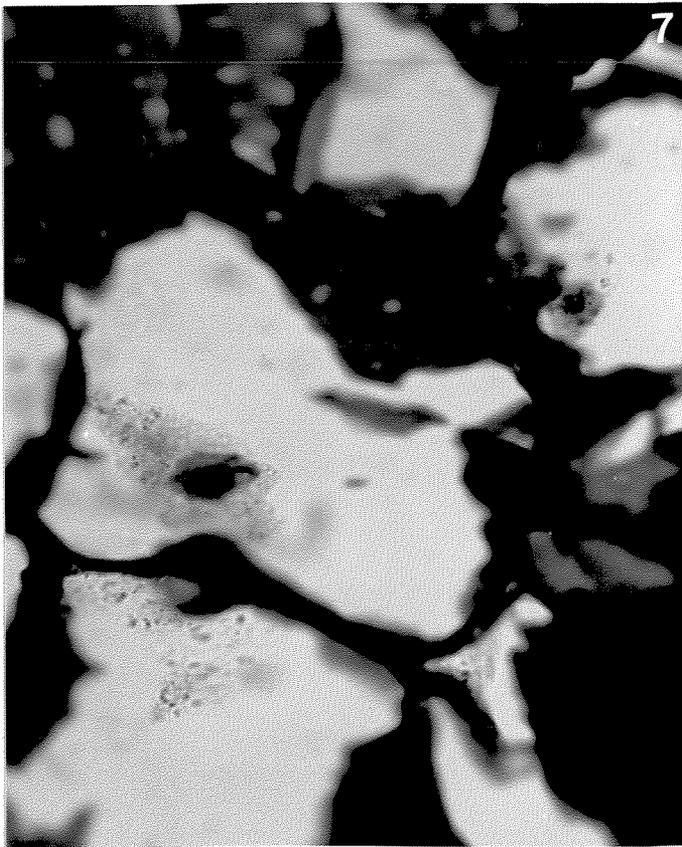
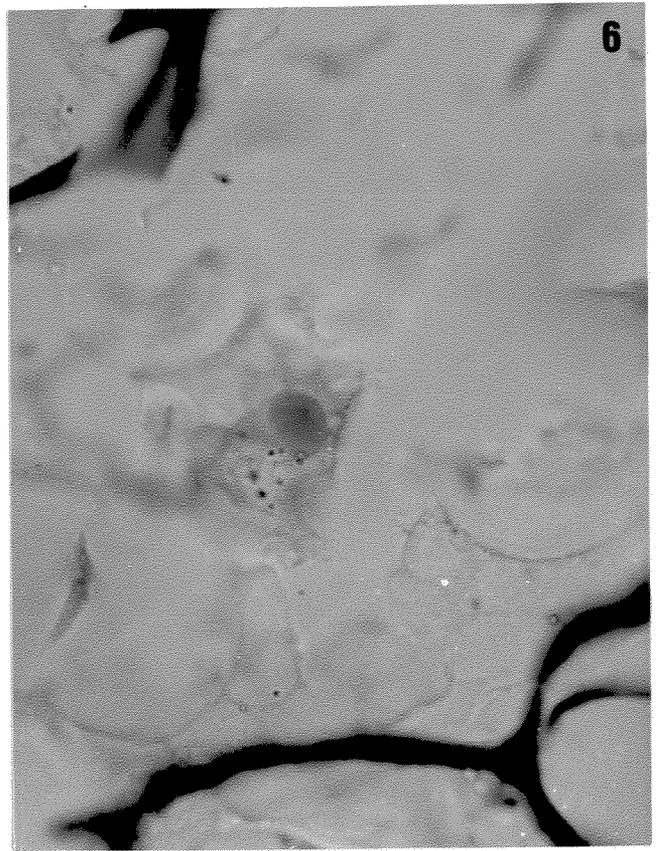
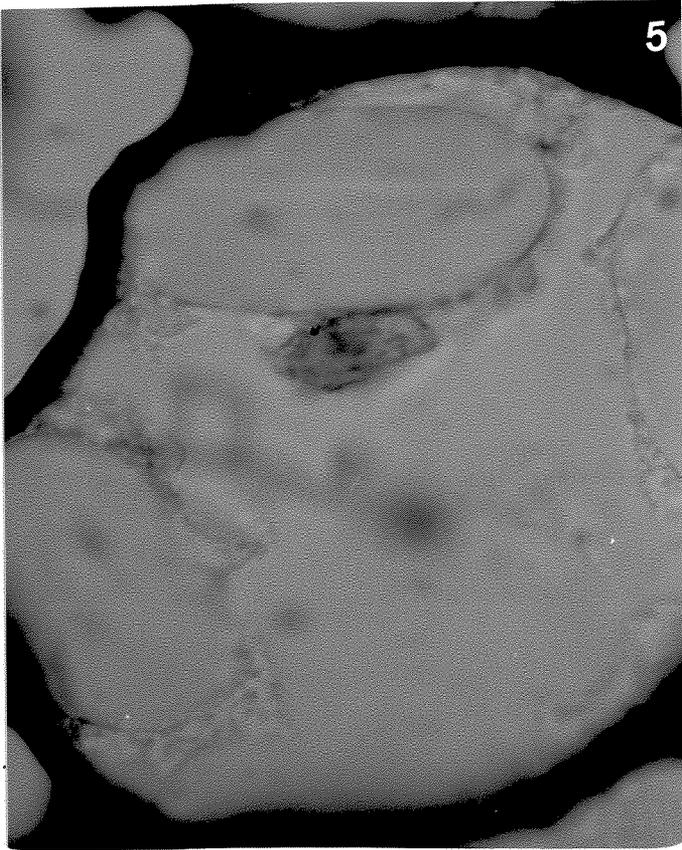
Com o passar do tempo, os núcleos foram se tornando mais picnóticos e em muitos casos, foi observada apenas a imagem negativa do nucléolo (Fig.7 e 8).

Nos eixos embrionários o padrão de coloração pelo AT foi o mesmo, com paredes celulares metacromáticas e conteúdo citoplasmático granular e pouco corado. Após 7 dias de embebição, o sistema radicular já estava desenvolvido, havendo grande formação de raízes secundárias nesse período. No câmbio foi notada a presença de células com paredes ortocromáticas enquanto que as células parenquimáticas do córtex apresentaram paredes metacromáticas (Fig.9). Após 21 dias de embebição as raízes já haviam iniciado o seu desenvolvimento secundário (Fig.10).

3.3. Coloração com xylidine Ponceau a pH 2,5.

Os cotilédones de sementes quiescentes corados pelo XP apresentaram suas paredes celulares pouco coradas. No citoplasma, foi observada a presença dos grânulos não co-

Fig.5-8: Detalhe de células cotiledonares de Canavalia após coloração pelo AT. Pode ser notada a coloração das paredes celulares, núcleos e nucléolos. Aumento: 1150 X. **Fig.5:** Célula de Ce0d. **Fig.6:** Célula de Cg0d. **Fig.7:** Ce21d. **Fig.8:** Cg28d. Nota-se a maior metacromasia das paredes celulares em relação ao material quiescente e os núcleos mais picnóticos. Na Fig.7 pode ainda ser visualizada a presença de inúmeros poros quando o plano de corte foi tangencial às paredes celulares. Na Fig.8, é visível a imagem negativa do nucléolo (↑).



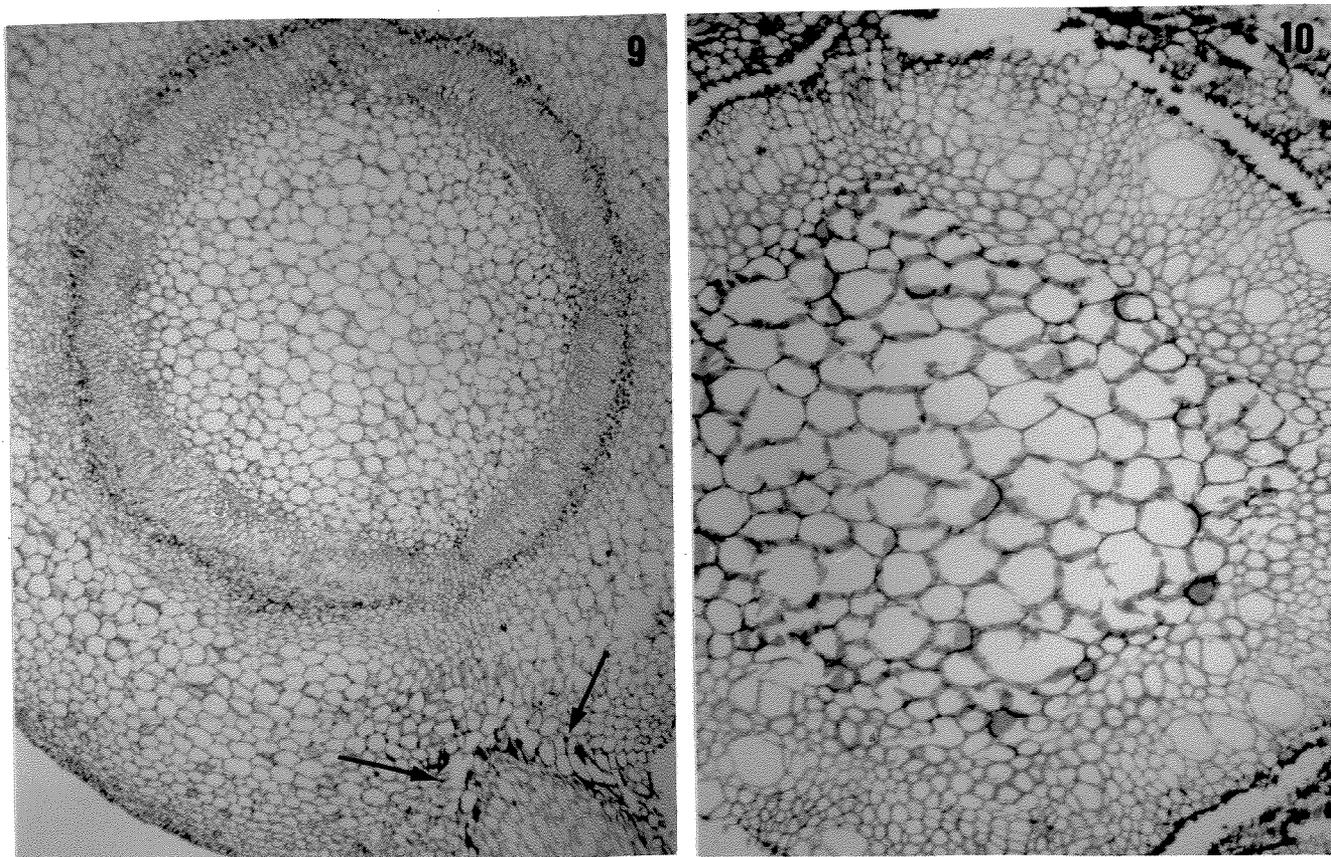


Fig. 9 e 10: Cortes transversais da raiz de C. ensiformis após a coloração pelo AT. Podem ser visualizadas as paredes celulares metacromáticas e, na região do câmbio, inúmeras paredes celulares ortocromáticas. **Fig. 9:** Ce7d. Nota-se a formação e desenvolvimento de raízes secundárias (↑). Aumento: 40 X. **Fig.10:** Ce21d. Aumento: 115 X.

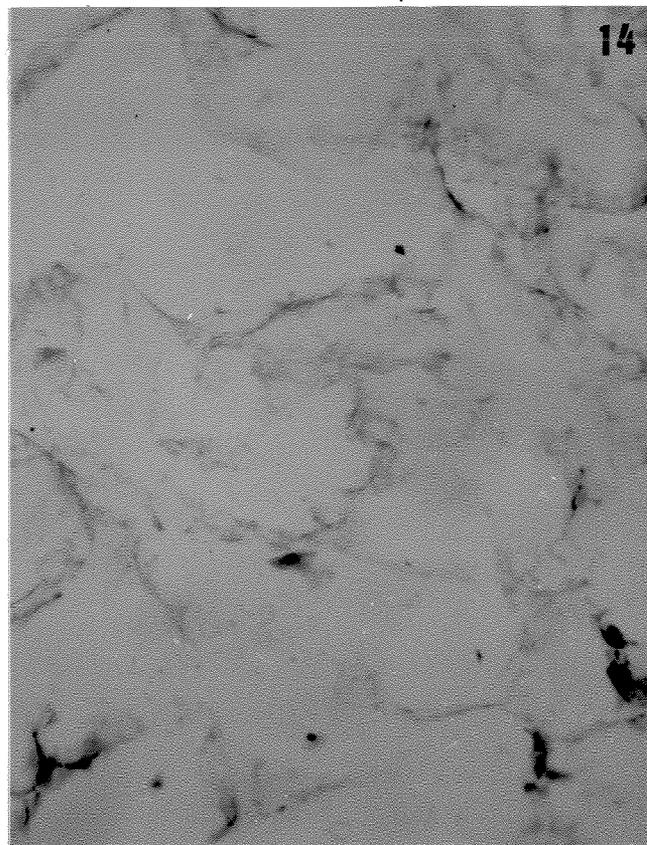
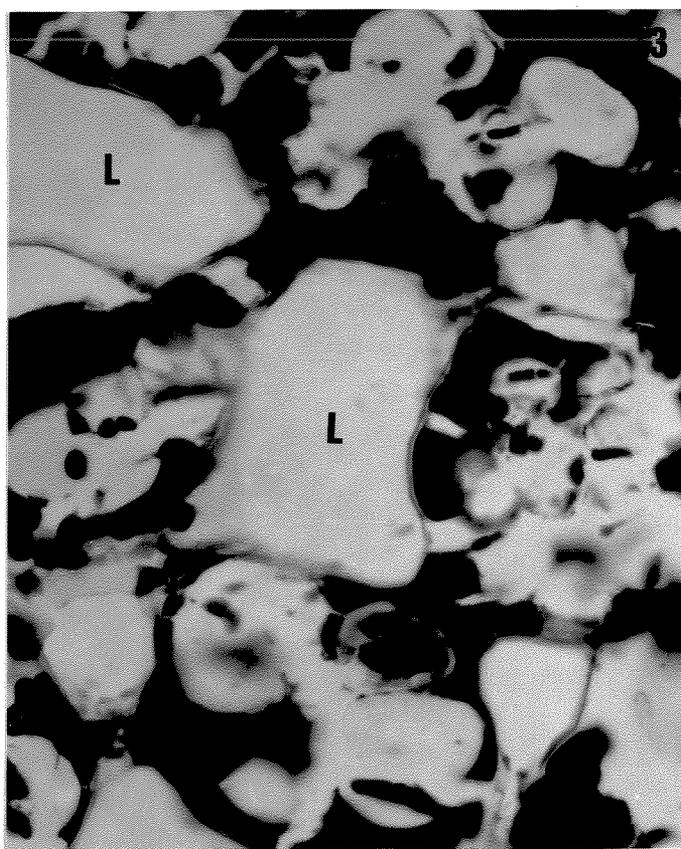
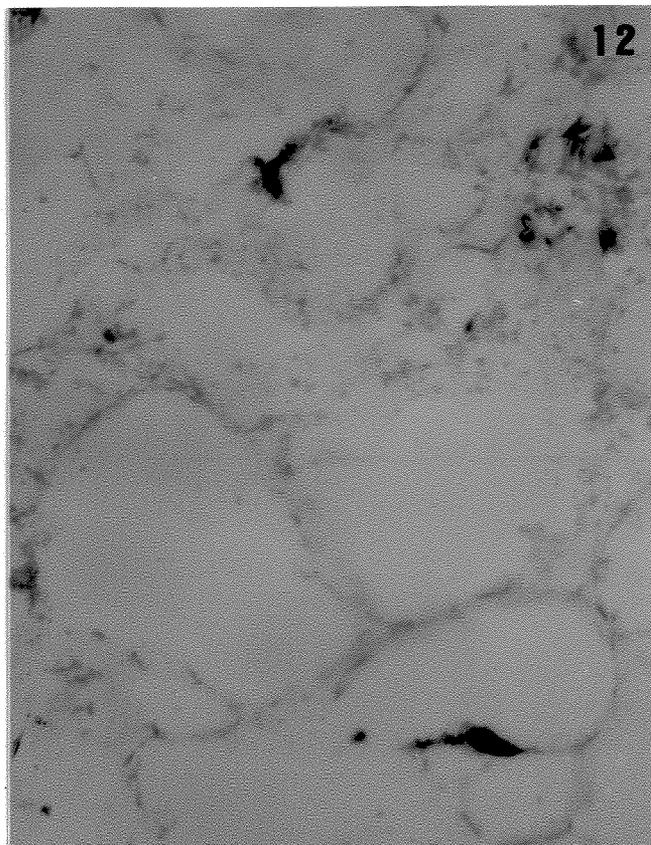
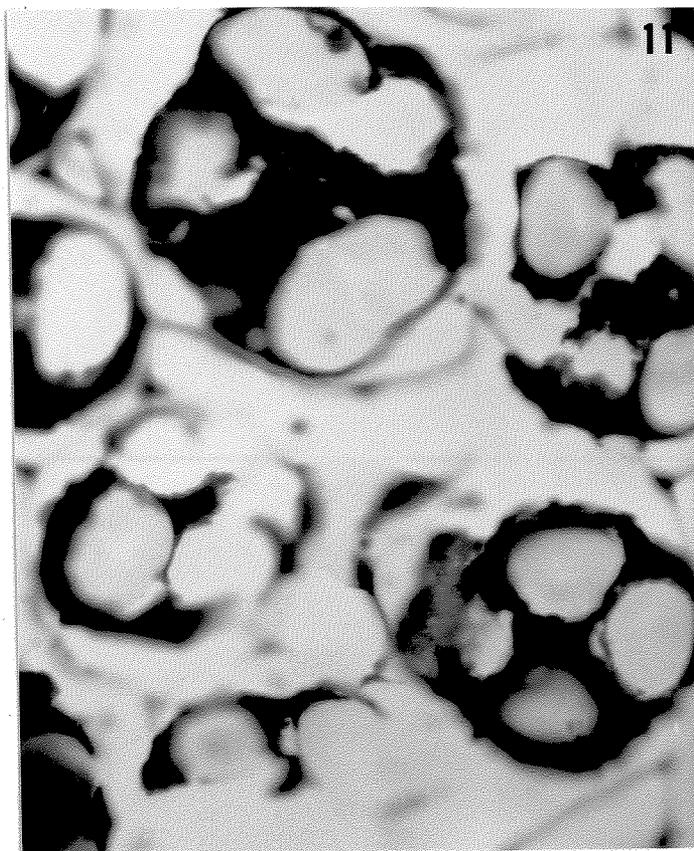
rados pelo AT, que também não foram corados pelo xylidine Ponceau. Entretanto, os glóbulos já descritos, que circundam os grânulos, foram intensamente corados, tanto em *C. ensiformis* quanto em *C. gladiata* (Fig. 11 e 13).

Após a germinação, o conteúdo citoplasmático foi gradativamente diminuindo. A princípio, até o 14º dia após a embebição, foi notada uma diminuição mais suave. Entretanto, após esse tempo, o material corado diminuiu de forma brusca até a abscisão dos cotilédones em Ce21d e Cg28d, quando praticamente apenas as paredes celulares continuaram XP positivas (Fig. 12 e 14).

O uso de xylidine Ponceau possibilitou a visualização de diferenças no arranjo do material corado conforme a posição da célula no cotilédone, desde a formação da semente, até a abscisão dos cotilédones. As regiões mais periféricas do cotilédone, apresentaram material corado tomando praticamente todo o espaço celular, com alguns grânulos pequenos não corados, enquanto que nas regiões mais centrais, o material corado apresentou um formato globular mais delimitado e os grânulos não corados apresentaram-se maiores (Fig. 15 e 16).

Os eixos embrionários de sementes quiescentes das duas espécies corados pelo XP, apresentaram uma grande quantidade de material corado. As células parenquimáticas exibiram material com um aspecto mais globular e em seu interior foram observados grânulos não corados. As células vasculares e precursoras de vasos, mostraram uma coloração

Fig.11-14: Cortes de cotilédones de Canavalia corados pelo XP para proteínas. **Fig.11 :** Sementes quiescentes de Canavalia ensiformis mostrando material protéico circundando os grãos não corados. As paredes celulares apresentam-se pouco coradas. **Fig.12:** Cotilédone de C. ensiformis após 21 dias de embebição. Praticamente não são notadas regiões celulares coradas, exceto ao nível das paredes celulares. **Fig.13:** Sementes quiescentes de C. gladiata mostrando o conteúdo protéico corado, circundando os grãos não corados. As células, com formato mais irregular, possibilitam a formação de espaços intercelulares vazios (L). **Fig.14:** Cotilédone de C. gladiata após 28 dias de embebição, apresentando basicamente apenas as paredes celulares fracamente coradas.



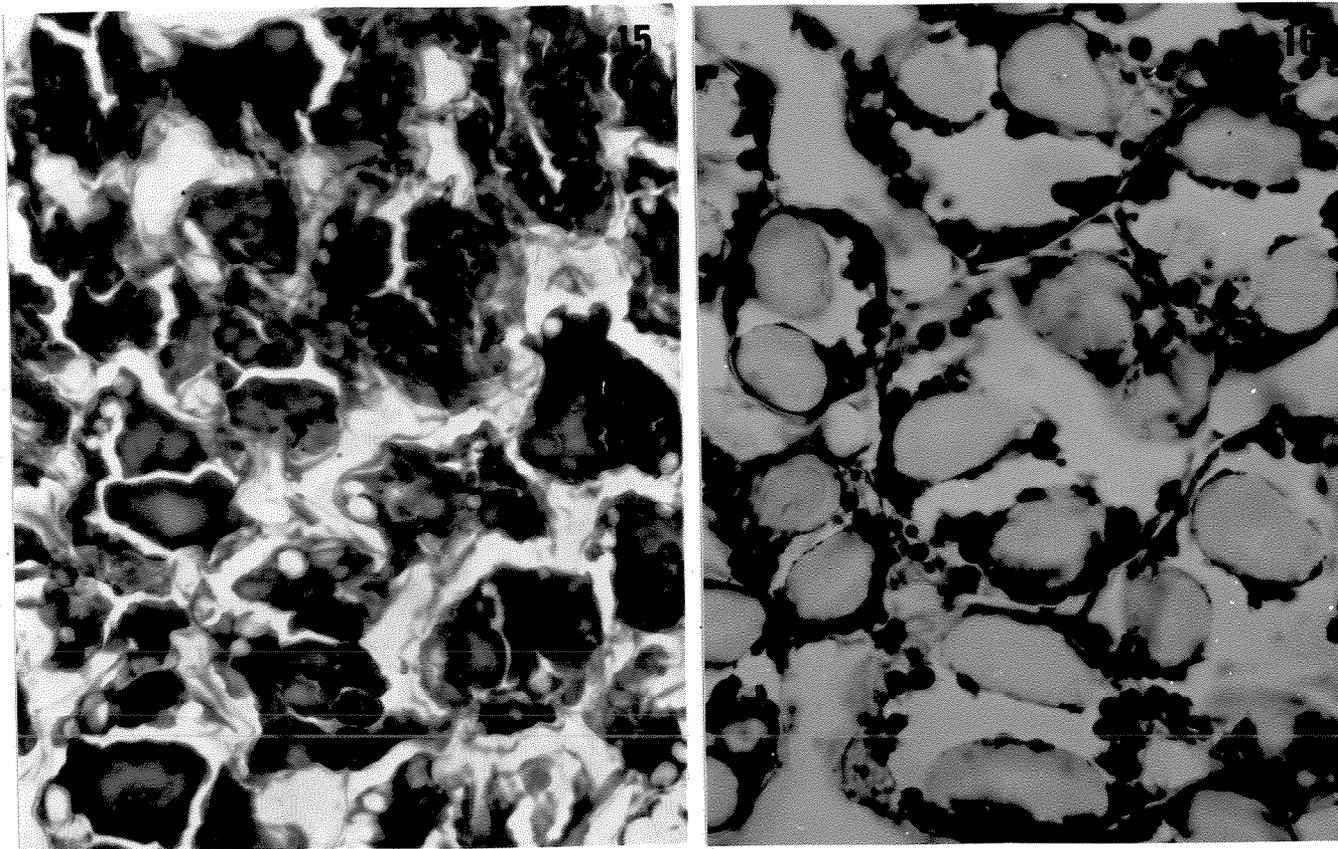


Fig.15 e 16: Cortes de cotilédones de C. ensiformis após 7 dias de embebição corados pelo XP. Aumento: 460 X. **Fig.15:** Região adaxial do cotilédone. Pode ser notada a presença de material citoplasmático corado, circundando alguns grânulos não corados. **Fig.16:** Região central do cotilédone. O material corado é mais nitidamente globular e os grânulos não corados são bem maiores.

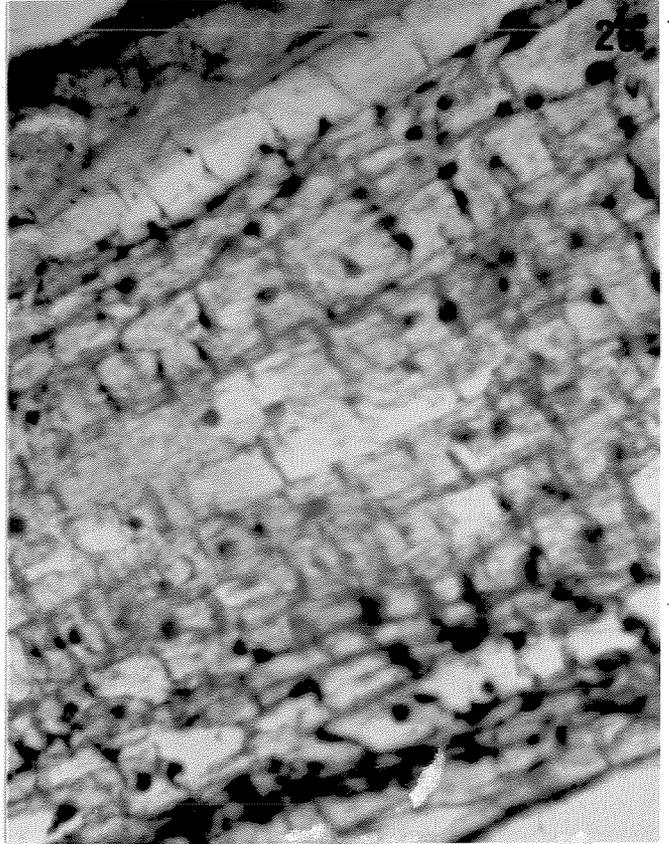
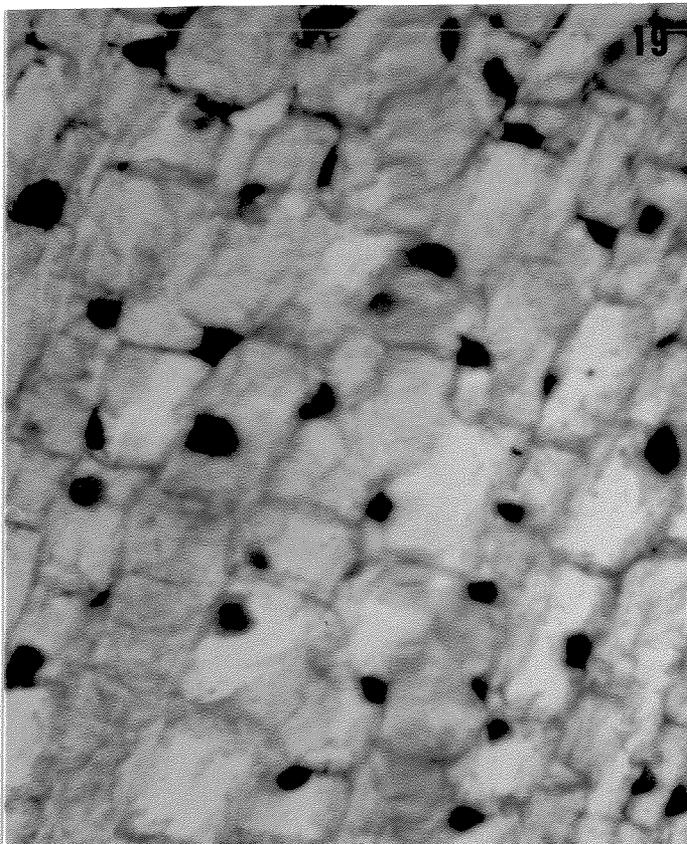
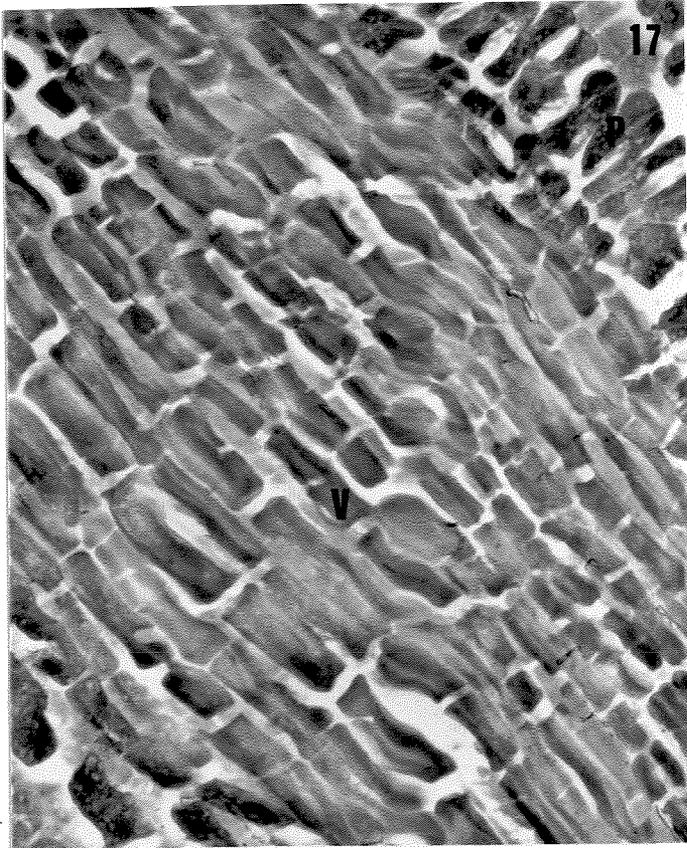
mais homogênea e ausência desses grânulos (Fig.17 e 18). As raízes de Ce21d e Cg28d apresentaram um conteúdo citoplasmático e paredes celulares pouco coradas, sendo que os núcleos dessas células apresentaram-se XP positivos (Fig. 19 e 20).

Os materiais corados pelo XP, previamente submetidos à digestão pela pepsina foram removidos, uma vez que não foi notado resultado positivo a esse método após a digestão.

3.4. Reação de Feulgen:

A Reação de Feulgen evidenciou os núcleos celulares em magenta e a imagem negativa dos nucléolos. Em sementes quiescentes de C. ensiformis pôde-se verificar a presença de material nuclear mais descompactado se comparado aos resultados obtidos para os cotilédones após 21 dias de embebição (Fig.21 e 22). Em C. gladiata os resultados foram idênticos, com núcleos mais picnóticos em Cg28d. Ao nível dos eixos embrionários e das porções meristemáticas das raízes, os resultados também foram semelhantes para as duas espécies analisadas, podendo-se verificar a presença dos núcleos corados em magenta (Fig.23 e 24). Em todos os casos pôde ser notada uma leve coloração pelo Reativo de Schiff nas paredes celulares e no material citoplasmático (Fig. 21-24).

Fig.17-20: Cortes corados pelo XP. Aumento: 460 X. **Fig.17 • 18:** Eixos embrionários de sementes quiescentes de C. ensiformis e C. gladiata respectivamente. Note o conteúdo citoplasmático corado, mais homogêneo na região de vasos (V) e mais globular e com grânulos não corados no parênquima (P). **Fig.19 • 20:** Cortes da porção apical da raiz em Ce21d e Cg28d respectivamente. Note as paredes celulares e o conteúdo citoplasmático pouco corados em relação aos núcleos, mais corados.



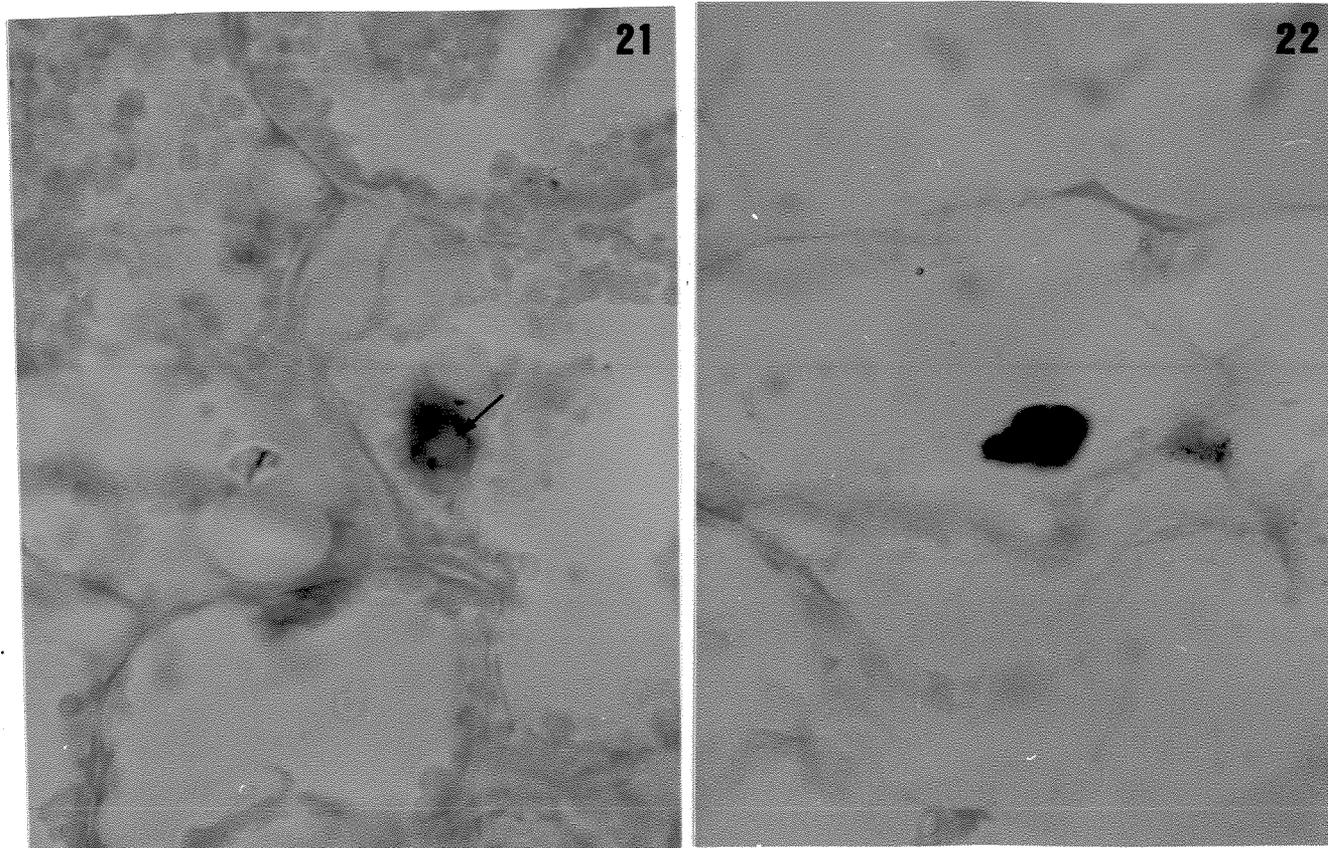


Fig. 21 e 22: Cortes de *C. ensiformis* submetidos à Reação de Feulgen. Aumento: 1150 X. **Fig.21:** Cotilédone de semente quiescente. Nota-se a coloração dos núcleos em magenta e a imagem negativa dos nucléolos (↑). **Fig.22:** Folha cotiledonar após 21 dias de germinação. Os núcleos apresentam-se mais picnóticos, com inúmeras regiões bastante compactadas.

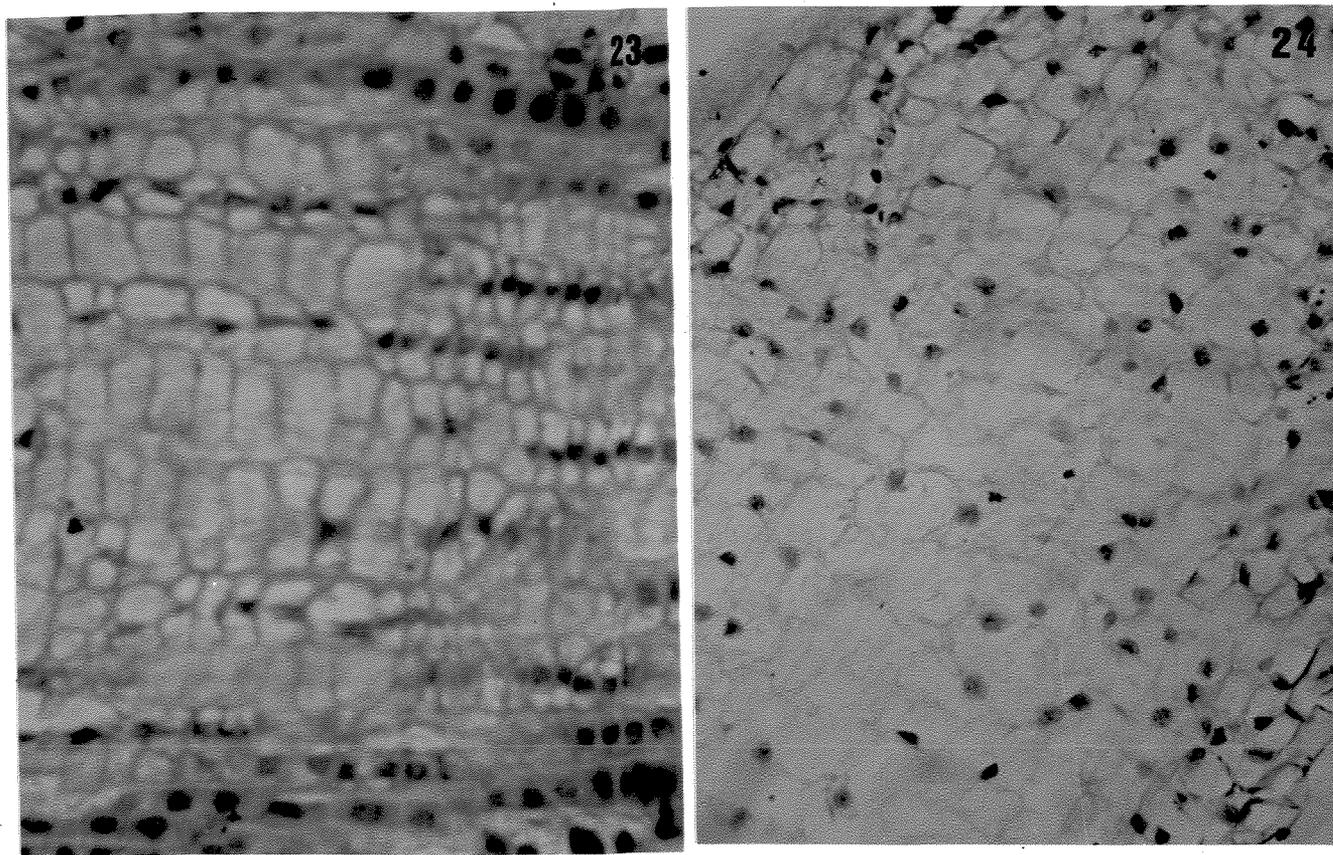


Fig.23 e 24: Cortes de C. ensiformis submetidos à Reação de Feulgen. Podem ser notados os núcleos corados em magenta e a imagem negativa do nucléolo. Aumento: 460 X. **Fig.23:** Eixos embrionários de sementes quiescentes. **Fig.24:** Porção meristemática de raiz com 21 dias após a embebição.

3.5. Coloração pelo PAS:

Os cortes de cotilédones de C. ensiformis e C. gladiata corados pelo PAS evidenciaram as paredes celulares e a presença de grânulos com formato ovóide, fortemente corados, circundados por material menos corado (Fig.25 e 26). Durante o início da germinação os grânulos corados se apresentaram em grande número. Com o passar do tempo, a quantidade e o tamanho desses grãos diminuiu, culminando com um esgotamento quase que total dos mesmos em Ce21d e Cg28d (Fig.27 a 30). Não foram observados grânulos PAS positivos no interior dos vasos dos cotilédones.

Com a utilização deste método pôde ainda ser confirmada a presença de inúmeros poros nos cortes tangenciais das paredes celulares como já descrito nos cortes corados pelo azul de toluidina (Fig.28).

Eixos embrionários de sementes quiescentes das duas espécies analisadas também apresentaram inúmeros grânulos PAS positivos em suas células parenquimáticas. No interior dos vasos e, nas raízes a partir do 7º dia após a embebição, não foi mais detectada a presença desses grânulos.

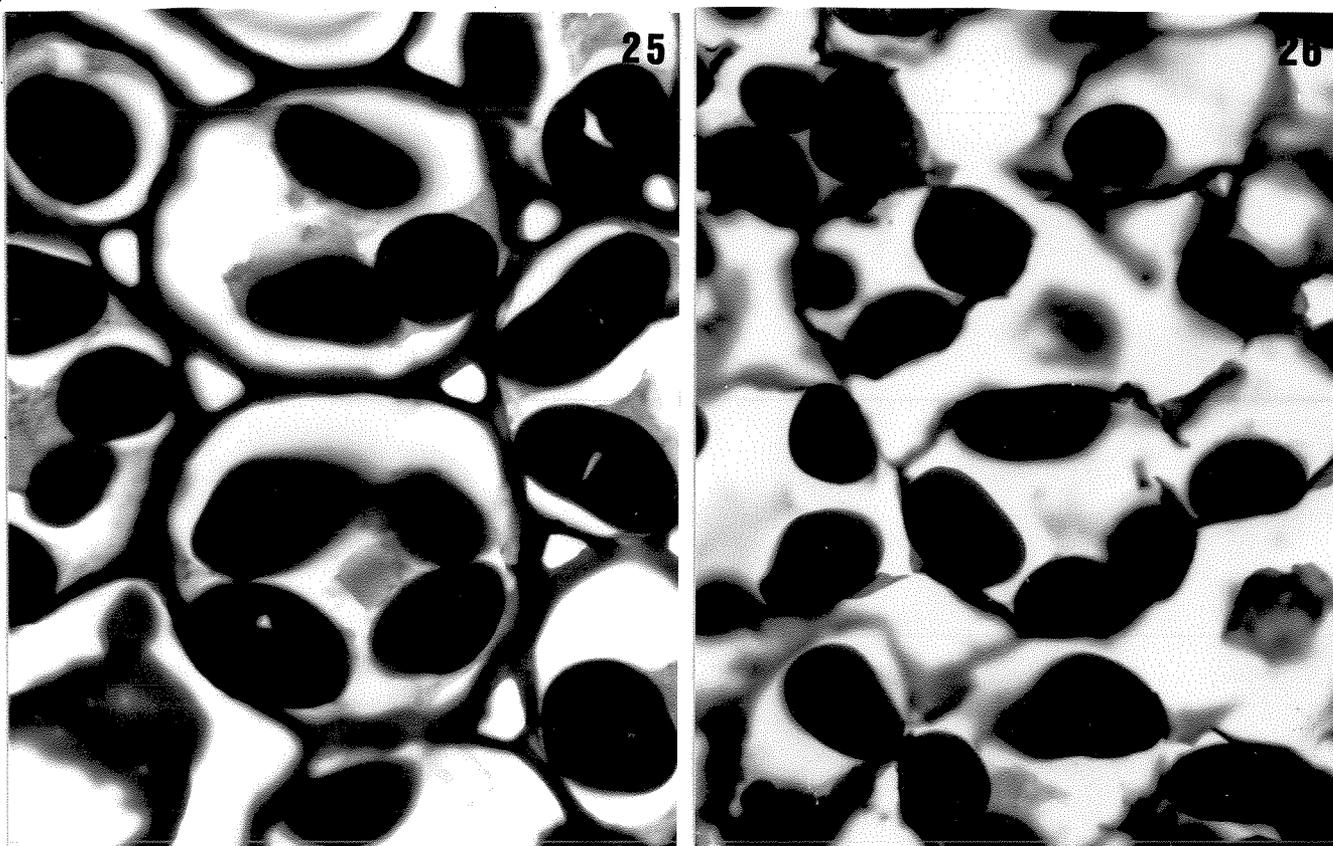
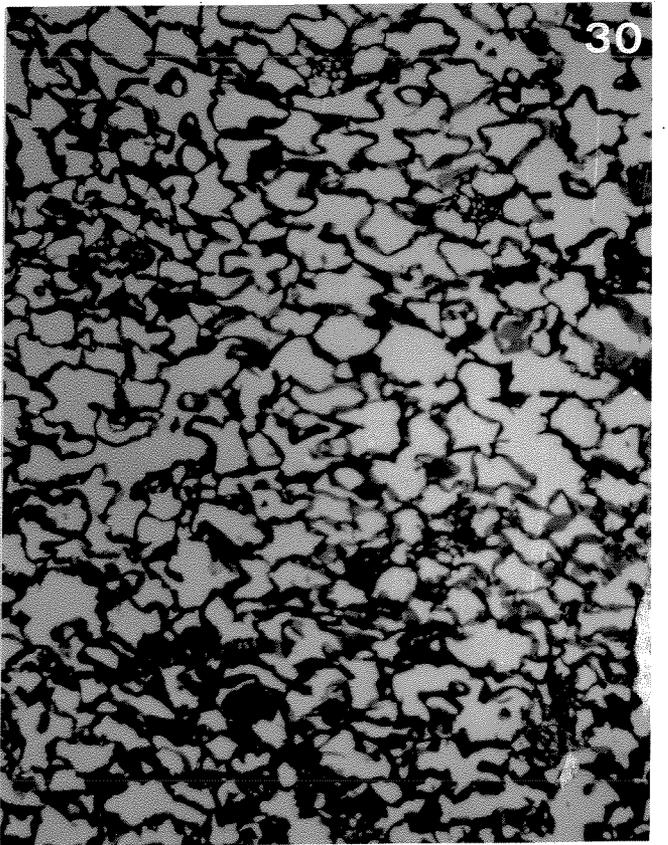
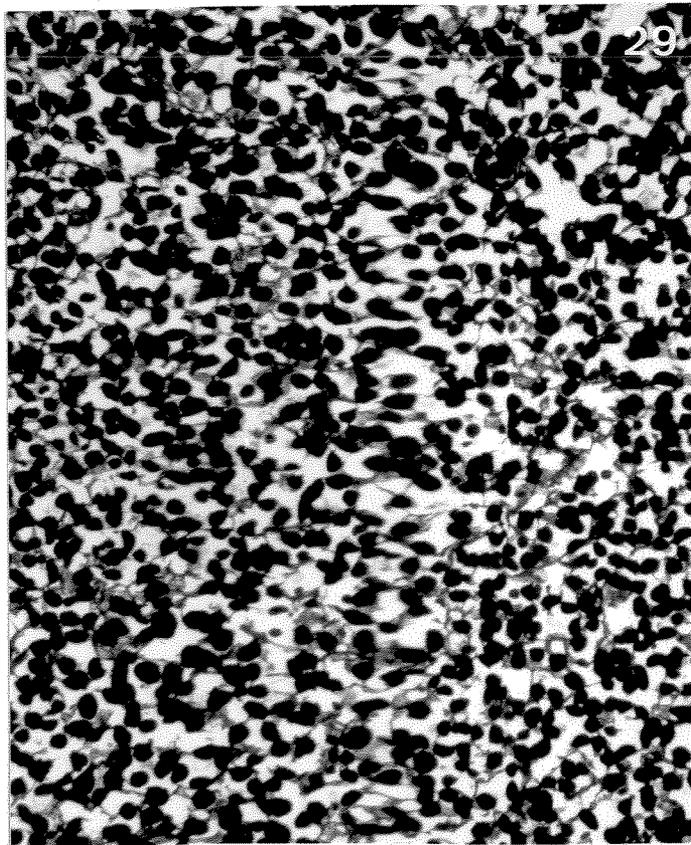
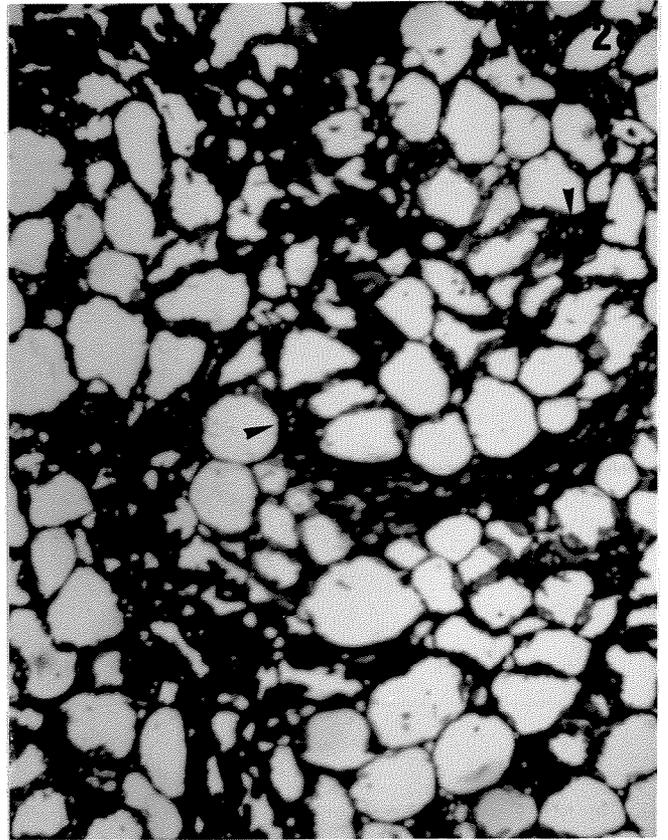
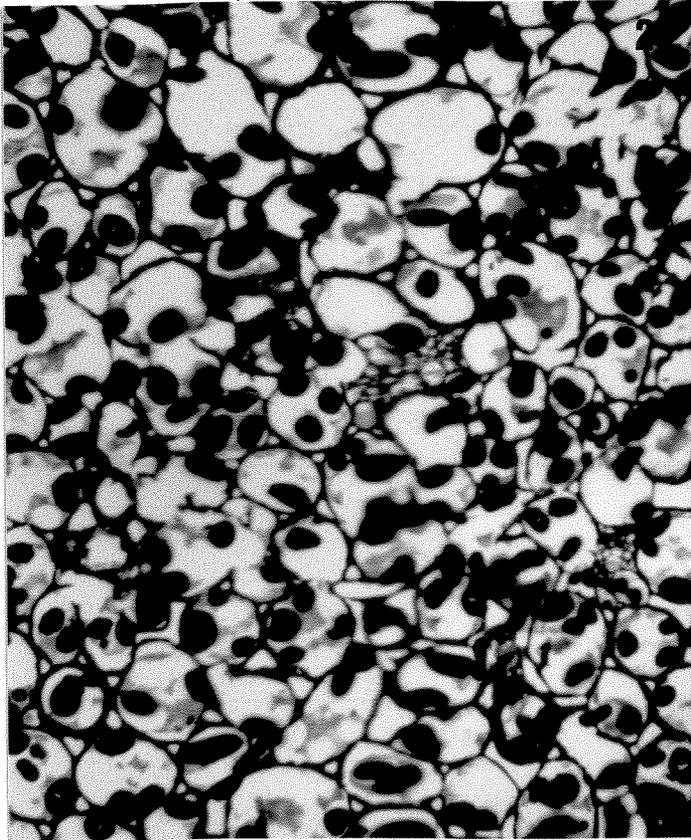


Fig.25 • 26: Detalhe de cortes de células cotiledonares coradas pelo PAS. Nota-se a presença de grãos de amido e as paredes celulares fortemente coradas pelo reativo de Schiff. Aumento: 460 X. Fig.25: C. ensiformis Od, evidenciando o formato arredondado das células e o aspecto mais ovóide dos grãos corados. Fig.26: C. gladiata Od, evidenciando o formato mais irregular das células, um pouco menores que as primeiras. Os grãos citoplasmáticos também apresentam-se ovóides e intensamente corados.

Fig.27-30: Cortes de células cotiledonares submetidas à reação pelo PAS. Note as paredes celulares e grânulos fortemente corados por esse método. Aumento: 225 X. **Fig.27:** Cotilédones de semente quiescente de C. ensiformis. Pode ser notada uma grande quantidade de grãos ocupando as células, cujo formato é arredondado. **Fig.28:** Cotilédone de C. ensiformis após 21 dias de embebição, apresentando inúmeros poros nas paredes celulares (↑). Não é notada a presença de grãos corados. **Fig.29:** Cotilédone de semente quiescente de C. gladiata. As estruturas coradas são as mesmas da Fig.27. **Fig.30:** Cotilédone de C. gladiata após 28 dias de embebição. Observa-se um formato celular mais irregular e a ausência de grãos corados.



Os materiais submetidos ao Reativo de Schiff sem oxidação pelo ácido periódico praticamente não apresentaram nenhuma coloração. Entretanto, o material que circunda os grânulos fortemente corados, menos evidente quando se utilizou a metodologia normal para a reação, foi aquele que continuou apresentando alguma coloração (Fig. 31).

3.6. Áreas e volumes dos grãos de amido:

As figuras 32 e 33 mostram os diagramas esquemáticos do número de grãos de amido por célula em cotilédones de *C. ensiformis* e *C. gladiata* respectivamente, nos diversos tempos analisados. Nessas figuras, cada bloco representa a distribuição das quantidades de grãos de amido por célula cotiledonar ao longo da germinação. A primeira linha horizontal formadora do bloco, representa o 1º quartil, que determina que 25% dos valores obtidos localizam-se abaixo desse ponto. A segunda linha é a mediana, indicando que existem 50% das quantidades observadas abaixo desse valor. A terceira linha horizontal é o 2º quartil, determinando que 75% dos valores obtidos encontram-se abaixo desse ponto. Pontos localizados acima ou abaixo de uma diferença interquartílica e meia foram salientados e são chamados pontos desgarrados. Os pontos desgarrados ocorrem com baixíssima frequência. Não foram encontrados pontos soltos nas medições, que seriam aqueles localizados na região delimitada por uma diferença interquartílica e até uma diferença interquartílica e meia, acima do 2º quartil ou abaixo do 1º (TUKEY, 1977).

Fig.31: Corte de célula cotiledonar de C. ensiformis submetido ao Reativo de Schiff sem oxidação prévia pelo ácido periódico. Pode ser notada uma fraca coloração no material que envolve os grãos intensamente corados quando é realizada a reação do PAS. Esses grãos, não apresentam praticamente nenhuma coloração. Aumento: 460 X.

Fig.32: Diagramas esquemáticos representando as relações entre as quantidades de grãos de amido por célula cotiledonar de C. ensiformis, em sementes quiescentes e após 7, 14 e 21 dias de germinação. # = número de observações; * = menor quantidade de grãos/célula; J_1 = quartil inferior; MD = mediana; J_2 = quartil superior; * = maior quantidade de grãos/célula; X = valor extremo mínimo ou máximo que se encontra dentro do comprimento de uma diferença de junta, da junta respectiva. • = pontos desgarrados.

Canavalia ensiformis

	Ce0d	Ce7d	Ce14d	Ce21d
#	40	40	40	40
*	2	2	2	0
J ₁	3	3	3	0
MD	4	4	3	0
J ₂	5	5	4	1
*	7	7	6	4

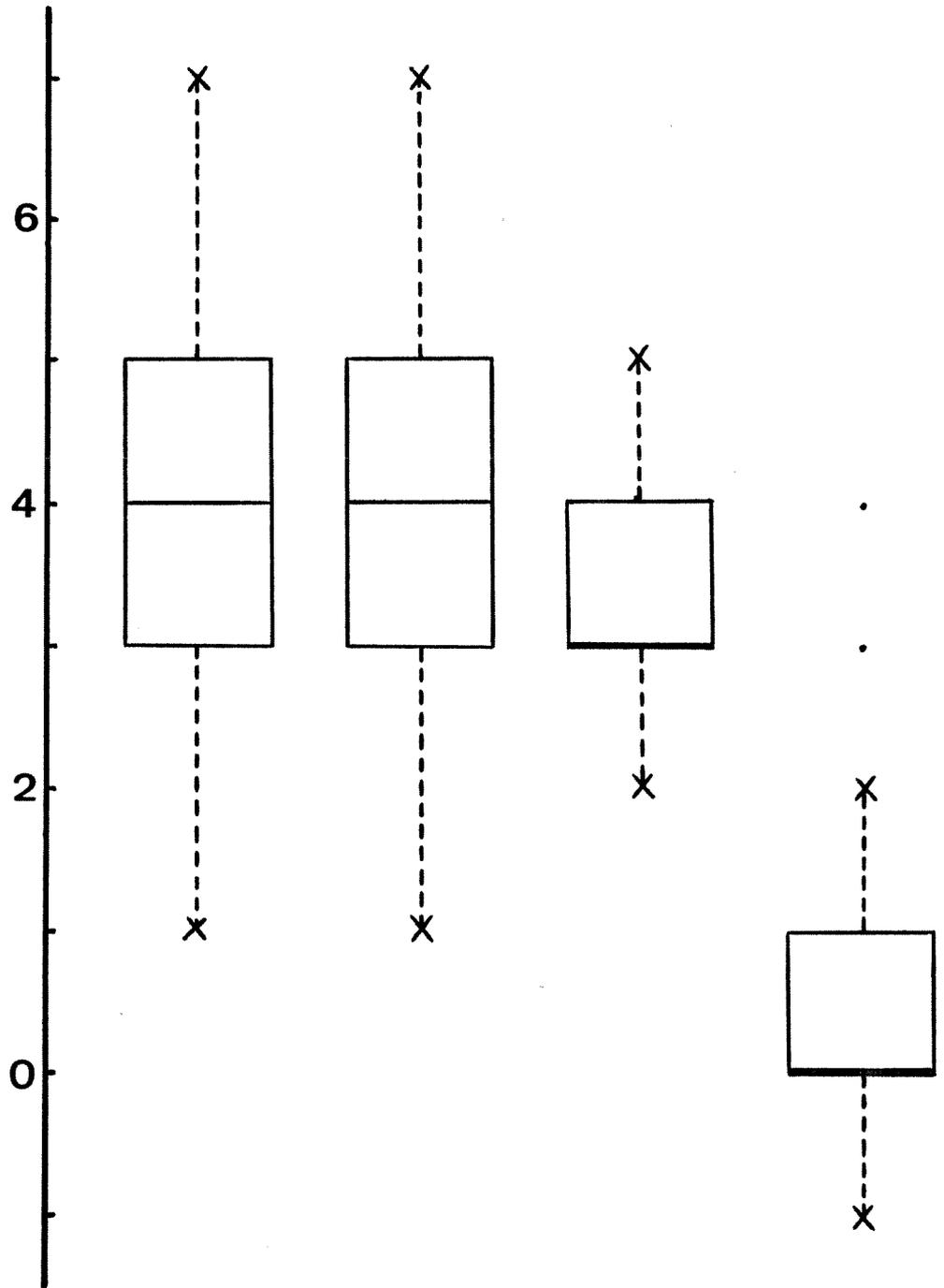
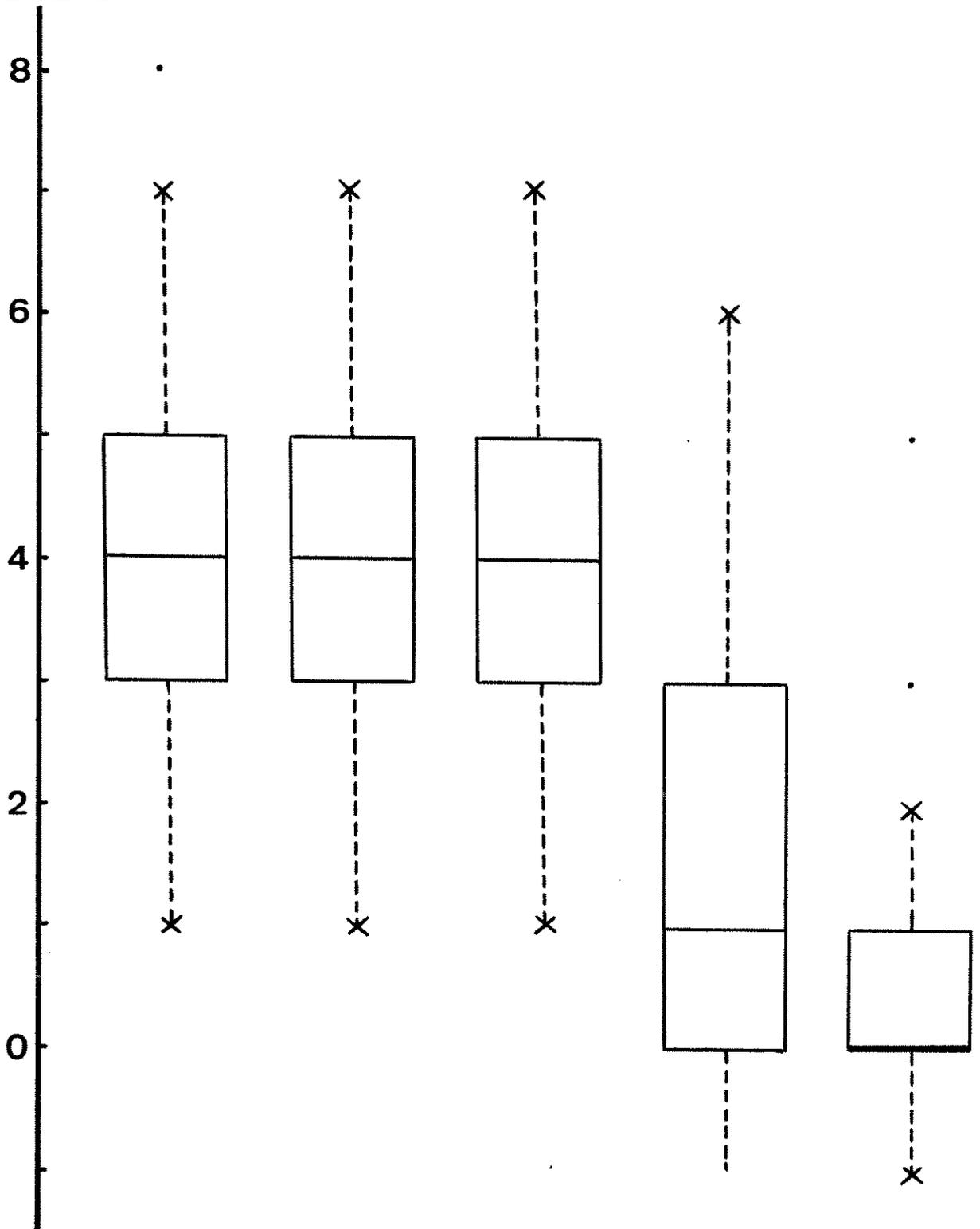


Fig.33: Diagramas esquemáticos representando as relações entre as quantidades de grãos de amido por célula cotiledonar de *C. gladiata*, em sementes quiescentes e após 7, 14, 21 e 28 dias de germinação. # = número de observações; * = menor quantidade de grãos/célula; J_1 = quartil inferior; MD = mediana; J_2 = quartil superior; * = maior quantidade de grãos/célula; X = valor extremo mínimo ou máximo que se encontra dentro do comprimento de uma diferença de junta, da junta respectiva. • = pontos desgarrados.

Canavalia gladiata

	Cg0d	Cg7d	Cg14d	Cg21d	Cg28d
#	40	40	40	40	40
*	2	2	2	0	0
J ₁	3	3	3	0	0
HD	4	4	4	1	0
J ₂	5	5	5	3	1
*	8	7	6	6	5



Na figura 32 pode ser notada uma distribuição bastante homogênea em Ce0d e Ce7d, que diminui em Ce14d, atingindo o seu mínimo em Ce21d, onde mais de 50% das células observadas não apresentaram nenhum grão de amido. Em *C. gladiata* ocorre um comportamento semelhante, com a manutenção das quantidades de grãos de amido até o 14º dia de germinação (Cg0d, Cg7d e Cg14d). Essa quantidade diminui em Cg21d e atinge o mínimo em Cg28d com mais de 50% das células observadas sem nenhum grão de amido (Fig.33). Nessas figuras pode ainda ser observado que algumas células apresentam até 4 ou 5 grãos de amido, apesar de aparecerem com baixíssima frequência (Fig.32 e 33)

A estimativa das áreas ocupadas por cada grão em células contendo a quantidade de grãos obtida no 1º quartil, mediana e 2º quartil em *C. ensiformis* e *C. gladiata*, encontra-se descrita na Tabela 4. As determinações revelaram que as áreas desses grãos não apresentam entre si diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade nas células de cotilédones com o mesmo tempo de embebição, exceto em células de Ce0d com 5 grãos, que apresentaram uma área um pouco inferior às demais e em células de Ce21d, Cg21d e Cg28d, com 1 grão, que acabaram tendo uma área maior pois as demais células não apresentaram em seu interior nenhum amido (Tabela 4).

Os valores encontrados para os volumes desses grãos, revelaram basicamente as mesmas semelhanças e diferenças obtidas nas estimativas das áreas, salientando a se-

TABELA 4: Valores das áreas (μm^2) de grãos de amido em células cotiledonares de Canavalia ensiformis e C. gladiata em sementes quiescentes e após diversos tempos de embebição.

Tempo	Grãos/célula		
	1º Quartil (J_1)	Mediana (MD)	2º Quartil (J_2)
Ce0d	406,1 a	440,6 a	293,2 c
Ce7d	375,0 a,b	370,5 a,b	334,2 b,c
Ce14d	270,0 c	279,2 c	254,9 c
Ce21d	-----	-----	24,9 e
Cg0d	367,8 a,b	404,3 a,b	384,1 a,b
Cg7d	379,9 a,b	374,5 a,b	337,8 a,b
Cg14d	385,3 a,b	319,2 b,c	307,4 c
Cg21d	-----	103,2 d	125,3 d
Cg28d	-----	-----	105,6 d

Cada valor corresponde à média de 120 medições; valores acompanhados por letras iguais não apresentam entre si diferenças significativas ao nível de $P = 0,01$.

semelhança existente entre as células contendo 3 e 4 grãos de amido em Ce0d e Ce7d, e as células de Cg0d, Cg7d e Cg14d que praticamente não apresentaram diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade. É bom salientar ainda que, apesar de serem encontradas células contendo 1 grão de amido em Ce21d, os valores de seus volumes foi nitidamente inferior aos demais. Da mesma forma, em Cg21d e Cg28d os valores obtidos foram bem menores do que nos demais tempos analisados para essa espécie (Tabela 5).

A área total ocupada pelos grãos de amido em uma determinada célula, tendeu a aumentar a medida que aumentou o número de grãos por célula, quando analisadas as células cotiledonares com o mesmo tempo de embebição e tenderam a diminuir à medida que esse tempo aumentou. Entretanto, até o 7º dia de embebição em C. ensiformis e até o 14º dia em C. gladiata, esses valores guardaram entre si uma certa semelhança (Tabela 6).

Os resultados obtidos nos cálculos dos volumes confirmaram essa semelhança entre Ce0d e Ce7d, mostrando um nítido decaimento nos volumes a partir de Ce14d, que culminou com o esgotamento dessa reserva em torno do 21º dia de germinação, quando ocorreu a abscisão dos cotilédones. Em C. gladiata, os volumes totais por célula se mantiveram semelhantes até o 14º dia, notando-se seu decaimento no 21º dia e em Cg28d houve a abscisão dos cotilédones e o maior número de células sem nenhum amido. Em termos comparativos, pôde ser notada a semelhança entre C. ensiformis até o 7º dia e C. gladiata até o 14º dia de germinação (Tabela 7).

TABELA 5: Valores dos volumes (μm^3) de grãos de amido em células cotiledonares de Canavalia ensiformis e C. gladiata em sementes quiescentes e após diversos tempos de embebição.

Tempo	Grãos/célula		
	1º Quartil (J_1)	Mediana (MD)	2º Quartil (J_2)
Ce0d	5.085,2 a	5.841,4 a	3.252,8 b
Ce7d	4.533,0 a	4.489,6 a	4.039,3 a,b
Ce14d	2.712,1 b	2.965,4 b	2.507,9 b
Ce21d	-----	-----	88,1 d
Cg0d	4.934,7 a	5.552,1 a	4.893,2 a
Cg7d	4.412,5 a	4.638,1 a	3.922,1 a,b
Cg14d	4.529,0 a	3.629,8 b	3.601,9 b
Cg21d	-----	672,2 c	867,8 c
Cg28d	-----	-----	753,8 c

Cada valor corresponde à média de 120 medições; valores acompanhados por letras iguais, não apresentam entre si diferenças significativas ao nível de $P = 0,01$.

TABELA 6: Valores das áreas (μm^2) do total de grãos de amido por célula em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata*, em sementes quiescentes e após diversos tempos de embebição.

MATERIAL	1º Quartil (J_1)	Mediana	2º Quartil (J_2)
Ce0d	1.218,4 b	1.755,4 a	1.430,5 a,b
Ce7d	1.125,1 b	1.460,1 a,b	1.647,5 a
Ce14d	810,1 c	837,6 c	1.025,3 b,c
Ce21d	-----	-----	25,6 f
Cg0d	1.135,4 b	1.637,3 a	1.920,5 a
Cg7d	1.148,2 b	1.497,4 a,b	1.689,0 a
Cg14d	1.157,0 b	1.285,0 b	1.537,2 a,b
Cg21d	-----	91,9 e	370,3 d
Cg28d	-----	-----	99,9 e

Cada valor corresponde à média de 24 células; valores acompanhados por letras iguais não apresentam entre si diferenças significativas ao nível de $P = 0,01$.

TABELA 7: Valores dos volumes (μm^3) do total de grãos de amido por célula em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata*, em sementes quiescentes e após diversos tempos de embebição.

MATERIAL	1º Quartil (J_1)	Mediana	2º Quartil (J_2)
Ce0d	15.165,7 b	23.235,2 a	15.733,3 a,b
Ce7d	13.839,6 b,c	17.439,5 a,b	19.898,9 a,b
Ce14d	8.169,4 d	8.869,3 d	10.331,4 c,d
Ce21d	-----	-----	94,4 g
Cg0d	15.443,2 b	22.171,2 a	24.474,2 a
Cg7d	13.250,2 b,c	18.477,8 a,b	19.863,6 a,b
Cg14d	13.677,8 b,c	14.685,7 b,c	18.307,3 a,b
Cg21d	-----	561,9 f	2.557,5 e
Cg28d	-----	-----	715,3 f

Cada valor corresponde à média de 24 células; valores acompanhados por letras iguais não apresentam entre si diferenças significativas ao nível de $P = 0,01$.

Os resultados obtidos nos cálculos das áreas ocupadas pelas células cotiledonares das duas espécies foram diferentes ao nível de $P = 0,01$, valendo $4.060 \mu\text{m}^2$ para C. ensiformis e $2.884 \mu\text{m}^2$ para C. gladiata. Além disso, o número de células por campo analisado também se apresentou maior na primeira espécie, devido as inúmeras lacunas existentes entre as células cotiledonares na segunda. Do mesmo modo, os volumes das células cotiledonares mostraram-se cerca de 65% maiores em C. ensiformis em relação a C. gladiata (Tabela 8).

3.7. Microscopia de polarização:

A análise dos materiais em microscópio de polarização com polarizador e analisador cruzados revelou a birrefringência das paredes celulares e dos grãos PAS positivos, com formato em "cruz de malta" (Fig.34). Não foram observadas estruturas com esse formato no interior de vasos dos diversos materiais analisados, confirmando a ausência desses grânulos, já observada no material corado pelo PAS.

As medições dos retardos ópticos apresentados pelas paredes nos cortes embebidos em água, glicerol 100% ou nujol, revelaram um comportamento semelhante nas duas espécies analisadas, com uma tendência à diminuição dos retardos a partir do início da embebição e um retorno aos valores iniciais em Ce21d e Cg28d. A birrefringência de forma foi maior para os materiais embebidos em nujol (Tabela 9).

TABELA 8: Valores das áreas e volumes das células cotiledo-
nares de C. ensiformis e C. gladiata.

Parâmetro	<u>C. ensiformis</u>	<u>C. gladiata</u>
Área das células (μm^2)	4.060 \pm 703	2.884 \pm 605
Volume das células (μm^3)	181.863 \pm 44.863	109.199 \pm 37.668

Os valores acima representam em cada caso, a média de 50 medições efetuadas e são estatisticamente diferentes ao nível de 1% de probabilidade.

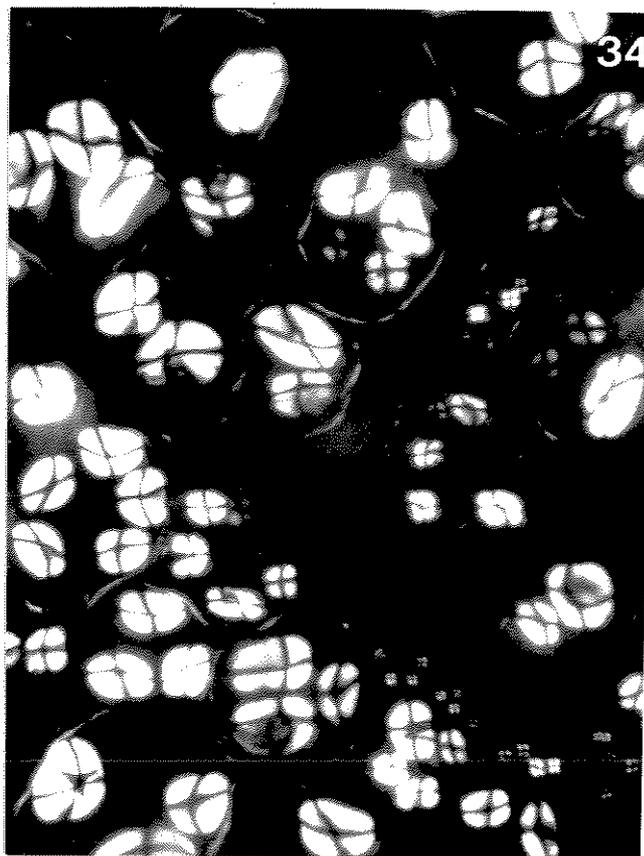


Fig.34: Corte de cotilédone de C. ensiformis visualizado em microscópio de polarização com analisador e polarizador cruzados. Pode ser observada a birrefringência das paredes celulares e o aspecto em "cruz de malta" dos grânulos PAS positivos. Aumento: 290 X.

TABELA 9: Valores dos retardos ópticos (em nm) de paredes celulares de cotilédones de C. ensiformis e C. gladiata em diversos tempos de embebição.

MATERIAL	Água	Glicerol 100%	Nujol
Ce0d	19,408 d	15,009 b,e	32,259 b
Ce7d	20,617 c,d	9,205 c	25,719 c,d
Ce14d	17,609 d	10,268 c	25,013 e,d
Ce21d	20,585 c,d	11,232 b	29,741 b,c
Cg0d	27,893 b	18,018 a	36,657 a
Cg7d	23,904 c	15,467 a,b	27,779 c
Cg14d	25,604 b,c	15,990 a,b	23,626 d
Cg21d	22,677 c	13,342 b	23,004 d
Cg28d	34,155 a	17,789 a	39,992 a

Ce: Canavalia ensiformis; Cg: Canavalia gladiata; Cada valor representa a média de 20 medições. Valores acompanhados por letras iguais em uma mesma coluna, não apresentam diferenças significativas ao nível de $P = 0,01$.

A birrefringência intrínseca (embebição em glicerol a 100%) em Ce0d representou 77% do valor da birrefringência obtida para o material embebido em água. Esse valor decaiu para cerca de 55% em Ce21d. Em *C. gladiata* 0d, essa relação foi de 65% e em Cg28d, de 52%. A relação dos retardos obtidos em glicerol a 100% e nujol revelaram valores abaixo de 50% para as duas espécies nas paredes celulares dos cotilédones de sementes quiescentes (46% em Ce0d e 49% em Cg0d) e no tempo em que ocorreu a abscisão dos cotilédones (37% em Ce21d e 44% em Cg28d). Além disso, o valor da birrefringência intrínseca de Cg0d e Cg28d apresentaram-se maiores do que em Ce0d e Ce21d (Tabela 9).

3.8. Extração, dosagem e caracterização de ácidos graxos dos lipídios:

Os resultados obtidos nas extrações de lipídios encontram-se descritos na Tabela 10. Nela pode-se observar que o conteúdo total de lipídios é baixo nessas sementes e em *C. ensiformis* é 70,7% maior do que em *C. gladiata*. Entretanto, devido ao maior peso das sementes desta última, o conteúdo de lipídios por semente atinge praticamente o dobro do valor (102 mg/semente) obtido para *C. ensiformis* (52 mg), (Tabela 10).

TABELA 10: Relação entre o conteúdo de lipídios e peso fresco e seco (dados da Tabela 1) em cotilédones de sementes quiescentes de C. ensiformis e C. gladiata:

Espécie	mg/100mgPF	mg/100mgPS	mg/PT
<u>C. ensiformis</u>	3,53±0,23	3,94±0,26	52,2
<u>C. gladiata</u>	2,07±0,13	2,28±0,14	102,5

Dados expressos em miligramas de lipídio por 100 miligramas de peso fresco (PF) ou peso seco (PS), ou em mg de lipídio por peso total (PT) das sementes.

As Figuras 35 e 36 apresentam os gráficos das cromatografias líquido gasosas (GLC) dos ácidos graxos componentes do óleo obtido na dosagem. Para *C. ensiformis* foram observados 11 picos (Fig.35) e para *C. gladiata*, 13 (Fig.36). O principal componente nas duas espécies é o ácido esteárico e em *C. ensiformis* seu conteúdo representa praticamente 60% do total de lipídios. Também aparecem em *C. ensiformis*, quantidades apreciáveis de ácido palmítico (16,5%) e oléico (12,4%). Em *C. gladiata*, além do ácido esteárico (37,59%), os ácidos oléico (30,6%), palmítico (15,7%) e linoléico (11%) aparecem em grande quantidade. Foram identificados praticamente todos os ácidos graxos componentes da reserva lipídica (Tabela 11).

O índice de peróxidos para as duas sementes foi zero, pois após a adição do amido não houve a formação da cor azul, não havendo assim titulação com o tiosulfato de sódio.

3.9. Dosagem de amido:

Os resultados das dosagens de amido para cotilédones ou folhas cotiledonares das duas espécies e nos diversos tempos analisados encontram-se descritos na Tabela 12. Pode ser notada uma diminuição dos valores a partir da embebição quando os dados são apresentados em relação ao peso fresco ou peso seco. Entretanto, esses valores se modificam tornando-se mais próximos em Ce0d e Ce7d e em Cg0d, Cg7d e

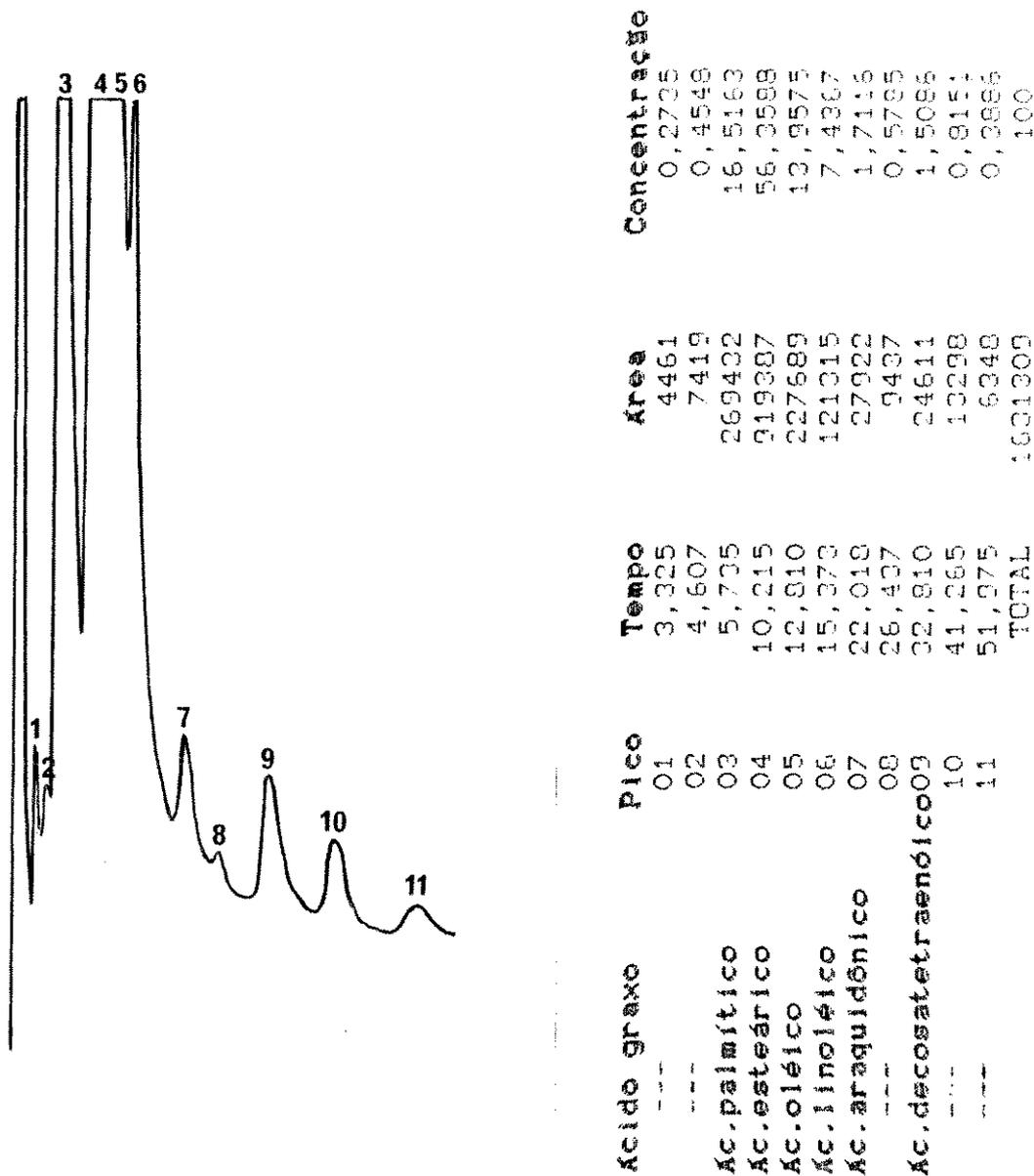


Fig.35: Cromatograma da GLC de *C. ensiformis*. Nota-se a presença de 11 picos. As concentrações obtidas pelo integrador encontram-se descritas na figura.

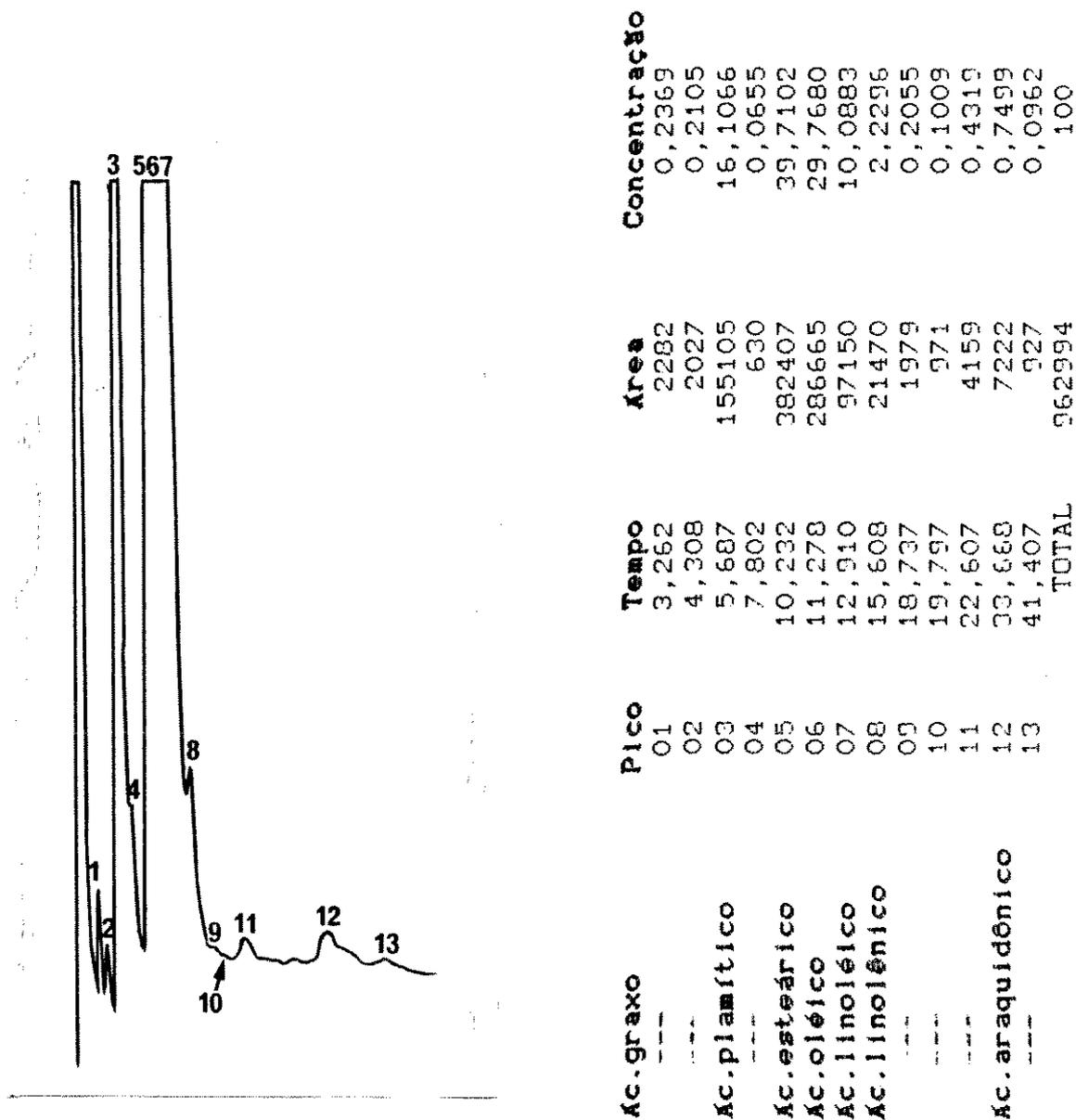


Fig. 36: Cromatograma da GLC de *C. gladiata*. Nota-se a presença de 13 picos. As concentrações obtidas pelo integrador encontram-se descritas na figura.

TABELA 11: Composição de ácidos graxos do óleo de cotilédones de C. ensiformis e C. gladiata:

Ácido Graxo		<u>C. ensiformis</u>	<u>C. gladiata</u>
Ácido palmítico	16:0	16,554±0,05	15,708±0,56
Ácido esteárico	18:0	59,349±4,22	37,590±2,99
Ácido oléico	18:1	12,436±2,15	30,619±1,20
Ácido linoléico	18:2	6,287±1,62	11,049±1,35
Ácido linolênico	18:3	-	2,368±0,19
Ácido araquidônico	20:4	1,746±0,04	0,878±0,63
Ácido decosatetraenóico	22:4(?)	1,606±0,02	-
Total identificado:.....		97,978%	98,212%
Ácidos graxos não identificados:....		2,022%	1,788%

Dados obtidos a partir de 2 repetições dos cromatogramas obtidos na GLC e ácidos determinados a partir de padrões de ácidos graxos (Sigma) submetidos ao mesmo método.

Cg14d, quando são apresentados em relação ao peso seco, apesar de ser notado um aumento no conteúdo de amido em Ce7d (Tabela 12).

O conteúdo de amido chega a atingir 56,4% do peso seco em Ce0d e 52,9% em Cg0d. Essas quantidades diminuem chegando a 23% em Ce21d e Cg28d. Pode ainda ser notado um acentuado decréscimo no conteúdo de amido por cotilédones da semente, que em Ce0d representa 744,7 mg do peso total dos cotilédones e em Ce21d apresenta pouco mais de 26 mg. Em Cg0d observa-se mais de 2.394 mg por cotilédones, diminuindo gradativamente para pouco mais de 49 mg em Cg28d (Tabela 12).

A análise de regressão da comparação dos dados relativos ao peso seco e ao número de grãos obtidos pela mediana (Fig.32 e 33) revelou a existência de uma relação entre os mesmos, sendo para essas espécies, igual à seguinte equação:

$$\text{mg amido/gPS} = \exp[5,3052 + 0,2024 (\text{n}^\circ \text{ de grãos} + 1)]$$

Os resultados das dosagens de amido em eixos embrionários e raízes das duas espécies e vários tempos utilizados, encontram-se descritos na Tabela 13. Pode-se notar que o conteúdo de amido nos eixos embrionários representa cerca de 10-14% de seu peso seco ou fresco. Após 7 dias de embebição, nota-se um aumento da relação do amido/peso seco em *C. ensiformis* e, a partir do 14º dia, essa relação se estabiliza entre 7-9% (Tabela 13).

TABELA 12: Relação entre o conteúdo de amido e os pesos fresco e seco (dados da Tabela 3), em cotilédones de C. ensiformis e C. gladiata, em diversos tempos de embebição.

Tempo	mg amido/gPF	mg amido/gPS	mg amido/PT
Ce0d	506,61±10,26 a	564,15±11,42 b	744,72
Ce7d	224,61± 4,30 b	725,73±13,88 a	754,69
Ce14d	39,21± 1,38 e	417,10±14,73 e	125,47
Ce21d	31,83± 1,90 e	231,34±13,83 g	26,32
Cg0d	485,78± 8,48 a	529,92± 9,25 c	2.394,90
Cg7d	156,35±11,49 e	483,14±35,52 d	1.662,00
Cg14d	62,50± 1,97 d	506,08±15,93 c,d	571,88
Cg21d	76,67± 3,45 d	360,80±16,25 f	270,64
Cg28d	26,77± 1,58 e	234,60±13,85 g	49,25

Cada valor corresponde à média de 3 repetições; PF = peso fresco; PS = peso seco; PT = peso total da semente, em grammas. Valores acompanhados por letras iguais em uma mesma coluna, não apresentam diferenças significativas ao nível de $P = 0,01$.

TABELA 13: Relação entre o conteúdo de amido e os pesos fresco e seco em eixos embrionários e raízes de *C. ensiformis* e *C. gladiata*, em diversos tempos de embebição.

Tempo	mg amido/gPF	mg amido/gPS
Ce0d	96,82± 4,89 b	106,59± 5,38 c
Ce7d	7,13± 0,27 c	178,25± 6,72 a
Ce14d	3,19± 0,14 c	79,73± 3,38 d
Ce21d	3,94± 0,00 c	98,44± 0,00 d
Cg0d	132,41±19,24 a	144,44±20,99 b
Cg7d	5,06± 0,46 c	126,56±11,48 b,c
Cg14d	3,09± 0,61 c	77,34±15,19 d
Cg21d	2,91± 0,58 c	72,65±14,45 d
Cg28d	3,38± 0,35 c	86,76± 8,76 d

Cada valor corresponde à média de 3 repetições; PF = peso fresco; PS = peso seco; Conforme média de 50 medições, 1g de PF de raízes corresponde a 0,04g de PS; para eixos embrionários, o PS utilizado foi o descrito na Tabela 1. Valores acompanhados por letras iguais em uma mesma coluna, não apresentam diferenças significativas ao nível de $P = 0,01$.

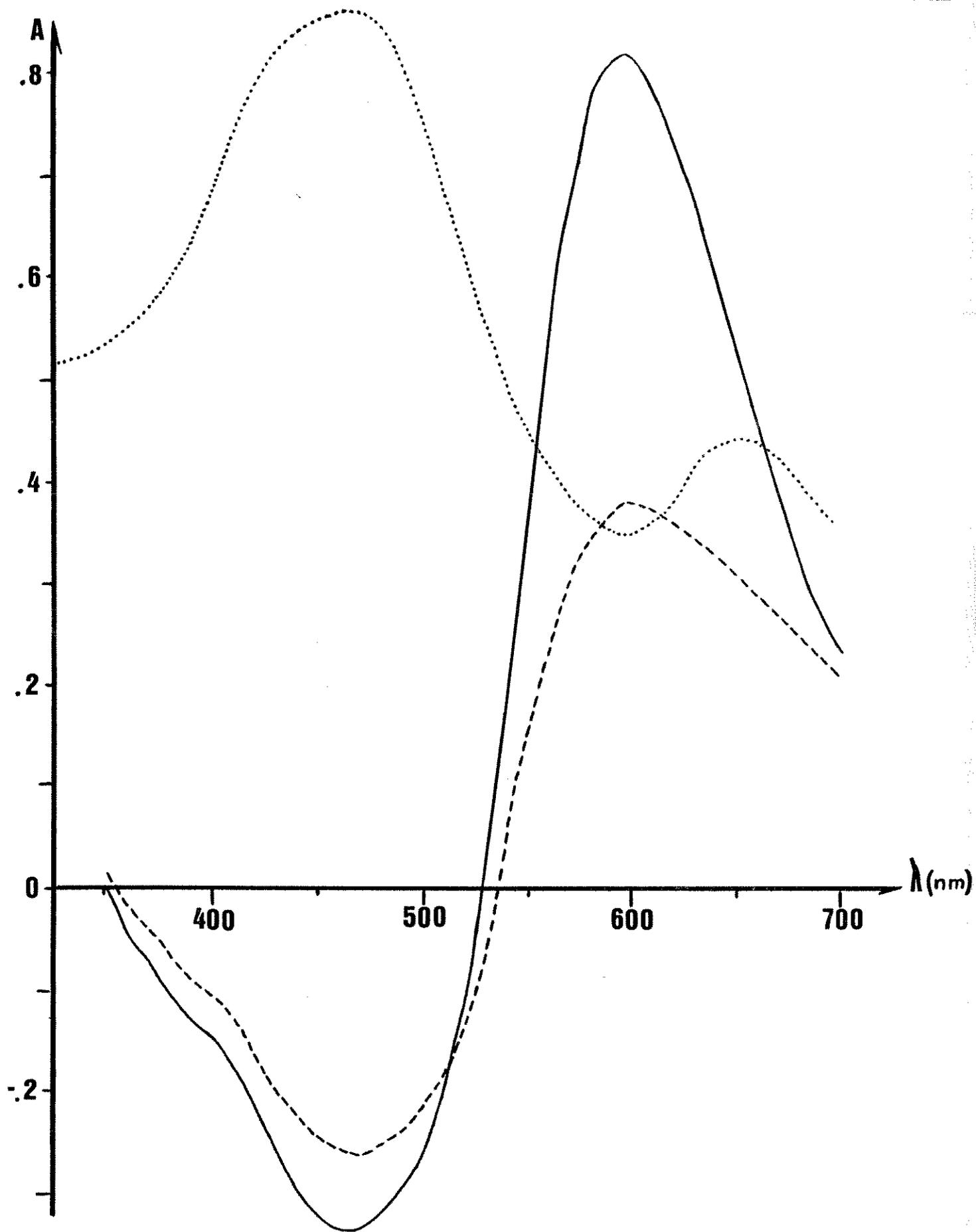
A partir dos dados de peso dos eixos embrionários existentes na Tabela 1, pôde-se calcular a quantidade de amido por eixo embrionário. Em *C. ensiformis* existem 1,05 mg de amido por eixo e em *C. gladiata*, 3,18 mg.

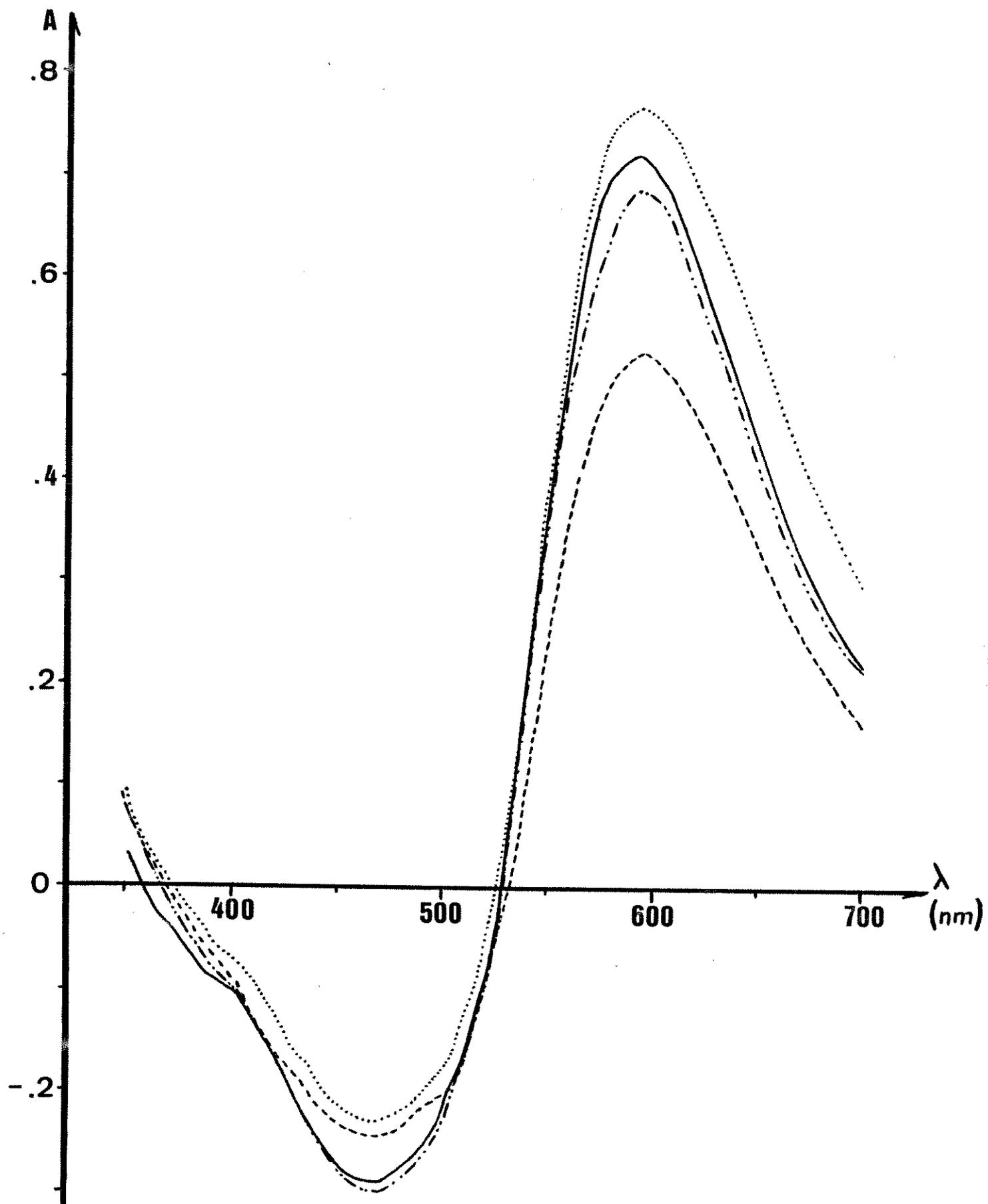
Em relação aos cálculos das quantidades de amido por peso seco das raízes, utilizou-se um valor médio obtido para raízes em diversos tempos de germinação, ou seja: a cada grama de peso fresco de raízes, corresponde aproximadamente 0,04 g de peso seco.

3.10. Dosagem de proteínas:

As curvas espectrais realizadas com as soluções de BSA e os extratos protéicos totais e das frações de globulinas (vicilinas e leguminas) das duas espécies, apresentaram um perfil semelhante, com pico de absorção em $\lambda = 595$ nm em todos os casos. A curva espectral da solução de Coomassie blue utilizada apresentou seu pico em $\lambda = 460$ nm. Após a reação dessa solução com o material protéico foi observada uma diminuição desse pico em 460 nm e um aumento do mesmo em 595 nm. Na faixa de comprimentos de onda entre 350-370 nm e 520-530 nm obteve-se valores negativos de absorbância (Fig.37 e 38).

Os picos de absorção em $\lambda = 595$ nm para os extratos totais, fração leguminas e vicilinas, não apresentaram diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade.





de para as duas espécies. Entretanto, o valor da absorbância em 595 nm para vicilinas foi maior do que para leguminas e o extrato protéico total apresentou um valor intermediário mas mais próximo da fração vicilina. Na Fig.38 são apresentadas as curvas de absorção dos extratos protéicos totais das duas espécies, além das curvas espectrais de leguminas e vicilinas de C. ensiformis.

As retas padrão obtidas para as soluções de BSA e dos extratos protéicos totais em diferentes concentrações, encontra-se na Fig. 39. Pode-se notar um menor coeficiente angular das retas do extrato protéico das duas espécies analisadas em comparação à curva obtida com as soluções de BSA, que apresenta maiores valores de absorbância (Fig.39).

Os resultados das dosagens de proteínas foram subdivididos em duas Tabelas. Na primeira, Tabela 14, foram calculados valores em mg de proteína/peso, obtidos após o confronto dos valores das absorbâncias no método do Coomassie Blue e a reta padrão obtida para as soluções com concentrações conhecidas de BSA (Fig.39). Na segunda, Tabela 15, os valores foram calculados a partir do confronto com a reta padrão do extrato protéico total (Fig.39).

Os resultados obtidos nas dosagens do material protéico/BSA (Tabela 14) revelaram um conteúdo protéico maior para C. gladiata (37,3%) do que para C. ensiformis (26,6%). A queda brusca desse conteúdo em relação ao peso seco dos cotilédones se dá a partir do 14º dia de germinação, atingindo 3,1% em Ce21d e 8,0% em Cg28d. Em Ce7d,

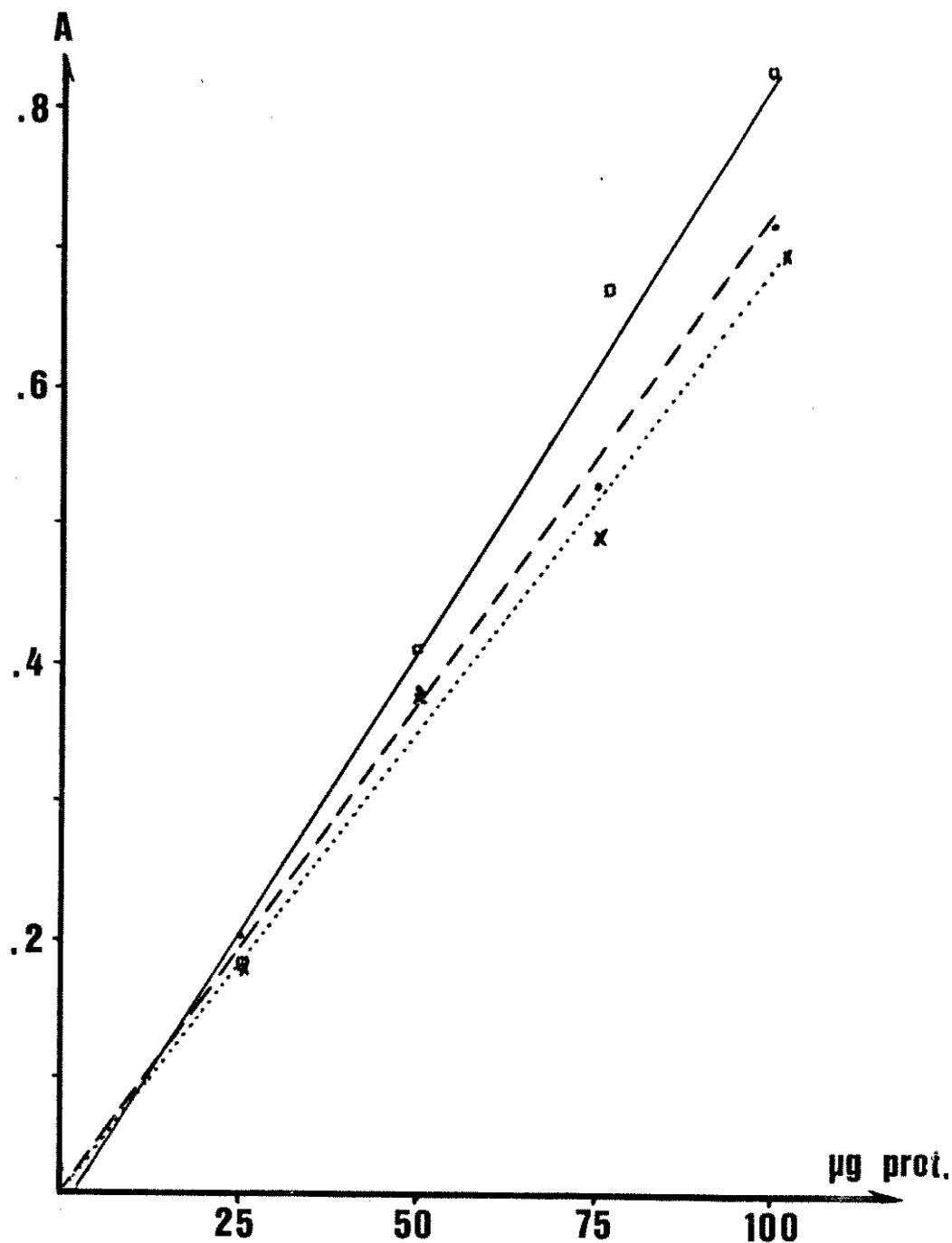


Fig.39: Retas padrão obtidas pelas medições das absorbâncias de soluções contendo 25, 50, 75 e 100 µg de material protéico em 0,1 ml de solução. (—): BSA; (---): EPT de *C. ensiformis*; (.....): EPT de *C. gladiata*.

Ce14d, Cg7d e Cg14d, os valores são bastante próximos e em torno de 200 mg de proteína/g de peso seco. Em relação ao conteúdo protéico total por semente, os resultados revelaram 0,35 g de proteína nos dois cotilédones em Ce0d e 1,67 g em Cg0d (Tabela 14).

As dosagens do material protéico em relação à reta padrão dos extratos protéicos totais (Fig. 39), revelaram resultados ligeiramente superiores para os tempos iniciais, tendendo a uma aproximação para menores valores de material protéico. Com a utilização dessa técnica, Ce0d contém 30,1% de proteínas em relação ao seu peso seco e Cg0d, 44,3%. Do mesmo modo que os resultados das dosagens em relação ao BSA, a queda acentuada no conteúdo protéico foi a partir do 14º dia de germinação (Tabela 15).

• O confronto entre os resultados obtidos nas Tabelas 14 e 15 encontra-se descrito na Tabela 16. Pode-se notar que em relação ao peso fresco, a partir do 7º dia de germinação não existem diferenças significativas entre os resultados obtidos nos dois procedimentos. Entretanto, em relação ao peso seco, isto só se verifica a partir do 14º dia de germinação para *C. ensiformis* e a partir do 21º dia em *C. gladiata* (Tabela 16).

As dosagens do material protéico nos eixos embrionários ou raízes das duas espécies demonstraram um alto conteúdo dessa reserva, atingindo em ambas, pouco mais de 30% do peso seco.

TABELA 14: Relação entre o conteúdo de proteínas calculado a partir da reta padrão com solução de BSA e os pesos fresco e seco (dados da Tabela 3), em cotilédones de *C. ensiformis* e *C. gladiata*, em diversos tempos de embebição.

Tempo	mg prot./gPF	mg prot./gPS	mg prot./PT
Ce0d	238,51± 8,61 b	265,60± 9,58 b	350,61
Ce7d	65,35± 3,85 c	211,15±12,43 c	219,58
Ce14d	16,32± 0,32 d,e	173,56± 3,40 d	52,22
Ce21d	4,30± 0,12 e	31,27± 0,89 g	3,56
Cg0d	338,35±11,74 a	373,17±12,94 a	1.668,07
Cg7d	58,49± 2,81 c	180,75± 8,67 d	621,75
Cg14d	27,94± 0,80 d	226,26± 6,47 c	255,65
Cg21d	21,90± 0,74 d,e	103,03± 3,50 e	77,31
Cg28d	9,11± 0,41 d,e	79,87± 3,61 f	16,76

Cada valor corresponde à média de 3 repetições; PF = peso fresco; PS = peso seco; PT = peso total da semente, em grammas. Valores acompanhados por letras iguais em uma mesma coluna, não apresentam diferenças significativas ao nível de $P = 0,01$

TABELA 15: Relação entre o conteúdo de proteínas calculado a partir da reta padrão com solução do extrato total e os pesos fresco e seco (dados da Tabela 3), em cotilédones de C. ensiformis e C. gladiata, em diversos tempos de embebição.

Tempo	mg prot./gPF	mg prot./gPS	mg prot./PT
Ce0d	270,43±10,25 b	301,15±11,41 b	397,53
Ce7d	74,73± 2,72 c	241,46± 8,77 d	251,09
Ce14d	18,41± 0,36 d,e	195,82± 3,91 e	58,91
Ce21d	4,91± 0,21 e	35,65± 1,53 h	4,06
Cg0d	402,04±15,65 a	443,47±17,23 a	1.982,06
Cg7d	69,64± 3,22 c	215,19± 9,95 e	740,27
Cg14d	32,78± 0,78 d	265,41± 6,36 c	299,94
Cg21d	25,96± 0,92 d,e	122,15± 4,31 f	91,64
Cg28d	10,74± 0,53 e	94,12± 4,62 g	19,76

Cada valor corresponde à média de 3 repetições; PF = peso fresco; PS = peso seco; PT = peso total da semente, em grammas. Valores acompanhados por letras iguais em uma mesma coluna, não apresentam diferenças significativas ao nível de $P = 0,01$.

TABELA 16: Confronto entre os valores obtidos nas dosagens de proteínas utilizando-se como reta padrão solução de BSA ou dos extratos protéicos totais de *C. ensiformis* e *C. gladiata*, em diversos tempos de embebição.

Tempo	mg prot./gPF		mg prot./gPS	
	BSA	EPT	BSA	EPT
Ce0d	238,507 d	270,427 e	265,597 d	301,147 e
Ce7d	65,353 e,f	74,730 e	211,150 f	241,460 e
Ce14d	16,317 g,h,i	18,407 g,h,i	173,560 h	195,823 g,h
Ce21d	4,303 i	4,907 i	31,273 i	35,653 i
Cg0d	338,353 b	402,037 a	373,170 b	443,403 a
Cg7d	58,490 f	69,367 e,f	180,753 h	215,187 f,g
Cg14d	27,943 g	32,777 g	226,263 f	265,410 d
Cg21d	21,897 g,h	25,957 g,h	103,033 i,j	122,150 i
Cg28d	9,113 h,i	10,737 h,i	79,873 j	94,123 j

Os valores apresentados, constam das Tabelas 14 e 15. Valores de mg/PF ou mg/PS acompanhados por letras iguais, não apresentam entre si diferenças significativas ao nível de $P = 0,01$.

A partir do 7º dia de germinação o conteúdo protéico das raízes em relação ao peso fresco não apresenta diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade e se situam abaixo de 1% desse peso. Entretanto, com relação ao peso seco, esses valores se estabilizam entre 8-11% a partir do 21º dia de germinação (Tabela 17).

Utilizando-se os valores dos pesos fresco e seco calculados para os eixos embrionários em Ce0d e Cg0d e dados na Tabela 1, o total de material protéico em Ce0d é de 3,13 mg e em Cg0d, 6,71 mg.

3.11. Eletroforeses:

O uso de tampão de amostra contendo ou não 2-Mercaptoetanol não ocasionou a formação de bandas com diferentes padrões em gel de poli(acrilamida)-SDS, com uma concentração de 6% de acrilamida, para o material cotiledonar de Ce0d (Fig.40). Pode-se notar a presença de diversas bandas com peso molecular menor do que 68.000, correspondente à banda da soroalbumina bovina. Entretanto, devido à baixa concentração de acrilamida do gel, muitas proteínas de baixo peso molecular não conseguiram ser visualizadas nessa eletroforese (Fig.40).

Os resultados da PAGE-SDS a 10% para os extratos protéicos totais, leguminas, vicilinas e albuminas das duas espécies analisadas, encontram-se descritos na Figura 41.

TABELA 17: Relação entre o conteúdo de proteínas calculado a partir da reta padrão com solução de BSA e os pesos fresco e seco em eixos embrionários ou raízes de *C. ensiformis* e *C. gladiata*, em diversos tempos de embebição.

Tempo	mg prot./gPF	mg prot./gPS
Ce0d	287,69±15,01 a	316,73±16,53 a
Ce7d	6,98± 0,13 b	174,48± 3,21 c
Ce14d	6,58± 0,24 b	164,58± 5,89 c
Ce21d	4,50± 0,10 b	112,54± 2,50 d
Cg0d	279,52± 1,09 a	304,92± 1,19 a
Cg7d	7,23± 0,48 b	180,73±12,12 c
Cg14d	8,42± 0,47 b	210,44±11,87 b
Cg21d	3,34± 0,06 b	83,34± 1,48 e
Cg28d	3,32± 0,44 b	82,82±11,05 e

Cada valor corresponde à média de 3 repetições; PF = peso fresco; PS = peso seco; Conforme média de 50 medições, 1g de PF de raízes corresponde a 0,04g de PS; para eixos embrionários, o PS utilizado foi o descrito na Tabela 1. Valores acompanhados por letras iguais em uma mesma coluna, não apresentam diferenças significativas ao nível de $P = 0,01$.

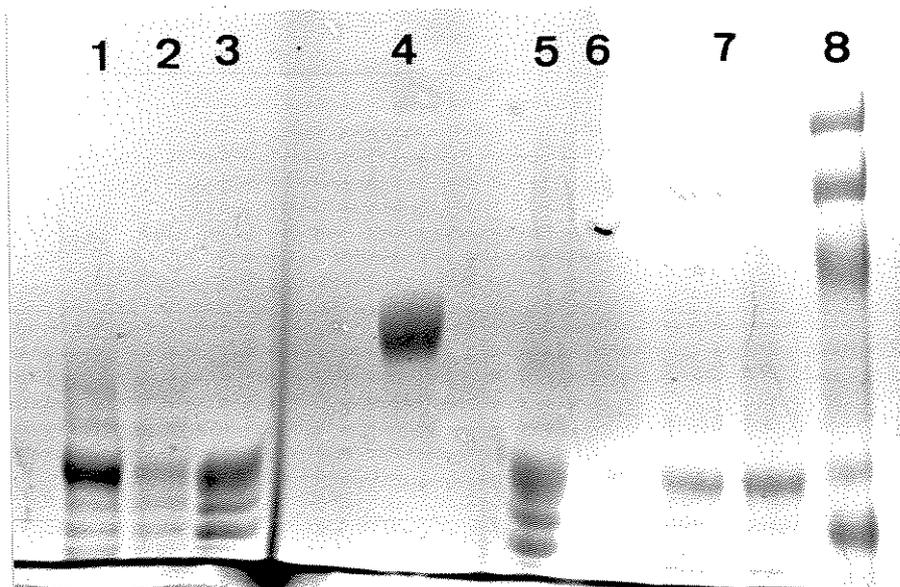


Fig. 40: SDS-PAGE (6% de acrilamida) das amostras de proteínas de *C. ensiformis*, preparadas em tampão não redutor (1 a 3) ou redutor (5 a 7). Padrões de pesos moleculares (8) e BSA (4) também foram utilizados. Condições de corrida: corrente de 25 mA, tensão: 100 V, durante 2h15min, temperatura ambiente. Coloração pelo Coomassie blue.

Na Figura 41, o padrão de pesos moleculares encontra-se em 5, onde podem ser notadas 6 bandas distintas: a primeira, corresponde à miosina (PM.205.000) e não penetrou no gel a 10%; a segunda, da b-galactosidade (PM.116.000); a terceira, da fosforilase b (PM.97.400); a quarta, da albumina bovina (PM.66.000); a quinta, da ovalbumina (PM.45.000) e a sexta, da anidrase carbônica (PM.29.000). Em 6, encontra-se a banda da soroalbumina bovina pura; Em 7 e 8, são notadas duas bandas cada, com pesos moleculares aproximados de 20-25.000 e de 8-12.000 e referem-se à Concanavalina A de duas diferentes procedências.

As amostras 1 e 9 são dos extratos protéicos totais de C. ensiformis e C. gladiata. Nota-se a presença de inúmeras bandas, com pesos moleculares abaixo de 100.000, com destaque para uma banda pouco nítida em torno de 55.000, uma intensa banda na região de 48.000 e outra em torno de 24.000 (Fig.41).

Em 2 e 10, têm-se as sub frações de albuminas das duas espécies. Praticamente não se nota a presença de bandas, exceto uma, pouco nítida, próxima a 48.000. Apesar de nas amostras 3 e 4 praticamente não serem notadas bandas, a observação do gel demonstrou sua presença, semelhantes àquelas das de números 11 e 12, correspondentes respectivamente às sub-frações de leguminas e vicilinas de C. gladiata. Percebe-se que a banda de 55.000 obtida no extrat. total aparece subdividida em duas na fração legumina. A forte banda ao redor de 48.000 pertence à subfração das vicilinas, assim como as bandas de 24.000 e 12.000 (Fig.41).

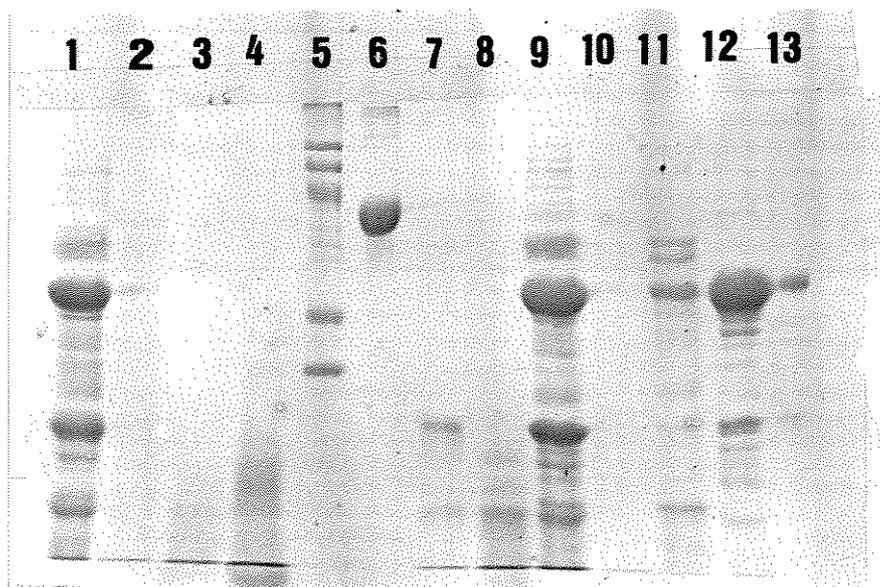


Fig. 41: SDS-PAGE (10% de acrilamida) das amostras de proteínas de *C. ensiformis* (de 1 a 4) e *C. gladiata* (de 9 a 12). Padrão de pesos moleculares (5), BSA (6) e ConA (7 e 8) também foram utilizados. Condições de corrida: corrente de 25 mA, tensão: 100V, durante 3h30min a temperatura ambiente. Coloração pelo Coomassie blue.

3.12. Hemaglutinações:

Os resultados das hemaglutinações "in vitro" revelaram um alto poder hemaglutinante da subfração das vicilinas nas duas espécies analisadas. As subfrações de albuminas e leguminas não apresentaram poder hemaglutinante, tendo seus resultados bastante semelhantes aos controles. Os extratos protéicos totais também conseguiram aglutinar as hemácias, mas de forma menos intensa do que as vicilinas (Fig. 42-45).

Durante a germinação, o poder aglutinante diminuiu a partir de Ce14d e Cg14d mas ainda pôde ser observada alguma hemaglutinação em Ce21d, Cg21d e Cg28d.

As hemaglutinações realizadas "in situ" não demonstraram o poder hemaglutinante dos materiais, em nenhuma das espécies ou tempos utilizados. Da mesma forma, a utilização de 20 C ou 37 C para a realização dos experimentos, não provocou nenhuma alteração perceptível nos resultados obtidos.

3.13. Visão geral das dosagens bioquímicas:

O resumo das quantidades de amido, proteínas e lipídios dosados nos cotilédones de sementes quiescentes ou nos cotilédones após diversos períodos de embebição, encontra-se descrito na Tabela 18.

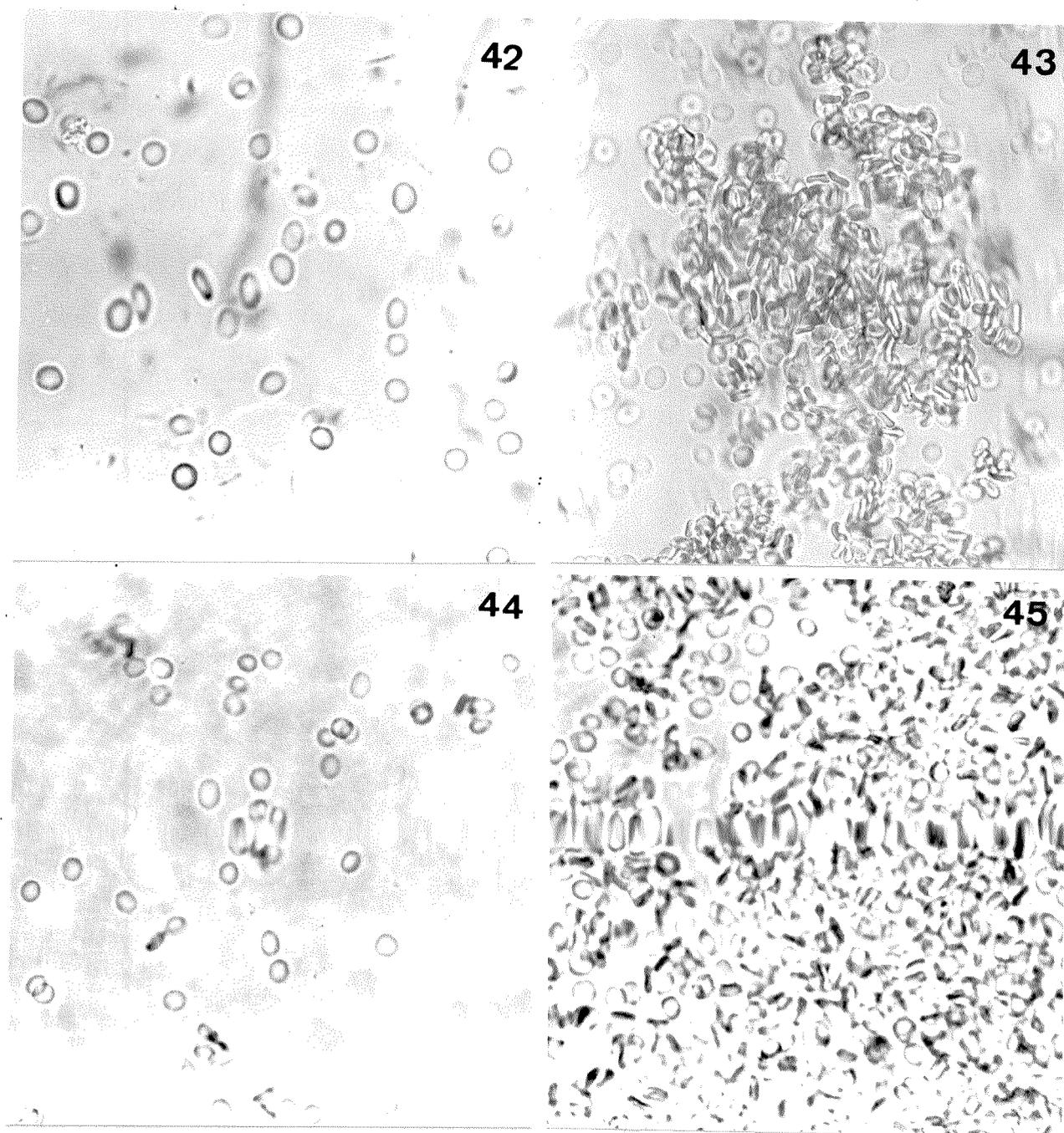


Fig. 42-45: Fotos das hemaglutinações "in vitro", obtidas a partir de solução de hemácias de coelho tripsinizadas e extratos protéicos dos cotilédones de *C. ensiformis*. **Fig.42:** Controle. **Fig.43:** Extrato protéico total. **Fig.44:** Subfração de leguminas. **Fig.45:** Subfração de vicilinas. Aumento 1.500 X.

TABELA 18: Resumo contendo as dosagens das reservas encontradas nos cotilédones de *C. ensiformis* e *C. gladiata* nos diversos tempos de embebição.

Tempo	Lipídio	Amido	Proteína	mg/100mgPS	mg/PT	PS	%
Ce0d	3,5	56,4	26,6	86,5	1141,8	1320	86,5
Ce7d	---	72,5	21,1	93,6	973,4	1040	93,6
Ce14d	---	41,7	17,4	59,1	177,3	300	13,4
Ce21d	---	23,1	3,1	26,2	28,8	110	2,2
Cg0d	2,0	52,9	37,3	92,2	4121,3	4470	92,2
Cg7d	---	48,3	18,1	66,4	2284,2	3440	66,4
Cg14d	---	50,6	22,6	73,2	827,2	1130	18,5
Cg21d	---	36,0	10,3	46,3	347,3	750	7,8
Cg28d	---	23,4	8,0	31,4	65,9	210	1,5

Valores de lipídio (Tabela 10), amido (Tabela 12) e proteína (Tabela 14) são dados em mg. A soma das três reservas encontra-se na 4ª coluna; mg/PT corresponde à quantidade total de reservas por cotilédones da semente; PS: peso seco dos cotilédones dado em mg; %: valor percentual do total de reservas por cotilédones em relação ao peso seco dos mesmos nas sementes quiescentes.

4. DISCUSSÃO

4.1. Paredes celulares:

Azul de toluidina é um corante básico, portador do radical NH_3^+ , amplamente utilizado para colorações de cortes histológicos em soluções preparadas numa ampla faixa de pH, que oscila em geral de valores em torno de 2, onde poucos radicais aniônicos presentes nos tecidos encontram-se desprotonados, até pH 11-12, a partir do qual, o grupamento amino presente nas moléculas de AT, também perde seu próton. A pH 4,0, poucos radicais carboxila presentes em proteínas encontram-se negativados. Entretanto, os radicais fosfato, presentes nos ácidos nucleicos e os radicais sulfato e carboxila presentes em polissacarídeos ácidos são corados (LISON, 1953; PEARSE, 1961).

Um aumento na disponibilidade de radicais aniônicos convenientemente próximos possibilita, ao nível celular, a interação entre as moléculas planares do AT. Isso faz com que a energia necessária para a excitação dos elétrons pertencentes aos grupos cromofóricos dessas moléculas seja maior, diminuindo assim o pico de absorção de 625 nm, para comprimentos de onda menores, que podem atingir 550 nm ou menos. Esse fenômeno, denominado de metacromasia, é comum a inúmeros corantes básicos e pode revelar, mesmo sem a utilização de medidas absorciométricas, um aumento na disponibilidade de radicais aniônicos em diferentes estágios fisiológicos de um mesmo tecido, ou de tecidos diferentes, pela simples visualização da cor obtida, que em função dessas interações, passa do verde (basicamente monômeros de AT) para o azul, azul-arroxeadado e róseo (empilhamento de moléculas de AT) (VIDAL, 1987).

Em vegetais, a presença de radicais aniônicos nas substâncias pécticas, faz com que as paredes celulares sejam coradas em tom arroxeadado pelo AT a pH 4,0, apresentando assim, metacromasia. Segundo a "teoria ácida" do crescimento celular (HALL et alii, 1984), para o alongamento celular, um abaixamento do pH provocado a princípio pela influência de auxinas, possibilitaria o rompimento de certas ligações químicas entre os polímeros presentes nas paredes celulares, causando o afrouxamento necessário para a sua posterior expansão. Este evento poderia favorecer a liberação de radicais aniônicos próximos, aumentando assim a meta-

cromasia da coloração pelo AT. Essa característica já foi anteriormente descrita em coleoptiles de Avena sativa (CLELAND, 1976) e pôde ser demonstrada "in situ" através da coloração pelo AT a pH 4,0 em paredes celulares de cotilédones de Glycine max pelo menos até o sexto dia de embebição através de medições do índice metacromático das paredes (CORTELAZZO & VIDAL, 1988b) e em paredes de células rizoidais em esporos de Cyathea delgadii durante o desenvolvimento do gametófito (RANDI et alii, 1988).

Em C. ensiformis e C. gladiata, também ocorreu um aumento na metacromasia dos cortes corados pelo AT, a medida que o tempo de germinação aumentou, confirmando assim ser este um fenômeno comum nessas estruturas vegetais. Além disso, a metacromasia foi máxima nas paredes das células de folhas cotiledonares próximas ao seu período de abscisão, o que indica que a disponibilidade dos radicais aniônicos vai gradativamente aumentando durante todo o período em que as reservas presentes nas sementes são mobilizadas e exauridas, quer seja pela sua produção nesse local, quer pela expansão das paredes durante a embebição ou mesmo pela ação da pectina-metil-esterase, liberando radicais carboxílicos nesses locais.

Após a embebição das sementes, ocorreu uma diferenciação de células do parênquima do cotilédone para a formação de feixes vasculares de xilema, cujas paredes são ricas em lignina e se apresentam ortocromáticas (verdes) quando coradas pelo AT. Esses feixes de células não foram obser-

vados em sementes quiescentes mas, a partir do 7º dia de embebição puderam ser notados em todos os cortes analisados. Esse fato pode ser explicado pela necessidade de transporte de água proveniente do solo para esses locais.

A presença de inúmeros plasmodesmos ao nível das paredes celulares formando verdadeiros poros interligantes de elevado tamanho, sugerem a possibilidade de transporte dos materiais de reserva não totalmente degradados, de célula a célula do cotilédone para seus feixes vasculares não lignificados e destes para o eixo embrionário.

As paredes celulares também são evidenciadas quando se utiliza o método do PAS, principalmente devido à sua riqueza em celulose. Assim, o fato de também serem observados plasmodesmos por esse método, confirmam os resultados obtidos pelo AT pois eles poderiam levar à idéia de tratar-se de regiões pobres em polissacarídeos ácidos.

Paredes celulares quando observadas em microscópio de polarização apresentam-se birrefringentes devido ao arranjo ordenado de seus biopolímeros formadores (FREY-WISSLING, 1948; PRESTON, 1952; 1959; FREY-WISSLING & MUHLETHALER, 1965). Ao nível das células cotiledonares durante a germinação, é de se supor que hajam alterações no estado de agregação dessas moléculas, que provoquem uma alteração na birrefringência apresentada.

Uma forma de detectar as alterações na ordem molecular e estado de cristalinidade de materiais birrefringentes é a construção de curvas de birrefringência de forma

(CBF), a partir da medição dos retardos ópticos provocados pelo material quando imerso em meios de embebição com diferentes índices de refração (VIDAL, 1964). Essas curvas retratam a influência desses meios de embebição na ordem molecular do material analisado (birrefringência de forma ou textural) e também a birrefringência intrínseca ou própria do material, que independe do meio de embebição. Alterações nos perfis das CBF e na birrefringência intrínseca, podem relatar portanto, diferenças de cristalinidade do material. Em sementes de soja durante o início da germinação, a birrefringência intrínseca das paredes de células cotiledonares diminui à medida que o tempo de germinação aumenta, indicando uma diminuição da ordem molecular ao nível das paredes durante esse processo (CORTELAZZO & VIDAL, 1988b).

Entretanto, só foram construídas CBF em células de cotilédones no início do processo de germinação (de zero a 6 dias de embebição) e portanto os resultados obtidos retratam esse período da fisiologia dessas células. Assim, no presente trabalho, utilizou-se apenas os meios de embebição representantes dos pontos máximos da birrefringência textural (água e nujol) e do ponto mínimo (birrefringência intrínseca) relatados nas CBF obtidas em soja (CORTELAZZO & VIDAL, 1988b) e o tempo de germinação foi estendido até a abscisão dos cotilédones.

Os resultados obtidos nas medições dos retardos ópticos das duas espécies, confirmaram uma diminuição da birrefringência intrínseca das paredes no início da germina-

ção. Entretanto, revelaram um aumento no estado de agregação dos biopolímeros formadores da parede quando se aproxima o tempo de abscisão dos cotilédones. Esse comportamento pode ser explicado pela perda de água dos cotilédones nesse período. Com isso, haveria uma maior compactação dos materiais da parede e conseqüentemente um aumento na birrefringência. Esse comportamento pôde também ser observado para o material embebido em nujol, o que reforça a idéia do envolvimento da água nessa alteração pois, como um material hidrofóbico, o nujol poderia causar uma retração nos componentes da parede (hidrofílicos), aumentando assim a birrefringência dos mesmos. Com a perda de água, haveria um aumento na interação entre os materiais da parede, com um conseqüente aumento dos retardos ópticos. Esse aumento provocado pelo nujol é também observado em outros materiais birrefringentes e polares como é o caso das fibras colagênicas da matriz extra-celular presente em animais (VIDAL, 1964; 1977).

4.2. Material protéico:

O material protéico foi detectado pelo xylidine Ponceau a pH 2,5. Esse corante possui dois radicais sulfato ionizados nesse pH, ligando-se assim aos radicais catiônicos disponíveis. No presente trabalho, o material corado era de natureza protéica uma vez que, após a digestão pela pepsina não houve resposta positiva ao corante.

O uso do XP possibilitou a verificação de diferenças no conteúdo protéico de células presentes no centro do cotilédone daquelas localizadas mais próximas ao tegumento das sementes. As primeiras apresentaram-se com um aspecto mais globular, o que poderia indicar que a mobilização se inicia nessa região do cotilédone, que apresentaria corpos protéicos já agrupados em glóbulos maiores e em menor número (PERNOLLET, 1982). Esse fato pôde ser confirmado durante o acompanhamento "in situ" do material protéico no decorrer da germinação, uma vez que as diminuições em seu conteúdo são primeiramente notadas nas regiões centrais dos cotilédones.

As colorações efetuadas pelo XP revelaram ainda que é a partir do 14º dia de germinação que há uma necessidade maior do material protéico pelas plântulas, provocando assim uma queda acentuada de material corado a partir desse tempo.

Os corpos protéicos presentes nos cotilédones das duas espécies, também foram levemente corados pelo método do PAS, sugerindo a presença de glicoproteínas no interior dos mesmos.

Ao nível dos eixos embrionários, o XP revelou um alto conteúdo protéico em Ce0d e Cg0d, ocupando todo o espaço celular. Isso indica haver estocagem de material protéico também no eixo embrionário, que com a germinação é transportado para as partes da plântula em crescimento, levando a uma menor quantidade de material corado nas radículas após a germinação e havendo uma manutenção do padrão de materiais corados a partir do 7º dia.

O fato de não serem obtidas hemaglutinações "in situ", indica que nessas espécies, a Concanavalina A se encontra agregada a outros materiais protéicos e/ou se apresenta de forma não funcional (dissociada). Resultados semelhantes foram obtidos para lectinas de Pachyrhizus tuberosus (VIDAL & PIMENTEL, 1985) e em Glycine max (CORTELAZZO & VIDAL, 1988a), demonstrando ser esta uma característica frequente em cotilédones. Além disso, a associação de lectinas com as demais proteínas dos corpos protéicos têm sido descrita para diversas espécies de leguminosas (EINHOFF et alii, 1986).

A despeito do fato de que as albuminas são solúveis em água (OSBORNE & CAMPBELL, 1898), o processo de separação dessas proteínas das globulinas das sementes foi iniciado diretamente com solução de NaCl 1 M pois a liberação de íons do material, provocada pela água, poderia solubilizar alguma quantidade de globulina, prejudicando assim a extração. Após a diálise, pôde-se obter a separação das albuminas, que permaneceram solúveis, enquanto as globulinas precipitaram.

Uma forma comum de armazenamento de fósforo e outros íons em cotilédones de leguminosas é sob a forma de fitato (LOTT, 1980). Podem existir interações entre as proteínas de reserva e o fitato existente. Essas interações são ativadas pela presença de cátions e o complexo proteína-fitato precipita em valores de pH entre 4,5 e 6,6 (SMITH & RACKIS, 1957). Devido a isso, a extração inicial foi feita

em solução tamponada a pH 7,2. O fitato nessas sementes pode estar mais concentrado nas porções periféricas dos corpos protéicos uma vez que nesses locais há uma maior reação com o azul de toluidina a pH 4,0, que poderia interagir com os radicais fosfato não comprometidos nas interações do fitato com o material protéico.

A separação entre as leguminas e vicilinas se deu baseada na diferença entre seus pontos isoelétricos. Assim, baixou-se o pH da solução de NaCl 0,2 M contendo a mistura dessas globulinas para 4,7, que é o pH aproximado do ponto isoelétrico das leguminas. Pôde-se então separá-las das vicilinas ($pI \sim 5,6$) após centrifugação. Existem diversas críticas quanto a obtenção de elevado grau de pureza dessas sub-frações utilizando-se o ponto isoelétrico, pois proteínas de leguminas e vicilinas podem se misturar durante o mesmo (DERBYSHIRE et alii, 1976). Entretanto, como essa separação foi feita basicamente para possibilitar a construção das curvas espectrais após reação com a solução de Coomassie blue e não para a quantificação do conteúdo protéico dessas sub-frações das sementes, esse fato pôde ser relegado.

Uma característica das vicilinas é a de possuírem mais lisina e menos ácido glutâmico do que as leguminas. Também possuem um ponto isoelétrico mais elevado (DERBYSHIRE et alii, 1976). Assim, as curvas espectrais das vicilinas das duas espécies, apresentaram maiores valores de absorbância na região do pico de absorção ($\lambda = 595 \text{ nm}$) uma vez que o Coomassie blue é um corante ácido e assim, sua reação com os radicais catiônicos seria maior para as vicilinas.

Outro fator observado nas curvas espectrais das proteínas e que está de acordo com a literatura, é a predominância de canavalina, uma proteína da sub-fração das vicilinas, em *C. ensiformis* e *C. gladiata* (SMITH et alii, 1982; SAMMOUR et alii, 1984). Assim, as curvas espectrais dos extratos protéicos totais, aproximaram-se mais dos valores das vicilinas nas duas espécies analisadas.

Apesar de serem obtidos valores um pouco inferiores em *C. gladiata* na região do pico de absorção, na comparação entre as diversas soluções protéicas, elas não foram estatisticamente diferentes, revelando uma semelhança entre os materiais protéicos das duas espécies. Essa semelhança pôde ser confirmada pelos perfis eletroforéticos dessas espécies, que apresentaram apenas pequenas diferenças entre si.

As eletroforeses também evidenciaram o grande conteúdo de canavalina e de concanavalina A, as duas proteínas mais abundantes nessas espécies, que apresentaram bandas características em torno de 48.000 e 24.000 (SUMNER et alii, 1938; YAMAUCHI & MINAMIKAWA, 1986; 1987).

Segundo dados obtidos por YAMAUCHI & MINAMIKAWA (1986), a canavalina de *C. gladiata*, apresenta duas bandas características em SDS-PAGE. Uma com P.M. em torno de 48.000 e outra em torno de 24.000. SAMMOUR et alii (1984) apresentam praticamente os mesmos valores para a canavalina de *C. ensiformis*. Assim, as maiores bandas obtidas no extrato bruto e na fração vicilinas se referem a essa proteína. Do mes-

mo modo, EINHOFF et alii (1986) identificam as bandas de canavalina e de concanavalina A, esta última com P.M. em torno de 26.000. Deste modo, a banda obtida em torno de 25.000 na eletroforese de C. ensiformis e C. gladiata, pode ser devida à mistura das sub-unidades de canavalina e da Con A.

As observações dos materiais "in situ", foram amplamente confirmadas pelos métodos bioquímicos de análise. As dosagens de proteínas, evidenciaram uma maior queda do conteúdo protéico a partir do 14º dia, da mesma forma que as análises dos cortes corados.

Os resultados das dosagens bioquímicas, sugerem que no início da germinação as proteínas estocadas nos eixos embrionários são primeiramente requeridas do que aquelas presentes nos corpos protéicos dos cotilédones, para possibilitarem o crescimento. Esse fato é reforçado pela maior diminuição do conteúdo protéico ao nível dos eixos embrionários entre o início e o 7º dia de germinação, enquanto que o mesmo fenômeno só é notado de forma mais contundente nos cotilédones a partir do 14º dia de embebição.

O confronto entre os resultados das dosagens do material protéico com a utilização de diferentes retas padrão demonstrou haverem diferenças entre os mesmos. A idéia de que isso ocorre partiu do fato de que o Coomassie blue é um corante ácido portador de radicais sulfato e portanto se liga a radicais catiônicos presentes no material protéico, podendo também interagir por hidrofobicidade com amino-ácidos próximos ao local de ligação (TAL et alii, 1986). Logi-

camente uma proteína mais rica em amino ácidos básicos do que a BSA tende a reagir mais com o corante e ser subestimada. O oposto poderia se supor com um material protéico mais pobre nesses amino ácidos ou mesmo com uma riqueza elevada de amino ácidos (VIDAL, comunicação pessoal). Assim, a utilização de diversos extratos protéicos obtidos do próprio material a ser analisado, partiu desse princípio e teve a finalidade de demonstrar a existência ou não dessas diferenças e também tornar o método de dosagem mais fiel ao material analisado. Ainda assim, a metodologia é passível de críticas pois, utilizou-se apenas o extrato protéico total dos cotilédones de sementes quiescentes e, a partir desses materiais, foram feitas as dosagens para todos os tempos de embebição. Uma vez que a degradação dos diferentes tipos de proteínas pode não ser simultânea e proporcional, os resultados podem ser considerados mais fiéis apenas para o material quiescente e nos tempos iniciais de embebição.

As hemaglutinações "in vitro" também confirmaram a presença de Con A no extrato protéico total e na subfração das vicilinas uma vez que as demais subfrações não apresentaram poder aglutinante.

A Con A apresenta-se na forma tetramérica a 37°C mas, se dissocia em dímeros à medida que a temperatura baixa (HUET et alii, 1974). Esses autores, não observaram efeito hemaglutinante a 0°C. No presente trabalho, mesmo a 20° C os resultados das hemaglutinações foram positivos nos testes "in vitro". Pode-se então supor que a essa temperatura, mul-

tas das moléculas de Con A apresentam-se ainda em sua forma funcional (tetramérica). Esse fator poderia explicar a não observação de hemaglutinações "in situ" pois os materiais foram fixados a uma temperatura próxima a 0°C (5°C durante 48 horas).

4.3. Amido

Os inúmeros grânulos de elevado tamanho presentes nas células cotiledonares e não corados pelo AT e XP, foram intensamente corados pelo método do PAS. Isso indica que sua composição química é rica em polissacarídeos neutros, uma vez que o ácido periódico oxida hidroxilas de carbonos vicinais, rompendo a ligação entre os mesmos e produzindo 2 radicais carbonila no local (PEARSE, 1961) que se ligarão com o reativo de Schiff através de ligações covalentes (MELLO & VIDAL, 1978). Assim, devido a isso e também a sua natureza granular, pode-se supor que o material corado pelo PAS é amido.

Outro fator que comprova a composição química dos grânulos PAS-positivos é a sua análise em microscópio de polarização. Sabe-se que esse material de reserva é estocado de forma que as diversas moléculas de amilose e amilopectina se disponham circularmente a partir de um centro de nucleação. Essa disposição faz com que esses grânulos sejam birrefringentes e apresentem um aspecto característico de "cruz de malta", sempre observado nesse tipo de reserva (VIDAL, 1987).

A não observação de material PAS-positivo ou birrefringente no interior dos vasos do cotilédone ou do eixo embrionário, indicam que para o transporte, esse material seja previamente degradado e/ou que o mesmo seja consumido no próprio local onde foi estocado.

A utilização do m.m.c. para ser determinado o número de grãos a ser analisado em cada caso baseou-se no fato de também terem sido analisadas as quantidades de amido por célula. Assim, garantiu-se sempre um número inteiro de células na amostragem. Da mesma forma, a idéia de se trabalhar com um erro máximo de 5% nas estimativas acabou sendo válido apenas nos primeiros dias de embebição pois nos tempos mais próximos a abscisão dos cotilédones, os desvios padrão aumentaram em demasia, o que pode ser explicado pela alta demanda energética necessária para o desenvolvimento da planta jovem. Foram utilizados apenas grãos de amido situados nas regiões mais centrais dos cotilédones pois seu tamanho nas regiões mais periféricas é nitidamente menor.

A partir do 4º-5º dia de germinação, os cotilédones tornam-se fotossintetizantes. Isso pode contribuir para a observação de uma certa manutenção das áreas e volumes dos grãos de amido durante os primeiros dias de germinação. A esse respeito, os resultados também indicam que ocorre simultaneamente uma diminuição no tamanho e na quantidade de grãos por célula no decorrer do tempo analisado. Assim, em C. ensiformis é notada uma diminuição na quantidade de grãos por célula já no 14º dia, que é o período em que as áreas e

volumes dos grãos também se tornam menores. Em C. gladiata se confirma esse comportamento, que se manifesta uma semana depois, em Cg21d.

Esses resultados quando confrontados com os valores obtidos para o comprimento da parte aérea, revelam que em C. ensiformis o decaimento do amido corresponde ao período de grande crescimento, entre o 7º e o 14º dia de germinação, período após o qual, o crescimento se torna mais lento. Em C. gladiata, o crescimento continua elevado até o 21º dia, diminuindo em seguida. Assim, o crescimento da plântula requereria num certo período, uma maior demanda de material de reserva, tanto protéico quanto de carboidratos. Do mesmo modo, os pesos secos dos cotilédones diminuem pouco até o 7º dia de germinação, confirmando assim as relações obtidas nos estudos "in situ" das principais reservas dessas sementes.

Ainda assim, mesmo próximo a abscisão dos cotilédones, algumas células ainda apresentam grãos de amido praticamente intactos, sugerindo que nesses locais estes grãos podem estar de algum modo mais resistentes a degradação ou que poderia haver alguma falha na síntese das enzimas necessárias a essa degradação. De qualquer modo, a quantidade de amido por cotilédone é bastante baixa nos tempos em que essas estruturas sofrem abscisão, mostrando uma grande eficiência no aproveitamento dessa reserva por parte da planta.

O amido é primeiramente consumido ao nível dos eixos embrionários, que logo no início da germinação apresentam uma queda acentuada dessa reserva.

A relação encontrada entre o número de grãos de amido e as dosagens bioquímicas nos cotilédones, poderá servir, se confirmada para outras espécies, para uma estimativa do conteúdo dessa reserva em cortes de sementes, podendo contribuir para uma rápida análise em laboratórios que não disponham dos equipamentos necessários para as dosagens bioquímicas, podendo ainda dispensar os cálculos para a estimativa de áreas e volumes como forma de avaliar a diminuição dessa reserva em sementes durante a germinação.

O elevado tamanho dos grãos de amido pode indicar ainda a existência de endopoliploidia nas células cotiledonares. Tipicamente, grãos de amido com 20-50 μm de comprimento são encontrados em células de cotilédones que apresentam endopoliploidia e tamanhos menores, entre 2 a 10 μm , são normalmente encontrados em cotilédones de espécies que não a apresentam (SMITH, 1981). No caso de *C. ensiformis* e *C. gladiata* o elevado tamanho dos grãos de amido sugere que suas células apresentam esse fenômeno. Essa característica poderá ser confirmada a partir de medições absorciométricas "in situ" do conteúdo Feulgen-DNA (MELLO & RAYMUNDO, 1977), utilizando-se núcleos das células cotiledonares e de outras regiões da planta.

4.4. Lipídios:

Os resultados das dosagens de lipídios revelaram um baixo conteúdo dessas substâncias nas duas sementes e es-

tão próximos aos dados existentes na literatura. WOLFF & KWOLEK (1971) relatam 2,6% de óleos em relação ao peso fresco nas sementes de Canavalia. GRANATO (1925) descreve 3,2% de substâncias gordurosas em C. ensiformis e 3,3% em C. gladiata. Entretanto, pela descrição do texto desse autor, percebe-se que a C. gladiata a que o mesmo se refere, pode se tratar de C. ensiformis variedade gladiata uma vez que na época em que o trabalho foi realizado existiam inúmeros problemas com a classificação correta dessas plantas.

Um fator que chama a atenção na composição lipídica dessas sementes, é o baixo teor de ácido linoléico, comum em muitas espécies vegetais, como por exemplo Leucaena leucocephala que possui 6,4% de lipídios, dos quais 53,8% são de ácido linoléico. Em Physalis minima, dos 40% do peso seco em lipídios, 61,4% são também desse ácido graxo (RAO et alii, 1984) e em girassol, 57,6% dos lipídios se compõem de ácido linoléico (CAVALCANTI, 1986). Da mesma forma, o ácido esteárico não é uma forma comum de lipídios em sementes. Nas espécies citadas acima, nenhuma delas possui mais do que 8% desse ácido graxo, em contraste com os teores de C. ensiformis (59%) e de C. gladiata (37%).

Apesar de serem utilizadas sementes com cerca de 8 meses de estocagem os resultados do índice de peróxidos indicaram não ter havido peroxidação durante esse período, indicando que as condições de estocagem foram satisfatórias para as duas espécies analisadas.

4.5. Material nuclear:

Núcleos e nucléolos também foram corados em azul pelo AT a pH 4,0, devido a presença dos radicais fosfato no DNA nuclear e RNA nucleolar.

Com o avanço do tempo de germinação, nas duas espécies puderam ser observadas alterações nucleares, com a formação de regiões mais picnóticas, culminando muitas vezes com a degeneração do nucléolo. Esse fenômeno vem sendo há muito relacionado com a morte celular de tecidos em necrose (SANCHEZ-LUCAS, 1959). Assim, no caso das folhas cotiledonares, o esgotamento do material de reserva pode ser seguido da morte celular, numa sequência de eventos semelhante ao que ocorre nos tecidos animais.

A reação de Feulgen foi realizada por tratar-se de metodologia específica para a detecção de DNA, a fim de confirmar os resultados obtidos pelo AT. Assim, devido a hidrólise do RNA que antecede a coloração pelo reativo de Schiff (MELLO & VIDAL, 1978), foi possível essa confirmação sem o uso de enzimas como a DNase e RNase para a remoção dos ácidos nucleicos. Do mesmo modo, xylidine Ponceau evidenciou os núcleos das células da radícula, corando as proteínas presentes nesse local. Esse fato também pôde ser confirmado através da reação de Feulgen, que evidenciou o DNA dessas estruturas.

5. CONCLUSÕES:

1. Há um aumento na disponibilidade de radicais aniônicos nas paredes celulares a partir da germinação, que se mantém durante todo o período em que as reservas são mobilizadas e exauridas;
2. Feixes de células do parênquima das folhas cotiledonares se diferenciam para a formação de células de xilema, já no 7º dia de germinação;
3. As células cotiledonares apresentam plasmodesmos de elevado tamanho, que podem estar envolvidos no transporte das reservas de célula a célula no interior dos cotilédones;

4. O arranjo molecular dos componentes das paredes de células cotiledonares apresentam uma diminuição em sua birrefringência intrínseca no início da germinação, seguindo-se um aumento de cristalinidade quando se aproxima o período da excisão das folhas cotiledonares, possivelmente devido a uma maior agregação desse material em função da perda de água;
5. C. gladiata, apresenta um maior conteúdo protéico, menos amido e menos lipídios do que C. ensiformis;
6. O arranjo do material protéico difere nas células cotiledonares mais próximas à casca, que também contém menos amido do que as células mais centrais.
7. A mobilização de proteínas se inicia nos eixos embrionários. Nos cotilédones ela se dá a partir das células mais centrais e é mais notada a partir do 14º dia de germinação;
8. A Concanavalina A se apresenta agregada a outros materiais protéicos e/ou dissociada, de forma a não serem obtidos resultados positivos nas hemaglutinações "in situ";

9. A fração protéica rica em ConA nas duas espécies é a das vicilinas, que apresentam as bandas correspondentes a essa metaloproteína e promovem uma maior hemaglutinação nos materiais "in vitro", a 20°C ou 37°C;
10. O amido presente nos cotilédones é degradado nesse local. A degradação se dá de tal forma que o tamanho e a quantidade de grãos diminuem simultaneamente;
11. Existe uma relação entre a quantidade de grãos de amido nessas espécies e o conteúdo obtido a partir das dosagens. Essa relação pode ser característica apenas dessas espécies, mas possibilita uma estimativa da quantidade de amido/g de peso seco, a partir do número de grãos/célula;
12. C. ensiformis e C. gladiata possuem pouco lipídio. Entretanto, a alta proporção de ácido esteárico nesse conteúdo, é atípica em relação a outras sementes, pobres ou não dessa reserva;
13. A medida que o tempo de excisão das folhas cotiledonares se aproxima, suas células entram em necrose, que pode ser detectada através de alterações morfológicas a nível nuclear visualizadas nas colorações pelo AT e Feulgen.

6. RESUMO:

No presente trabalho, foram realizados vários métodos topoquímicos e bioquímicos de análise, com o intuito de caracterizar as sementes quiescentes e folhas cotiledonares de Canavalia ensiformis e C. gladiata. A principal reserva dessas sementes é o amido, que representa mais de 50% do peso seco das sementes. Outra reserva expressiva é o material protéico, que atinge 27-30% do peso seco em C. ensiformis e 37-44% em C. gladiata. As sementes possuem pouco lipídio e destas substâncias destaca-se um conteúdo elevado de ácido esteárico. Os perfis eletroforéticos das duas espécies revelam uma grande semelhança do material protéico, com predominância de canavalina e concanavalina A, presentes nas sub-frações de vicilinas. Os extratos protéicos totais e as

vicilinas, apresentam poder hemaglutinante, enquanto que nas leguminas e albuminas isso não ocorre. Esse poder só se manifesta nos testes "in vitro", pois "in situ" a ConA está agregada a outras proteínas dos corpos protéicos e/ou apresenta-se dissociada. As paredes celulares dos cotilédones apresentam grandes plasmodesmos, que poderiam contribuir para o transporte das reservas de célula a célula no decorrer da germinação. As folhas cotiledonares de *C. ensiformis* sofrem excisão no 21º dia de germinação, enquanto que as de *C. gladiata*, apenas no 28º, quando a planta já se encontra com mais de 1,7 m de altura. A diminuição das principais reservas nos cotilédones das duas espécies se dá de forma diferenciada. O conteúdo protéico já é menor após 7 dias de germinação, embora apenas a partir do 14º dia é que se tem uma diminuição brusca do mesmo. O amido também apresenta uma maior diminuição a partir do 14º dia de germinação, quando as plantas estão com elevada taxa de crescimento. Nos eixos embrionários, a diminuição das reservas se inicia primeiro. Durante a germinação, as paredes celulares aumentam sua disponibilidade de ânions, o que pôde ser demonstrado através de colorações pelo azul de toluidina a pH 4,0. A birrefringência a esse nível diminui nos primeiros dias de germinação, aumentando a medida que se aproxima do tempo da excisão das folhas cotiledonares, principalmente devido à perda de água nesses locais.

7. ABSTRACT:

The present research was carried out using various topochemical and histochemical methods of analysis, with the intention of characterizing quiescent seeds and cotyledons of Canavalia ensiformis and C. gladiata. The principal stored material in these seeds is starch, which represents over 50% of their dry weight. Another important reserve is protein, which represents up to 27-30% of the dry weight of C. ensiformis and 37-44% of C. gladiata. The seeds contain very little lipid which consists mostly of stearic acid. The electrophoretic profiles of the two species are very similar, with predominance of canavalin and concanavalin A, present in the vicilin fractions. The total protein extracts and the vicilin are hemagglutinating, while

the legumins and albumins do not have this characteristic. This hemagglutinating ability can only be verified "in vitro" since "in situ" the concanavalin A is either associated with other proteins, and/or occurs dissociated. The cell walls of the cotyledons have large plasmodesms, which may contribute to the transport of reserve material from cell to cell during germination. The cotyledons of *C. ensiformis* fall on the 21 day of germination, while those of *C. gladiata* fall only on the 28 day when the plant has attained a height of 1.7 m. The removal of the principal reserves of the cotyledons is differential. The protein content diminishes already after 7 days of germination, but a sudden drop in protein content occurs only after 14 days. Starch also diminishes first in the embryo. During germination, the quantity of free anions augments in the cell walls, as can be demonstrated with toluidine blue staining at pH 4.0. The level of birefringence of the cell walls falls on the first days of germination, rising again, mainly due to the loss of water, as the cotyledons near the time of abscission.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ASHTON, F.M. Mobilization of storage proteins of seeds.
Ann.Rev.Plant Physiol., 27: 95-117, 1976.

BAILEY, C.J. & BOULTER, D. The structure of vicilin of
Vicia faba. Phytochemistry, 11: 59-64, 1972.

BAUMGARTNER, B.; TOKUYASU, K.T. & CHRISPEELS, M.J.
Localization of vicilin peptidohydrolase in the cotyledons
of mung bean seedlings by immunofluorescence microscopy.
J.Cell Biol., 79: 10-9, 1978.

BERRY, E.W. The lower eocene floras of southeastern North
America. U.S.Geol.Surv.Prof., 91: 1-353, 1916.

- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Berlin, Springer-Verlag, 1978. v.1, 306p.
- BLIGH, E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can.J.Biochem.Physiol., 37: 911-7, 1959.
- BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 8: 93-99, 1987.
- BOX, G.E.P. & JENKINS, G.M. Time series analysis - forecasting and control. San Francisco, Holden-day, 1976. 575p.
- BOWLES, D.J.; MARCUS, S.E.; PAPPIN, D.J.C.; FINDLAY, J.B.C.; ELIOPOULOS, E.; MAYCOX, P.R. & BURGESS, J. Post-translational processing of Concanavalin A precursors in jack-bean cotyledons. J.Cell Mol., 102: 1284-97, 1986.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Anal.Biochem., 72: 248-54, 1976.

BURKART, A. Tribu Faseoleas. In:_____. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. Buenos Aires, ACME Agency, 1943. Cap.XX, p.408-492.

CARRINGTON, D.M.; AUFFRET, A. & HANKE, D.E. Polypeptide ligation occurs during post translational modification of concanavalin A. Nature, 313: 64-7, 1985.

CAVALCANTI, T.C. Efeito do 7-12-dimetilbenzantraceno (DMBA) e de dietas lipídicas sobre a atividade da ATPase mitocondrial e a composição de ácidos graxos dos lipídios de mitocôndrias do tecido mamário de ratas. Tese de doutorado - I.B. - UNICAMP - Campinas, 1986.

CHANDLER, P.M.; SPENCER, D.; RANDALL, P.J. & HIGGINS, T.J.V. Influence of sulfur nutrition on developmental patterns of some major pea seed proteins and their mRNAs. Plant Physiol., 75: 651-7, 1984.

CHRISPEELS, M.J.; HARTL, P.; STURM, A. & FAYE, L. Characterization of the endoplasmic reticulum associated precursor of Concanavalin. J.Biol.Chem., 261: 10021-4, 1986.

_____ : HIGGINS, T.J.V. & SPENCER, D. Assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processing of the polypeptides in the protein bodies of developing pea cotyledons. J. Cell Biol., 93: 306-13, 1982.

CLELAND, R.E. Kinetics of hormone-induced H⁺ excretion. Plant Physiol., 58: 210-3, 1976

CORTELAZZO, A.L. & VIDAL, B.C. Soybean seed proteins: detection "in situ" and mobilization during germination. Submetido à publicação (Revta. Bras. Bot.), 1988.

_____ & _____. Metachromasia and macromolecular orientation in the cell walls of soybean during germination. Submetido à publicação (Plant Cell Physiol.), 1988.

COVAS, G. Estudos cariológicos em antófitas. Darwiniana, 9: 158-62, 1949.

DANIELSSON, C.E. Seed globulins of the Gramineae and Leguminosae. Biochem. J., 44: 387-400, 1949.

DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J. & BOULTER, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochemistry 15: 3-24, 1976.

EINHOFF, W., FLEISCHMANN, G.; FREIER, T., KUMMER, H. & RUDIGER, H. Interactions between lectins and other components of leguminous protein bodies. Biol.Chem. Hoppe-Seyler, 367: 15-25, 1986.

EREKEN-TUMER, N.; RICHTER, J.D. & NIELSEN, N.C. Structural characterization of the glycinin precursors. J.Biol. Chem., 257: 4016-8, 1982.

FAYE, L. & CHRISPPEELS, M.J. Transport and processing of the glycosylated precursor of concanavalin A in jack-bean. Planta: 170: 217-24, 1987.

FREY-WISSLING, A. Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. Amsterdam, Elsevier, 1948. p.194-206.

_____ & MHLETHALER, J. Cell Wall. In: _____
Ultrastructural plant cytology with an introduction to molecular biology. Amsterdam, Elsevier, 1965. p.275-328.

FUJIHARA, S.; NAKASHIMA, T. & KUROGOSHI, Y. Occurrence of a new polyamine, canavalmine, in the sword bean Canavalia gladiata. Biochem.Biophys.Res.Com., 107: 403-10, 1982.

-----; -----; ----- & YAMAGUCHI, M. Distribution and metabolism of sym-homospermidine and canavalmine in the sword bean Canavalia gladiata cv Shironata. Plant Physiol., 82: 795-800, 1986.

GATEHOUSE, J.A.; EVANS, I.M.; BOWN, D.; CROY, R.R.D. & BOULTER, D. Control of storage-protein synthesis during seed development in pea (Pisum sativum L.) Biochem.J., 208: 119-27, 1982.

GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. São Paulo, Nobel, 1982. 430p.

GOMES, L. Contribuição ao estudo de proteínas ligantes de laminina através de anticorpos monoclonais. Tese de doutorado - Escola Paulista de Medicina - São Paulo - SP, 1988.

GEMTCHÓJNICOV, I.D. Manual de Taxonomia vegetal. São Paulo, Agronômica Ceres, 1976. 368p.

GRANATO, L. O feijão de porco na adubação verde dos cafezaes. Bol.Agric.RS., 10: 146-58, 1925

GRANICK, S. Urease distribution in Canavalia ensiformis. Plant Physiol., 12:601-23, 1937.

HALL, J.L.; FLOWERS, T.J. & ROBERTS, R.M. Cell Walls. In: _____ . Plant cell structure and metabolism. London, Longman, 1984. 2.ed. p.430-72.

HALMER, P. The mobilization of storage carbohydrates in germinated seeds. Physiol.Vég., 23: 107-25, 1985.

HARRIS, N.; CHRISPEELS, M.J. & BOULTER, D. Biochemical and histochemical studies on protease activity and reserve protein metabolism in the cotyledons of germinating cowpea (Vigna unguiculata). J.Exp.Bot., 26: 544-54, 1975.

HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab.Prat., 22: 475-94, 1976.

HERMAN, E.M.; SHANNON, L.M. & CHRISPEELS, M.J. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor. Planta, 165: 23-9, 1985.

HIGGINS, T.J.V.; CHRISPEELS, M.J.; CHANDLER, P.M. & SPENCER, D. Intracellular sites of synthesis and processing of lectin in developing pea cotyledons. J.Biol.Chem., 258: 9950-2, 1983.

- HUET, C.; LONCHAMPT, M.; HUET, M. & BERNADAC, A.
Temperature effects on the concanavalin A molecule and on
concanavalin A binding. Biochem. Biophys. Acta, 365: 28-39,
1974.
- JANZEN, D.H. The defense of legumes against herbivores. In.
Polhill, R.M. & Raven P.H. ed. Advances in legume
systematics part 2. Kew, Royal Botanic Gardens, 1981.
p.951-978.
- JINNO, T. On the relation between the chromosome numbers
and the flora growing in the coast of the inland sea in
Japan. Jap. J. Gen., 31: 147-54, 1956.
- KAWAKAMI, J. Chromosome numbers in Leguminosae. Bot. Mag.
Tokyo, 44: 319-28, 1930.
- KIERNAN, J.A. Histological & histochemical methods: theory
and practice. London, Pergamon, 1981. 344p.
- LEWIN, R. Surprising discovery with a small RNA. Science,
218: 777-8, 1982.
- LILLIE, R.D. Histopathologic technic and practical
histochemistry. New-York, Blakiston, 1954.

- LISON, L. Histochemie et citochemie animales. Paris, Gauthier-Villars, 1953. 2ed. 607p.
- LOTT, J.N.A. Protein bodies. In: Tolbert, N.E. ed. The plant cell. New York, Academic, 1980. cap.14, p.589-623 (The biochemistry of plants, v.1).
- MAIA, V. Técnica histológica. São Paulo, Atheneu, 1979. 2ed. 246p.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. The germination of seeds. Oxford, Pergamon, 1982. 3ed. 211p.
- MCCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V. & OWENS, H.S. Determination of starch and amylose in vegetables. Anal. Chem., 22:1156-8, 1950.
- McLEESTER, R.C.; HALL, T.C.; SUN, S.M. & BLISS, F.A. Comparison of globulin proteins from Phaseolus vulgaris with those from Vicia faba. Phytochemistry, 12: 85-93, 1973
- MEINKE, D.W.; CHEN, J. & BEACHY, R.N. Expression of storage protein genes during soybean seed development. Planta, 153: 130-9, 1981.

MELLO, M.L.S. & RAYMUNDO, H.H. Change with age of Feulgen-DNA values in the blood-sucking insect, Triatoma infestans Klug. Histochemistry, 54: 219-23, 1977.

_____ & VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. Ciênc.Cult., 30: 665-76, 1978.

_____ & _____. Práticas de Biologia celular. São Paulo, Edgar Blucher-Funcamp, 1980. 69p.

MIEGE, J. Nombres chromosomiques de plantes d'Afrique Occidentale. Rev.Cytol.Biol.Veg., 21: 373-84, 1960.

OSBORNE, T.B. & CAMPBELL, G.F. Proteids of the soy bean (Glycine hispida). J.Am.Chem.Soc., 20: 419-28, 1898.

PATE, J.S. Pea. In: Crop Physiology. Evans, L.T., ed. Cambridge, Univ.Press, 1975. p.191-224.

PEAFSE, A.G.E. Histochemistry: theoretical and applied. London, J & A Churchill Ltd., 1961. 2ed. 998p.

PERNOLLET, J.C. Protein bodies of seeds: ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. Phytochemistry 17: 1473-80, 1978.

_____. Les corpuscules protéiques des graines, stade transitoire de vacuoles spécialisées. Physiol.Vég., 20: 259-76, 1982.

_____. Biosynthesis and accumulation of storage proteins in seeds. Physiol.Vég., 23: 45-59, 1985.

PIPER, C.V. The American species of Canavalia and Wenderothia. Contrib.U.S.Nat.Herb., 20:555-88, 1925.

POLHIL, R.M. & RAVEN, P.H. Advances in legumes systematics part I. In: _____ ed. Kew, Royal Botanic Gardens, 1981. 266p.

POLICARD, A.; BESSIS, A. & LOCQUIM, M. Traité de microscope - instruments et techniques. Paris, Masson et Cie., 1957. 608p.

PRESTON, R.D. The molecular architecture of plant cell walls. London, Chapman & Hall, 1952. 211p.

_____. Wall organization in plant cells. Int.Rev. Cytology, 8: 33-60, 1959.

RANDI, A.M.; VIDAL, B.C. & CORTELAZZO, A.L. Cytochemical aspects of spores and rhizoids of Cyathea delgadii during germination. Submetido à publicação (Plant Cell Physiol.) 1988.

RAO, T.C.; LAKSHMINARAYANA, G.; PRASAD, N.B.L.; RAO, S.J.M. RAMAYYA, D.A. & RAO, S.D.T. Characteristics and compositions of Carissa spinarum, Leucaena leucocephala and Physalis minima seeds and oils. JAOCS, 61: 1472-3, 1984.

RILEY, H.P. Chromosomes of some plants from the Kruger National Park. J.S.Afr.Bot., 26: 37-44, 1960.

ROSENTHAL, G.A.; BERGE, M.A.; BLEILER, J.A. & RUDD, T.P. Aberrant, canavanyl protein formation and the ability to tolerate or utilize L-canavanine. Experientia, 43: 558-61, 1987.

SAMMOUR, R.H.; GATEHOUSE, J.A.; GILROY, J. & BOULTER, D. The homology of the major storage protein of jack bean (Canavalia ensiformis) to pea vicilin and its separation from mannosidase. Planta, 161: 61-70, 1984.

SANCHEZ-LUCAS, J.G. Modificaciones patológicas de las células y de los tejidos. In: Tratado de Patología general y anatomía patológica. Barcelona, Labor, 1959. 7^{ed.} p.129-176.

SAUER, J. Revision of Canavalia. Brittonia, 16:106-81, 1964.

SCOTT Jr., T.A. & MELVIN, E.H. Determination of dextran with anthrone. Anal.Chem., 25: 1656-61, 1953

SHANNON, J.C. A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature Zea mays Kernels. Res.Bull., 842:1-8, 1968.

SIMMONDS, N.W. Chromosome behavior in some tropical plants. Heredity, 8: 139-46, 1954.

SMITH, A.K. & RACKIS, J.J. Phytin elimination in soybean protein isolation. Chem.Soc., 79: 633-5 , 1957.

SMITH, D.L. Cotyledons of the Leguminosae. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. ed. Advances in legume systematics part 2. Kew, Royal Botanic Gardens, 1981. p.927-940.

SMITH, S.C.; JOHNSON, J.S.; ANDREWS, J. & McPHERSON, A.
Biochemical characterization of canavalin, the major
storage protein of jack bean. Plant Physiol., 70:
1199-209, 1982.

SUMNER, J.B.; GRALÉN, N. & ERIKSSON-QUENSEL, I-B. The
molecular weights of canavalin, concanavalin A, and
concanavalin B. J.Biol.Chem., 125: 45-8, 1938.

TAL, M.; SILBERSTEIN, A. & NUSSER, E. Why does coomassie
brilliant blue R interact differently with different
proteins? J.Biol.Chem., 260: 9976-80, 1986.

TEIXEIRA-MENDES, J.E. Adubação verde para cafezais.
Boletim I.A.C., 24. Campinas-SP, 1940.

TUKEY, J.W. Exploratory data analysis. Reading,
Addison-Wesley, 1977. 507p.

VAN DER WILDEN, W.; HERMAN, E.M. & CHRISPEELS, M.J. Protein
bodies as autophagic organelles. Proc.Natl.Acad.Sci
U.S.A., 77: 428-32, 1980.

VAN ONCKELEN, H.A.; CAUBERGS, R. & DE GREEF, J.A. Effect of
light treatment and endogenous growth hormones on -and -
amylase activities in cotyledons of Phaseolus vulgaris L.
Plant Cell Physiol., 18: 1029-40, 1977.

VIDAL, B.C. The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of collagen. Protoplasma, 59: 472-9, 1964.

_____. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine Ponceau 2R. Ann.Histochim., 15:289-96, 1970.

_____. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. Cell.Mol.Biol., 22:45-64, 1977.

_____. Métodos em Biologia Celular. In: _____ & MELLO, M.L.S. ed. Biologia Celular. Rio de Janeiro, Atheneu, 1987. cap.2, p.5-39.

_____. & PIMENTEL, E.R. Caracterização bioquímica, topográfica e estrutural dos corpos protéicos do feijão macuco ou jacatupé (Pachyrhizus tuberosus (Lam.) Spreng). Revta. Bras.Bot., 8:223-9, 1985.

WALLING, L.; DREWS, G.N. & GOLDBERG, R.B. Transcriptional and post-transcriptional regulation of soybean seed protein mRNA levels. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 83: 2123-7, 1986.

WOLFF, I.A. & KWOLEK, W.F. Lipids of the Leguminosae. In: Harborne, J.B.; Boulter, D. & Turner, B.L. ed. Chemataxonomy of the Leguminosae. London, Academic, 1971. p.231-255.

WRIGHT, D.J. & BOULTER, D. A comparison of acid extracted globulin fractions and vicilin and legumin of Vicia faba. Phytochemistry, 12: 79-84, 1972.

YAMAUCHI, D. & MINAMIKAWA, T. In vivo studies on protein synthesis in developing seeds of Canavalia gladiata D.C. Plant Cell Physiol., 27: 1033-41, 1986.

_____ & _____. Synthesis of canavalin and concanavalin A in maturing Canavalia gladiata seeds. Plant Cell Physiol., 28: 421-30, 1987.

ZINGALES, B. Analysis of protein by sodium dodecyl-sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. In: Morel, C.M. ed. Genes and antigens of parasites. Rio de Janeiro, UNDP/World Bank/WHO/Fiocruz, 1984. p.357-363.

ERRATA

Pág.3, penúltima linha: onde se lê solubllidade, leia-se solubilidade

Pág.16, ítem 2.4.4, 2a.linha: onde se lê 0,05%, leia-se 0,5%

Pág.21, 10a. e 11a. linha: leia-se 2°C/min e 230°C

Pág.70, ítem 3.9, 2a.linha: retirar "ou folhas cotiledonares"

Pág.77, 7a.linha; Pág.86, 1a.linha; Pág.111, 4a.linha; Pág.113, ítem 7, 4a. linha: onde se lê germinação, leia-se embebição

Pág. 93, Tabela 18, na coluna das porcentagens (%), em Ce7d, leia-se 73,7% e em Cg7d, leia-se 51,1%

Pág.112, ítem 2, 1a.linha: onde se lê das folhas cotiledonares, leia-se dos cotilédones

Pág.113, ítem 4,5a.linha; Pág.114, ítem 13: onde se lê excisão das folhas co tiledonares, leia-se abscisão dos cotilédones.