

PROTEÍNAS COTILEDONARES DE SOJA: DETECÇÃO
"IN SITU" E MOBILIZAÇÃO DURANTE A GERMINAÇÃO.

Angelo Luiz Cortelazzo

ANGELO LUIZ CORTELAZZO

Este exemplar corresponde à redação final da
tese defendida pelo Sr. Angelo Luiz Cortelazzo
e aprovada pela Comissão julgadora.
Campinas, 28 de fevereiro de 1986.



PROTEÍNAS COTILEDONARES DE SOJA: DETECÇÃO
"IN SITU" E MOBILIZAÇÃO DURANTE A GERMINAÇÃO.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do tí
tulo de Mestre em Biologia, área
de Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

Campinas

1986

À

Bruno e Izolina,

meus pais.

AGRADECIMENTOS:

1. Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, orientador e amigo, por acreditar em mim, me mostrar como proceder com dignidade, honradez, vibração e método no trato da ciência e da vida e ainda por seus ensinamentos em Biologia Celular.
2. À Profa. Dra. Maria Luiza S. Mello, por estar participando de minha formação de maneira amiga e incentivadora, por seus ensinamentos valiosos desde que iniciei no Depto. de Biologia Celular, pelas sugestões oferecidas e pelo critério com que leu o manuscrito do presente trabalho.
3. Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel, pela sua amizade, compreensão e apoio, quer ao nível de Chefia do Depto. de Biologia Celular, quer ao nível pessoal, pela forma com que leu o manuscrito do presente trabalho, pelas sugestões oferecidas e pelo seu acompanhamento e orientação no preparo e análise das eletroforeses realizadas.
4. Ao Prof. Dr. Ivan F. M. Valio, pela amizade com que tem me distinguido, pelos seus ensinamentos, destacando-se os relacionados à germinação de sementes, por sua valiosa análise do manuscrito do presente trabalho e pelas sugestões oferecidas.
5. Ao Homero Ferracini Gumerato, grande amigo, pela paciência e vibração com que passou inúmeros fins de semana trabalhando e ensinando a processar os dados quantitativos para a análise estatística, cujo mérito lhe pertence.
6. À Vera Lucia P.F. Gumerato, grande amiga, por ter pacientemente acompanhado e auxiliado na análise estatística junto com seu companheiro, vibrando e incentivando mesmo nas horas mais difíceis, pelo auxílio na montagem das figuras e tabelas e por sua amizade.

7. À Profa. Dra. Maria Lucia F. Wada e Dulce Maria Daltro, pela compreensão, amizade e paciência na leitura e correção da maior parte do texto.
8. À Mara Aparecida de Lucio, Walter Barrella e Maria Lucia E, Kato, amigos de minha turma de graduação, por sua compreensão e auxílio em todas as horas.
9. Aos amigos do Depto. de Biologia Celular, em especial à Dna. Luiza P. Burghi e à Profa. Shirlei M.R. Pimentel, pelos ensinamentos de inúmeras técnicas citológicas desde minha época de graduação e ao Dean V. Buonomano, pela redação do Abstract.
10. Ao Depto. de Biologia Celular, por ter possibilitado a realização do presente trabalho.
11. A todos os meus amigos não citados, pois de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.
12. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido na forma de Bolsa de Mestrado, o qual contribuiu para a realização de parte deste trabalho.
13. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido na forma de equipamentos e materiais de consumo, que contribuíram para a realização de parte deste trabalho.

ÍNDICE

	pag.
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
SEMENTES "IN NATURA"	
2.1. Fixação.....	10
2.1.1. Paraformaldeído tamponado.....	10
2.1.2. Paraformaldeído a seco.....	10
2.1.3. Etanol absoluto.....	10
2.1.4. Etanol X ácido acético 3:1 v/v.....	10
2.2. Processamento pós-fixação.....	11
SEMENTES DURANTE A GERMINAÇÃO:	
2.3. Fixação.....	11
2.3.1. Paraformaldeído tamponado.....	11
2.3.2. Etanol X ácido acético 3:1 v/v.....	11
2.4. Processamento pós-fixação.....	12
2.5. Regiões observadas.....	12
2.6. Métodos gerais e citoquímicos para	
determinações qualitativas.....	13
2.6.1. Hematoxilina eosina.....	13
2.6.2. Sudan black.....	13
2.6.3. Impregnação pela prata.....	13
2.7. Métodos citoquímicos para a análise	
qualitativa e quantitativa.....	14
2.7.1. Xylidine Ponceau.....	14
2.7.2. Azul de toluidina.....	15
2.7.3. Azul de alcian.....	16
2.7.3.1. Azul de alcian a pH 2,5.....	16
2.7.3.2. Azul de alcian a pH 1,0.....	17

2.8. Cálculo das áreas e volumes dos	
corpos proteicos.....	18
2.9. Extrações proteicas.....	19
2.9.1. Prê-tratamento com ácido acético.....	19
2.9.2. Digestão com pepsina.....	20
2.9.3. Digestão com tripsina.....	20
2.10. Detecção citofotométrica do ponto isoelétrico	
aparente dos corpos proteicos.....	20
2.10.1. Xileno cianol.....	21
2.10.2. Azul de metileno.....	21
2.10.3. Medições citoespectrofotométricas.....	21
2.11. Curvas de birrefringência de forma.....	22
2.12. Eletroforese.....	23
2.12.1. Obtenção do extrato total.....	23
2.12.2. Extração da fração rica em lectinas.....	24
2.12.3. Preparo do gel.....	24
2.12.4. Preparo da amostra.....	24
2.12.5. Corrida.....	24
2.13. Dosagem de proteínas.....	25
2.14. Testes de aglutinação-.....	26
2.14.1. Aglutinação "in vitro".....	26
2.14.2. Aglutinação "in situ".....	26
3. RESULTADOS.....	27
3.1. Aspectos gerais.....	27
3.1.1. Cortes corados pela hematoxilina eosina..	27
3.1.2. Cortes corados pelo Sudan black.....	32
3.1.3. Cortes submetidos à impregnação	
pela prata.....	32

3.2. Resultados das análises citoquímicas	
qualitativas e quantitativas.....	36
3.2.1. Xylidine Ponceau.....	36
3.2.1.1. Quantificação do conteúdo	
proteico.....	39
3.2.2. Cortes corados com azul de toluidina.....	43
3.2.2.1. Cálculo do índice metacromático...	49
3.2.3. Cortes corados com azul de alcian.....	55
3.3. Cálculo da área e volume dos corpos proteicos.....	55
3.3.1. Corpos proteicos por corte celular.....	55
3.3.2. Corpos proteicos.....	61
3.4. Extrações proteicas.....	66
3.4.1. Controles.....	66
3.4.2. Pré-tratamento com ácido acético.....	66
3.4.3. Tratamento pela pepsina.....	66
3.4.4. Tratamento pela tripsina.....	67
3.5. Determinação do ponto isoelétrico aparente	
dos corpos proteicos "in situ".....	67
3.6. Curvas de birrefringência de forma.....	71
3.7. Eletroforese.....	80
3.8. Dosagem de proteínas.....	86
3.9. Testes de aglutinação.....	89
3.9.1. Aglutinação "in vitro".....	89
3.9.2. Aglutinação "in situ".....	89
4. DISCUSSÃO.....	93
4.1. Processos de fixação.....	93
4.2. Aspectos gerais.....	95

	pag
4.3. Aspectos quantitativos.....	099
4.3.1. Material proteico.....	099
4.3.2. Radicais aniônicos totais.....	106
4.4. Curvas de birrefringência de forma.....	108
4.5. Considerações finais.....	113
5. CONCLUSÕES.....	115
6. RESUMO.....	117
7. ABSTRACT.....	118
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

1. INTRODUÇÃO:

Sementes de soja, como as de muitas outras leguminosas, têm sido alvo de várias pesquisas devido ao seu alto valor nutritivo. Para uma umidade em torno de 8-10%, sua composição química porcentual apresenta como maiores constituintes as proteínas (~40%), lipídios em geral (~22%), carboidratos totais (~17%), inúmeros constituintes minerais, com destaque para o potássio (1,67%) e outras substâncias como alguns tipos de vitaminas ou seus precursores como o inositol, ácido nicotínico, tiamina, etc. (MAYER & POLJAKOFF MAYBER, 1982). Apresentam portanto, um alto teor proteico, representado principalmente por proteínas de reserva.

A classificação das proteínas de sementes é feita normalmente segundo proposição de OSBORNE (1924), baseada na solubilidade das mesmas, em quatro grandes grupos. Em leguminosas, destaca-se a presença de globulinas, que são proteínas insolúveis em água mas solúveis em soluções salinas. As globulinas, são subdivididas em dois grandes grupos baseando-se em seu coeficiente de sedimentação (CS), a saber: fração 11 S ou legumina e fração 7 S ou vicilina. Em soja, a fração legumina apresenta um CS = 12,2 S com peso molecular = 345.000-363.000 daltons e recebe normalmente o nome de glicinina que, com base em suas propriedades imunoquímicas parece ser formada apenas por uma proteína (MILLERD, 1975). A fração vicilina possui um CS = 8,0 S com P.M. de 330.000 daltons (DERBYSHIRE et alii, 1976), sendo ainda menos abundante que as leguminas (PERNOLLET, 1985).

Em leguminosas, as proteínas de reserva são estocadas nos cotilédones dos embriões diplóides e a síntese dessas proteínas é feita simultaneamente à fase de expansão celular no desenvolvimento do embrião, que sucede a fase de divisão celular, na qual praticamente não há síntese das mesmas.

Em soja, vicilinas e leguminas se acumulam a partir de diferentes tempos de desenvolvimento do embrião (MEINKE et alii, 1981) e, nos tecidos de reserva formam estruturas sub-celulares denominadas corpos proteicos (LOTT & BUTTROSE, 1978).

Os corpos proteicos diferem em complexidade, entre as diversas espécies, com diâmetros oscilando entre 0,1 a 22 μm . Em leguminosas, normalmente são estruturas envolvidas por membrana lipoproteica, com formato arredondado, um teor proteico médio de 80%, com a presença de fitatos e de lipídeos, podendo ainda apresentar cristais globóides em seu interior (LOTT, 1980).

Leguminas de Glycine max são sintetizadas a nível do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) através da partícula reconhedora sinal (PRS) e se acumulam nas cisternas do mesmo (BILS & HOWELL, 1963; EREKEN-TUMER et alii, 1982). Vicilinas são também sintetizadas a nível do RER, seguindo daí para o Aparelho de Golgi e a seguir formando vacúolos que originarão os corpos proteicos (PERNOLLET, 1982). Como glicoproteínas, tanto leguminas quanto vicilinas sofrem glicosilações pós-traducionais no RE (DAVIES & DELMER, 1979; 1981; CHRISPPEELS et alii, 1982a; 1982b).

Várias outras informações a respeito da formação e desenvolvimento dos cotilédones em geral e sobre a biossíntese e estocagem de proteínas em sementes, podem ser obtidas em inúmeros trabalhos, destacando-se os de MILLERD et alii (1978), THOMSON et alii (1978a; 1978b), CRAIG et alii (1979; 1980a; 1980b), RANDALL et alii (1979), FASSEAS & BOWES (1980), SIDDARAME & PILLAY (1980), THORNE (1981) e a revisão de PERNOLLET (1985).

Para ser iniciado o processo de germinação as sementes requerem condições mínimas de umidade, temperatura e concentração de oxigênio que podem variar bastante entre as espécies mas, de forma geral, o processo de embebição em água, nas condições usuais de pressão e temperatura desencadeia a germinação em sementes viáveis e não dormentes. Com a embebição, ocorre a ativação da respiração na semente.

O processo de respiração das sementes durante a germinação pode ser dividido em quatro fases (BEWLEY & BLACK, 1978):

Fase I: onde ocorrem as ativações e hidratações das enzimas e substâncias mitocondriais associadas ao ciclo de Krebs e à cadeia respiratória, podendo durar algumas horas.

Fase II ou fase lag: há nessa fase o término da hidratação e todo o sistema enzimático pré-existente se encontra ativado. O quociente respiratório apresenta valores próximos a 3,0, indicando um processo de respiração anaeróbico (SPRAGG & YEMM, 1959). Apesar de nem todas as sementes apresentarem essa fase, no caso da soja e de inúmeras outras espécies, ela ocorre, durando algumas horas.

Fase III: há novo incremento na respiração aeróbica (QR próximo a 1,0). No início dessa fase (ou final da fase II em vários casos), é observada a protrusão da radícula.

Fase IV: Ocorre nova queda no consumo de oxigênio, que coincide com o início da desintegração dos cotilédones e esgotamento do material de reserva.

No início da embebição as primeiras moléculas a serem metabolizadas são de carboidratos. Em soja, o conteúdo de rafinose e estaquiose decai em 50% nos dois primeiros dias de embebição, havendo nesse período a emergência da radícula. Sacarose, mais abundante, somente declina após esse período (EAST et alii, 1972). Durante a degradação de estaquiose, rafinose e sacarose, há acúmulo de glicose e frutose livres na semente (PAZUR et alii, 1962). Lipídeos são metabolizados a seguir, envolvendo glioxissomos e mitocôndrias (HUTTON & STUMPF, 1971). Síntese de proteínas e enzimas hidrolíticas ocorre também no início do processo de embebição (Fase I da respiração), a partir de RNA pré-existente na semente seca (na maioria dos casos). Pode ocorrer a síntese "de novo" de moléculas dos diversos RNAs celulares durante a embebição.

A síntese de DNA ocorre apenas após a germinação, uma vez que a expansão inicial da radícula se dá por elongação. Assim, apenas após a emergência da mesma, as células meristemáticas passam a sofrer divisões mitóticas. Entretanto, células de embriões secos, podem apresentar um conteúdo de DNA = 4C, enquanto que em algumas espécies, embriões e radículas contêm núcleos 2C e 4C e outras ainda, apenas 2C (BEWLEY & BLACK, 1978).

A mobilização das proteínas de reserva se inicia normalmente, a partir da fase III da respiração. São encontradas em sementes "in natura" de Phaseolus vulgaris e Pisum sativum, proteinases com baixa atividade. Após 4-5 dias do processo de embebição, há grande incremento na atividade dessas enzimas (YOMO & SRINIVASEN, 1973; YOMO & VARNER, 1973) e essa atividade parece não envolver desaminações ou descarboxilações. Em soja, nessa fase, ocorre a atuação de desaminases (CATSIMPOOLAS et alii, 1968; DAUSSANT et alii, 1969). A mobilização das reservas em G. max, como em Vicia faba, ocorre a partir da região abaxial do cotilédone e o processo se desenvolve com a manutenção do conteúdo proteico nas camadas celulares mais adjacentes ao sistema vascular do cotilédone, em contraste com outras formas de mobilização, que podem ocorrer a partir da região adaxial, a partir do centro, ou mesmo simultaneamente a partir das regiões ab e adaxial do cotilédone (SMITH, 1974).

As modificações dos corpos proteicos durante a germinação e as suas relações com os feixes vasculares (TOMBS, 1967; CATSIMPOOLAS et alii, 1968; MIALONIER et alii, 1973; GANESH et alii, 1978) e a mobilização das proteínas (ASHCROF & MURRAY, 1979), têm sido apontadas em alguns trabalhos, porém, com ênfase para o aspecto bioquímico. Nesses trabalhos é defendida a idéia de que um processo enzimático degradaria as proteínas para transporte pelo eixo de crescimento e também destinada às perdas respiratórias. Entretanto uma degradação simplesmente, pode ser questionada se considerarmos a possibilidade dessas proteínas poderem ser

transportadas pelo sistema vascular existente no cotilédone para a radícula, desde o início da germinação, sem uma degradação enzimática, pelo menos em sua totalidade. Segundo VIDAL (1983) ocorrem modificações dos corpos proteicos e das células cotiledonares na fase da germinação, expressas por modificações da reatividade da proteína, descompactação ou desagregação e seu aparecimento em estruturas vasculares para o transporte do material citado, podendo-se detectar nestes, material com reações próprias para proteínas. Assim sendo, torna-se importante uma pesquisa mais detalhada das modificações estruturais cotiledonares na fase da germinação e do desenvolvimento de um sistema de condução implicado no transporte de proteínas para a radícula.

A existência de lectinas (glicoproteínas) a nível de cotilédone é outro fator relevante a ser estudado, devido à sua importância nos estudos da estrutura e das funções da cobertura celular do plasmalema. Aproximadamente 2,5% da proteína de Canavalia ensiformis é a lectina Concanavalina A e em soja, 1,5% do conteúdo proteico da semente, é uma aglutinina (CALLOW, 1975). A identificação dos tipos sanguíneos "in vitro" são levadas a efeito com facilidade, graças à existência de glicoproteínas intrínsecas da membrana das hemácias que são reconhecidas pelas lectinas (SHARON & LIS, 1972; SIMPSON et alii, 1978; BARONDES, 1981). Reconhecimento de alta especificidade é inerente a cada lectina e se faz a nível da fração glicídica terminal não redutora das glicoproteínas, culminando geralmente em fenômenos de aglutinação e precipitação. Contudo, nos próprios vegetais onde são

produzidas, especialmente em leguminosas, ainda não se determinou com precisão as suas funções, que podem ser postas à prova inclusive pelas suas características de aglutinar determinadas células, incluindo-se as bacterianas.

As interações entre lectinas e outras glicoproteínas toma particular importância no caso das leguminosas, devido às suas interações com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (BARONDES, 1981). A esse respeito, alguns estudos entre a interação patógeno-hospedeiro, têm sido feitos em feijão (ALBERSHEIM & VALENT, 1974), aveia (LANGSTON - UNKEFER & GADE, 1984), alfafa (VASSE & TRUCHET, 1984) e soja (BAL et alii, 1978; CALVERT et alii, 1978; MORT & BAUER, 1980; 1982; STACEY et alii, 1980), destacando o papel das lectinas presentes na planta, para a atração e interação com a bactéria infectante, tornando-se necessária uma comprovação mais acurada dessas propriedades "in situ".

Nesse terreno, revisões importantes (DILWORTH, 1974; ALBERSHEIM & VALENT, 1978; ALBERSHEIM et alii, 1980; ROBERTSON & FARNDEN, 1980; DAZZO & TRUCHETT, 1983) nos chamam a atenção, não só para os fenômenos interativos de reconhecimento, mas também para aqueles em que da interação entre resíduos de carboidratos resultam estímulos para que a planta hospedeira sintetize fitolexinas, como é o caso em Phaseolus vulgaris (HARGREAVES & SELBY, 1978).

Neste contexto vem se impondo cada vez mais a necessidade de conhecimentos detalhados e integrados sobre a parede celular vegetal em termos de composição "in situ", estrutura e propriedades físicas.

A relevância dos estudos das paredes celulares não deve se confinar à determinação de sua composição química e topoquímica (PRESTON, 1959; WILSON, 1964), mas estender-se à detecção e quantificação da ordem molecular "in situ" através de métodos topofísicos. Problemática semelhante com relação a Matriz Extra Celular tem sido abordada com sucesso em tecidos animais (VIDAL, 1963 a 1983) mas no que concerne a célula vegetal não foram encontradas ainda, informações comparáveis, embora a importância da configuração molecular de seus constituintes para a dinâmica de sua fisiologia já tenha sido apontada por PRESTON (1979). O fato contudo é que, apesar de alguns trabalhos (FREY-WISSLING, 1948; FREY-WISSLING & MUHLETHALER, 1965; FINCHER & STONE, 1983), faltam publicações que tratem do assunto com mais profundidade, acurácia e quantitativamente, como é o propósito de se levar a efeito neste trabalho, com cotilédones e radículas de G.max.

Pelo acima exposto e a despeito das informações atualmente existentes sobre a formação dos corpos proteicos e sua degradação durante a germinação, o presente trabalho tem como objetivos:

1. Detectar os corpos proteicos dos cotilédones "in situ", através de reações gerais e citoquímicas, apontando possíveis variações quantitativas, estruturais, topoquímicas e topofísicas durante o processo de germinação.
2. Caracterizar os vasos cotiledonares, quantificando as relações do material proteico e localizando-o em tais vasos, antes e durante o processo de germinação.
3. Averiguar "in situ" a existência ou não de modi

ficações na polaridade das paredes celulares, durante a germinação através de métodos citoquímicos.

4. Verificar possíveis alterações na ordem molecular das paredes celulares antes e após a germinação, em diversas regiões do cotilédone e radícula.

5. Extrair e separar proteínas cotiledonares e do embrião, quantificá-las e caracterizá-las através de eletroforeses em gel de poliacrilamida.

6. Verificar a ligação de lectinas bivalentes específicas para sacarídeos nas paredes celulares a partir de testes de aglutinação de hemácias, diretamente sobre preparados de cotilédones e raízes.

2. MATERIAL E MÉTODOS:

Foram utilizadas sementes de soja (Glycine max), variedade Santa Rosa, "in natura" e em diversas etapas do processo de germinação.

SEMENTES "IN NATURA"

2.1. Fixação:

As sementes foram submetidas a quatro processos de fixação, descritos a seguir:

2.1.1. Fixadas em solução de paraformaldeído a 4% em Tampão fosfato 0,2 M a pH 7,4 e glutaraldeído a 5% durante 24 horas a aproximadamente 5°C (KIERNAN, 1981).

2.1.2. Fixadas em vapores de paraformaldeído a seco: as sementes foram mantidas à vácuo em dessecador, suspensas em cuba contendo paraformaldeído e algumas gotas de ácido clorídrico concentrado, durante quatro dias à temperatura ambiente.

2.1.3. Fixadas em etanol a 100% durante 48 horas à temperatura ambiente (LISON, 1953).

2.1.4. Fixadas em etanol 100% X ácido acético glacial 3 :1 v/v, durante 30 min à temperatura ambiente. Parte desse material foi pré-tratado com ácido acético a 45% por uma hora (McCLUNG, 1967).

2.2. Processamento pós-fixação:

Após fixação, quando necessário, o material foi desidratado em soluções de etanol com concentrações crescentes (de 70% até 100%), diafanizado em toluol durante 30 min e posteriormente deixado em óleo de cedro para término da diafanização, por um mínimo de sete dias (POLICARD et alii, 1957).

O material assim processado foi incluído em parafina e seccionado em micrótomo (R.JUNG-HEIDELBERG), em cortes com 8 μ m de espessura.

SEMENTES DURANTE A GERMINAÇÃO:

As sementes foram lavadas em água, higienizadas com hipoclorito de sódio a 2% durante 5 min, novamente lavadas e colocadas para germinar em placas de Petri, que foram mantidas à temperatura ambiente e na ausência de luz, sendo os cotilédones e raízes retirados após 24, 48, 72 e 144 horas do início do processo de embebição.

2.3. Fixação:

As amostras coletadas foram submetidas a dois processos de fixação:

2.3.1. Material com 24, 48, 72 e 144 horas de desenvolvimento foi fixado em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2 M a pH 7,4 e glutaraldeído a 5%.

2.3.2. Amostras obtidas após 72 horas de embebição foram fixadas em etanol 100% X ácido acético glacial 3:1 v/v durante

30 min à temperatura ambiente. Parte desse material foi pré-tratado com ácido acético a 45% por uma hora, antes da fixação.

2.4. Processamento pós-fixação:

O material assim obtido, sofreu o mesmo processamento descrito no item 2.2, sendo os cotilédones e as raízes incluídos em parafina, separadamente.

2.5. Regiões observadas:

Nos diversos métodos qualitativos e quantitativos utilizados, os cotilédones e radículas foram observados nas seguintes regiões:

- a) CDVA: Células distantes do sistema vascular do cotilédone, antes da embebição para a germinação.
- b) CAVA: Células adjacentes ao sistema vascular do cotilédone, antes da embebição para a germinação.
- c) CSVA: Células do sistema vascular, antes da embebição para a germinação.
- d) CRE : Células da porção radicular do embrião, antes da embebição para a germinação.
- e) CDVB: idem ao item a, após embebição para a germinação. Seguindo-se à sigla, será colocado o tempo correspondente. Por ex.: após 72 horas de embebição:CDVB-72.
- f) CAVB: idem ao item b, após embebição para a germinação.
- g) CSVB: idem ao item c, após embebição para a germinação.

h) CRB : Células da radícula, após germinação.

Para melhor esclarecimento das regiões acima citadas, vide Fig. 1.

2.6. Métodos gerais e citoquímicos para determinações qualitativas:

2.6.1. Hematoxilina-eosina (HE):

O material foi corado durante 7 min em hematoxilina, seguindo-se banho em água destilada por 12 min, eosina durante 10 min, rápida desidratação (álcool 95%, 100%), diafanização em xilol e montagem em bálsamo do Canadá ($n_D=1,54$).

2.6.2. Sudan-black a 0,05% em álcool 95°GL:

Para a detecção de lipídios e/ou radicais hidrofóbicos, foi utilizada solução de sudan-black 0,05% em etanol 95%. O material foi corado durante 30 min, deixado ao ar para secagem, rapidamente diafanizado em xilol e montado em bálsamo do Canadá.

2.6.3. Impregnação pela prata para a detecção de radicais vic glicóis de polissacarídeos:

O material foi submetido à oxidação em ácido periódico a 0,5% durante 10 min, lavado em água destilada, imerso em prata amoniacal a 1% por 10 min, tratado com formol a 10% durante 30 s, novamente lavado em água e, em seguida, tratado com tiosulfato de sódio a 5% durante 3 min, desidratado e montado em bálsamo do Canadá (GALLYAS, 1970; LHOTKA & MHYRE, 1953).

Os materiais assim preparados, foram observados em microscópio Pol Zeiss.

2.7. Métodos citoquímicos para a análise qualitativa e quantitativa:

2.7.1. Xylidine Ponceau a pH 2,5 (XP) para a detecção de radicais $-NH_3^+$ totais:

O material foi corado durante 15 min à temperatura ambiente seguindo-se lavagem em ácido acético a 2% durante 30 min, desidratação, diafanização e posterior montagem em bálsamo do Canadá (VIDAL, 1970b). O material assim preparado foi observado em microscópio Pol Zeiss.

A quantificação do conteúdo proteico foi realizada em fotomicroscópio Pol Zeiss equipado com fotômetro 01 e fotomultiplicador EMI 6256, utilizando-se objetiva Plan 40/0,65, optovar 2,0, diafragma de medida de 0,25 mm, diafragma de campo de 0,3 mm, com medidas realizadas em $\lambda = 570$ nm, escolhido após confecção de curva espectral com o material corado, obtido com o uso de régua monocromadora marca SCHOTT. Nessas condições, a área medida de cada corpo proteico foi de $7,67 \mu m^2$. Foram realizadas 40 medições da absorbância em CDVA e B, CAVA e B, CSVA e B. As radículas (CRE e ainda CRB) foram subdivididas em duas regiões; células do parênquima e células do sistema vascular, com um total de 40 medições, para cada tipo de região.

Os resultados das diversas medições e os resultados transformados segundo a função: $\log (\text{abs} + 1)$ (Box, 1976),

foram submetidos a análise de variância com dois fatores: tempo e posição, segundo o modelo associado:

$$Abs_{ijk} = \mu + p_i + t_j + pt_{ij} + e_{ijk}$$

onde $i = 1, 2, 3, 4$ e 5 , representando as 5 diferentes posições; $j = 1, 2$ e 3 , representando os 3 tempos diferentes, $k = 1, 2, \dots, 40$, representando o número da observação realizada; μ = média populacional; Abs_{ijk} = absorbância na posição i , tempo j e observação k ; p_i = efeito da i -ésima posição; t_j = efeito do j -ésimo tempo; e_{ijk} = erro casual associado à medida da Abs_{ijk} .

Foram testadas as seguintes hipóteses para o modelo, ao nível de 1% de probabilidade.

$$H_{01} = p_1 = p_2 = p_3 = p_4 = p_5 = 0 \text{ (não existe efeito da posição);}$$

$$H_{02} = t_1 = t_2 = t_3 = 0 \text{ (não existe efeito do tempo);}$$

$$H_{03} = pt_{11} = pt_{12} = \dots = pt_{53} = 0 \text{ (não existe efeito da interação).}$$

Para a rejeição das hipóteses foi utilizado 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 célula ij .

2.7.2. Azul de Toluidina a pH 4,0 (AT):

O AT foi utilizado para a detecção de grupos aniônicos e de metacromasia. As amostras foram submetidas a co-

loração com azul de Toluidina a pH 4,0 em tampão McIlvaine durante 15 min à temperatura ambiente, seguindo-se 3 banhos rápidos em água destilada, secagem ao ar, diafanização durante 10 min em xilol e montagem em bálsamo do Canadá.

Cálculo do Índice Metacromático (VIDAL, 1977):

A determinação do índice metacromático (A_{555}/A_{625}) das paredes celulares de CDVA e B, CAVA e B e CRE e B foi realizada a partir de 20 medições em $\lambda = 555$ nm e $\lambda = 625$ nm em cada um dos materiais especificados, em fotomicroscópio como descrito no ítem anterior, porém com a utilização de diafragma de medida = 0,16 mm e diafragma de campo = 0,2 mm, apresentando portanto uma área tomada em cada medição de $3,14 \mu\text{m}^2$.

Os resultados obtidos nas diversas medições e aqueles obtidos através da transformação $1/\exp(\text{abs})$ foram submetidos à análise de variância com dois fatores: tempo e posição, usando-se o modelo:

$$IM_{ijk} = \mu + p_i + t_j + pt_{ij} + e_{ijk}$$

onde IM_{ijk} = índice metacromático na posição i , tempo j e observação k ; $i = 1, 2, 3$, representando as 3 diferentes posições analisadas; $k = 1, 2, \dots, 20$, representando o número da observação realizada. As demais variáveis, bem como o procedimento estatístico utilizado, foram os mesmos daqueles utilizados no ítem anterior (XP).

2.7.3. Azul de Alcian (AA):

2.7.3.1. Azul de Alcian 1% em ácido acético a 1%, pH 2,5 para a detecção de glicanas ácidas totais: Os cortes foram co-

rados durante 30 min, seguindo-se banho em água destilada, desidratação, diafanização e montagem em bálsamo do Canadá (PEARSE, 1961).

2.7.3.2. Azul de Alcian 1% em HCl 0,1 N a pH 1,0 para a detecção de glicanas ácidas sulfatadas: As amostras foram submetidas à coloração durante 30 min, em seguida lavadas em água destilada, desidratadas, diafanizadas e montadas em bálsamo do Canadá (PEARSE, 1961).

A quantificação do conteúdo de GAGA foi obtida em fotomicroscópio como descrito no ítem 2.7.2., com 20 observações em CDVA, B72 e B144; CAVA, B72 e B144; CRE e CRB72 e B144, para os dois pHs utilizados, sendo as medições efetuadas em $\lambda = 625 \text{ nm}$ (SCOTT, 1970).

Os dados obtidos nas medições citofotométricas e os dados transformados segundo a função: $y = \text{sen}(\sqrt{\text{abs}})$ foram, então, submetidos à análise de variância fatorial, segundo o modelo:

$$\text{Abs}_{ijkm} = \mu + \text{pH}_i \text{p}_j + t_k \text{pH}_i \text{p}_j + \text{pH}_i t_k + \text{pH}_i \text{p}_j t_k + \text{pH}_i \text{p}_j t_k + e_{ijkm},$$

onde $i = 1$ ou $2,5$, representando os dois pHs utilizados; $j = 1, 2$ ou 3 e se refere às 3 diferentes posições; $k = 1, 2$ ou 3 , representando os três diferentes tempos; $m = 1, 2, \dots, 20$, correspondendo às 20 medições realizadas; Abs_{ijkm} = absorbância no pH i , posição j , tempo k e medição m ; μ = média populacional; pH , p e t representam o pH, a posição e o tempo, com as diversas interações entre os mesmos, representadas na equação acima; e_{ijkm} = erro casual associado à medida da Abs_{ijkm} .

Foram testadas as seguintes hipóteses para o modelo, ao nível de

H_{01} : $pH_1 = pH_2 = 0$ (não existe efeito significativo do pH);

H_{02} : $p_1 = p_2 = p_3 = 0$ (não existe efeito signif. da posição);

H_{03} : $t_1 = t_2 = t_3 = 0$ (não existe efeito signif. do tempo);

H_{04} : $pH_i p_j = \dots = pH_p p_q = 0$ (não existe efeito significativo da interação entre pH e posição);

H_{05} : $pH_i t_k = \dots = pH_p t_r = 0$ (não existe efeito significativo da interação entre o pH e tempo);

H_{06} : $p_j t_k = \dots = p_q t_r = 0$ (não existe efeito significativo da interação entre a posição e o tempo);

H_{07} : $pH_i p_j t_k = \dots = pH_p p_q t_r = 0$ (não existe efeito significativo da interação entre pH, posição e tempo);

onde i = efeito do i -ésimo pH; j = efeito da j -ésima posição; k = efeito do K -ésimo tempo.

Para a rejeição das hipóteses foi utilizado o teste de Tukey (Vide 2.7.1.).

2.8. Cálculo das áreas e volumes dos corpos proteicos:

Para ser estimado o valor da área e volume ocupado pelos corpos proteicos das células, foram fotografados cortes de cotilédones antes da germinação obtidos após os diversos métodos de coloração descritos e os negativos foram projetados e desenhados em papel milimetrado em câmara escura, procedendo-se então à contagem dos quadrados equimétricos do papel (MELLO & VIDAL, 1980) para os seguintes cálculos:

Área:

$A(\mu\text{m}^2) = c.f$, onde A = área do corpo proteico em μm^2 ; c = quantidade de mm^2 contados; f = fator de correção para μm^2 estimado a partir de $1/(\text{aumento total em } \mu\text{m})^2$.

Volume:

$V(\mu\text{m}^3) = 4/3 \Pi r^3$, onde V = volume do corpo proteico em μm^3 ; $\Pi = 3,14$; r = raio, obtido a partir da área, ou seja: $r = \sqrt{A/\Pi}$.

Foi utilizado ainda, o método do traçado dos dois maiores eixos ortogonais (CRAIG et alii, 1979; MELLO & VIDAL, 1980), sendo então obtidos os valores para área e volume como segue:

$$A = \Pi.(a+b/4)^2 \quad e$$

$$V = \Pi/6.(a.b.c), \text{ onde}$$

A = área em μm^2 ; $\Pi = 3,14$; a = maior eixo, em μm ; b = maior eixo ortogonal ao eixo a , em μm ; V = volume, em μm^3 ; $c = b$.

2.9. Extrações proteicas:

Sementes "in natura" e após 72 horas de embebição para a germinação, foram submetidas aos seguintes métodos de extração:

2.9.1. Pré-tratamento com ácido acético a 45% durante uma hora à temperatura ambiente, seguido de fixação em etanol 100% X ácido acético glacial 3:1 v/v, processado como descrito nos itens 2.2 e 2.4. e corado com xylidine Ponceau a pH 2,5.

2.9.2. Digestão com pepsina:

O material fixado e processado como em 2.9.1., foi incubado em solução de pepsina (2 mg/ml em solução de HCl a pH 1,6), por 3 horas a 37°C. Após esse período, o material foi lavado em água, corado com xylidine Ponceau e montado em bálsamo do Canadá (Vide 2.7.1.). Como controle, foi incubado material apenas em solução do ácido (PEARSE, 1961).

2.9.3. Digestão com tripsina:

O material fixado e processado como em 2.9.1., foi incubado durante 60 min a 37°C em tampão fosfato 0,05 M a pH 8,9, contendo 0,2 mg/ml de tripsina, corado com xylidine Ponceau e montado em bálsamo do Canadá (Vide 2.7.1.). Como controle foi utilizada a incubação do material apenas na solução Tampão (PEARSE, 1961).

Com o material assim processado, foram efetuadas 30 medições da absorbância dos corpos proteicos dos cotilédones (Células distantes e do interior de vasos), para os controle e para o material pré-fixado com ácido acético, em fotomicroscópio Pol Zeiss equipado com fotômetro 01 e fotomultiplicador EMI 6256, utilizando-se objetiva Plan 40/0,65, op-tovar 2,0, diafragma de medida de 0,25 mm, diafragma de campo de 0,3 mm, em $\lambda = 570 \text{ nm}$ (com o uso de régua monocromadora Schott). Área medida por corpo proteico = $7,67 \mu\text{m}^2$.

2.10. Detecção citofotométrica do ponto isoelétrico aparente dos corpos proteicos:

Foi utilizado o método descrito por LISON (1953), modificado quanto ao fixador e quanto ao corante básico utilizado.

A fixação foi realizada com solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2 M a pH 7,4 (Vide 2.1.1. e 2.3.1.) e o material foi processado como descrito anteriormente.

Os cortes obtidos foram submetidos aos seguintes tratamentos:

2.10.1. Coloração com solução de xileno-cianol 0,05% em tampão McIlvaine 0,01 M em 2 lâminas de cada material, nos seguintes pHs: 2,2; 3,0; 3,8; 4,2; 4,6; 5,4; 6,2; 7,0; 7,8. O material foi corado durante 15 minutos, lavado em solução tampão correspondente, água destilada, desidratação rápida em bateria de etanol, diafanização em xilol e montagem em bálsamo do Canadá.

2.10.2. Coloração com solução de azul de metileno 0,05% em tampão McIlvaine 0,01 M em 2 lâminas de cada material, nos mesmos pHs do item anterior. O material foi corado durante 15 min, lavado em solução tampão correspondente, água destilada, deixado secar ao ar, imerso durante 30 min em butanol, novamente secado ao ar e posteriormente montado em bálsamo do Canadá.

2.10.3. Medições citoespectrofotométricas: As medições foram realizadas em fotomicroscópio Pol Zeiss equipado com fotômetro 01 e fotomultiplicador EMI 6256, utilizando-se objetiva Plan 40/0,65, optovar 2,0; diafragma de medida de 0,16 mm; diafragma de campo de 0,2 mm. Assim, a área medida em

cada corpo proteico foi de $3,14 \mu\text{m}^2$. Foram realizadas 20 medições em cada uma das seguintes regiões: corpos proteicos situados longe do sistema vascular do cotilédone antes da embebição para a germinação e após 72 horas da embebição (CDVA e B72); corpos proteicos situados no interior do sistema vascular do cotilédone nos mesmos tempos de embebição (CSVA e B72); material situado na radícula após 72 horas de embebição para a germinação, nas células parenquimáticas ou nas células do sistema vascular (CPRB72 e CVRB72 respectivamente).

As medições foram feitas em $\lambda = 600 \text{ nm}$ para azul de metileno e $\lambda = 630 \text{ nm}$ para xileno cianol (MELLO et alii, 1974; VIDAL et alii, 1974), com o uso de régua monocromadora Schott e a partir da média dos valores obtidos, foram determinados graficamente os pontos isoelétricos dos corpos proteicos "in situ".

2.11. Curvas de birrefringência de forma:

As curvas de birrefringência de forma foram obtidas com material desparafinado, imerso nos seguintes meios de embebição: água; soluções aquosas de glicerol a 20%, 40%, 60% e 80%; glicerol puro e nujol, tendo cada amostra permanecido por um mínimo de 2 horas num dado meio (VIDAL, 1964; VIDAL et alii, 1975).

As medições foram realizadas em microscópio de polarização Zeiss utilizando-se compensador de Brace Kohler $\lambda/10$, $\lambda/20$ e $\lambda/30$, conforme o caso. Foram realizadas 30 medi-

ções de retardos ópticos em paredes de células cotiledonares obtidas antes, após 72 e 144 horas de embebição para a germinação, distantes e próximas ao sistema vascular do cotilédone (CDVA, B72 e B144; CAVA, B72 e B144) e em células da radícula do embrião (CRE, CRB72 e B144).

Como controle comparativo, foram feitas medições de retardos ópticos com o uso do compensador de Sénarmont ($\lambda/4$) em fibras de algodão (Johnson & Johnson) previamente colocadas em etanol absoluto, diafanizadas em tolueno durante uma hora, incluídas em parafina e microtomadas com 8 μm de espessura.

Com as médias obtidas a partir dos valores dos retardos ópticos, foram construídas curvas de birrefringência de forma e curvas percentuais, para os diversos materiais analisados.

2.12. Eletroforese:

As eletroforeses foram realizadas com extratos totais e de frações ricas em lectinas obtidos a partir de cotilédones e radículas antes e após 144 horas de embebição para a germinação.

2.12.1. Obtenção do extrato total:

10 raízes e 20 cotilédones, separadamente, foram colocados em solução de PBS, homogeneizados em ultraturrax TP18/10-S₂ e centrifugados a 8000 x g durante 10 min, aproveitando-se o sobrenadante.

2.12.2. Extração da "fração lectinas":

10 raízes e 20 cotilédones (10 sementes), separadamente, foram colocados em solução tampão fosfato salina (PBS), homogeneizados em ultraturrax TP18/10 S₂ e centrifugados a 8000 x g durante 10 min. A solução sobrenadante teve então seu pH ajustado para 4,2 com HCl 1 N e mantida "overnight" a 4°C. A seguir, foi novamente centrifugada a 8000 x g durante 10 min aproveitando-se então o sobrenadante.

2.12.3. Preparo do gel:

Solução A: Acrilamida 30% e Bis 0,2%.

Solução B: Ácido acético glacial e TEMED 4%

Solução C: Tiosulfato de amônio 0,2% em uréia 10M.

Foram misturadas sob agitação e em banho de gelo, 3 ml da solução A, 1,5 ml da solução B e 7,5 ml da solução C e colocadas nos tubos para a polimerização do gel para a corrida eletroforética, com concentração final de 7,5% de poliacrilamida contendo uréia 6,25 M.

2.12.4. Preparação da amostra:

Foi adicionado a 0,5 ml da solução obtida em 2.12.1 ou 2.12.2., 0,025 ml de ácido acético concentrado, 0,15 g de sacarose, 0,5 ml de ácido acético 0,9 N e 0,01 ml de AT a pH 3,5 (VIDAL & PIMENTEL, 1986).

2.12.5. Corrida:

Para a corrida, foram adicionados 20 µl das amostras obtidas a partir de cotilédones, 40 µl das amostras obtidas a partir de embriões e 60 µl daquelas obtidas a partir

das radículas com 6 dias (~6 cm de comprimento). As condições iniciais foram de 12 mA/8 tubos, tensão de 30 V, término 4 horas após, com tensão de 50 V e mesma amperagem inicial.

Após a corrida, o material foi fixado em TCA a 30% corado com solução de "comassie blue" a 0,2% em metanol (50 ml) e ácido acético (19 ml) durante 24 horas e descorado com solução de ácido acético a 7% com 3 lavagens de 24 horas cada uma.

2.13. Dosagem de proteínas:

A dosagem de proteínas da fração total e da fração lectinas em cotilédones e embriões (Vide ítem 2.12.), foi feita segundo método de Lowry modificado (HARTREE, 1972), utilizando-se as mesmas soluções obtidas para a eletroforese com 3 repetições para cada amostra.

A curva padrão foi obtida com solução de BSA de 20 a 100 µg/ml.

O cálculo do conteúdo proteico foi realizado por unidade do fator amostrado, ou seja: µg de proteína/cotilédone ou por embrião, nos dois tempos utilizados.

Para ser estimado o conteúdo proteico inicial e determinadas as diluições a serem processadas, os extratos foram dosados primeiramente pelo método do Biureto (HENRY et alii, 1974).

2.14. Testes de aglutinação:

2.14.1. Aglutinação "in vitro":

Os testes de aglutinação foram efetuados utilizando-se o extrato total e a fração lectinas de cotilédones e radículas (Vide ítem 2.12.) e hemácias de coelho previamente fixadas e tripsinizadas. Foram colocados 5 μ l da suspensão de hemácias e 5 μ l do extrato total ou fração lectinas. Como controle utilizou-se a suspensão de hemácias e PBS.

O material assim processado, foi observado em microscópio Pol Zeiss e fotografado.

2.14.2. Aglutinação "in situ":

A solução de hemácias foi adicionada, sob agitação suave, a recipiente contendo o material desparafinado, antes e após 144 horas de embebição para a germinação e posteriormente foi observado em microscópio Pol Zeiss.

A preparação das hemácias foi feita segundo método descrito por VIDAL & PIMENTEL (1986).

3. RESULTADOS:

A observação do material fixado em vapores de paraformaldeído a seco e etanol absoluto (Vide material e métodos), revelou uma má preservação dos tecidos de forma geral, com a remoção dos corpos proteicos em inúmeras células e com rompimento das paredes celulares bastante freqüente.

Os resultados que se seguem, são referentes ao material fixado em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 5% em tampão fosfato exceto naqueles utilizados para a extração proteica, propositadamente fixados em etanol-ácido acético para esse fim, ou quando especificado no texto.

3.1. ASPECTOS GERAIS:

3.1.1. Cortes corados pela Hematoxilina-eosina (HE):

Os cortes de cotilédones corados por este método apresentaram as paredes celulares e os vasos condutores evidenciados pela hematoxilina e os corpos proteicos corados tanto pela hematoxilina quanto pela eosina salientando um padrão de organização em glóbulos, sendo cada glóbulo delimitado por uma fina camada H-positiva (Fig.2). Foi observada com freqüência a presença de uma região no interior de cada glóbulo mais intensamente corada pela hematoxilina, com tamanho e intensidade de cor variados (Fig.2, ▲).

A morfologia dos corpos proteicos difere quando observada em regiões próximas ou distantes dos vasos condutores. No primeiro caso apresentam um aspecto mais difuso, com glóbulos menos evidentes quando comparados com as regiões mais distantes desses vasos (Fig.2). Esse padrão morfológico mais difuso se acentua à medida em que aumenta o tempo de germinação (Fig.3).

O sistema vascular do cotilédone se distribui em quantidades crescentes a partir do centro para as regiões mais periféricas do mesmo. No interior dos vasos condutores, foi notada a presença de material positivo ao corante, com forma globular, como mostra a Fig. 4.

A observação da região do meristema radicular do embrião por este método permitiu a visualização de células portadoras de grandes nucléolos fortemente corados, núcleos hematoxilina positivos em contraste com o citoplasma globular e eosinófilo (Fig.5). As células parenquimáticas da radícula apresentaram seu citoplasma eosina-positivo, núcleos e nucléolos corados e um formato menos alongado quando comparadas com as células do sistema vascular, mais fortemente coradas (Fig.6). Foi ainda observada a presença de inúmeros grânulos fortemente corados nas células parenquimáticas da radícula, após 48 e 72 horas de embebição, característica essa não observada nas radículas após 144 horas depois do início do processo de germinação.

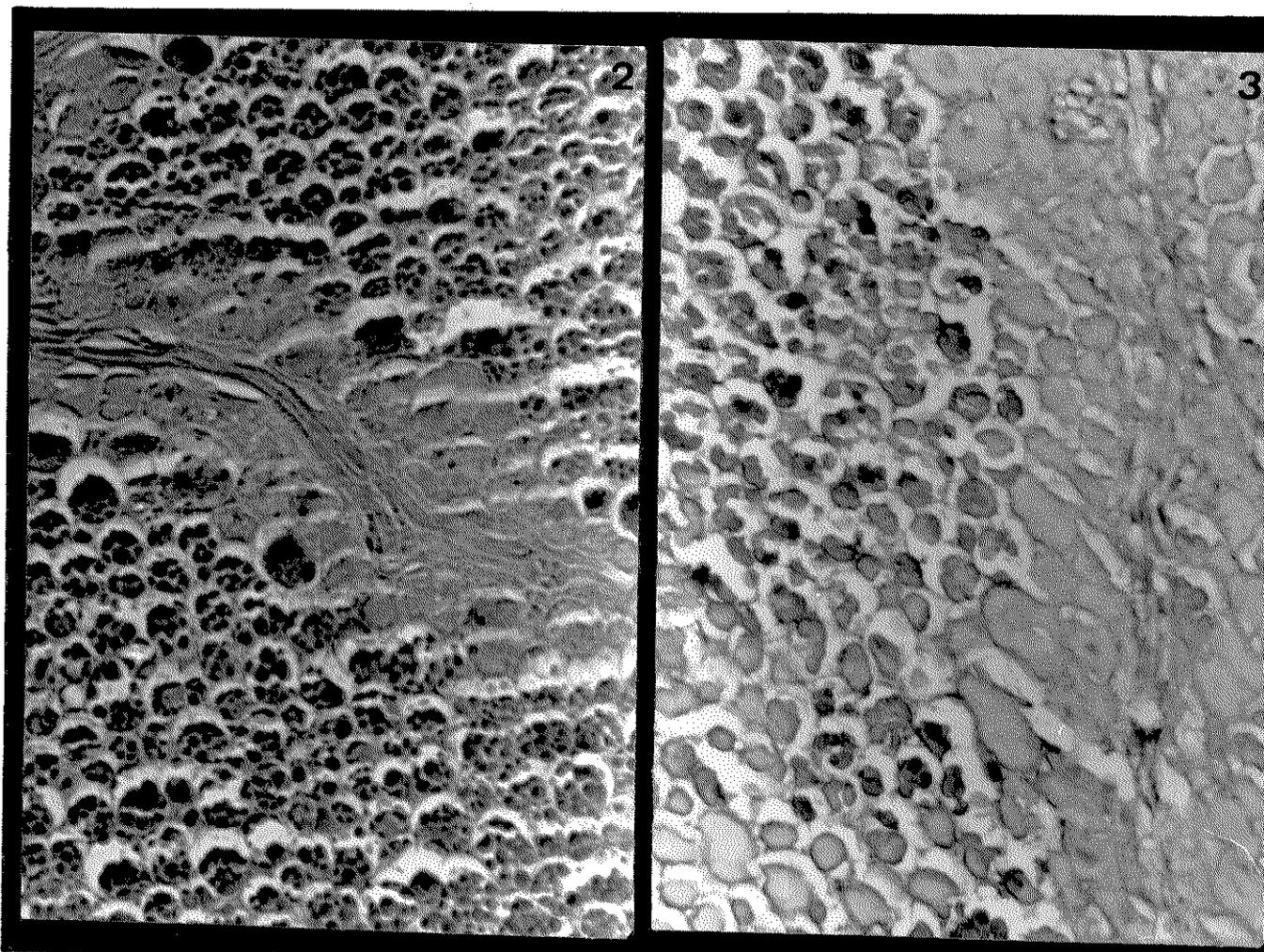


Fig. 2 e 3: Cortes de cotilédones de soja corados pela hematoxilina-eosina. Podem ser notadas as paredes celulares coradas pela hematoxilina e os corpos proteicos corados tanto pela hematoxilina quanto pela eosina. Aumento: 450 X. Fig. 2: Corte obtido antes da germinação (tempo zero). As células mais distantes do sistema vascular apresentam seus corpos proteicos formados por glóbulos, muitas vezes com uma região mais intensamente corada pela hematoxilina em seu interior (▲). As células mais próximas aos vasos mostram um padrão de coloração menos intenso. Material HE-positivo também é encontrado no interior dos vasos. Fig. 3: Corte obtido após 144 horas do início do processo de germinação. Podem ser observadas alterações na coloração e organização dos corpos proteicos, mesmo em células mais distantes do sistema vascular.

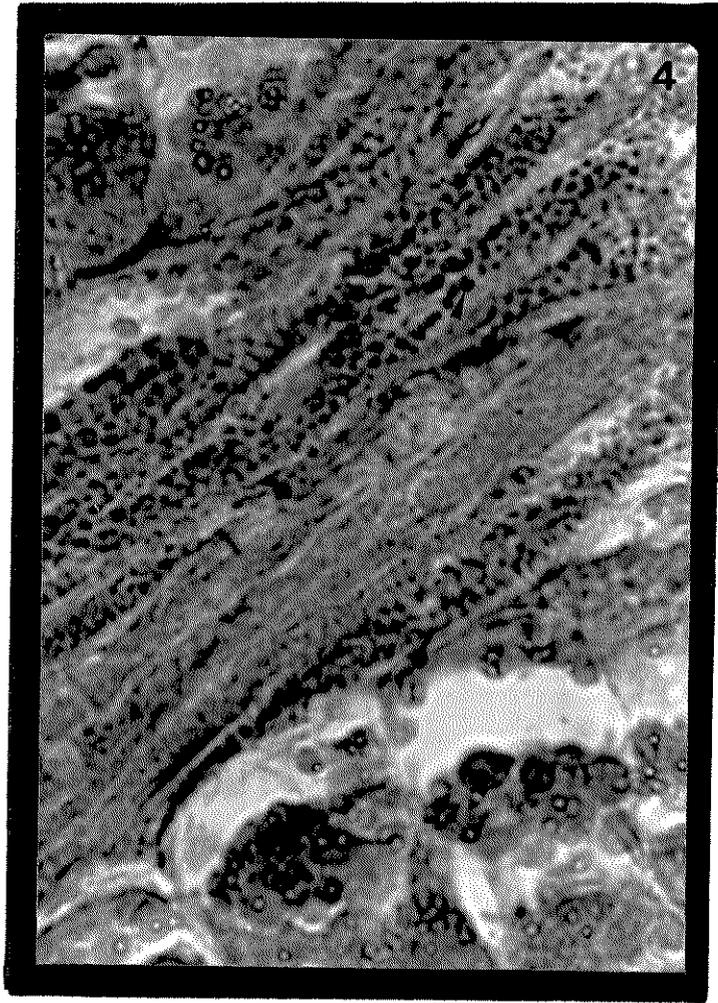


Fig.4: Corte de cotilédone de soja, antes da germinação, corado pela hematoxilina-eosina, em região de vasos. As paredes celulares podem ser visualizadas em roxo (hematoxilina) e os corpos proteicos com um padrão globular e HE-positivos, também são evidenciados. No interior dos vasos, é notada a presença de material globular, positivo aos corantes. (▲) Aumento: 1750 X.

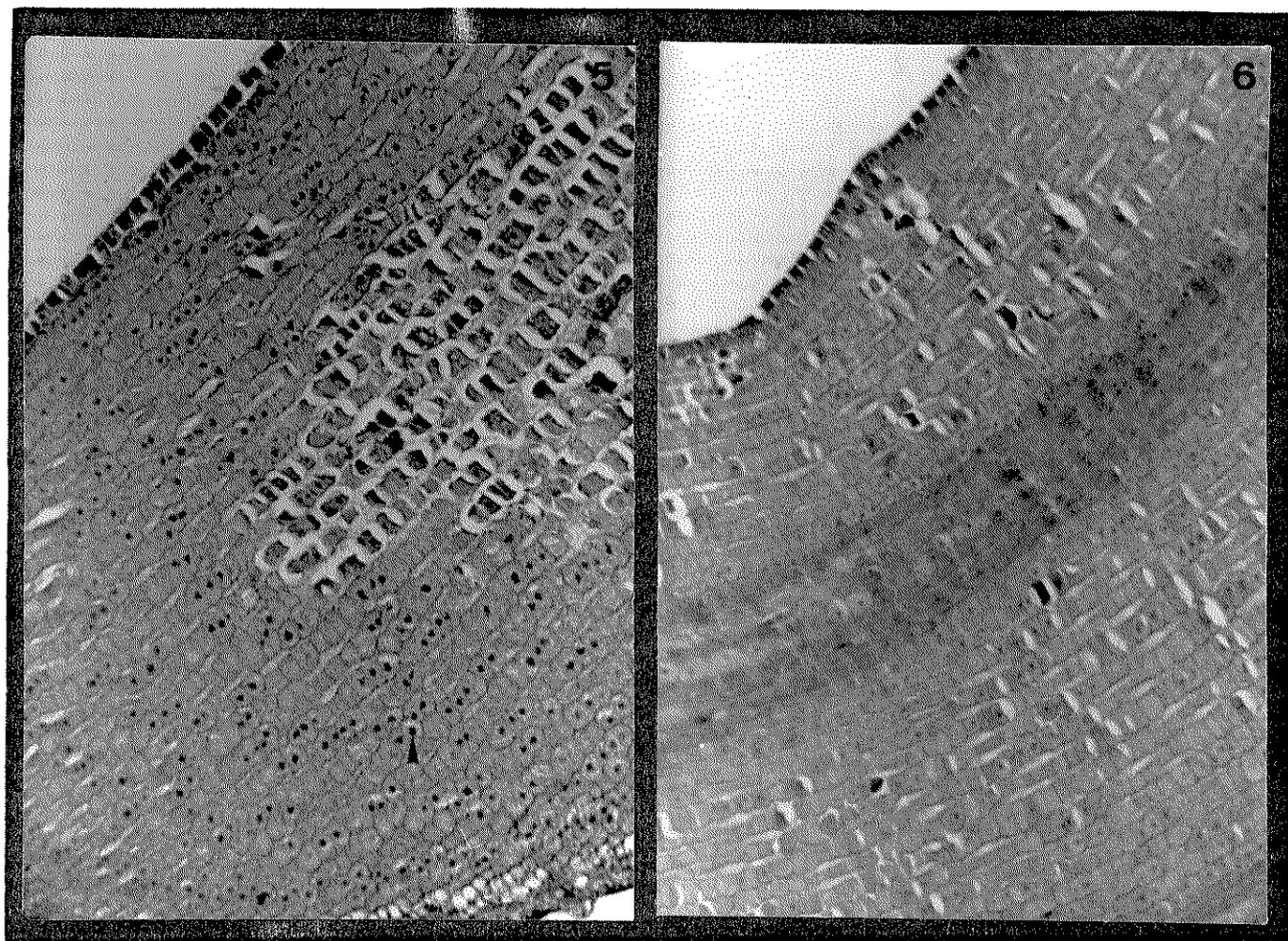


Fig. 5 e 6: Cortes longitudinais da porção radicular do embrião, antes da germinação, corados pela hematoxilina-eosina. Podem ser notados os núcleos corados pela hematoxilina e, em seu interior, nucléolos fortemente corados (▲) e citoplasma granular e eosinófilo. Aumento: 275 X. Fig. 5: Região meristemática da radícula. Fig. 6: Região mostrando células parenquimáticas e células precursoras do sistema vascular da radícula, mais coradas e alongadas que as primeiras.

3.1.2. Cortes corados com Sudan-black 0,05% (SB):

A utilização do Sudan-black evidenciou diferentemente os corpos proteicos, sendo que aqueles presentes em células localizadas próximas aos vasos condutores apresentaram acúmulo do corante. O emprego deste método salientou ainda mais fortemente, os limites de todos os corpos proteicos independentemente de sua localização. No interior dos vasos pode ser notada a deposição menos intensa do corante do que nas células cotiledonares de forma geral. As paredes celulares não foram evidenciadas com a utilização desse método (Fig.7).

3.1.3. Cortes submetidos à impregnação pela prata:

Os resultados obtidos com a impregnação pela prata revelaram uma deposição metálica nas bordas dos glóbulos proteicos mais acentuada do que no interior dos mesmos, havendo também deposição argêntica nas paredes celulares. No interior dos vasos, pode ser notada a presença de material globular (Fig.8).

A visualização do material após a germinação fixado em etanol X ácido acético e impregnado pela prata, revelou um padrão semelhante ao material sem germinar, apresentando porém, uma maior perda de material proteico (Fig.9). Em luz polarizada, foi salientada a organização macromolecular das paredes celulares das células dos cotilédones e dos vasos condutores com forte birrefringência, branco e amarelo de 1º

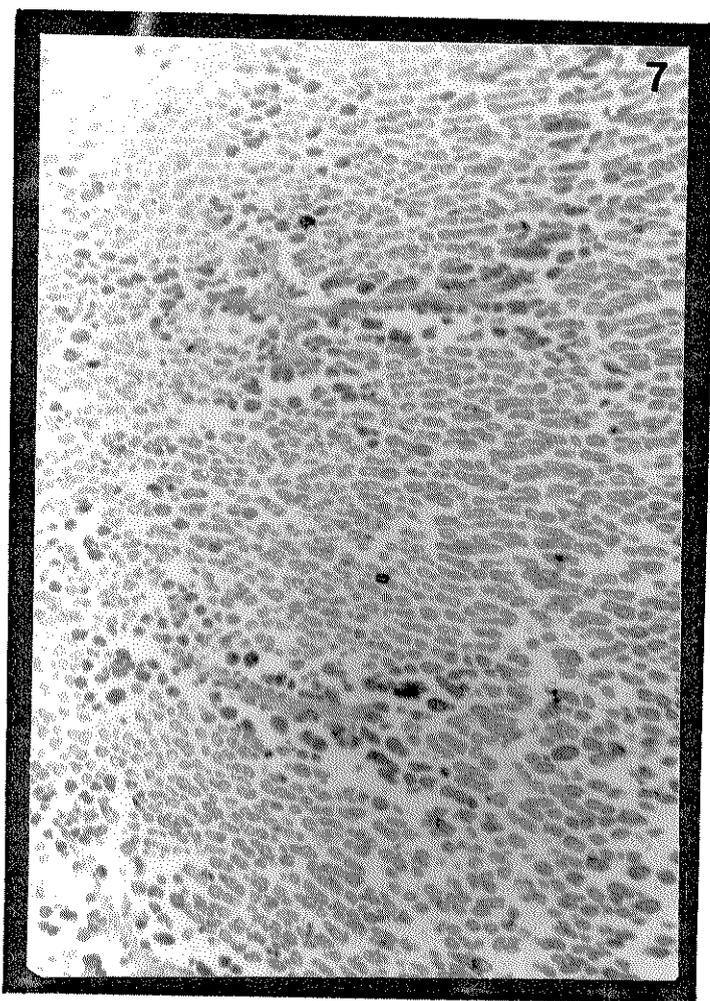


Fig. 7: Cotilédone de soja, antes da germinação, corado com Sudan black. O corante se deposita nos corpos proteicos de forma diferenciada de tal modo que os localizados mais próximos do sistema vascular ficam mais corados do que os mais distantes. Pode ser ainda observada a delimitação dos corpos proteicos mais fortemente corados e a deposição do corante no interior dos vasos. Aumento: 100 X.

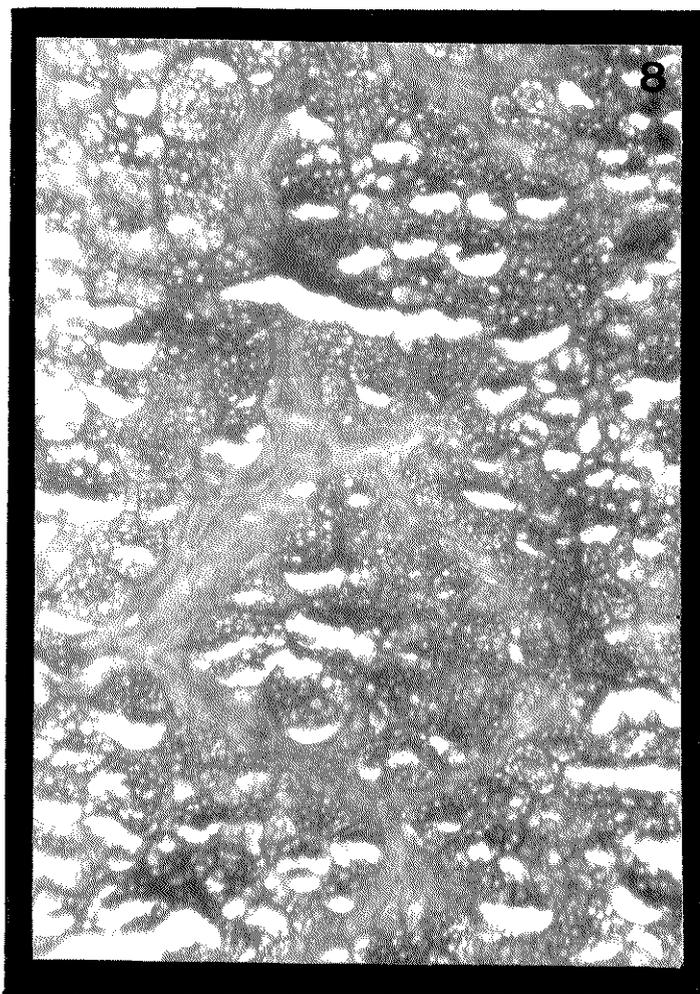


Fig. 8: Corte de cotilédone de soja, antes da germinação, submetido à impregnação pela prata. Podem ser notadas as paredes celulares coradas em marrom e os corpos proteicos com um aspecto g-obular, delimitado por uma camada mais fortemente evidenciada. No sistema vascular, também pode ser observada a presença de material globular (▲). Aumento: 275 X.

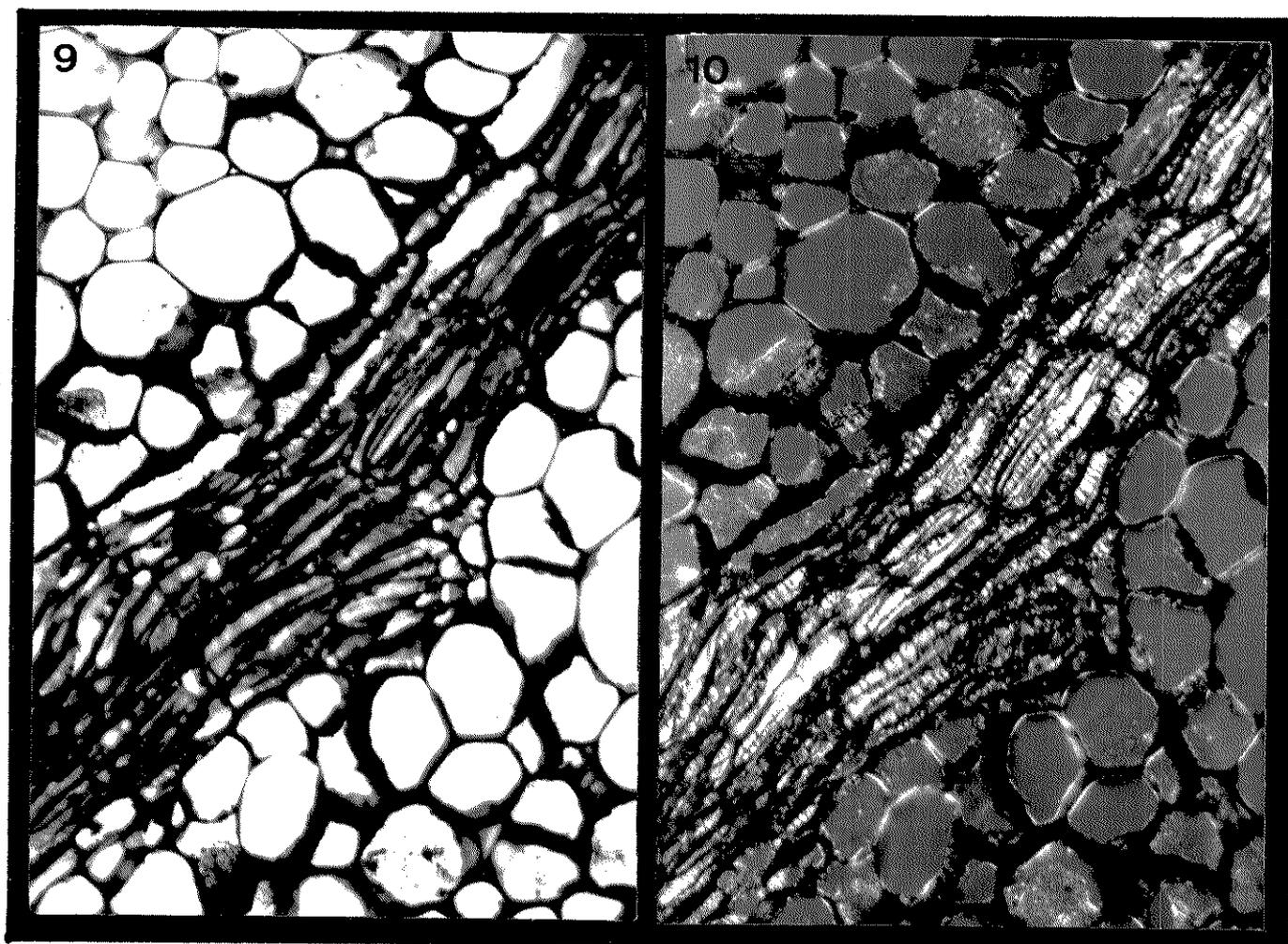


Fig. 9 e 10: Cortes de cotilédones de soja, após a germinação, submetidos à impregnação pela prata, para evidenciar glico-conjugados. Notam-se impregnadas as paredes celulares e o sistema condutor do cotilédone. Aumento: 900 X. Fig. 9: Paredes coradas em preto e vasos condutores em várias tonalidades de marrom. Os corpos proteicos não são evidenciados pelo método. Fig. 10: Mesma imagem, em microscopia de polarização, com polarizador e analisador cruzados (90°), podendo-se notar a birrefringência das paredes celulares de forma geral e a constituição dos vasos condutores ora com células perfuradas, ora fenestradas. Nota-se ainda regiões birrefringentes nos corpos proteicos.

ordem respectivamente, com os corpos proteicos apresentando em contrapartida, alguma birrefringência em regiões localizadas (Fig.10).

3.2. RESULTADOS DAS ANÁLISES QUALITATIVAS E QUANTITATIVAS:

3.2.1. Xylidine Ponceau (XP):

Os cotilédones antes da germinação, corados com XP para proteínas totais, apresentaram corpos proteicos fortemente corados e paredes celulares pouco evidenciadas (Fig.11). Uma observação em maior aumento desses corpos, salienta sua organização em glóbulos onde se nota que determinadas regiões ficam extremamente coradas, parecendo envolver as unidades globulares como uma parede. Constata-se ainda que os corpos proteicos localizados próximos aos vasos condutores se modificam em forma e tamanho e no interior desses vasos, há reação positiva ao corante (Fig.11).

Os cotilédones após germinação corados por este método, confirmam o padrão obtido em HE quanto ao desarranjo maior dos corpos proteicos, mesmo distantes dos vasos condutores do cotilédone (Fig. 12).

No interior do sistema vascular do cotilédone, pode ser observada a presença de material demonstrando afinidade pelo XP, com aspecto globular (Fig.13).

Em microscopia de polarização, mantendo o polarizador e analisador cruzados (90°), puderam ser notadas as pa-

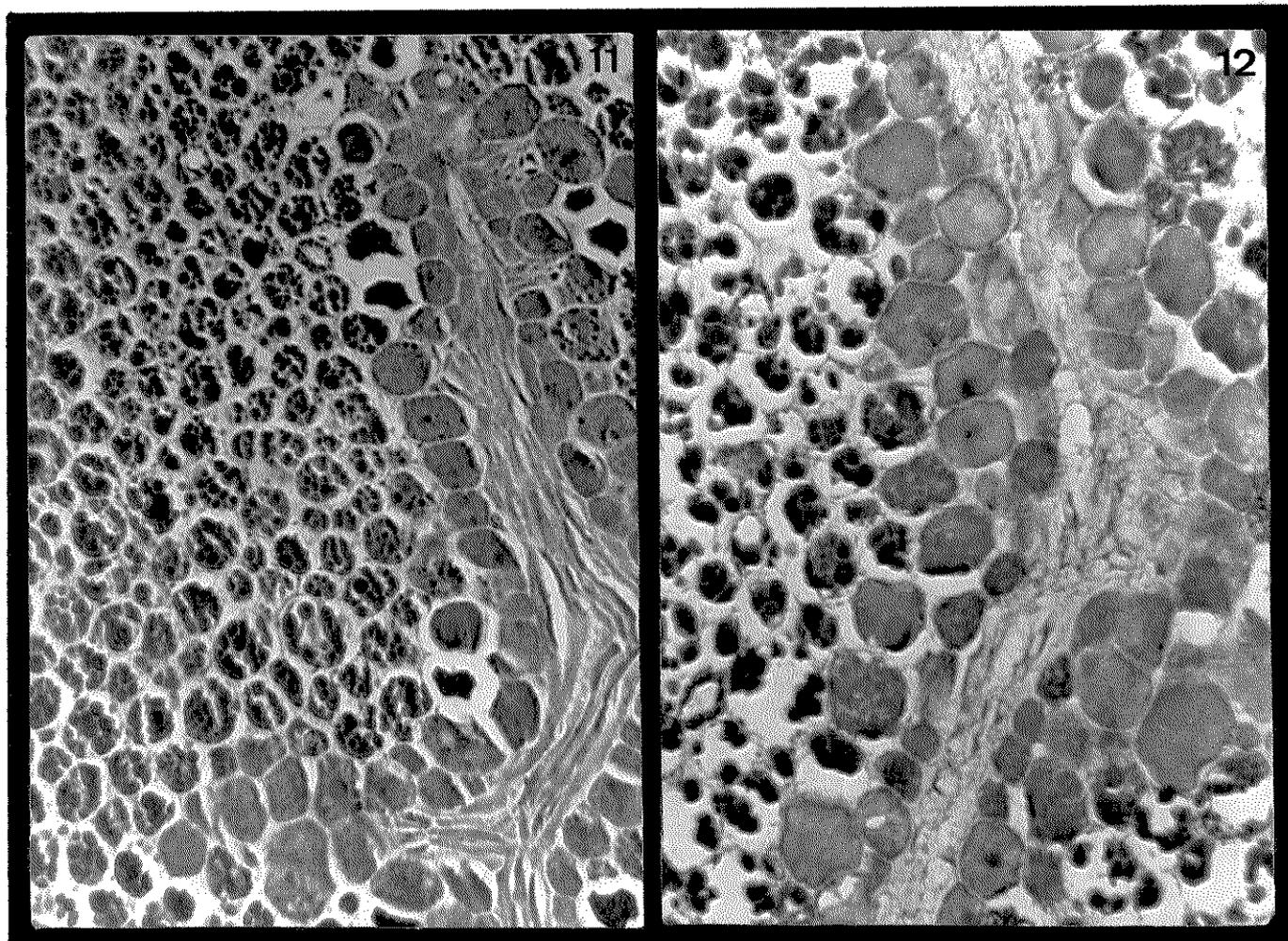


Fig. 11 e 12: Cortes de cotilédones de soja corados pelo xyli-dine Ponceau para proteínas totais. As paredes celulares são pouco evidenciadas por este método. Nota-se os corpos proteicos, globulares e fortemente corados. Aumento: 450 X. Fig. 11: Material antes da germinação (tempo zero). Destaca-se a diferença entre o padrão morfológico dos corpos proteicos distantes do sistema vascular (globulares) e próximos ao mesmo (mais difusos). Fig. 12: Material após 144 horas do início do processo de germinação. Pode ser notado um maior desarranjo dos corpos proteicos, mesmo nos mais distantes do sistema vascular.

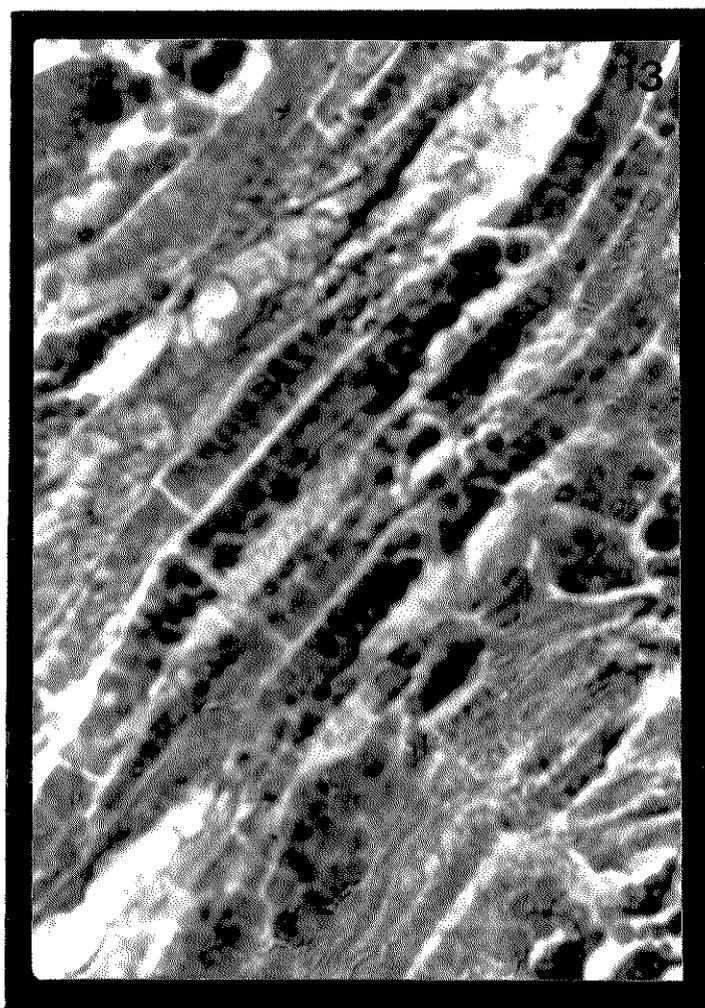


Fig. 13: Detalhe de vasos em cotilédones de soja no tempo zero, corados com xylidine Ponceau. Pode ser notado material em forma globular no interior das células vasculares, com forte reação ao corante. Aumento: 1750 X.

redes celulares, apresentando forte birrefringência de cor branca de 1ª ordem e ainda foi possível a observação de regiões birrefringentes nos corpos proteicos (Fig.14).

A região do meristema radicular do embrião corada com XP apresentou nucléolo fortemente corado, núcleo fracamente reativo e citoplasma com resposta positiva ao corante, o mesmo ocorrendo com as células do parênquima e sistema vascular da radícula, confirmando novamente os padrões obtidos com as outras técnicas utilizadas.

No material radicular após 48 e 72 horas de embebição para a germinação, foi notada a presença de inúmeros grânulos fortemente corados nas células parenquimáticas (Fig. 15).

3.2.1.1. Quantificação do conteúdo proteico:

Os valores das absorvâncias medidas nas diversas regiões dos cotilédones e radículas do embrião, corados com XP, encontram-se descritos na Tabela 1. Foi notado nos corpos proteicos situados em células distantes do sistema vascular do cotilédone, um aumento crescente nas absorvâncias do tempo zero até 72 horas e uma diminuição destes valores após 144 horas de embebição para a germinação. Nas células adjacentes a vasos, os valores das absorvâncias se mantiveram praticamente constantes durante todos os tempos analisados enquanto que, no interior dos vasos, houve um decréscimo após 72 horas. Na radícula, foi notada uma diminuição de conteúdo proteico nas células parenquimáticas e comportamento oposto nas células componentes do sistema vascular, a partir do tempo zero, até 144 horas após embebição (Tabela 1).

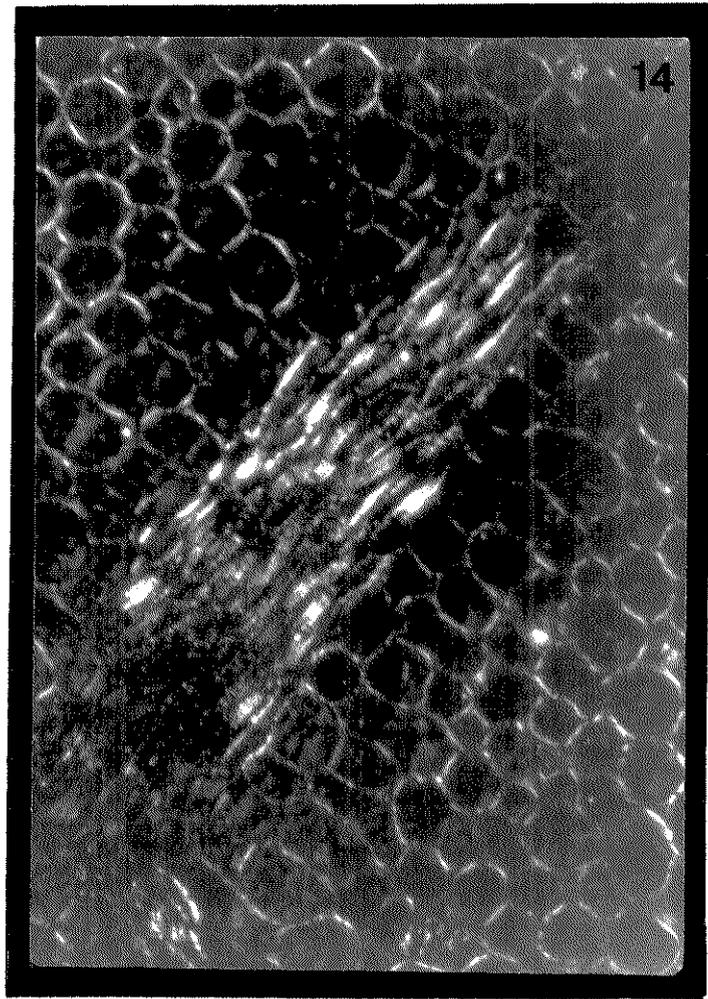


Fig. 14: Corte de cotilédone de soja antes da germinação, co
rado com xylydine Ponceau e visto em microscópio de polariza
ção, com polarizador e analisador cruzados. Pode ser observa
da a birrefringência das paredes celulares de forma geral em
branco de 1ª ordem. Nos corpos proteicos, algumas regiões
também apresentaram essa anisotropia. Aumento: 450 X.

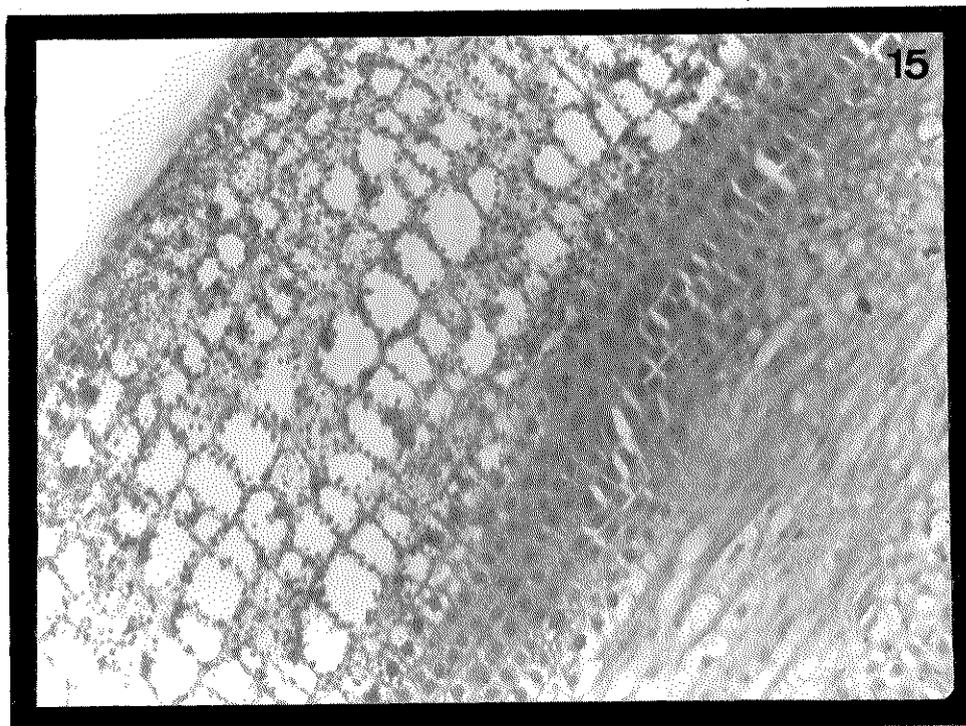


Fig. 15: Detalhe de corte longitudinal da radícula de soja, após 72 horas do processo de germinação. Podem ser notadas as células precursoras do sistema vascular da radícula, em processo de diferenciação. Nas células parenquimáticas é detectada a presença de inúmeros grânulos XP-positivos. Aumento: 450 X.

Tabela 1: Médias das absorvâncias obtidas a partir da coloração com xylidine Ponceau em cotilédones e radículas de soja.

DESCRIÇÃO	TEMPO						
	(a)	n (b)	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h
1. Células longe de vasos	40	40	0,850±0,171	0,855±0,165	0,954±0,145	0,986±0,138	0,746±0,130
2. Células adjac. a vasos	40	40	0,425±0,060	0,486±0,096	0,491±0,107	0,497±0,092	0,459±0,124
3. Interior de vasos	40	40	0,384±0,091	(d)	(d)	0,390±0,095	0,177±0,072
4. Sist.vasc. radícula	40	40	0,346±0,057(c)	(d)	(d)	0,255±0,035	0,408±0,091
5. Parênquima radícula	40	40	0,324±0,068(c)	(d)	(d)	0,106±0,025	0,137±0,056

Obs.: (a) Tempo considerado a partir da colocação da semente em placa de Petri com algodão umedecido, até a fixação do material; (b): número de medições efetuadas; (c): porção radicular do embrião; (d) : valores não calculados.

Condições das medidas: objetiva Plan 40/0,65; optovar 2,0; diafragma de medida: 0,25 mm; diafragma de campo: 0,3 mm; área tomada por medida: 7,7 μm^2 ; comprimento de onda utilizado: $\lambda = 570 \text{ nm}$.

A análise de variância com dois fatores e os testes das hipóteses para o modelo proposto (vide 2.7.1.) revelaram haver influência do efeito da posição, do tempo e da interação entre ambos. Entretanto, em alguns casos isolados, não foram notadas diferenças significativas ao nível de 1% (Tabela 2 e 3).

Os valores da distribuição entre as medidas das absorbâncias nos diversos tempos e locais analisados após a transformação $\log(\text{abs} + 1)$, efetuada de acordo com o descrito no item 2.7.1. de material e métodos, em função de suas respectivas médias, se encontram na Fig.16.

3.2.2. Cortes corados com azul de Toluidina a pH 4,0(AT):

Os resultados obtidos a partir da coloração com AT a pH 4,0 salientam as paredes celulares e os vasos condutores (Fig.17). A presença de metacromasia nesses locais foi detectada e aumentou nas paredes de células cotiledonares após 6 dias de embebição para a germinação (Fig. 17 e 18).

Os corpos proteicos apresentaram-se pouco corados e a delimitação dos mesmos foi salientada, demonstrando a presença de material basófilo (Fig.19) e confirmando os resultados obtidos nos cortes corados com HE e XP.

A diferença no padrão de organização globular dos corpos proteicos nas células distantes e adjacentes ao sistema vascular, o maior desarranjo desses corpos no material após a germinação e a presença de material globular no inte-

Tabela 2: Diagrama das diferenças entre os valores das absorbâncias obtidas nos corpos práticos corados com XP nos diversos tempos e posições analisados.

REGIÃO	CDVA	CAVA	CSVA	CVRE	CPRE	DV-72	AV-72	SV-72	VR-72	PR-72	DV144	AV144	SV144	VR144	PR144
Abs.	0,855	0,425	0,384	0,346	0,324	0,986	0,497	0,390	0,255	0,106	0,746	0,459	0,177	0,408	0,137
CDVA	0,000														
CAVA	0,430	0,000													
CSVA	0,471	0,041	0,000												
CVRE	0,509	0,079	0,038	0,000											
CPRE	0,531	0,106	0,060	0,022	0,000										
DV-72	0,986	0,131	0,561	0,602	0,662	0,000									
AV-72	0,358	0,072	0,113	0,151	0,173	0,489	0,000								
SV-72	0,465	0,035	0,006	0,044	0,066	0,596	0,107	0,000							
VR-72	0,600	0,170	0,129	0,091	0,069	0,731	0,242	0,135	0,000						
PR-72	0,749	0,319	0,278	0,240	0,218	0,880	0,391	0,284	0,149	0,000					
DV144	0,109	0,321	0,362	0,400	0,422	0,240	0,249	0,356	0,491	0,640	0,000				
AV144	0,396	0,034	0,075	0,113	0,135	0,527	0,038	0,069	0,204	0,353	0,287	0,000			
SV144	0,678	0,248	0,207	0,169	0,147	0,809	0,320	0,213	0,078	0,071	0,569	0,282	0,000		
VR144	0,447	0,017	0,024	0,062	0,084	0,578	0,089	0,018	0,153	0,302	0,338	0,051	0,231	0,000	
PR144	0,718	0,288	0,247	0,209	0,187	0,849	0,360	0,253	0,118	0,021	0,609	0,322	0,040	0,271	0,000

Obs.: Amplitude total studentizada (q) = 4,12.4 obtido nas condições do experimento = 0,0621. : valores inferiores ao calculado, representando assim, não haverem diferenças significativas entre

Tabela 3: Diagrama das diferenças entre os valores das absorbâncias obtidas nos corpos proteicos corados com XP após transformação log (abs + 1) nos diversos tempos e posições analisados, submetidos ao teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade.

REGIÃO	CDVA	CAVA	CSVA	CVRE	CPRE	DV72	AV72	SV72	VR72	PR72	DV144	AV144	SV144	VR144	PR144
VALOR	0,266	0,153	0,140	0,129	0,121	0,297	0,174	0,142	0,099	0,044	0,241	0,163	0,070	0,148	0,055
CDVA	0,266														
CAVA	0,153	0,000													
CSVA	0,140	0,013	0,000												
CVRE	0,129	0,024	0,011	0,000											
CPRE	0,121	0,032	0,019	0,008	0,000										
DV72	0,297	0,031	0,144	0,157	0,176	0,000									
AV72	0,174	0,092	0,021	0,034	0,053	0,123	0,000								
SV72	0,142	0,124	0,011	0,002	0,013	0,155	0,032	0,000							
VR72	0,099	0,167	0,054	0,041	0,038	0,198	0,075	0,043	0,000						
PR72	0,044	0,222	0,109	0,096	0,093	0,253	0,130	0,098	0,055	0,000					
DV144	0,241	0,025	0,088	0,101	0,120	0,056	0,067	0,099	0,142	0,197	0,000				
AV144	0,163	0,103	0,010	0,023	0,042	0,134	0,011	0,021	0,064	0,119	0,078	0,000			
SV144	0,070	0,196	0,083	0,070	0,067	0,227	0,104	0,072	0,029	0,026	0,171	0,093	0,000		
VR144	0,148	0,118	0,005	0,008	0,019	0,149	0,026	0,006	0,049	0,104	0,093	0,015	0,078	0,000	
PR144	0,055	0,211	0,098	0,085	0,074	0,082	0,119	0,087	0,044	0,011	0,186	0,108	0,015	0,093	0,000

Obs.: Valor calculado para o teste de Tukey: $\Delta = 0,0197$; : valores inferiores ao calculado, re-presentando assim, não haverem diferenças significativas entre as posições e tempos ao nível de 1% de probabilidade.

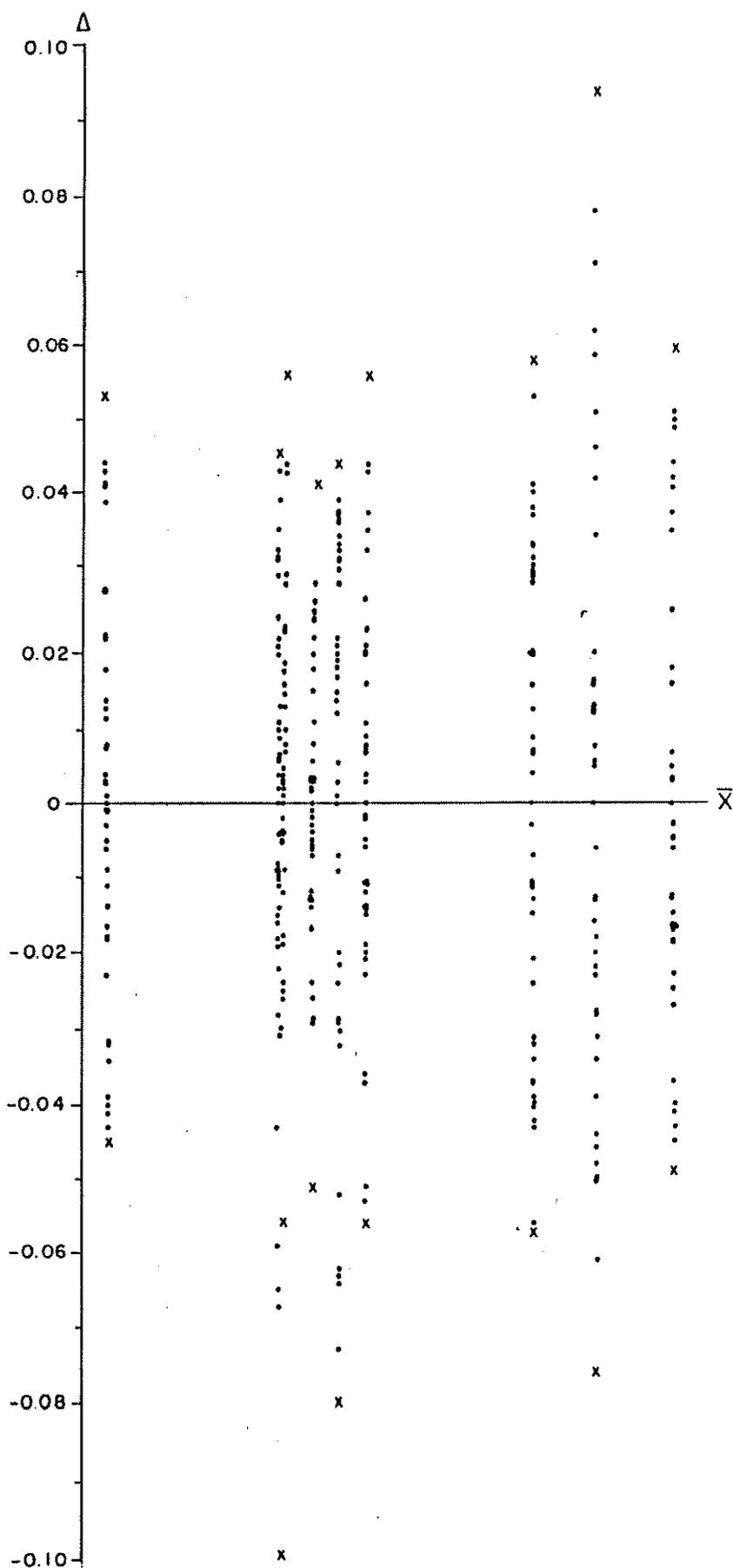


Fig. 16: Distribuição das diferenças entre a média e cada valor de absorvância obtido com XP nas diversas regiões e tempos analisados, após a transformação $\log(\text{abs} + 1)$, mostrando uma certa constância entre o intervalo dessas diferenças, independente do valor da média obtida. \bar{X} : média populacional num dado tempo e posição; Δ : diferença entre \bar{X} e as observações realizadas em cada caso.

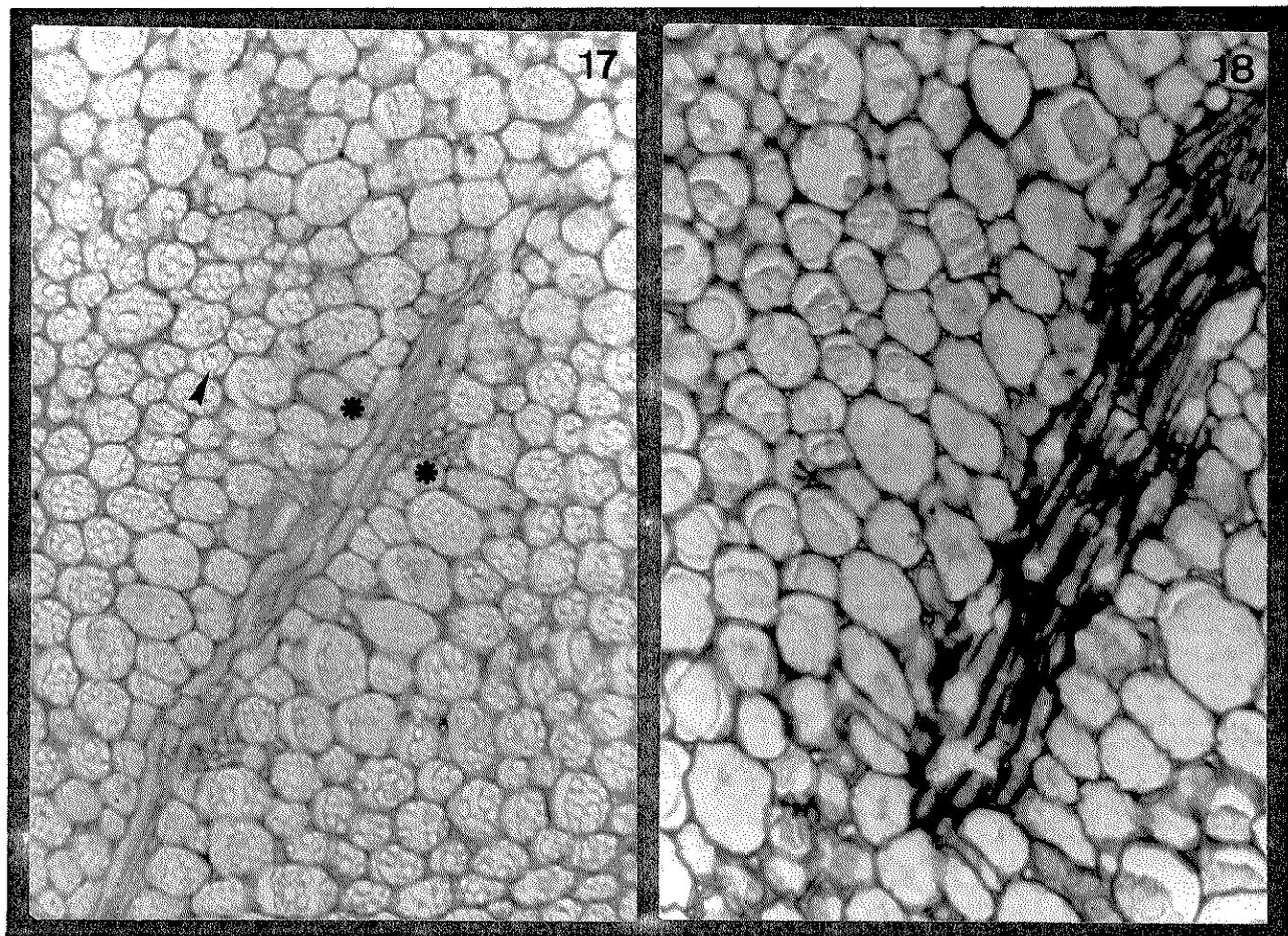


Fig. 17 e 18: Cortes de cotilédones corados com Azul de Toluidina a pH 4,0. Destacam-se coradas as paredes celulares de forma geral, com os corpos proteicos pouco corados mas envolvidos por uma fina camada de material positivo ao corante (▲). No interior dos vasos, pode ser observada a presença de material globular (região entre asteriscos). Aumento: 450 X. Fig. 17: Material obtido no tempo zero, possibilitando a visualização dos inúmeros glóbulos formadores dos corpos proteicos (▲). Fig. 18: Material obtido após 144 horas do processo da germinação, com as paredes mais metacromáticas que as da figura anterior e um padrão morfológico dos corpos proteicos, mais desorganizado.



Fig. 19: Detalhe de células cotiledonares de soja, distantes do sistema vascular, coradas com AT a pH 4,0. Nota-se com bastante clareza o padrão morfológico globular dos corpos proteicos, pouco corados, envolvidos por material mais basófilo e portanto mais corado, como uma membrana delimitante. Podem ser notadas ainda, as paredes celulares em geral. Aumento: 1750 X.

rior dos vasos condutores (Fig. 17 e 18) também foram detectados por este método.

O uso de luz polarizada na observação dos cortes, confirma a forte birrefringência detectada a nível da parede celular, conforme também observado nos demais métodos de coloração (Fig. 20).

3.2.2.1. Cálculo do índice metacromático (IM):

Os resultados do IM nos materiais corados com AT a pH 4,0 obtidos a partir das medições das absorbâncias (A_{555}/A_{625}) nos diversos tempos de embebição e posições, encontram-se descritos na Tabela 4, onde pode ser notado um aumento crescente nesse índice, em todas as posições, a partir do tempo zero.

A análise de variância com dois fatores, dos resultados dos índices e dos resultados após a transformação $y = 1/\exp(\text{abs})$, revelaram haver influência significativa do efeito da posição e tempo, com nível de $P = 0,01$ (Tabela 5 e 6). Pode ser notada a não influência do fator posição para os valores obtidos após 72 horas e uma semelhança dos mesmos com aqueles obtidos para as células adjacentes a vasos no tempo zero (CAVA) e para as da radícula após 144 horas. Pode ainda ser detectada uma diferenciação das células distantes do sistema vascular do cotilédone após 144 horas de embebição (CDVB144) em relação às demais posições nesse tempo (Tabela 5 e 6).

Os valores das diferenças entre as diversas medições após transformação e suas respectivas médias, encontram-se plotados na Fig. 21.

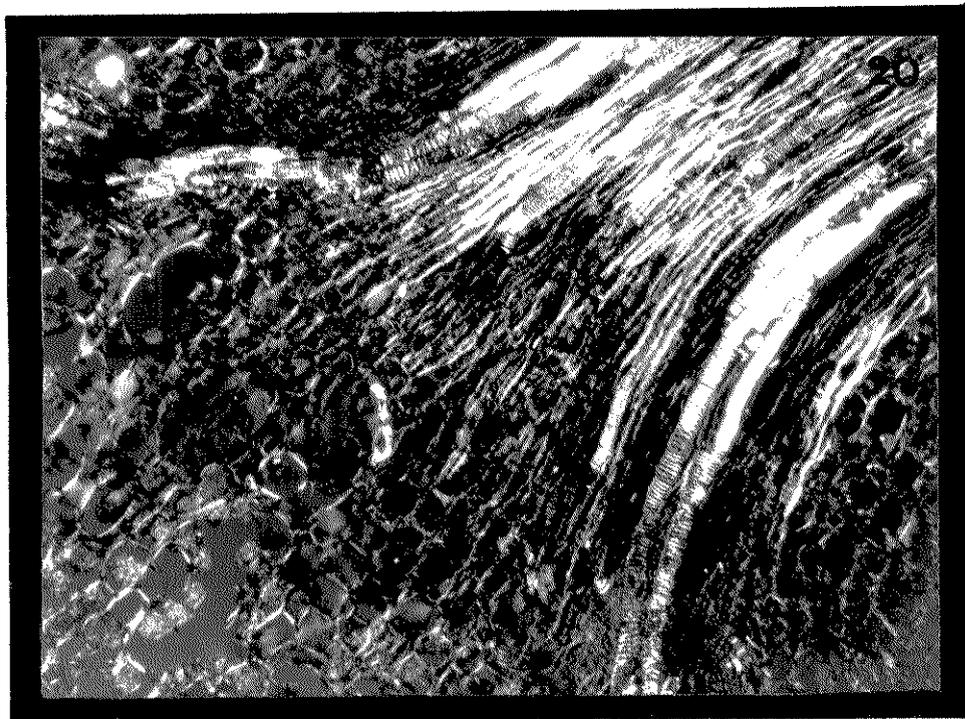


Fig.20 : Corte de cotilédone de soja, antes da germinação, corado com azul de toluidina a pH 4,0, visto em microscópio de polarização com o polarizador e analisador cruzados. Destaca-se a forte birrefringência das paredes celulares, principalmente das células do sistema vascular em direção à radícula do embrião. Aumento: 100 X.

Tabela 4: Valores do Índice metacromático (A_{555}/A_{625}) obtidos em paredes celulares de G. max após coloração com azul de Toluidina a pH 4,0 em diversas regiões e tempos de embebição.

REGIÃO	n(b)	TEMPO(a)	0 h	72 h	144 h
CDVA/B	20		0,599±0,132	1,256±0,267	1,777±0,288
CAVA/B	20		1,132±0,278	1,126±0,097	1,503±0,207
CR	20		0,948±0,224	1,283±0,151	1,349±0,282

Obs.: (a): tempo considerado a partir da colocação da semente em placa de Petri com algodão umedecido, até a fixação do material; (b) número de medições efetuadas em cada tempo e posição; Condições das medições: Objetiva Plan 40/0,65; optovar : 2,0; diafragma de medida: 0,16 mm; diafragma de campo: 0,2mm; área tomada por medição: 3,1 μm^2

Tabela 5: Valores das diferenças entre as medições do Índice Metacromático em co-tilédones e radiculas de Glycine max em diversos tempos e posições.

POSIÇÃO	CDVA	CAVA	CRE	CDVB-72	CAVB-72	CRB-72	CDVB144	CAVB144	CRB144
VALORES	0,599	1,132	0,957	1,256	1,126	1,283	1,777	1,503	1,349
CDVA	0,599								
CAVA	0,533	0,000							
CRE	0,358	0,175	0,000						
CDVB72	0,657	0,124	0,299	0,000					
CAVB72	0,527	0,006	0,169	0,130	0,000				
CRB72	0,684	0,151	0,326	0,027	0,157	0,000			
CDVB144	1,178	0,645	0,820	0,521	0,651	0,494	0,000		
CAVB144	0,904	0,371	0,546	0,247	0,377	0,220	0,274	0,000	
CRB144	0,750	0,217	0,392	0,093	0,223	0,066	0,428	0,154	0,000

Obs.: Valor calculado para o teste de Tukey: $\Delta = 0,206$; : valores inferiores ao calculado, representando assim, não haverem diferenças significativas entre as posições e tempos ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 6: Valores das diferenças entre as medições do Índice metacromático após a transformação $1/\exp(\text{abs})$ em cotilédones e radículas de G. max.

POSIÇÃO	Valor	CDVA	CAVA	CRE	CDVB72	CAVB72	CRB72	CDVB144	CAVB144	CRB144
CDVA	0,554	0,000	0,334	0,396	0,293	0,326	0,280	0,175	0,227	0,269
CAVA	0,334	0,220	0,000							
CRE	0,396	0,158	0,062	0,000						
CDVB72	0,293	0,261	0,041	0,103	0,000					
CAVB72	0,326	0,228	0,008	0,070	0,033	0,000				
CRB72	0,280	0,274	0,054	0,116	0,013	0,046	0,000			
CDVB144	0,175	0,379	0,159	0,221	0,118	0,151	0,105	0,000		
CAVB144	0,227	0,327	0,107	0,169	0,066	0,099	0,053	0,052	0,000	
CRB144	0,269	0,285	0,065	0,127	0,024	0,057	0,011	0,094	0,042	0,000

Obs.: Valor calculado para o teste de Tukey: $\Delta = 0,0595$; : valores inferiores ao calculado, representando assim, não haverem diferenças significativas entre as posições e tempos ao nível de 1% de probabilidade.

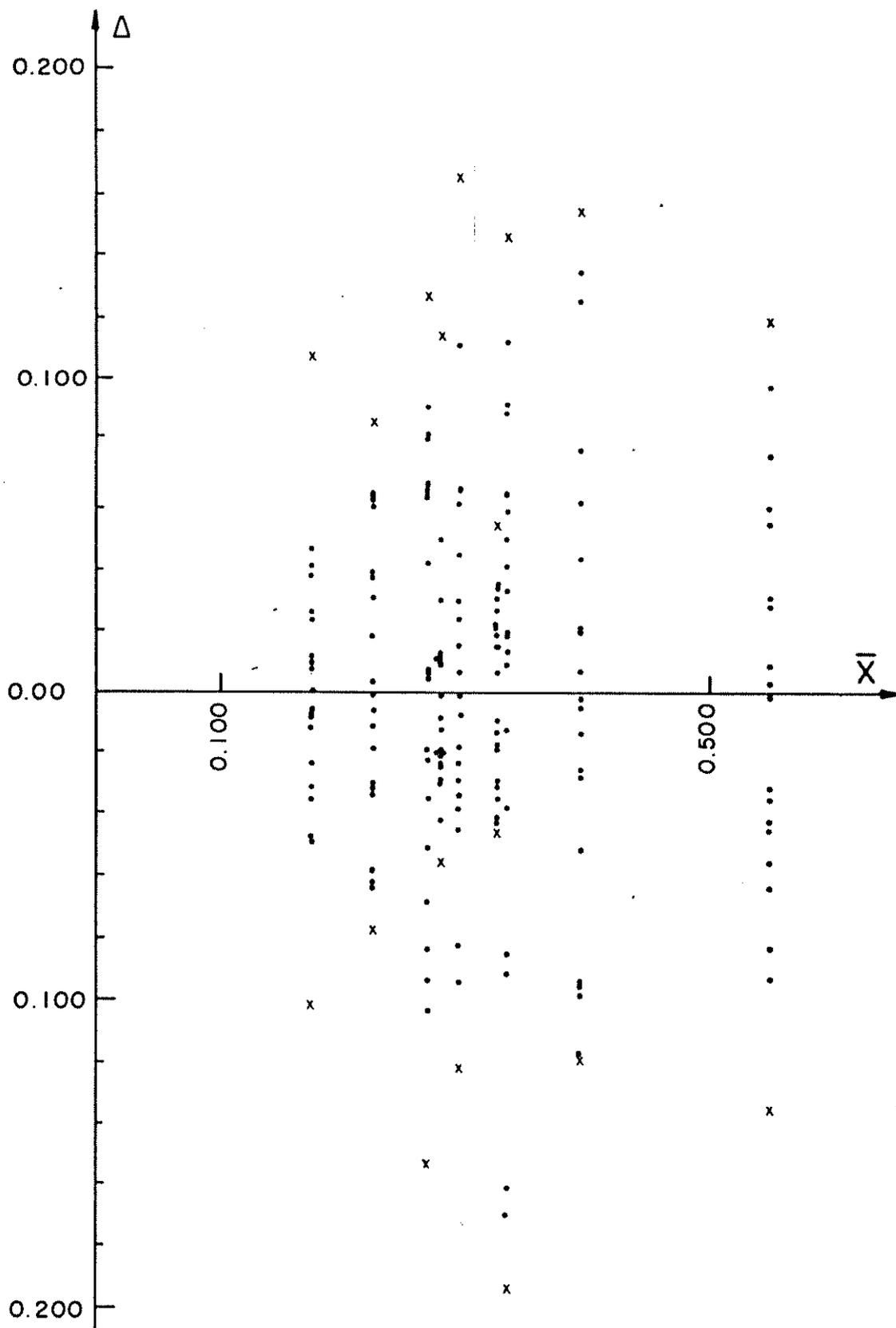


Fig. 21: Distribuição das diferenças entre a média e cada valor do índice metacromático obtido com AT nas diversas regiões e tempos analisados, após a transformação efetuada ($y = 1/\exp(\text{abs})$) mostrando uma certa constância entre o intervalo dessas diferenças, independente do valor da média obtida. \bar{X} : média populacional num dado tempo e posição; Δ : diferença entre \bar{X} e as observações realizadas em cada caso.

3.2.3. Cortes corados com azul de Alcian (AA):

O método do AA nos dois pHs utilizados, evidenciou as paredes celulares de forma geral, com uma maior intensidade de cor obtida para o pH 2,5 (Fig. 22 e 23). Os corpos proteicos puderam ser notados de forma discreta como em AT, assim como outras características gerais já descritas nos itens anteriores, foram confirmadas.

A quantificação das glicosaminas glicanas ácidas totais (pH 2,5) e sulfatadas (pH 1,0) é dada na Tabela 7 e revelou grande variação em todos os tempos e posições analisados, nos dois pHs. O confronto entre os diversos valores médios obtidos nas diversas medições é dado na Tabela 8. A análise de variância fatorial foi realizada a partir dos valores transformados (Tabela 9), que demonstram haver influência do pH, da posição e do tempo de forma global, apesar de, em alguns casos isolados, não haverem diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade.

Os valores das diferenças entre as diversas medidas após a transformação e as médias para cada população, são dados na Fig. 24.

3.3. CÁLCULO DA ÁREA E VOLUME DOS CORPOS PROTEICOS:

3.3.1. Corpos proteicos por corte celular:

Os valores das áreas e volumes dos corpos proteicos por célula após coloração com XP e impregnação pela prata,

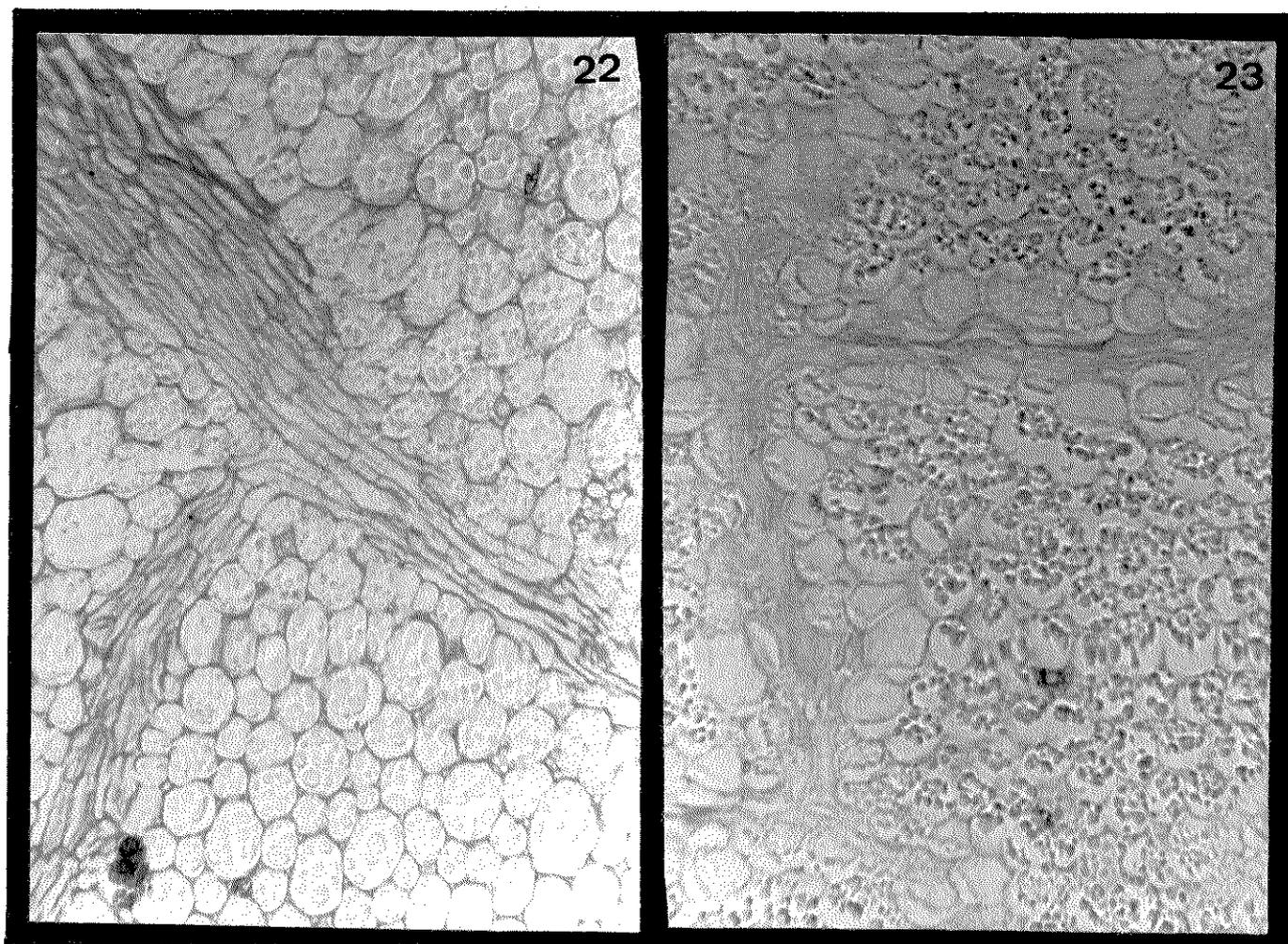


Fig. 22 e 23: Cortes de cotilédones de soja antes da embebição para a germinação, corados com azul de alcian. Podem ser observadas as paredes celulares com reação positiva ao corante, com os corpos proteicos pouco corados. Aumento: 450 X. Fig. 22: Corte corado com azul de alcian a pH 2,5 para glicosaminoglicanas totais. Fig. 23: Corte corado com azul de alcian a pH 1,0 para glicosaminoglicanas sulfatadas. Torna-se evidente uma menor intensidade de cor desta figura em relação à anterior.

Tabela 7: Valores obtidos para as absorvâncias das paredes celulares após a coloração com azul de Alcian.

TEMPO	pH	CÉLULAS COTILEDONARES		RADÍCULA
		CDVA/B	CAVA/B	CR
0 h	2,5	0,556±0,097	0,363±0,066	0,427±0,060
	1,0	0,271±0,078	0,213±0,066	0,263±0,043
72 h	2,5	0,328±0,096	0,297±0,089	0,157±0,035
	1,0	0,249±0,049	0,259±0,049	0,091±0,019
144 h	2,5	0,426±0,078	0,444±0,083	0,386±0,061
	1,0	0,177±0,052	0,231±0,051	0,135±0,041

Obs.: Todos os valores se referem à média obtida a partir de 20 medições, em $\lambda = 625$ nm. Condições das medições: Objetiva : Plan 40/0,65; optovar: 2,0; diafragma de medida: 0,16 mm; diafragma de campo: 0,2 mm; área tomada por medição: $3,1 \mu\text{m}^2$.

Tabela 8: Diagrama das diferenças entre os valores das absorvâncias obtidas nas paredes celulares coradas com azul de alcian, sem transformação de valores, nos diversos pHs, tempos e posições analisados.

POSIÇÃO	CDVA	CDVB 72	CDVB 144	CAVA	CAVB 72	CAVB 144	CRE	CRB 72	CRB 144	CDVA	CDVB 72	CDVB 144	CAVA	CAVB 72	CAVB 144	CRE	CRB 72	CRB 144
VALOR	0,556	0,328	0,426	0,363	0,297	0,444	0,427	0,157	0,386	0,271	0,249	0,177	0,213	0,259	0,231	0,263	0,091	0,135
CDVA	0,556	0,000																
CDVB 72	0,328	0,000																
CDVB 144	0,426	0,098	0,000															
CAVA	0,363	0,193	0,035	0,063	0,000													
CAVB 72	0,297	0,259	0,031	0,129	0,066	0,000												
CAVB 144	0,444	0,112	0,116	0,081	0,147	0,000												
CRE	0,427	0,129	0,099	0,064	0,130	0,017	0,000											
CRB 72	0,157	0,399	0,171	0,206	0,140	0,287	0,270	0,000										
CRB 144	0,386	0,170	0,058	0,040	0,023	0,089	0,041	0,229	0,000									
CDVA	0,271	0,285	0,057	0,092	0,026	0,173	0,156	0,114	0,115	0,000								
CDVB 72	0,249	0,307	0,079	0,114	0,048	0,195	0,178	0,092	0,137	0,022	0,000							
CDVB 144	0,177	0,379	0,151	0,186	0,120	0,267	0,250	0,020	0,209	0,094	0,072	0,000						
CAVA	0,213	0,343	0,115	0,150	0,084	0,231	0,214	0,056	0,173	0,058	0,036	0,000						
CAVB 72	0,259	0,297	0,069	0,104	0,038	0,185	0,168	0,102	0,127	0,012	0,010	0,082	0,046	0,000				
CAVB 144	0,231	0,325	0,097	0,132	0,066	0,213	0,196	0,074	0,155	0,000	0,018	0,054	0,028	0,000				
CRE	0,263	0,293	0,065	0,100	0,034	0,181	0,164	0,106	0,123	0,008	0,014	0,086	0,050	0,004	0,032	0,000		
CRB 72	0,091	0,465	0,237	0,272	0,206	0,353	0,336	0,066	0,295	0,180	0,158	0,086	0,122	0,168	0,140	0,172	0,000	
CRB 144	0,135	0,421	0,193	0,228	0,162	0,309	0,292	0,022	0,251	0,136	0,114	0,042	0,078	0,124	0,096	0,128	0,044	0,000
P H	2,5																	
	1,0																	

Obs.: Δ Obtido nas condições do experimento: 0,124; □ : valores inferiores ao calculado, representando assim, não haverem diferenças significativas entre os pHs, posições ou tempos ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 9: Diagrama das diferenças entre os valores das absorbâncias obtidas nas paredes celulares coradas com azul de alcian, nos diversos pHs, tempos e posições analisados.

POSIÇÃO	CDVA	CDVB 72	CDVB 144	CAVA	CAVB 72	CAVB 144	CRE	CRB 72	CRB 144	CDVA	CDVB 72	CDVB 144	CAVA	CAVB 72	CAVB 144	CRE	CRB 72	CRB 144	pH
VALOR	0,675	0,536	0,604	0,564	0,513	0,615	0,606	0,383	0,580	0,491	0,476	0,404	0,440	0,485	0,460	0,489	0,296	0,355	2,5
CDVA	0,675	0,000																	
CDVB 72	0,536	0,139	0,000																
CDVB 144	0,604	0,071	0,068	0,000															
CAVA	0,564	0,111	0,028	0,040	0,000														
CAVB 72	0,513	0,162	0,023	0,091	0,061	0,000													
CAVB 144	0,615	0,060	0,079	0,011	0,051	0,102	0,000												
CRE	0,606	0,069	0,070	0,002	0,042	0,093	0,009	0,000											
CRB 72	0,383	0,292	0,153	0,221	0,181	0,232	0,223	0,000											
CRB 144	0,580	0,095	0,044	0,024	0,016	0,067	0,035	0,026	0,197	0,000									
CDVA	0,491	0,184	0,045	0,113	0,073	0,072	0,124	0,115	0,108	0,089	0,080								
CDVB 72	0,476	0,199	0,060	0,128	0,088	0,037	0,139	0,130	0,093	0,104	0,015	0,000							
CDVB 144	0,404	0,271	0,132	0,200	0,160	0,109	0,211	0,202	0,021	0,176	0,087	0,072	0,000						
CAVA	0,440	0,235	0,096	0,164	0,124	0,073	0,175	0,166	0,057	0,140	0,051	0,036	0,036	0,000					
CAVB 72	0,485	0,190	0,051	0,119	0,079	0,028	0,130	0,121	0,102	0,095	0,006	0,009	0,061	0,045	0,000				
CAVB 144	0,460	0,215	0,076	0,144	0,104	0,053	0,155	0,146	0,077	0,120	0,031	0,016	0,056	0,020	0,025	0,009			
CRE	0,489	0,186	0,047	0,115	0,075	0,024	0,126	0,117	0,106	0,091	0,002	0,013	0,085	0,049	0,004	0,000			
CRB 72	0,296	0,379	0,240	0,308	0,268	0,217	0,319	0,310	0,087	0,284	0,195	0,180	0,108	0,144	0,189	0,164	0,193	0,000	
CRB 144	0,355	0,320	0,181	0,249	0,209	0,158	0,260	0,251	0,028	0,225	0,136	0,121	0,049	0,085	0,130	0,105	0,134	0,059	0,000
pH																			

1,0

2,5

Obs.: Δ obtido nas condições do experimento: 0,100; : valores inferiores ao calculado, representando assim não haverem diferenças significativas entre os pHs, posições ou tempos

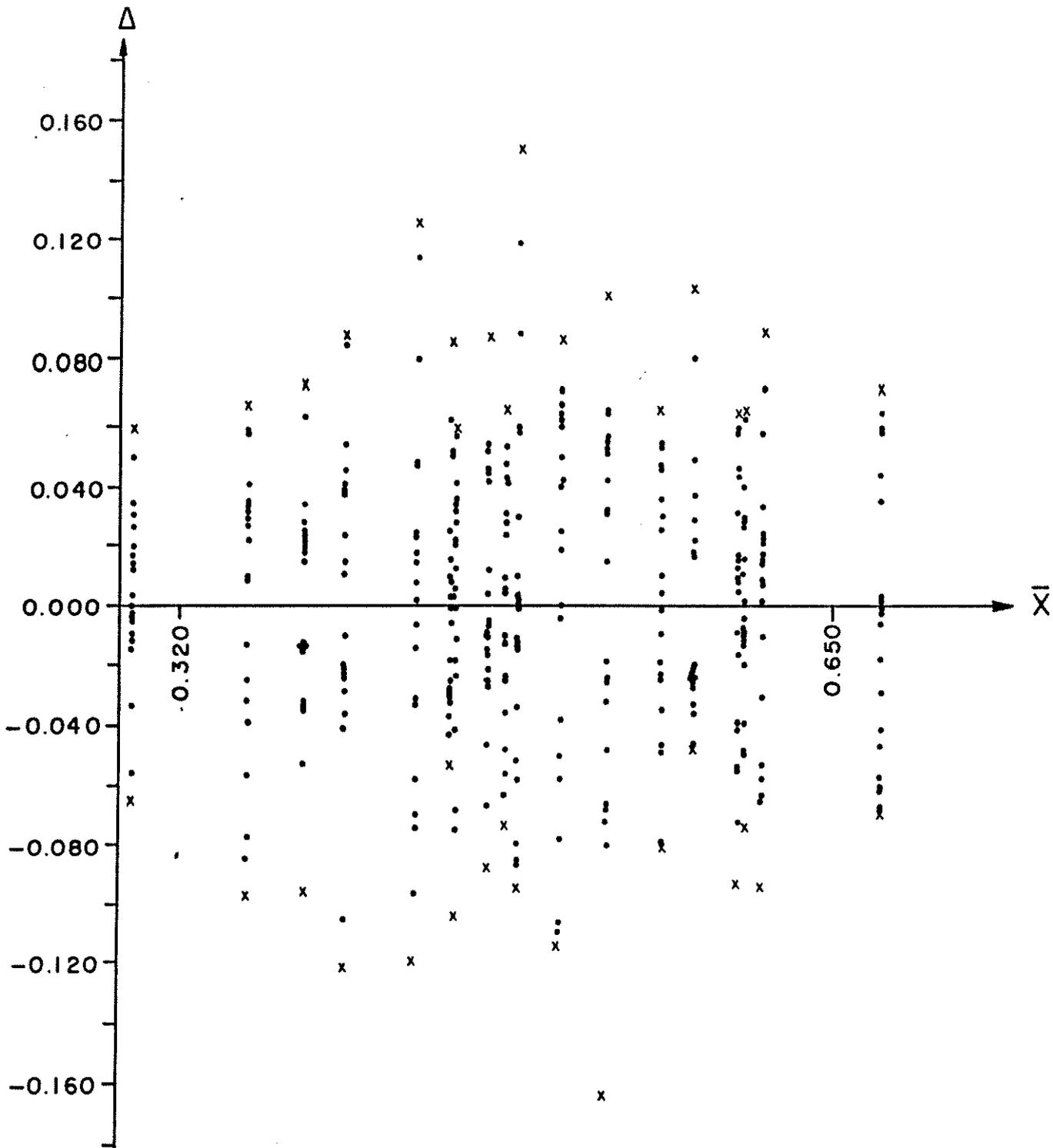


Fig. 24: Distribuição das diferenças entre a média e cada valor de absorvância obtido com AA nas diversas regiões, tempos e pHs analisados, após a transformação $\text{sen} \sqrt{\text{abs}}$, mostrando uma certa constância entre o intervalo dessas diferenças, independente do valor da média obtida. \bar{X} : média populacional num dado pH, tempo e posição; Δ : diferença entre \bar{X} e as observações realizadas em cada caso.

(Tabela 10), revelaram uma área média de $50,617 \pm 11,909 \mu\text{m}^2$ e um volume médio de $270,972 \pm 63,753 \mu\text{m}^3$. A distribuição de frequência para os valores de área obtidos é dada na Fig. 25. A análise de variância desses resultados demonstrou não haver diferença entre os mesmos a nível de 1% de probabilidade.

3.3.2. Corpos proteicos:

Os resultados obtidos para áreas e volumes dos corpos proteicos com AT, XP e HE (Tabela 11) revelaram um valor de área médio = $12,032 \pm 3,638 \mu\text{m}^2$ e um volume médio de $31,404 \pm 9,495 \mu\text{m}^3$ quando o método utilizado foi o de contagem de quadrados equimétricos do papel milimetrado e um valor médio de $14,335 \pm 3,433 \mu\text{m}^2$ e um volume médio de $40,37 \pm 12,5 \mu\text{m}^2$ para o método dos maiores eixos ortogonais (Tabela 11).

A distribuição de frequência para os valores de área obtidos para os dois métodos utilizados, encontra-se na Fig. 26. A análise de variância dos resultados demonstrou não haver diferença entre os mesmos ao nível de 1% de probabilidade, quer nos resultados obtidos para um determinado método, quer no confronto entre os mesmos.

Após a germinação, devido ao maior desarranjo dos corpos proteicos, não foram realizadas medições de suas áreas e volumes.

Tabela 10: Valores de área e volume dos corpos proteicos em cotilédones de soja antes da germinação.

MÉTODO	ÁREA (μm^2)	VOLUME (μm^3)
Xylidine Ponceau	49,457±11,282	261,707±59,700
	55,290±14,964	309,345±83,723
Impregnação Ag	47,104± 6,876	243,254±35,510
MÉDIA GERAL	50,617±11,909	270,972±63,753

Obs.: Valores das áreas, resultado da média de 30 medições dos quadrados equimétricos do papel milimetrado após projeção em câmara escura; valores dos volumes, obtidos a partir dos valores das áreas.

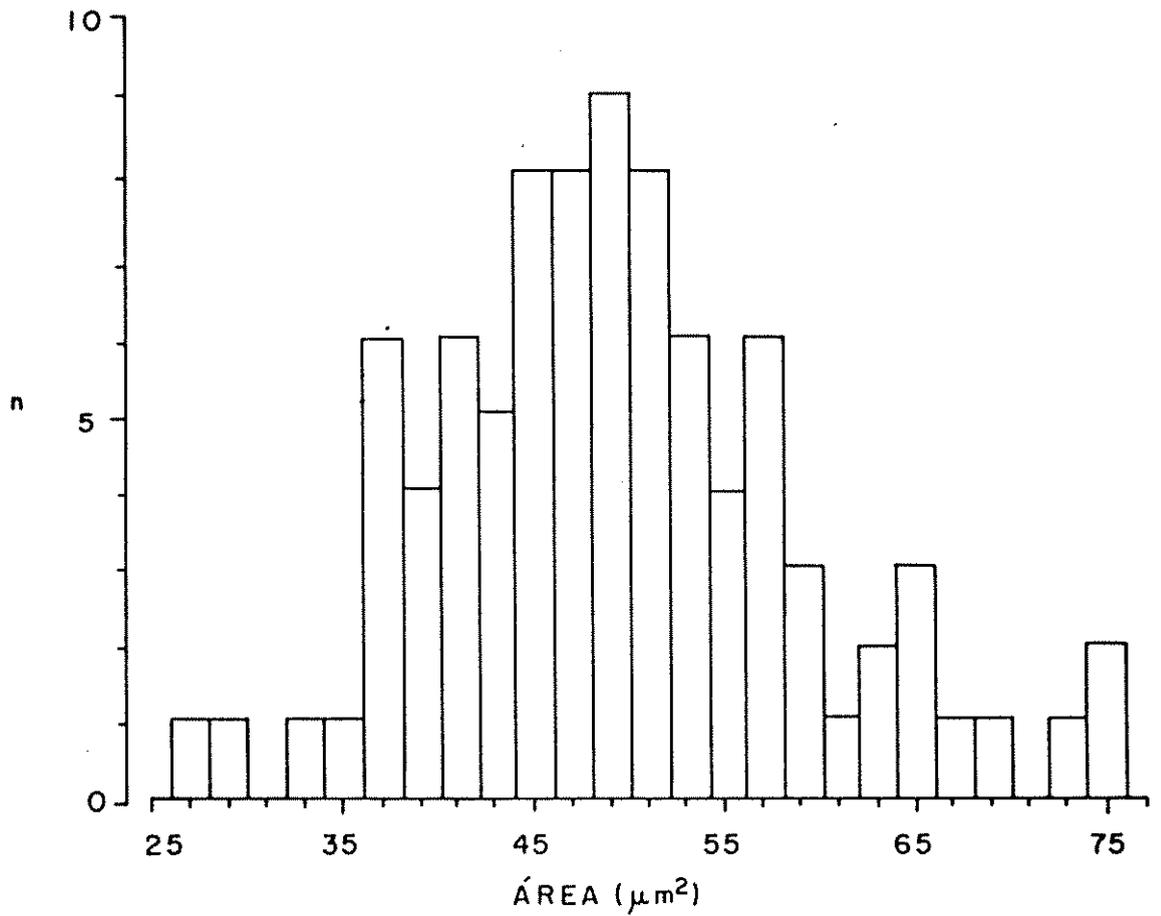


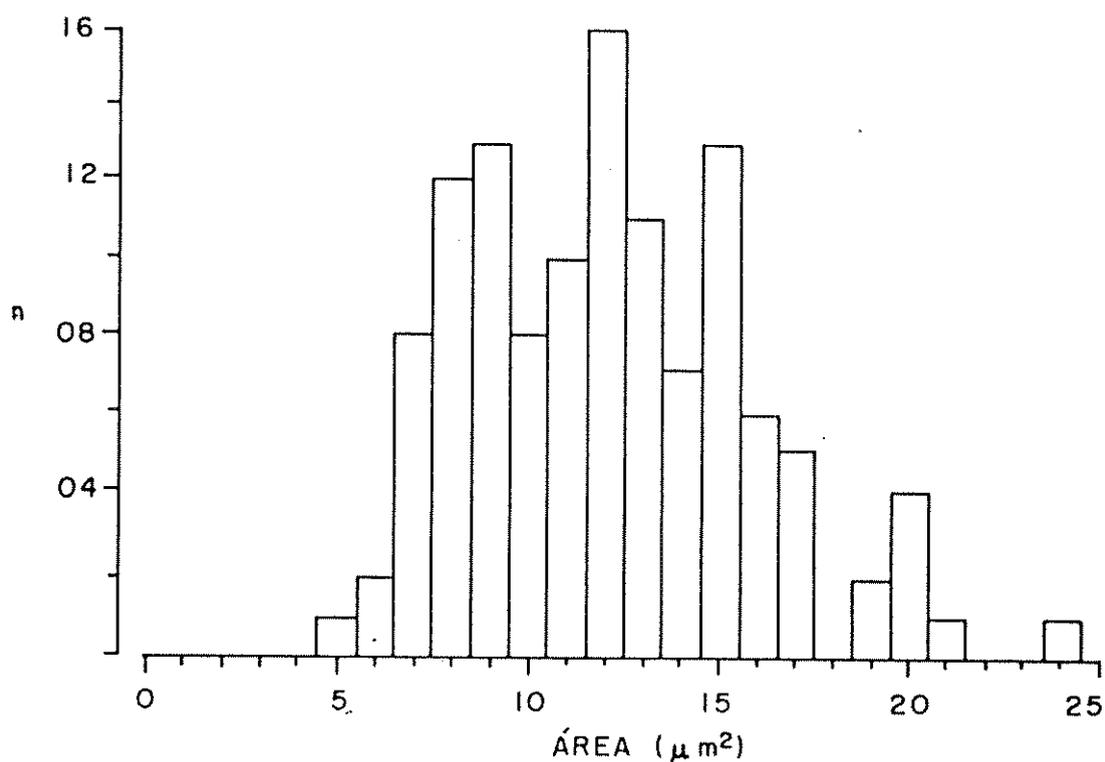
Fig. 25: Histograma de distribuição das áreas dos corpos proteicos por célula, em μm^2 . Total de amostras medidas = 90.

Tabela 11: Valores de área e volume dos glóbulos formadores dos corpos proteicos em cotilédones de soja antes da germinação.

MÉTODO	ÁREA (μm^2)	VOLUME (μm^3)
1. Contagem de quadrados equimétricos:		
AT a pH 4,0	12,817 \pm 2,480	34,527 \pm 6,681
	14,053 \pm 3,091	39,639 \pm 8,719
XP a pH 2,5	10,381 \pm 3,916	25,167 \pm 9,494
HE	10,875 \pm 3,769	26,985 \pm 9,352
MÉDIA GERAL	12,032 \pm 3,638	31,404 \pm 9,495
2. Traçado dos maiores eixos ortogonais:		
AT a pH 4,0	13,729 \pm 2,602	37,300 \pm 11,00
	14,940 \pm 4,055	43,440 \pm 14,00
MÉDIA GERAL	14,335 \pm 3,433	40,370 \pm 12,50

Obs.: Valores médios obtidos a partir de 30 medições; em 1., o volume foi calculado a partir dos valores das áreas; em 2., o volume foi calculado a partir da introdução de um terceiro eixo "C", sendo $C = B$.

I



II

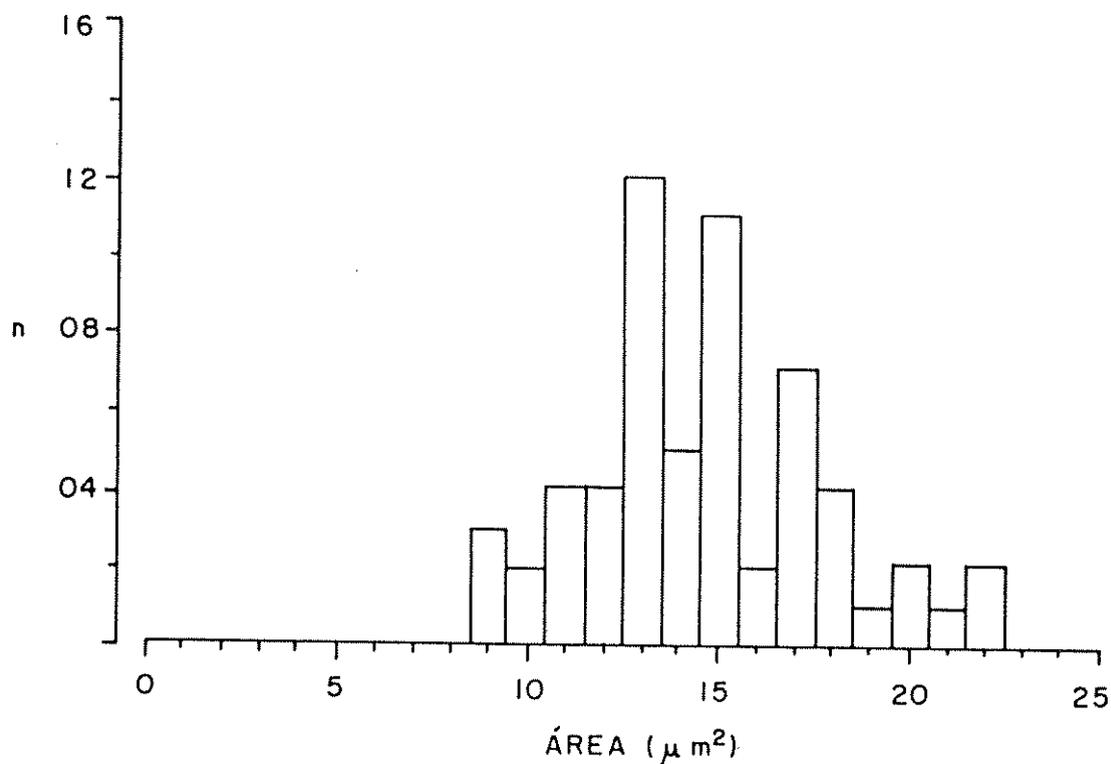


Fig. 26: Histograma de distribuição das áreas dos glóbulos proteicos, em μm^2 . I. Método de contagem de quadrados equimétricos em papel milimetrado. Amostragem: 120 glóbulos. II. Método do traçado dos maiores eixos ortogonais. Amostragem: 60 glóbulos.

3.4. EXTRAÇÕES PROTEICAS:

3.4.1. Controles:

Os resultados obtidos para o material utilizado como controle para os tratamentos enzimáticos com pepsina e tripsina após coloração com xylydine Ponceau (Fig.27) apresentaram um padrão morfológico semelhante àquele apresentado pelos cotilédones corados por esse método sem qualquer tratamento prévio (vide Ítem 3.2.1.) e seus valores de absorvância a $\lambda = 570$ nm. foram ligeiramente superiores aos das células não tratadas (Tabela 12).

3.4.2. Pré-tratamento com ácido acético:

O material pré-tratado com ácido acético a 45% antes da fixação e posteriormente corado com XP revelou um grande desarranjo dos corpos proteicos nas células (Fig.28) quando comparado aos obtidos naquelas sem pré-tratamento. O ácido acético além disso, remove material proteico das células cotiledonares, mas não em sua totalidade, tanto em cotilédones no tempo zero, quanto após 72 horas de embebição para a germinação (Tabela 12).

Blocos de parafina contendo o material pré-tratado puderam ser seccionados em micrótomo com maior facilidade que o fixado diretamente, mas a preservação das paredes celulares foi comparativamente menor.

3.4.3. Tratamento pela pepsina:

A utilização da pepsina a 0,2% para a remoção do conteúdo proteico das células cotiledonares foi muito mais

Tabela 12: Valores das absorvâncias obtidas em células cotiledonares de soja após coloração com XP, em material utilizado como controle de tratamentos de extração.

TEMPO	PRÉ-TRATAMENTO	CONTROLES DAS DIGESTÕES COM	
	c/HAc a 45%	Pepsina	Tripsina
0 h	0,643±0,164	1,028±0,091	0,954±0,163
72 h	0,614±0,185	1,472±0,212	1,245±0,183

Obs.: Médias obtidas a partir dos valores de 30 observações; condições de medição: Objetiva Plan 40/0,65; optovar 2,0; diafragma de campo: 0,3 mm; diafragma de medida: 0,25 mm; $\lambda = 570$ nm; área tomada por medição: $7,1 \mu\text{m}^2$.

eficiente do que a remoção pelo ácido acético extraíndo material diferenciadamente, conforme a posição da célula em relação ao sistema vascular, sendo que a remoção foi menor em CAV e CSV (Fig.29).

Nas células distantes do sistema vascular (CDVA ou B72), também pode ser notada uma extração proteica diferenciada, com o material formador do envoltório dos corpos proteicos, mais resistente à ação da enzima (Fig. 29, ▲). As paredes celulares também se apresentaram levemente coradas e portanto, com material proteico resistente à remoção pela pepsina nas condições e concentração utilizados (Fig. 29).

3.4.4. Tratamento pela tripsina:

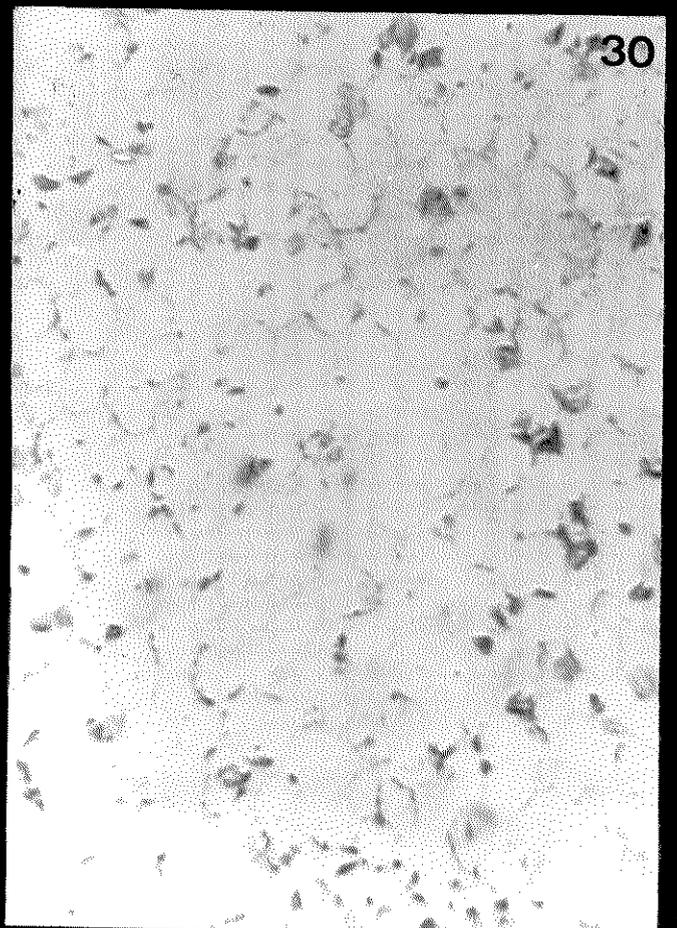
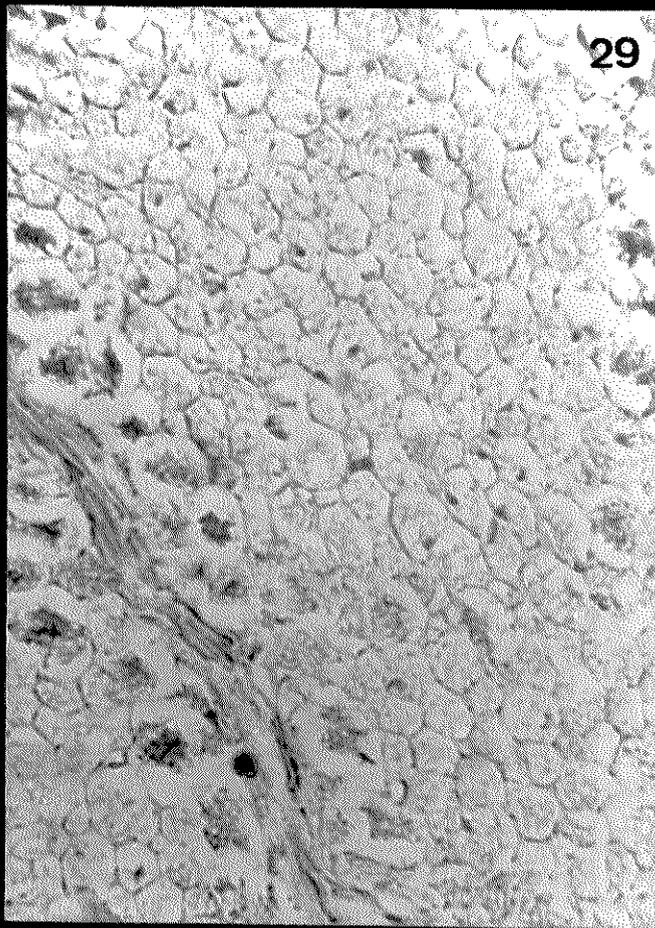
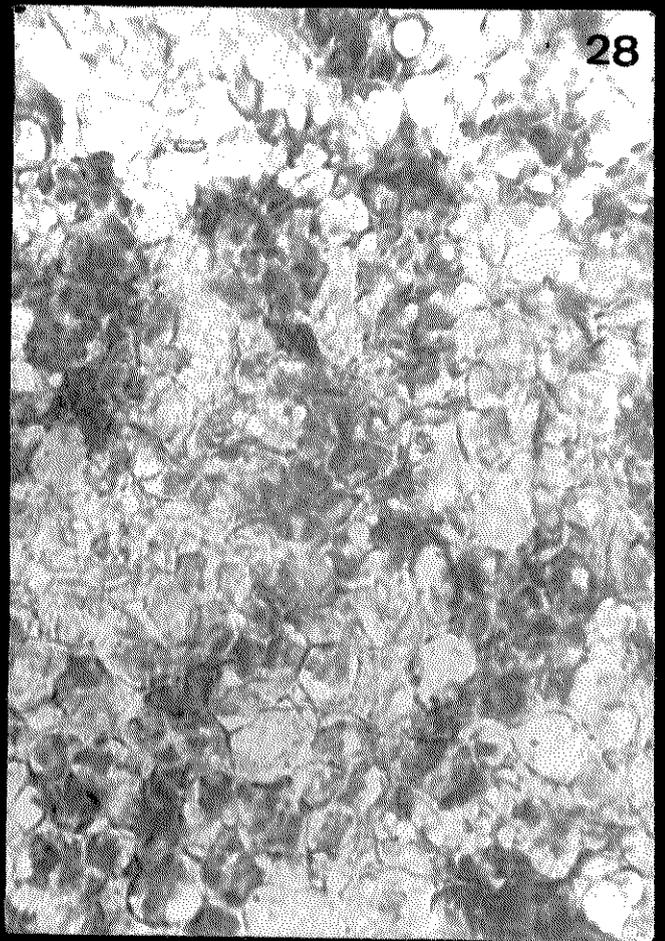
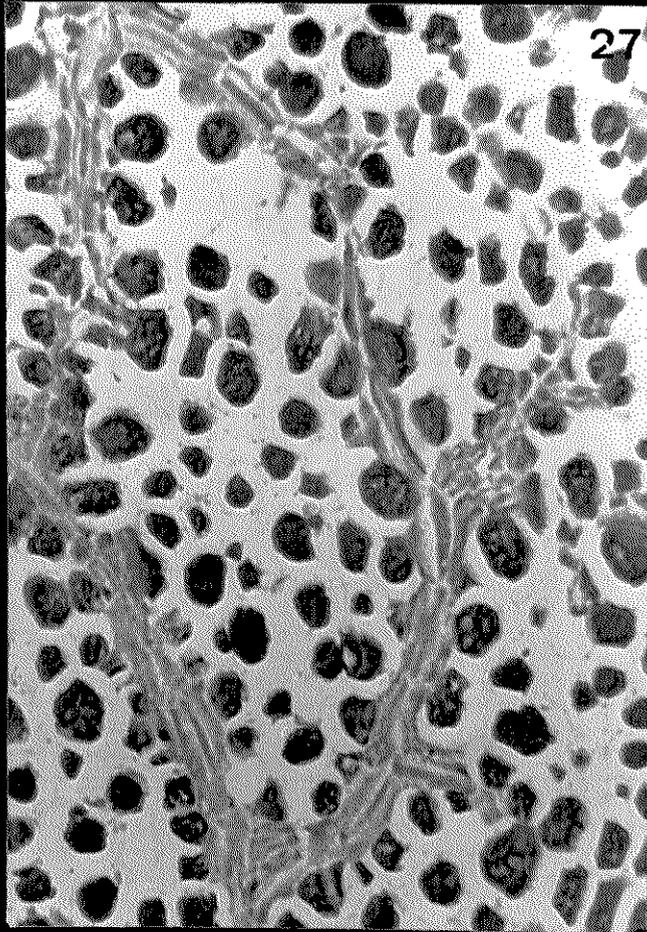
Das extrações proteicas realizadas, o uso da tripsina foi o de maior eficiência, removendo praticamente a totalidade dos corpos proteicos de todas as células cotiledonares (Fig. 30).

Também com a utilização desse método, alguns materiais da parede não foram removidos, permanecendo corados pelo XP, apesar de, comparativamente à extração com pepsina, ter havido uma maior remoção (Fig. 29 e 30).

3.5. DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO APARENTE DOS CORPOS PROTEICOS "in situ":

A medição das absorbâncias para os materiais corados com xileno cianol(XC)(Fig.31 e 32) e azul de metileno(AM)

Fig. 27 a 30: Cortes de cotilédones de soja, obtidos após extrações proteicas e submetidos à coloração com xylidine Ponceau a pH 2,5. Aumento: 450 X. Fig. 27: Controle do método de extração com tripsina. Podem ser notados os corpos proteicos fortemente corados e, no interior dos vasos, reação positiva ao corante. Fig. 28: Cortes obtidos após pré-tratamento com o ácido acético antes da fixação e posterior coloração com XP. Nota-se que o padrão globular apresentado pelos corpos proteicos sem pré-tratamento, é destruído, havendo um visível desarranjo e remoção de material. Fig. 29: Corte obtido após o tratamento com pepsina. Percebe-se claramente que há remoção nos corpos proteicos, mas nas paredes celulares e nas regiões que envolvem os glóbulos proteicos (▲), ainda se obtém resposta positiva ao corante. Observa-se ainda uma menor extração nas células do sistema vascular e naquelas adjacentes aos mesmos (▲). Fig. 30: Corte obtido após o tratamento com tripsina. Pode ser notada uma maior remoção do material do que pelo método de extração pela pepsina. As paredes celulares ainda apresentam resposta ao corante mas os corpos proteicos são praticamente removidos em sua totalidade.



(Fig. 33 e 34) nos diversos pHs, posições e tempos utilizados, apresentou, como esperado, valores médios crescentes para AM e decrescentes para XC em função do pH utilizado (Tabela 13).

O perfil das curvas obtidas para os corpos proteicos localizados em CDVA (Fig.35) e CDVB72 (Fig.36) foi semelhante para o material corado pelo xileno cianol mas apresentou uma maior inflexão para aqueles presentes em CDVB72 corados pelo azul de metileno. O ponto isoelétrico aparente para essas proteínas, nos dois tempos, foi praticamente o mesmo, com $pI = 4,4$ para CDVA e $pI = 4,35$ para CDVB72.

O material corado em CSVA (Fig. 37) e CSVB72 (Fig. 38) apresentou curvas com perfis diferentes aos das células distantes do sistema vascular, com um ponto de inflexão mais acentuado na curva do material em tempo zero corado com xileno cianol. A medição das absorvâncias dos corpos proteicos corados com azul de metileno no tempo zero, originou uma curva com ombro entre os pHs 3,0 e 3,8 e uma inflexão mais suave quando comparada com o material após 72 horas de embebição. No material em CSVB72, também foi detectada a presença de ombro na curva de AM deslocado para a faixa de pH entre 3,8 e 4,2. Os valores obtidos para o ponto isoelétrico para essas posições (CSVA e B72) também difere, sendo maior no tempo zero ($pI = 3,9$) do que após três dias de germinação ($pI = 3,7$).

O material radicular corado, apresentou curvas com perfis diferentes do material cotiledonar, com um padrão mais irregular e ainda, com diferenças quando comparadas en

Fig. 31-34: Cortes de cotilédones de soja antes da embebição para a germinação utilizados para a determinação do ponto isoelétrico aparente "in situ". Aumento:450 X. Fig. 31: Corte corado com xileno cianol a pH 2,2. Podem ser observados os corpos proteicos corados em azul, com material positivo ao corante no interior de vasos. Fig. 32: Corte corado com xileno cianol a pH 7,8. Nesse pH, os corpos proteicos praticamente não se coram. Fig. 33: Corte corado com azul de metileno a pH 2,2. Pode ser notada uma fraca coloração das paredes celulares em azul, mas os corpos proteicos praticamente não apresentam uma reação positiva ao corante. Fig. 34: Corte corado com azul de metileno a pH7,8. São observados os corpos proteicos fortemente corados em azul, podendo ainda serem notadas diferenças na dos mesmos, quando localizados próximos a vasos.

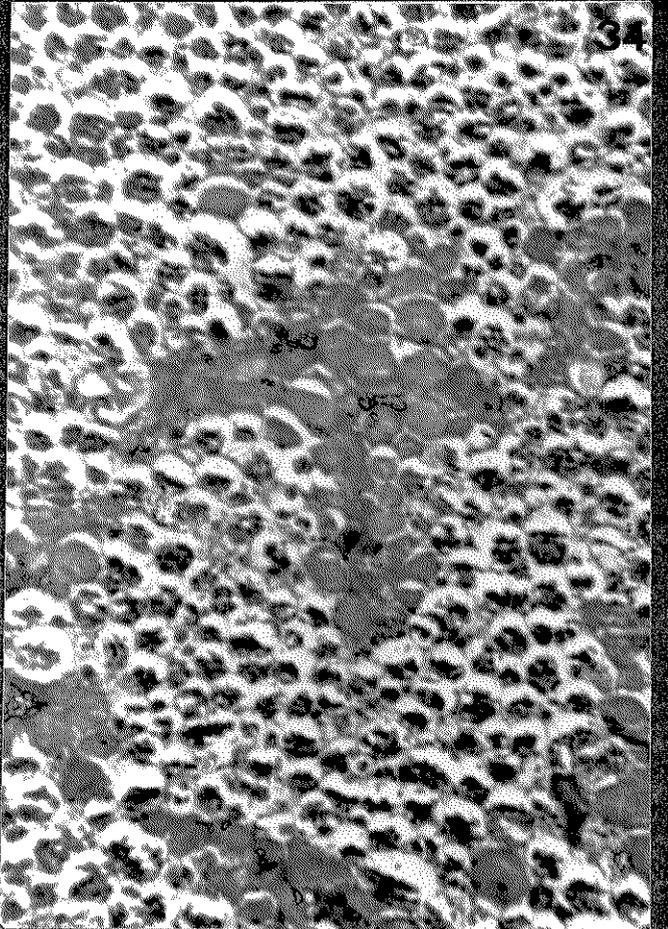
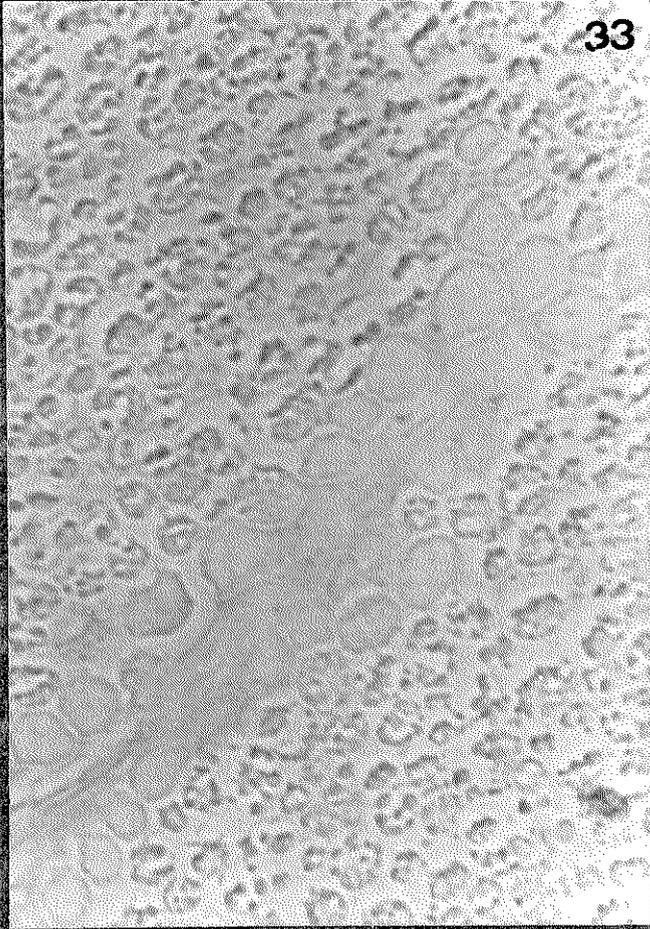
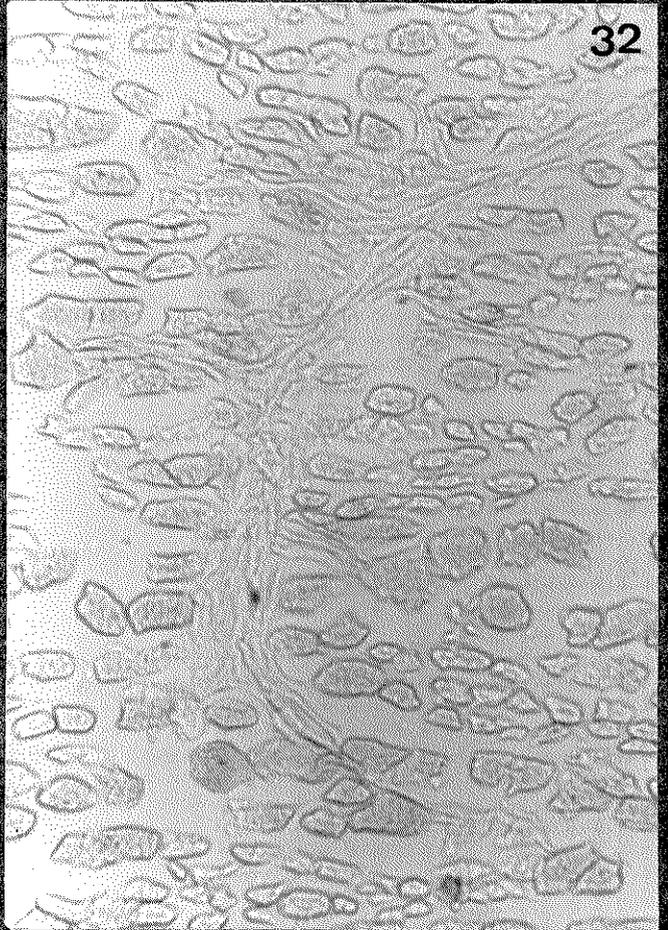
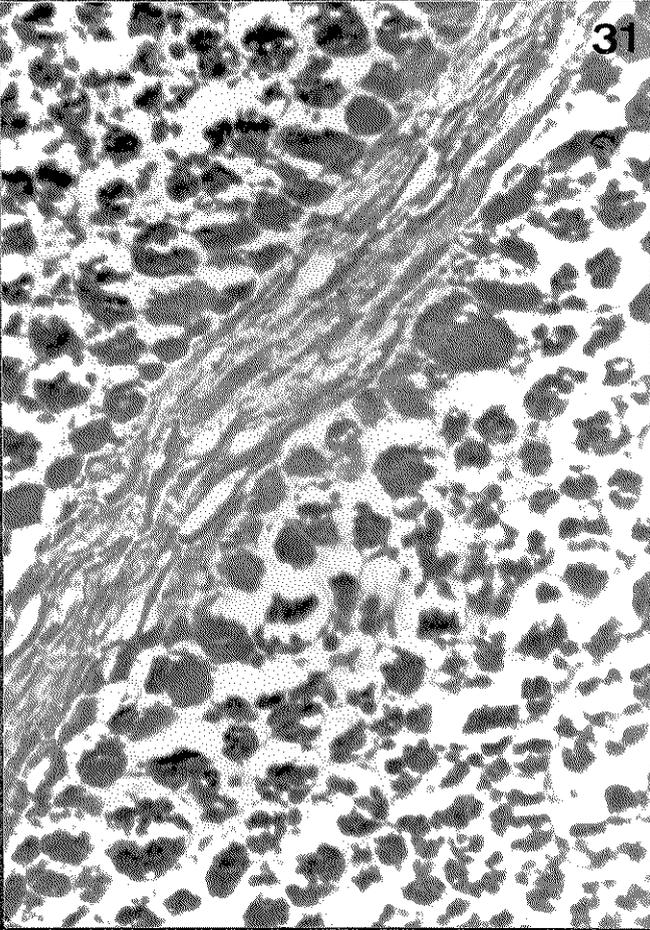


Tabela 13: Valores médios das absorbâncias dos corpos proteicos "in situ" após coloração com azul de metileno ou xileno cianol em diversos tempos, posições e pHs.

pH	CDVA		CDVB72		CSVA		CSV72		CPRB72		CVRB72	
	AM	XC	AM	XC	AM	XC	AM	XC	AM	XC	AM	XC
2,2	0,070	2,000	0,033	2,000	0,163	2,000	0,111	2,000	0,046	1,850	0,048	2,000
3,0	0,067	2,000	0,030	2,000	0,552	2,000	0,651	1,670	0,128	0,978	0,464	0,840
3,8	0,248	2,000	0,064	2,000	0,613	0,817	1,045	0,886	0,242	0,521	0,658	0,478
4,2	0,286	1,272	0,300	1,270	1,256	0,407	1,067	0,385	0,445	0,335	0,804	0,208
4,6	1,569	0,724	2,000	0,772	1,762	0,320	1,970	0,215	0,428	0,220	1,512	0,167
5,4	1,980	0,069	2,000	0,226	1,965	0,027	2,000	0,012	0,560	0,123	1,679	0,076
6,2	2,000	0,069	2,000	0,021	2,000	0,027	1,990	0,000	0,628	0,120	1,935	0,061
7,0	2,000	0,040	2,000	0,024	2,000	0,013	2,000	0,000	1,057	0,112	2,000	0,055
7,8	2,000	0,027	2,000	0,035	2,000	0,019	2,000	0,000	1,343	0,073	2,000	0,021

Obs.: Valores obtidos a partir da medição de 20 regiões em cada pH e corante utilizado. Condições das medições: Objetiva Plan 40/0,65; optovar 2,0; diafragma de medida: 0,16 mm; diafragma de campo: 0,2mm; área tomada em cada observação: 3,1 μm^2 ; comprimentos de onda utilizados: 600 nm para leituras de azul de metileno e 630 nm para leituras de xileno cianol.

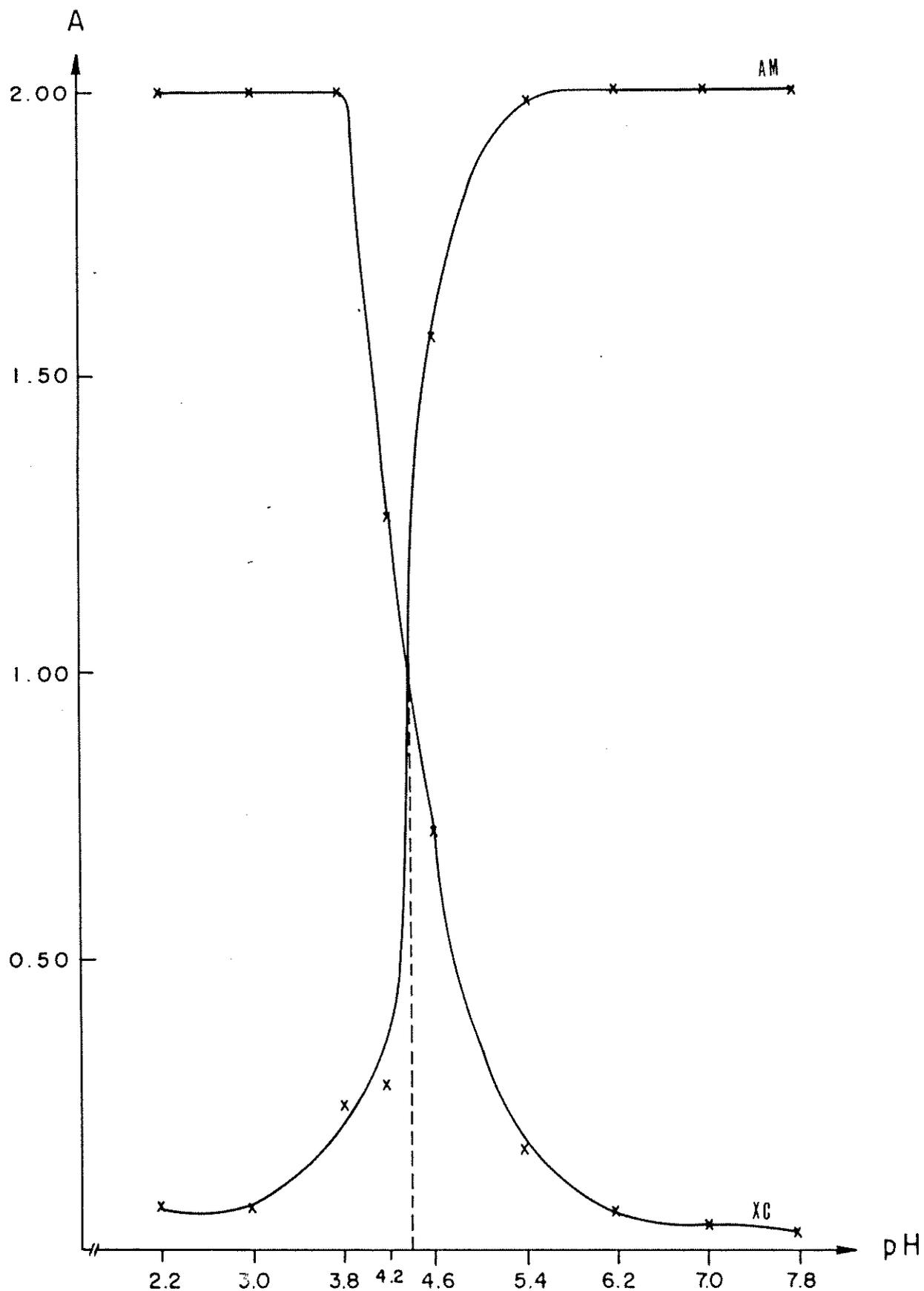


Fig. 35: Determinação gráfica do ponto isoelétrico aparente para corpos proteicos localizados em regiões distantes de vasos, de cotilédones "in natura" (CDVA), após coloração c/ xileno cianol (XC) ou azul de metileno (AM) em diversos pHs. pI obtido = 4,4

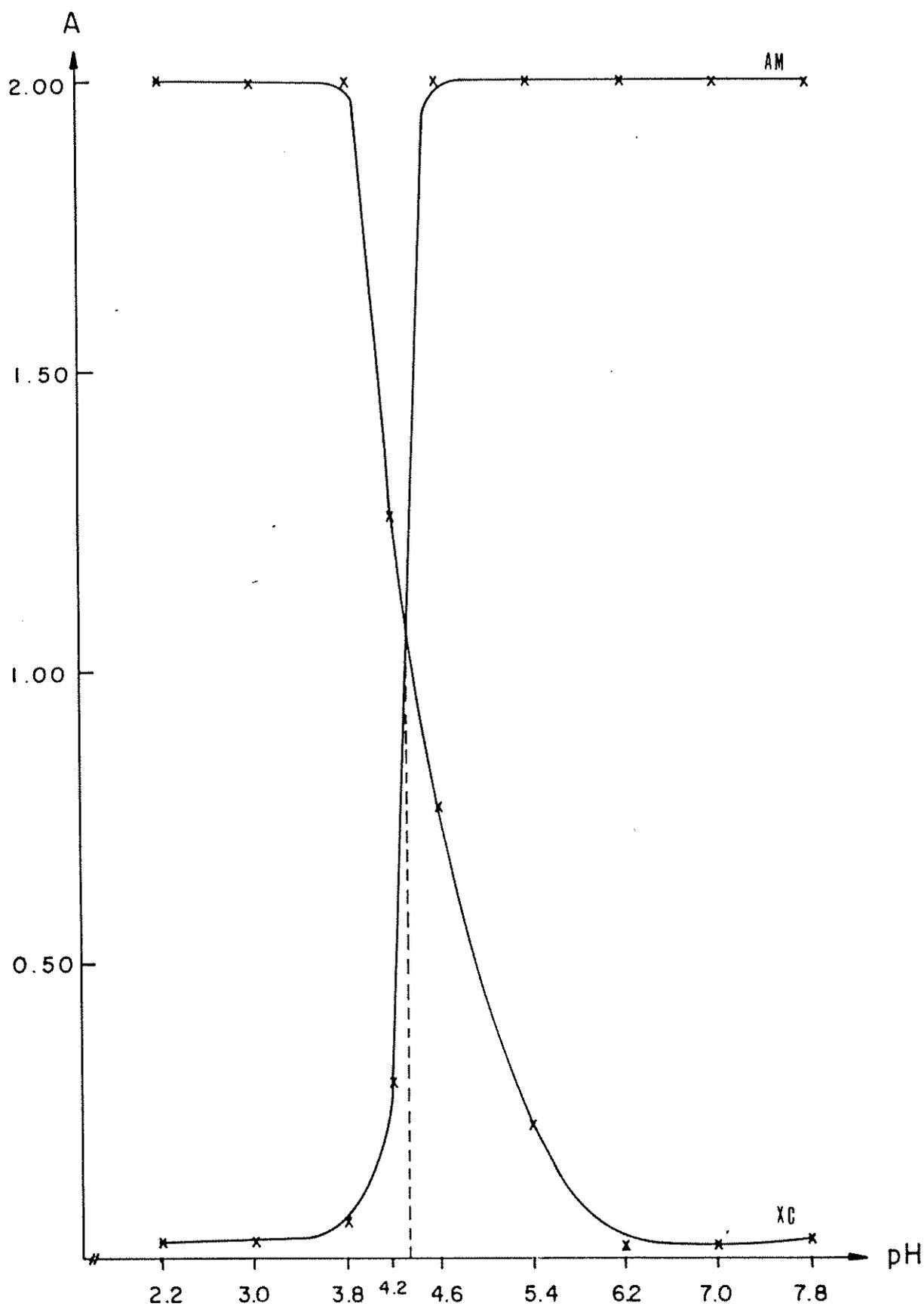


Fig. 36: Determinação gráfica do ponto isoelétrico aparente para corpos proteicos localizados em regiões distantes do sistema vascular de cotilédones após 72 horas de embebição para a germinação (CDVB72) submetidos à coloração com xileno cianol (XC) ou azul de metileno (AM) em diversos pHs. pI obtido = 4,35.

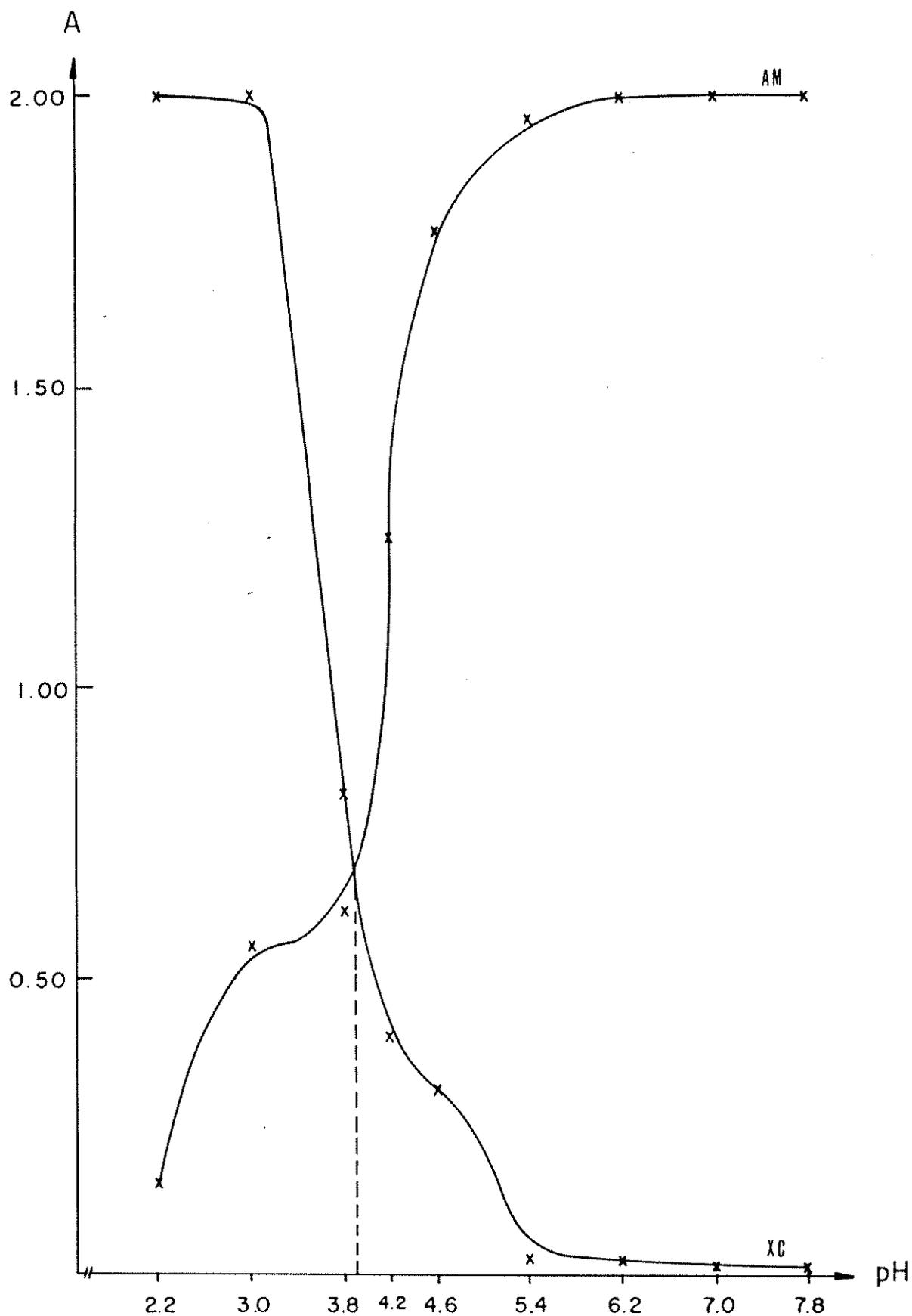


Fig. 37: Determinação gráfica do ponto isoelétrico aparente para corpos proteicos situados no interior do sistema vascular do cotilédone no tempo zero (CSVA) submetidos à coloração com xilencianol (XC) ou azul de metileno (AM) em diversos pHs. pI obtido: 3,9.

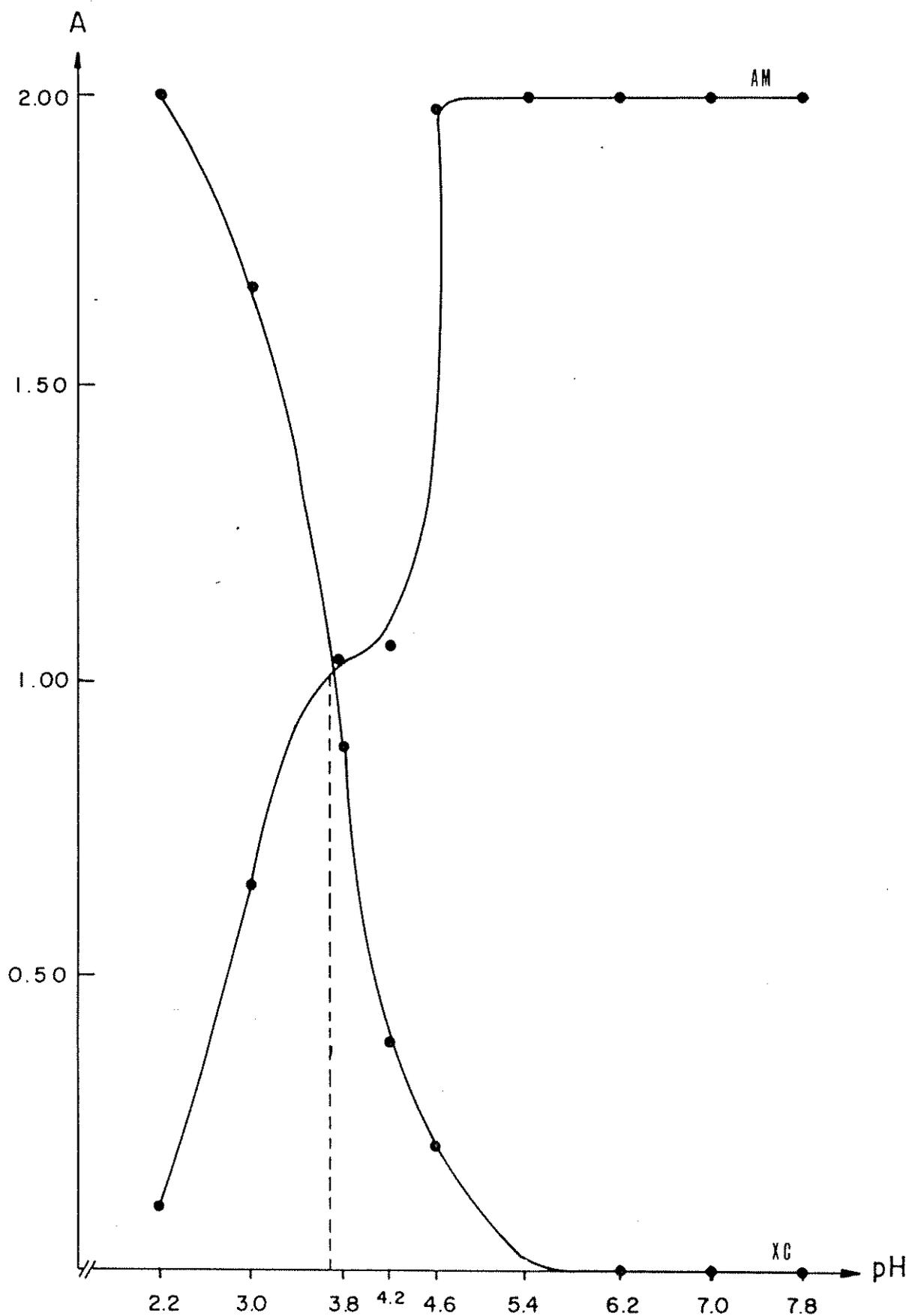


Fig. 38: Determinação gráfica do ponto isoelétrico aparente para corpos proteicos situados no interior de vasos em cotilédones após 72 horas de embebição para a germinação (CSV72) submetidos à coloração com xileno cianol (XC) ou azul de metileno (AM) em diversos pHs. pI obtido = 3,7.

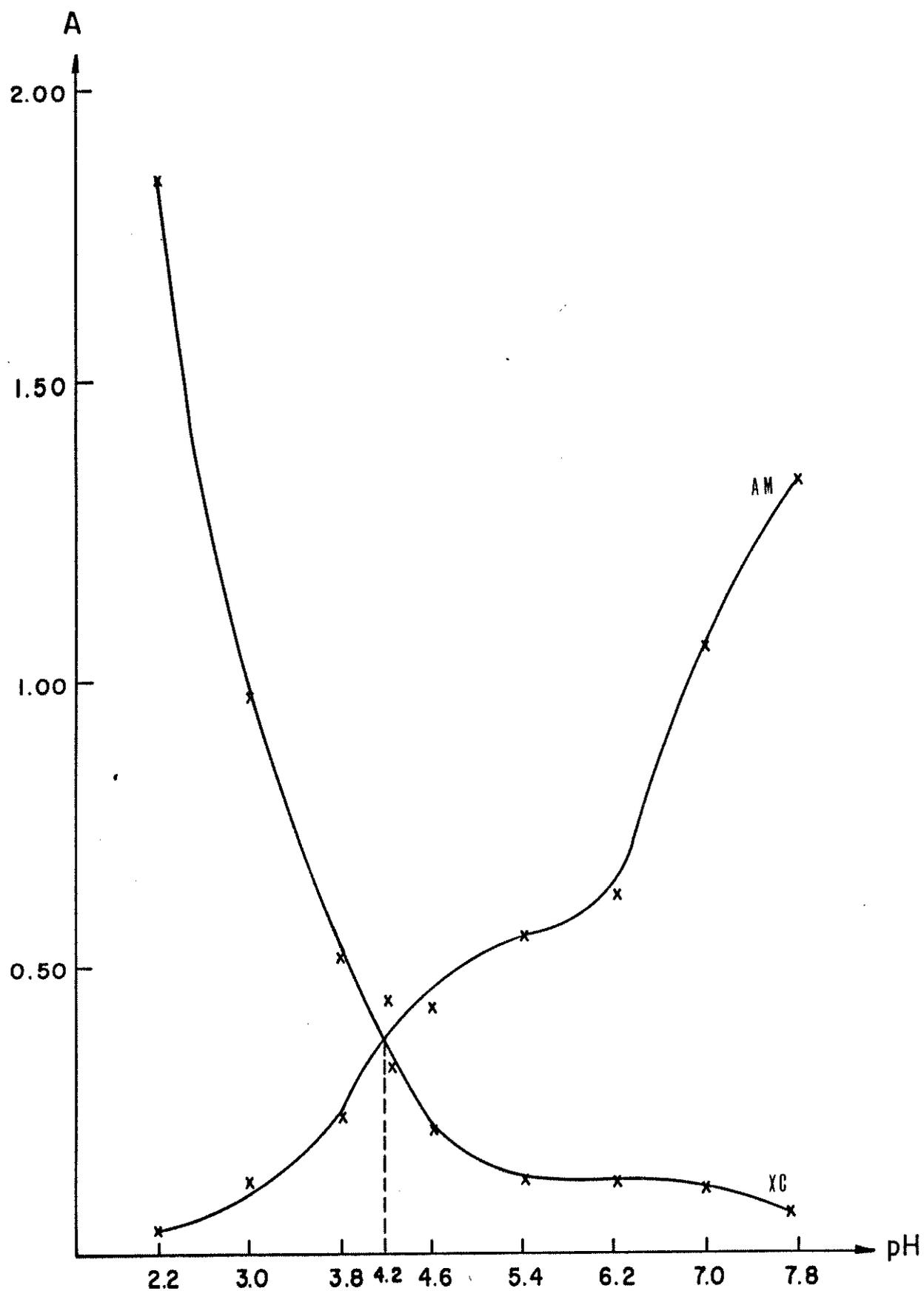


Fig. 39: Determinação gráfica do ponto isoelétrico aparente para corpos proteicos situados em células parenquimáticas da radícula após 72 horas de germinação (CPRB72), submetidas à coloração com xileno cianol (XC) ou azul de metileno (AM) em diversos pHs. pI obtido = 4,2.

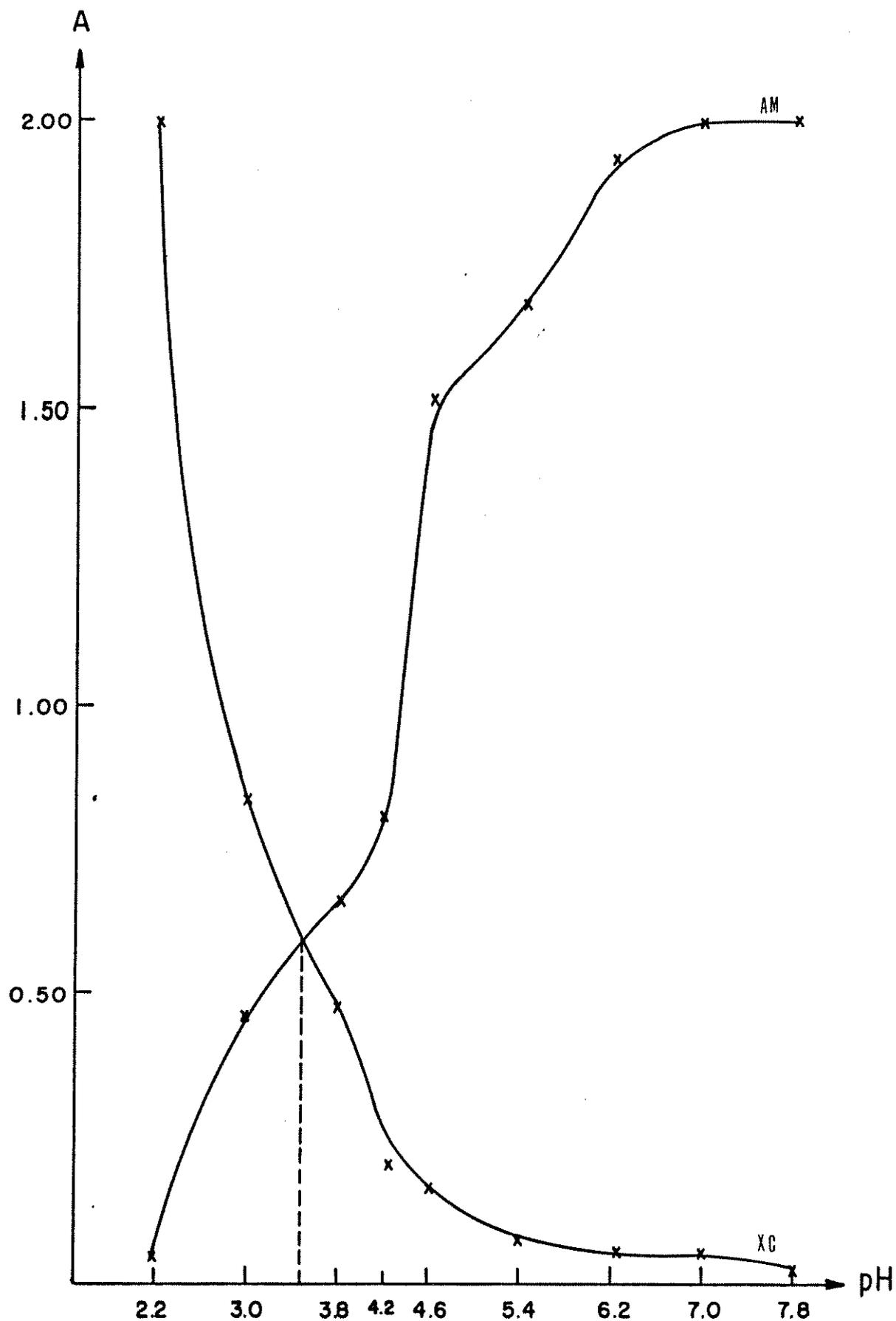


Fig. 40: Determinação gráfica do ponto isoelétrico aparente para corpos proteicos situados em células do sistema vascular da radícula após 72 horas do processo de germinação, (CVRB72) coradas com xileno cianol (XC) ou azul de metileno (AM) em diversos pHs. pI obtido = 3,5.

tre si. O material de células do parênquima da radícula (CPRB72) tem suas curvas plotadas na Fig. 39, onde podem ser notadas diferenças entre as curvas das absorvâncias do material corado com xileno cianol e com azul de metileno. O ρI obtido para esse material foi de 4,2. O conteúdo corado das células do sistema vascular da radícula (CVRB72) também apresentou diferenças entre as curvas obtidas a partir do uso dos dois corantes utilizados (Fig.40), com um $\rho I = 3,5$.

3.6. CURVAS DE BIRREFRINGÊNCIA DE FORMA:

As médias dos valores obtidos nas medições dos retardos ópticos nos diversos materiais e tempos utilizados, encontram-se na Tabela 14, assim como os valores percentuais relativos ao maior retardo obtido para cada material.

As curvas de birrefringência de forma obtidas para o material nos tempos 0h e 144 h (Fig. 41) mostraram um perfil semelhante para as células distantes de vasos e da radícula do embrião, exceto quando o meio de embebição utilizado foi a água.

A maioria dos materiais utilizados, teve sua birrefringência intrínseca (retardos mínimos) quando embebidos em glicerol puro ($n=1,472$). Porém em CDVB72, CRB72 e CAVB144 esse mínimo foi deslocado para $n = 1,435$ (Glicerol a 80%).

Para o material em tempo zero, houve um aumento do retardo entre $n = 1,36$ e $n = 1,386$, que se manteve no material após 3 dias apenas com um deslocamento desse aumento nas células da radícula ($n = 1,386$ a $n = 1,413$). Esse

Tabela 14: Valores de retardos ópticos em paredes celulares obtidos em diversos meios de embebição e regiões.

R	n	1,333 ÁGUA	1,360 GOH20%	1,386 GOH40%	1,413 GOH60%	1,435 GOH80%	1,472 GOH100%	1,479 NUJOL
CDVA	(a)	24,89±2,72	19,27±2,05	19,40±1,82	18,30±2,17	18,19±2,52	17,14±1,79	24,42±3,92
	(b)	100,0%	77,4%	77,9%	73,5%	73,1%	68,9%	98,1%
CAVA		13,40±2,18	11,19±1,74	11,67±1,71	8,92±1,38	9,55±1,88	8,86±0,46	14,05±2,40
		95,3%	79,6%	83,1%	63,5%	68,0%	63,1%	100,0%
CRE		20,01±2,14	18,83±2,48	19,67±2,17	17,66±1,85	16,19±2,04	14,89±2,22	26,23±3,32
		76,3%	71,8%	75,0%	67,3%	61,7%	56,8%	100,0%
CDVB72		22,38±2,88	15,19±2,81	18,10±1,52	13,69±1,26	11,71±1,32	13,03±1,50	16,60±2,47
		100,0%	67,9%	80,9%	61,2%	52,3%	58,2%	74,2%
CAVB72		18,03±2,88	11,57±1,94	18,38±0,99	13,72±1,08	10,78±1,11	8,90±1,98	14,46±2,00
		98,1%	62,9%	100,0%	74,6%	59,8%	48,4%	78,7%
CRB72		30,00±2,38	28,27±2,96	21,31±2,27	24,12±2,09	17,10±2,40	20,02±2,05	29,68±3,10
		100,0%	94,2%	71,0%	80,4%	57,0%	66,7%	98,9%
CDVB144		21,07±1,63	16,12±1,19	15,57±1,10	11,89±1,00	10,66±0,87	8,25±1,15	18,08±1,11
		100,0%	76,5%	73,9%	56,4%	50,6%	39,2%	85,8%
CAVB144		20,86±1,58	14,93±1,87	13,48±1,40	10,68±0,68	8,95±1,27	11,28±2,17	11,36±1,85
		100,0%	71,6%	64,6%	51,2%	42,9%	54,1%	54,5%
CRB144		32,23±2,29	23,70±0,70	20,17±0,95	17,44±0,71	17,37±0,80	11,52±1,11	19,57±1,59
		100,0%	73,5%	62,6%	54,1%	53,9%	35,7%	60,7%
CELULOSE		107,20±6,67	75,60±4,51	70,33±4,75	57,45±4,64	41,51±7,66	37,36±6,55	79,36±9,48
(c)		100,0%	70,5%	65,6%	53,6%	38,7%	34,9%	74,0%

Obs.: R = Região analisada (Vide material e métodos, 2.5.); n= Índice de refração do meio de embebição;
(a): primeiro valor de cada região, correspondente à média de 30 medições; (b): segundo valor de ca
da região, correspondente ao valor porcentual de determinada medida, em relação à maior; (c): celulo
se pura (algodão Johnson & Johnson).

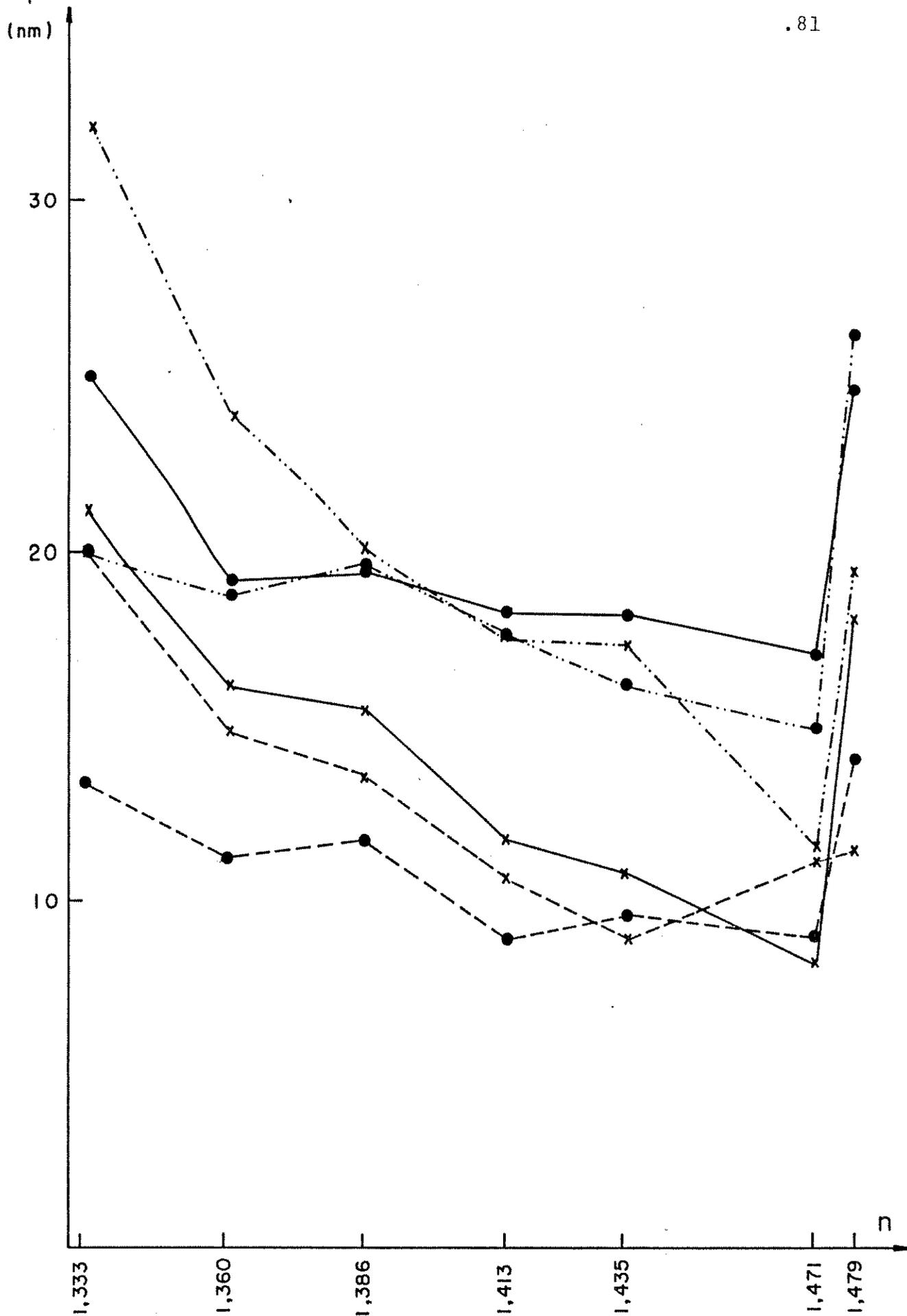


Fig. 41: Valores dos retardos ópticos (σ) em nm, obtidos para as paredes celulares de sementes no tempo zero e 144 horas. (●) valores para células de sementes "in natura" ; (x) valores para células após 144 h do processo de embebição; (—) células distantes de vasos (CDV); (----) células adjacentes a vasos (CAV); (-·-·-) células da radícula

perfil, não foi observado para o material após 6 dias de embebição para a germinação, nem para a celulose pura (Tabela 14).

Uma maior visualização dos perfis das curvas obtidas para o tempo zero e 6 dias pode ser feita na Fig. 41. As curvas percentuais para esses dois tempos mostram uma distinção entre o material antes e após a germinação, com uma diminuição da birrefringência intrínseca no material germinado (Fig. 42).

Os valores percentuais obtidos para o material B72 apresentam curvas mais irregulares quando comparados aos demais tempos, como pode ser notado na Fig. 43.

Quando consideramos apenas os valores obtidos para água e nujol e os valores das birrefringências intrínsecas dos diversos materiais e tempos, notamos sempre um valor mínimo para as paredes celulares próximas ao sistema vascular. O material antes da germinação apresenta os maiores retardos quando embebidos em água e o material após 6 dias, os menores (Fig. 44). A birrefringência intrínseca de forma geral diminui com a germinação, mas nas células adjacentes ao sistema vascular ela se manteve constante durante todo o intervalo de tempo analisado (Fig. 44).

3.7. ELETROFORESE:

Os resultados das eletroforeses para o material utilizado, encontram-se dispostos na Fig. 45.

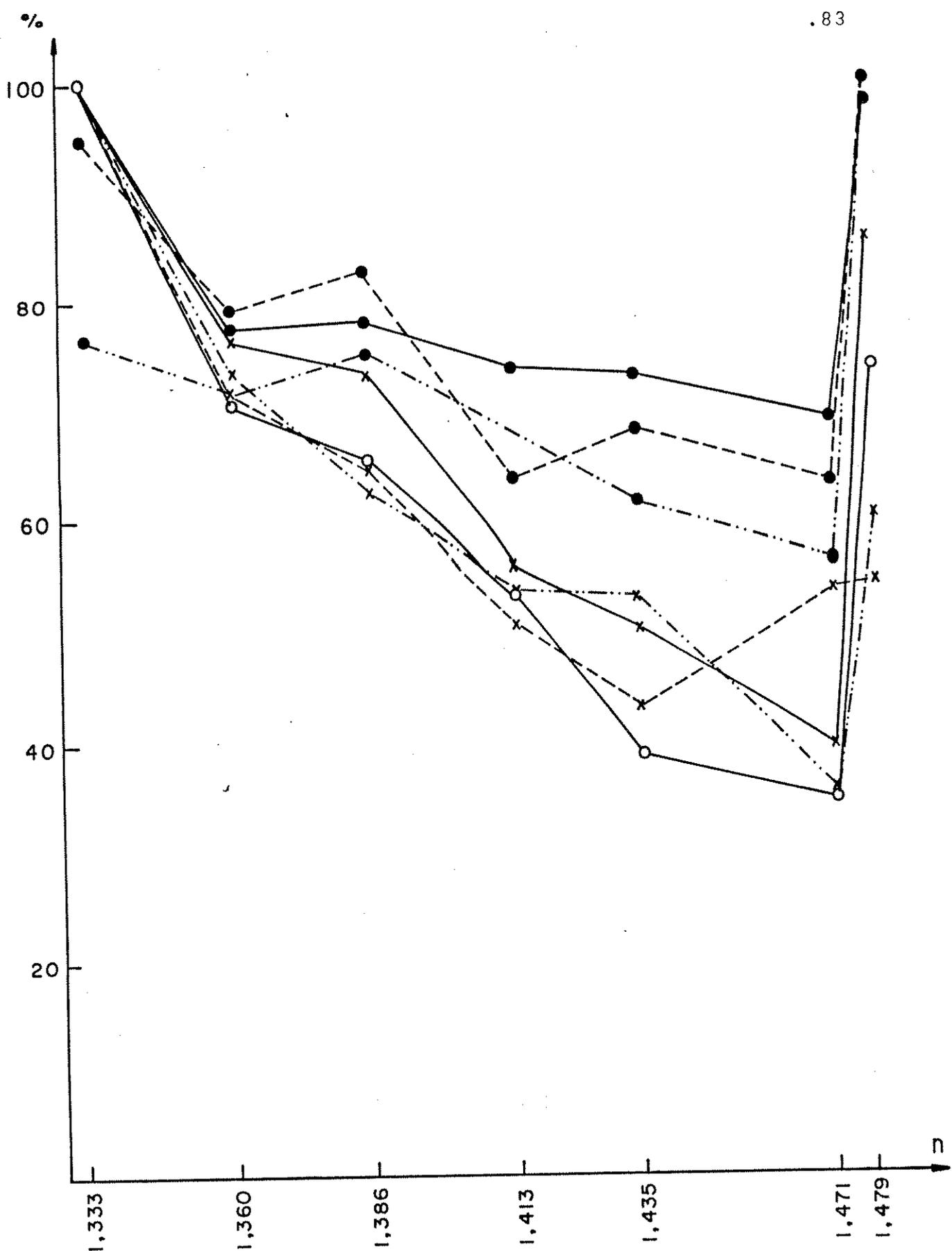


Fig. 42: Curva percentual para o material no tempo zero e após 144 h de embebição, baseada no maior retardo óptico obtido. (●) valores percentuais de paredes celulares de sementes no tempo zero; (x) após 144 h de embebição; (—): células distantes de vasos (CDV); (---): células adjacentes a vasos (CAV); (-.-.-): células da radícula (CR); (o): controle comparativo obtido a partir das medições de retardos em fibras celulósicas (algodão).

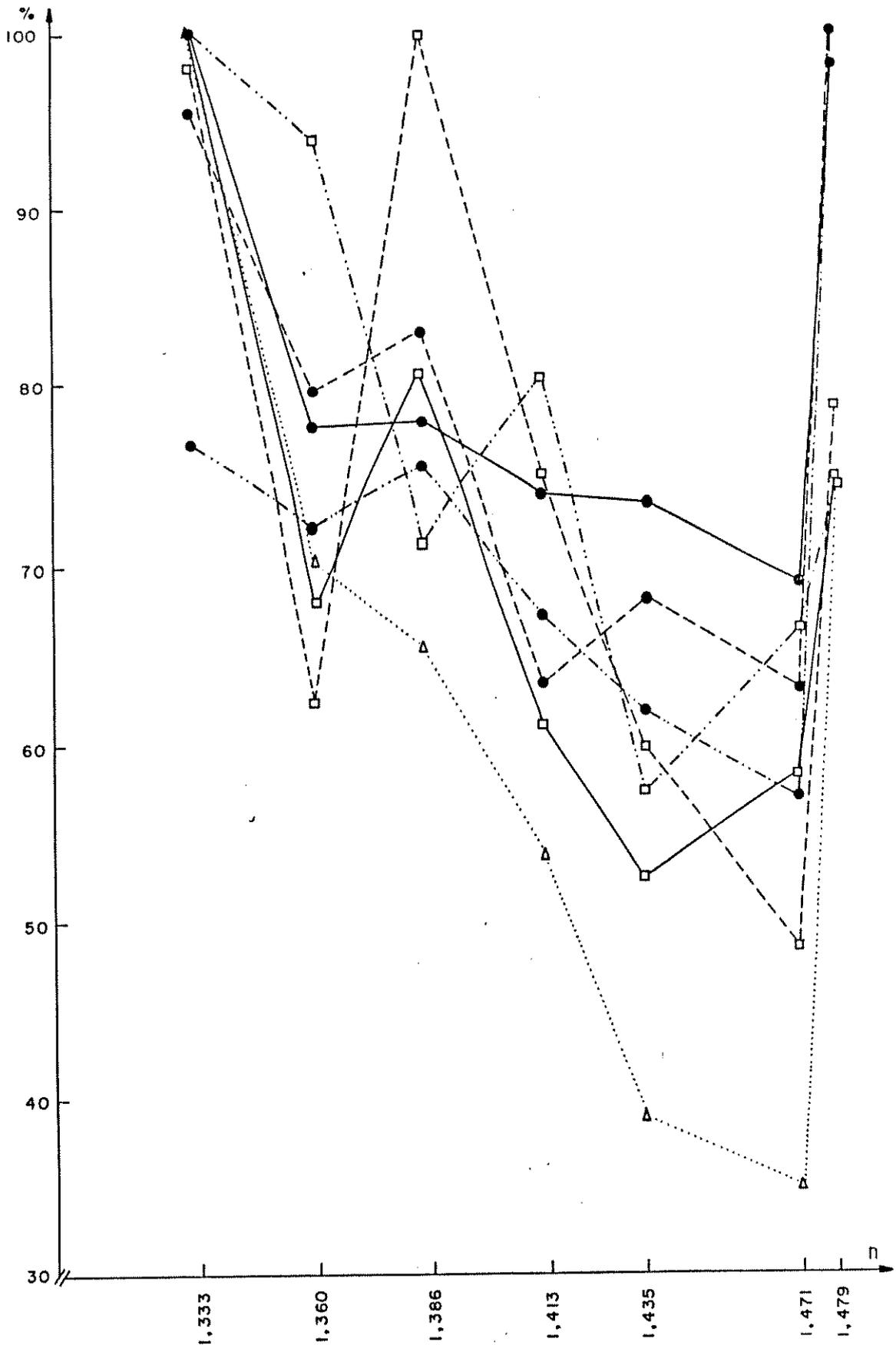


Fig. 43: Curva porcentual para o material no tempo zero e após 72 h de embebição, baseada no maior retardo óptico obtido. (●) valores percentuais de paredes celulares de sementes no tempo zero; (□) após 72 h de embebição; (—) células distantes de vasos (CDV); (---) células adjacentes a vasos (CAV); (....) células da radícula do embrião (CR); (Δ): controle comparativo obtido a partir das medições de retardos em fibras celulósicas.

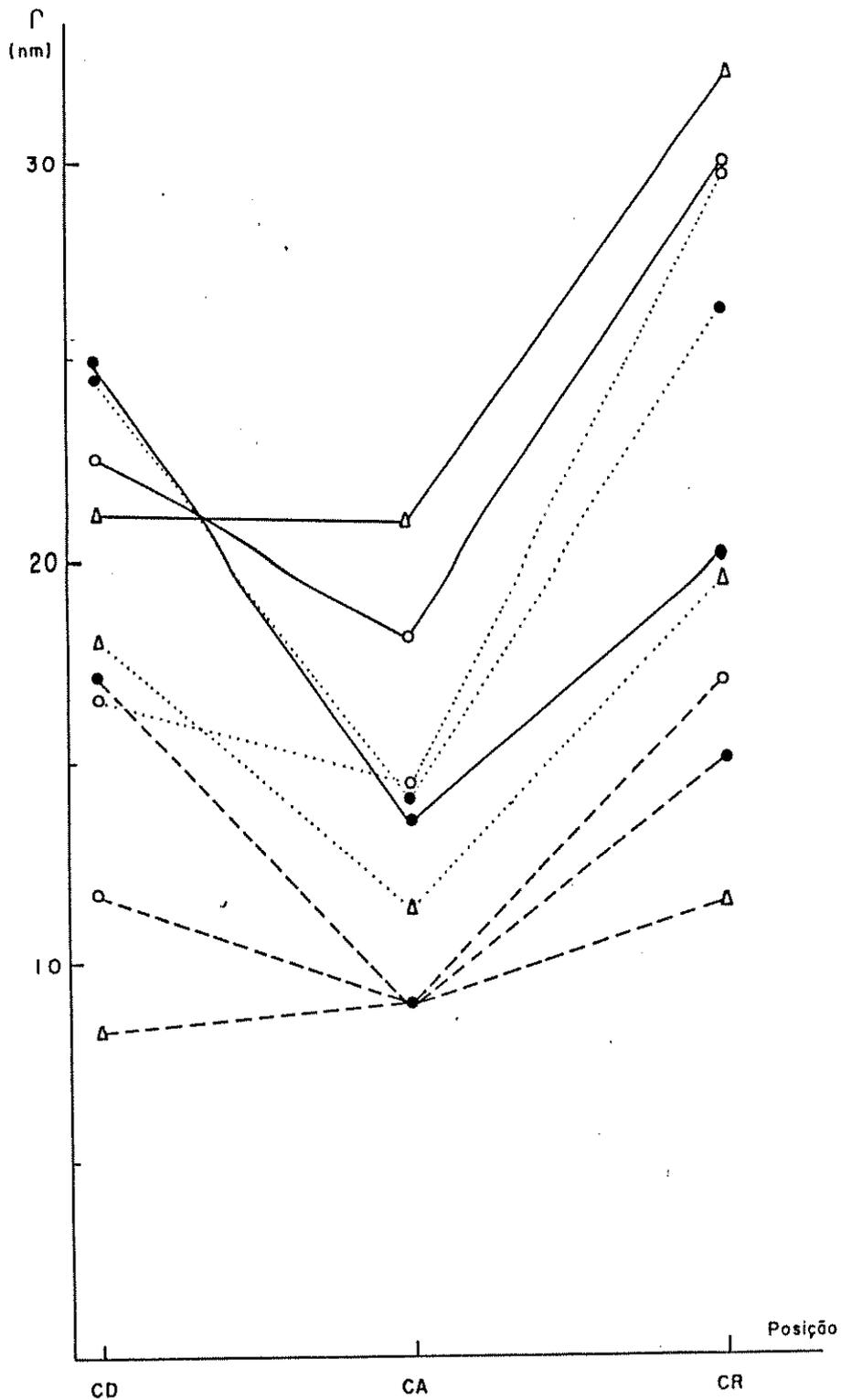


Fig. 44: Valores dos retardos ópticos nos índices de refração mínimo (1,333) e máximo (1,479) e valores de birrefringência intrínseca ($n = 1,435$ ou $n = 1,472$), em função da posição da célula na semente. (CD): células distantes de vasos; (CA) células adjacentes a vasos; (CR): células da radícula; (—): água ($n = 1,333$); (.....): nujol ($n = 1,479$); (- - -): birrefringência intrínseca (menores valores obtidos para cada caso); (●) tempo zero; (○) tempo 72 h; (Δ) tempo 144 h.

No extrato total de cotilédones, pode ser observada a presença de 10 bandas com extensão e coloração variadas, sendo que no material após 144 h, a 9ª e 10ª bandas não foram encontradas. Na fração rica em lectinas no tempo zero não foram encontradas as bandas de nº 1, 2 e 6, sendo que a banda de nº 4 se apresentou menos intensa que a de mesmo número do extrato cotiledonar total. Após 6 dias, reaparece a banda 6 e a de nº 4 se apresenta subdividida em 3 bandas, sendo uma delas menos intensa que as demais.

No embrião, o padrão de bandas foi mantido, apenas com uma diminuição na intensidade das mesmas.

3.8. DOSAGEM DE PROTEÍNAS:

A dosagem de conteúdo proteico pelo método do biuret para o material da fração rica em lectinas revelou as seguintes concentrações:

- a) Cotilédones: ~3 mg de proteína/ml de solução.
- b) Embrião tempo zero: ~1 mg prot./ml.
- c) Embrião tempo 144 h: ~0,2 mg prot./ml.

A partir desses valores foram feitas as diluições das diversas soluções de modo a se obter um conteúdo proteico em torno de 50 µg de proteína/ml de solução, podendo assim ser utilizado o método de Lowry para as dosagens (vide ítem 2.13). Os resultados das leituras das absorbâncias em $\lambda = 650$ nm bem como as concentrações finais obtidas, encontram-se descritos na Tabela 15. Os valores obtidos por unidade de

Fig. 45: Eletroforese em gel de Poliacrilamida dos diversos materiais e tempos analisados.

a) Esquema realizado a partir da observação dos tubos.

b) Fotografia dos resultados dos diversos tubos.

CT0: Células cotiledonares, extrato total, tempo zero.

CT6: Células cotiledonares, extrato total, tempo 144 h.

CL0: Células cotiledonares, fração rica em lectinas, tempo zero.

CL6: Células cotiledonares, fração rica em lectinas, tempo 144 horas.

E0 : Células da radícula, fração total, tempo zero.

E6 : Células da radícula, fração total, tempo 144 horas.

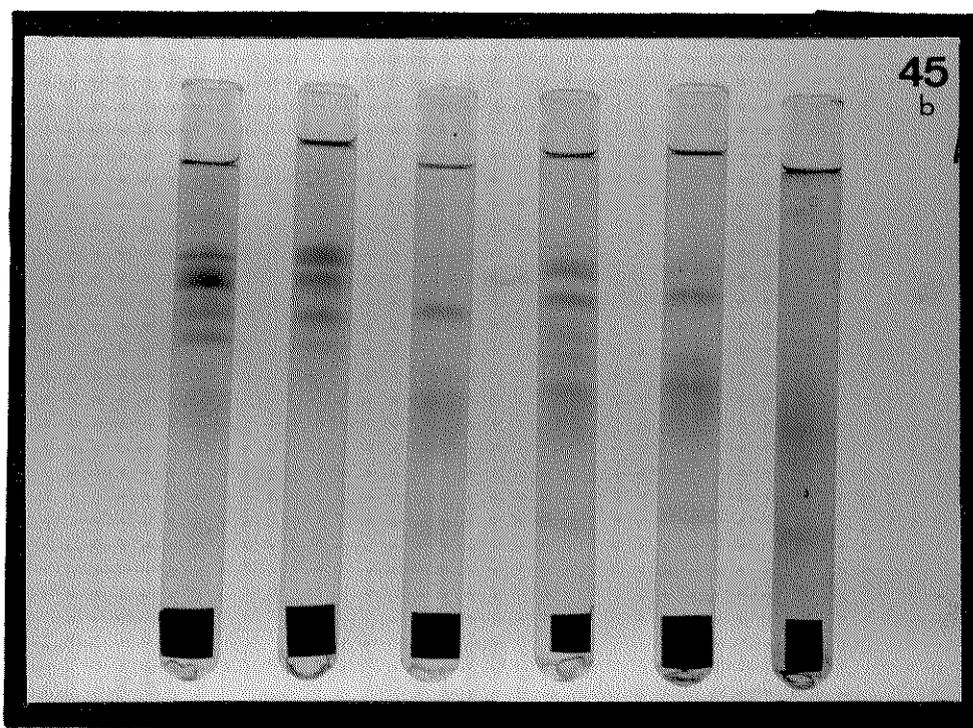
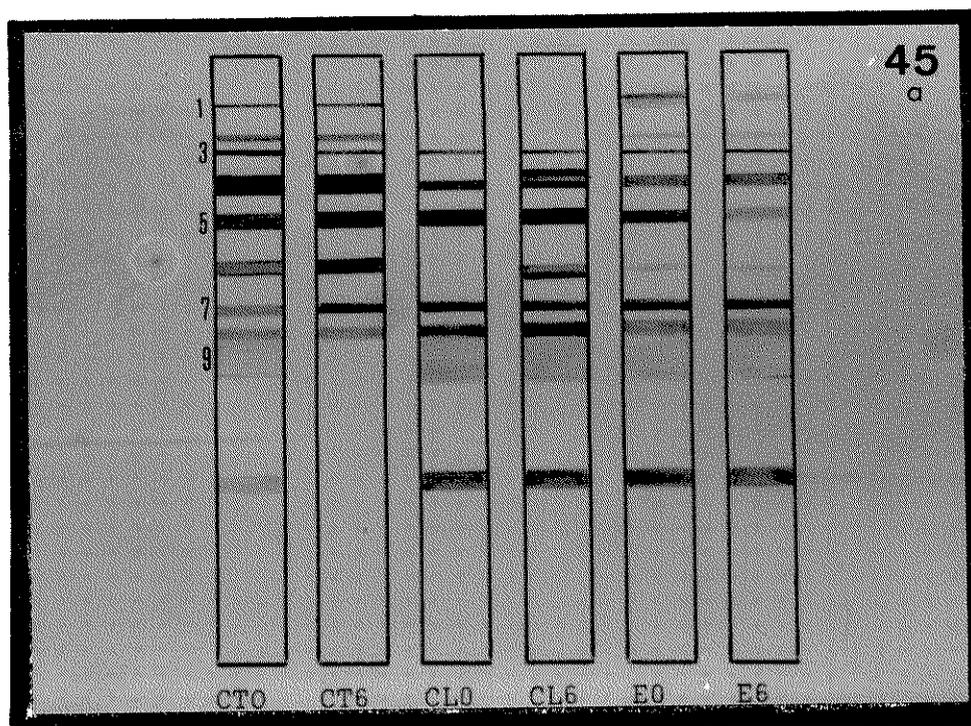


Tabela 15: Valores obtidos na dosagem de proteínas em cotilédones e embriões de soja, antes e após a germinação.

MEDIÇÃO	C O T I L É D O N E S				E M B R I Õ E S			
	TEMPO 0h		TEMPO 144h		TEMPO 0h		TEMPO 144h	
	L	T	L	T	L	T	L	T
Absorbância	0,241	0,543	0,179	0,356	0,427	0,936	0,599	1,069
Conteúdo	6,42	18,50	4,88	13,67	0,48	0,90	0,54	1,08

Obs.: L: fração rica em lectinas; T: fração total; conteúdo dado em mg/unidade de semente (2 cotilédones), ou de embrião.

amostragem (cotilédones ou embriões) acusam uma diminuição no conteúdo proteico ao nível de cotilédones e um aumento nesse conteúdo nas radículas (Fig. 46).

3.9. TESTES DE AGLUTINAÇÃO:

3.9.1. Aglutinação "in vitro":

Os resultados obtidos "in vitro" mostram um grande poder aglutinante tanto da fração total quanto da fração rica em lectinas (Fig. 47-49) em relação ao controle utilizado.

3.9.2. Aglutinação "in situ":

Os resultados das aglutinações "in situ" foram menos eficientes do que as realizadas "in vitro", tanto para as células cotiledonares e embriões no tempo zero, quanto naquelas após 144 horas de embebição para a germinação (Fig.50-1).

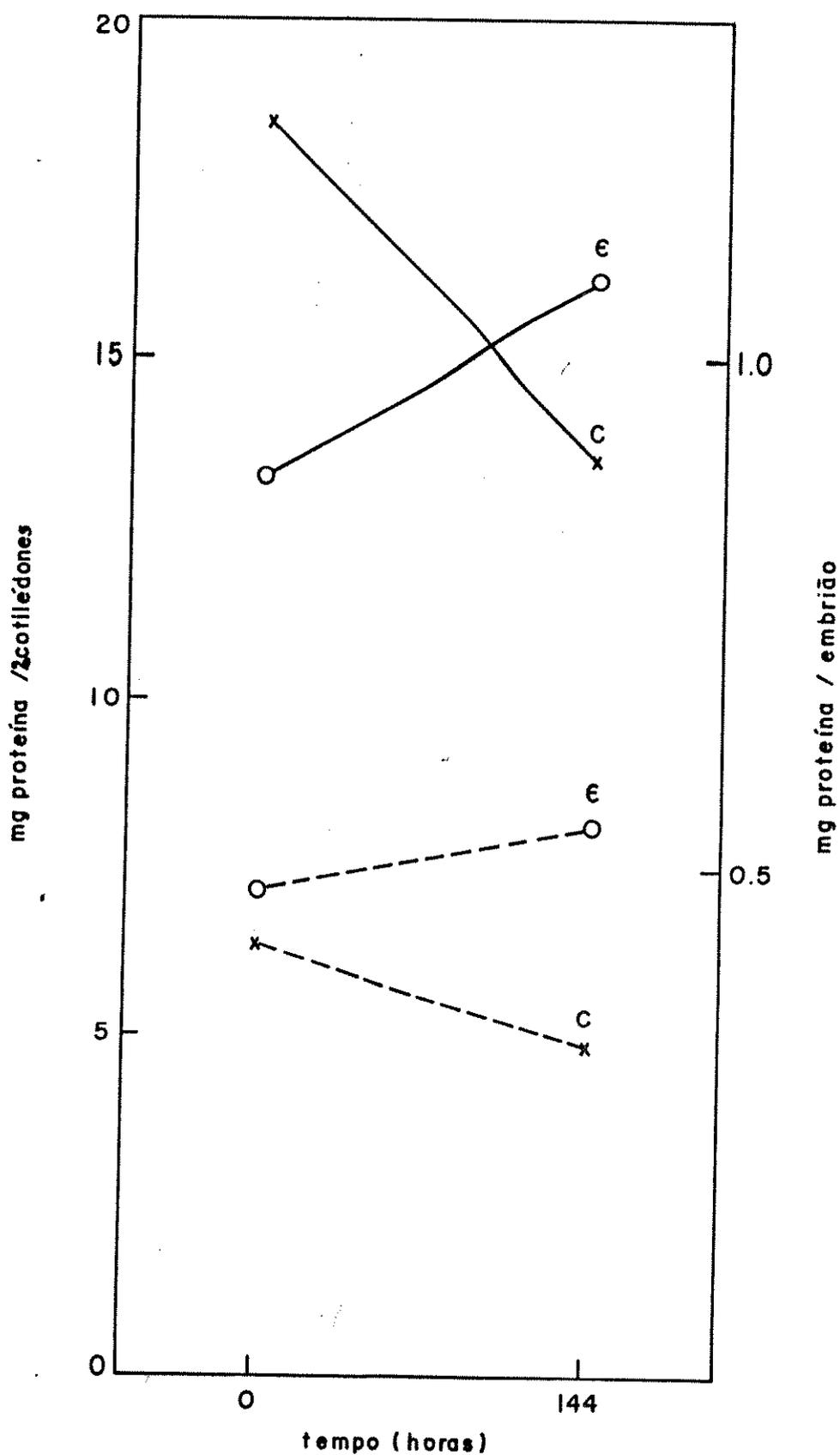


Fig. 46: Conteúdo proteico em cotilédones e embriões de *G. max*, dosado pelo método de Lowry modificado. (x) cotilédones; (o) embriões; (—) fração total; (---) fração rica em lectinas.

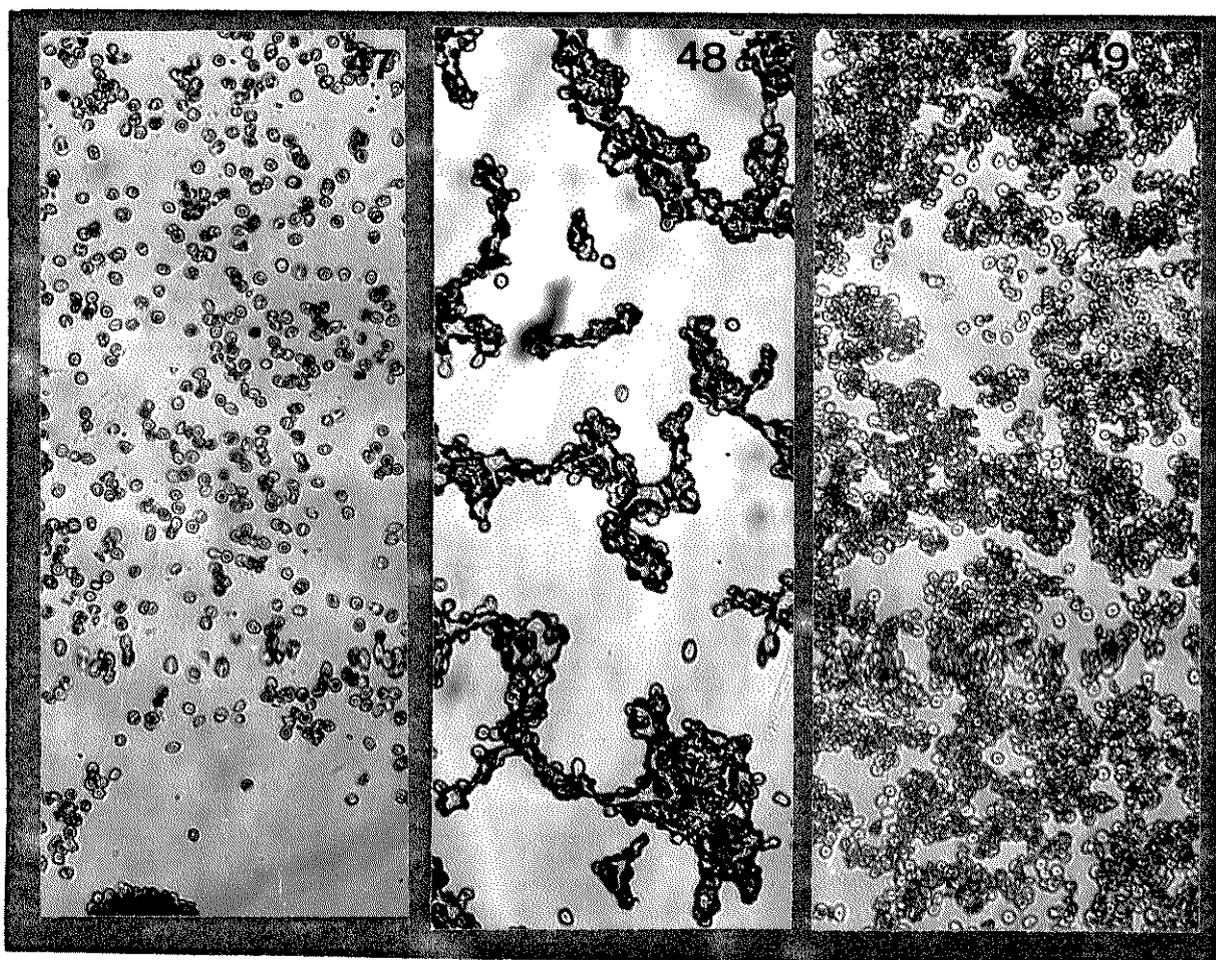


Fig.47-49: Resultados dos testes de aglutinação "in vitro".
Aumento: 100 x. Fig. 47: Controle: suspensão de hemácias em
PBS; Fig. 48: Suspensão de hemácias + fração rica em lecti-
nas; Fig. 49: Suspensão de hemácias + extrato total.

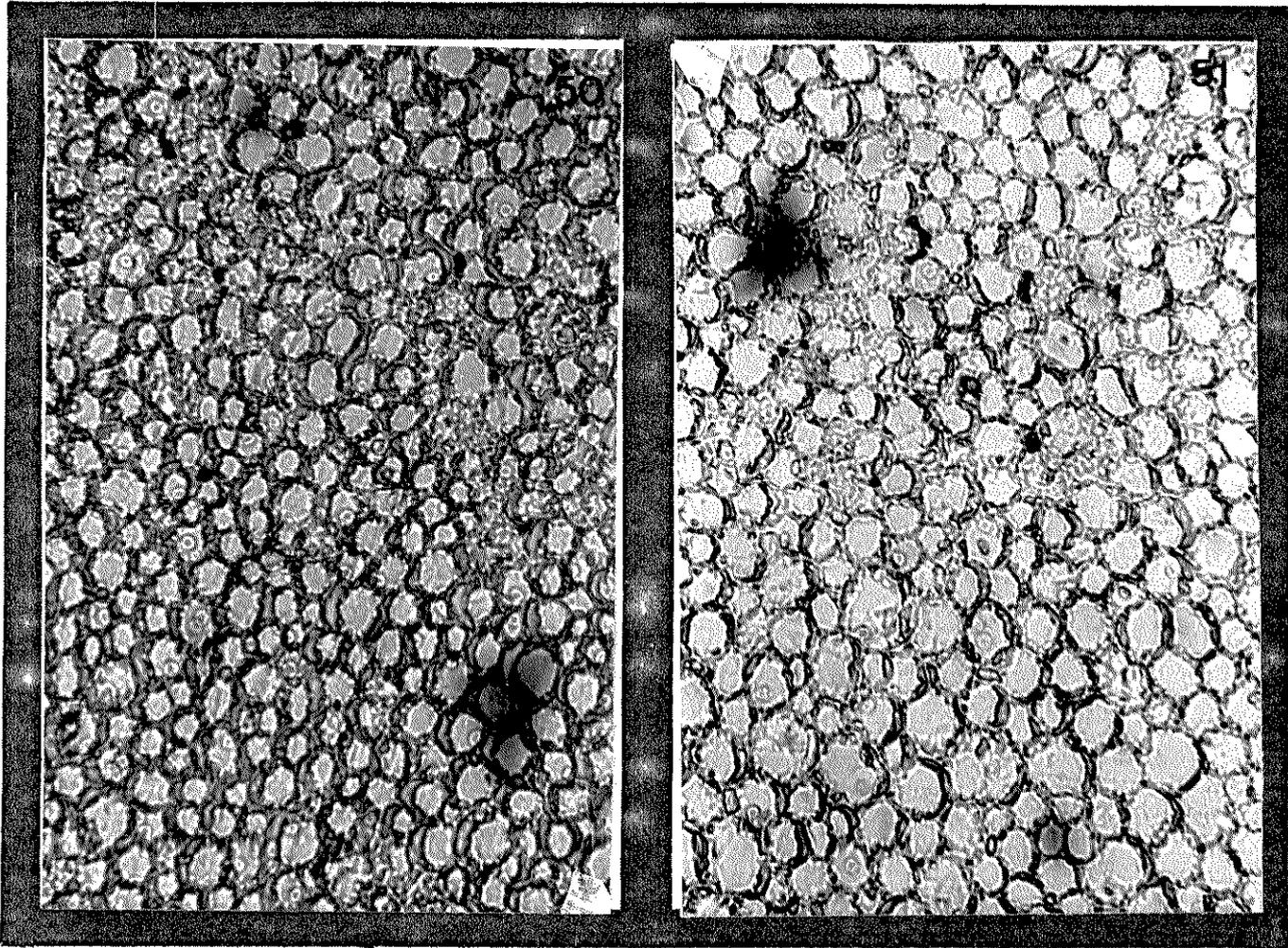


Fig.50-51: Resultados dos testes de aglutinação "in situ".
Aumento: 450 X. Fig.50: Células cotiledonares no tempo zero;
Fig. 51: células cotiledonares após 144 h de embebição para a germinação. Pode ser notada uma discreta atração do material com relação às hemácias, em ambos.

4. DISCUSSÃO:

4.1. Processos de fixação:

No presente trabalho, a utilização de etanol ou de vapores de paraformaldeído a seco como fixadores, foi tentada como uma forma alternativa para se evitar a expansão celular no cotilédone, tornando assim os corpos proteicos menos susceptíveis à remoção, uma vez que os mesmos, normalmente, encontram-se delimitados por membrana (LOTT & BUTTROSE, 1978; LOTT, 1980) e com a expansão celular durante a embebição ficam desprendidos do plasmalema. Além disso a utilização de soluções aquosas nas sementes "in natura", poderia levar a resultados irreais tendo como consequência conclusões errôneas no sentido de se estar lançando mão de artifícios não condizentes com a condição da semente madura, isto é, com um baixo teor de umidade (CHRISTENSEN, 1978) e, desencadeando o processo de germinação antes do material estar totalmente fixado. Devido a isso, foi utilizado o etanol que é um fixador de rápida penetração, porém, "com poder de fixação medíocre" (LISON, 1953). A mediocridade do fixador prevaleceu em termos de preservação e o material obtido após o tratamento com soluções alcoólicas de diversos corantes como o fast-green, o xylidine Ponceau, o Sudan black e o azul de Toluidina ou de metileno, mostrou um resultado final insatisfatório, com perda do material proteico e rompimentos das paredes celulares muito freqüentes. As poucas células aparentemente intactas, revelaram um padrão morfológico e

quantitativo idêntico ao material fixado com a solução de paraformaldeído tamponada.

O uso de vapores de paraformaldeído a seco, como alternativa para o processo de fixação foi sugerido por Vidal (comunicação pessoal), uma vez que o paraformaldeído, polímero do formaldeído ($(\text{HCHO})_n$), se mostra mais eficiente do que este último na formação de pontes de metileno entre as cadeias de proteínas (LISON, 1953; KIERNAN, 1981) e, a seco, sem o aparente inconveniente da rápida expansão das paredes dos cotilédones. Mesmo considerando esses aspectos iniciais extremamente vantajosos, e ainda utilizando-se fragmentos pequenos do material com 1-2 mm de espessura e com um tempo de fixação longo, com duração de quatro dias, os resultados obtidos para o material submetido a esse processo de fixação e posteriormente tratados com soluções alcoólicas de corantes também apresentou inúmeras quebras celulares e remoção de material do interior celular. Além disso, quando tentada uma coloração normal, com a utilização dos corantes em soluções aquosas, houve uma rápida expansão dos cortes, fazendo com que estes praticamente dobrassem sua área na lâmina, resultando assim na sobreposição das células cotiledonares ou na eliminação do material, por perder sua aderência ao vidro, comprometendo totalmente os resultados obtidos.

Devido aos fatores expostos, foi utilizada a fixação com solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 5%, tamponada a pH 7,4 com tampão Fosfato (KIERNAN, 1981). Justamente pelo fato de serem o paraformaldeído e o glutaraldeído bastante indicados para a fixação de proteínas, for

mando uma verdadeira "malha entrecruzada" de estruturas estáveis, esse fixador não foi utilizado para os casos em que se procedeu os tratamentos enzimáticos que ficariam comprometidos com uma menor eficiência para um material nessas condições. Assim, a fixação com etanol X ácido acético 3 : 1 v/v se mostrou ideal para as diversas extrações utilizadas, uma vez que o ácido acético "per se" promove uma certa remoção do material proteico de forma geral (DEITCH, 1966; MELLO, 1976; MELLO & VIDAL, 1978).

4.2. Aspectos gerais:

O uso da hematoxilina-eosina para uma visualização geral das sementes se deveu ao fato de serem estes corantes usados para esse fim há mais de um século, com a eosina (corante ácido), se ligando aos radicais positivos presentes e a hematoxilina, unida apropriadamente a mordantes, funcionando como um corante básico e evidenciando geralmente o conteúdo nuclear e radicais negativos em geral, presentes, por exemplo, nas paredes celulares (LISON, 1953; POLICARD et alii, 1957). Assim, a utilização desse método foi de extrema valia para a visualização morfológica geral, permitindo a detecção de modificações na forma e arranjo dos corpos proteicos diferenciada em regiões distantes de vasos (estrutura globular) e regiões adjacentes a vasos (estrutura mais difusa), bem como a presença de material globular no sistema vascular, resultados estes posteriormente confirmados pela utilização dos métodos citoquímicos e que estão de acordo com resultados obtidos por TOMBS (1967) para cotilédones de soja.

A coloração dos corpos proteicos pela hematoxilina sugere a existência de radicais negativos nesses corpos, pela presença de amino ácidos e/ou porções de sacarídeos ácidos. Essa aparente basofilia do material proteico é salientada nas regiões mais externas de seus glóbulos formadores, que envolvem a matriz proteica como uma membrana. Tal fato é confirmado quando se utiliza o AT a pH 4,0 e está de acordo com outros resultados obtidos para corpos proteicos de leguminosas (TOMBS, 1967; LOTT & BUTTROSE, 1978; PERNOLLET, 1978; CRAIG et alii, 1979; LOTT, 1980; CHRISPEELS, 1980; PERNOLLET, 1982; VIDAL & PIMENTEL, 1986).

A presença de uma pequena região mais intensamente corada nos corpos proteicos em alguns cortes corados pela HE pode sem dúvida ser algum artefato de técnica. Entretanto, a presença de cristais globóides no interior destes corpos em G. max já foi anteriormente descrita (LOTT & BUTTROSE, 1978), apesar de pouco frequente. Um plano de corte tangencial às membranas formadoras dos corpos proteicos, também deve ser levado em consideração como possível causador do aparecimento dessas regiões.

O Sudan black se liga a um determinado substrato por hidrofobicidade. Devido a isso, é largamente utilizado para a detecção de lipídios em cortes a fresco (MELLO & VIDAL, 1980). O processo de inclusão levado a efeito para a obtenção dos cortes em micrótomo, devido à utilização de soluções alcoólicas, remove praticamente a totalidade do conteúdo de lipídios das células. Ainda assim, a utilização desse método revelou uma deposição diferenciada do corante sobre o mate-

rial, com um maior acúmulo do mesmo nas bordas dos corpos proteicos e na proteína situada em células adjacentes vasos. O primeiro caso, confirma os resultados obtidos em HE quanto à presença de uma membrana nesses corpos, com um acúmulo de fosfolipídios no local (mais resistentes à solubilização em soluções alcoólicas) e/ou de porções proteicas mais hidrofóbicas do que no interior dos glóbulos. O segundo caso de maior deposição, sugere a possibilidade de haverem modificações conformacionais no conteúdo proteico das células de reserva que resultem na exposição de um maior número de regiões hidrofóbicas e como consequência, um maior acúmulo do corante nessas regiões (Fig. 7).

Paradoxalmente, foi constatada a presença de um maior número de radicais negativos ao nível do envoltório dos corpos proteicos (HE e AT) e um maior número de regiões hidrofóbicas na mesma região (SB). Entretanto, como pode ser notado (Fig. 2 e 7), o Sudan black se deposita em maior quantidade nas bordas externas do conjunto total dos corpos proteicos, não diferenciando os glóbulos como a hematoxilina. Tal fato pode significar que já existam interações hidrofóbicas entre os glóbulos diversos, restando apenas as regiões que limitam o conteúdo proteico total, com sítios disponíveis para a interação com esse corante. Além disso, uma maior repulsão entre os componentes do envoltório devido a um maior acúmulo de cargas de mesmo sinal, poderia alterar sua conformação, expondo um maior número de regiões hidrofóbicas. Este mesmo raciocínio pode ser utilizado para o material existente nas células adjacentes a vasos, mais corado pelo Sudan black.

A utilização de métodos de impregnação pela prata, teve a finalidade de determinar topoquimicamente radicais vic-glicóis presentes no cotilédone e radícula uma vez que a precipitação dos íons Ag^+ nos processos de impregnação se dá ao nível de resíduos de açúcares (GALLYAS, 1970; VELICAN & VELICAN, 1972). Utilizações desse método com a mesma finalidade, têm sido feitas com sucesso para tecidos animais (MELLO & VIDAL, 1972; MELLO et alii, 1974; VIDAL et alii, 1975). Os resultados obtidos confirmaram aqueles encontrados com HE e AT, no sentido de demonstrarem a presença desses radicais a nível do envoltório dos corpos proteicos e das paredes celulares em geral, possivelmente devido à presença de glicoproteínas e pelo menos ao nível da parede, sem dúvida, à presença de polissacarídeos, inclusive não celulósicos, como xiloglicanas, glicuronoarabinoxilanas, homogalacturonanas e ramnogalacturonanas I e II, polissacarídeos esses, comumente presentes em paredes celulares de dicotiledôneas (TAIZ, 1984).

Outro fator salientado com a utilização deste método foi a diferença na conservação dos corpos proteicos fixados em paraformaldeído tamponado (Fig. 8) ou em etanol X ácido acético (Fig. 9). Apesar de serem materiais originários de sementes em diferentes estágios do processo de germinação (tempo zero e 72 horas de embebição respectivamente), são exemplos bastante elucidativos das diferenças notadas devido aos diferentes processos de fixação utilizados no presente trabalho.

4.3. ASPECTOS QUANTITATIVOS:

4.3.1. Material proteico:

Xylidine Ponceau é um corante ácido cujas moléculas possuem o grupamento $-SO_3^-$ livre, sendo portanto utilizado para a detecção de proteínas totais, ligando-se aos radicais amino das mesmas, que se encontram protonados no pH utilizado para a coloração (VIDAL, 1970b; 1977; PIMENTEL et alii, 1981). O padrão morfológico obtido com XP foi semelhante ao dos demais métodos, com os corpos proteicos apresentando um padrão globular e com material proteico no interior do sistema vascular.

O aspecto morfológico do material germinado denota a transferência do material de reserva, do cotilédone para o embrião, com um desarranjo dos corpos proteicos nas células.

No parênquima da radícula nos tempos 48 e 72 h, a presença de inúmeros grânulos fortemente corados pelo XP, assim como pela HE, sugere a transferência desse material do cotilédone, uma vez que o mesmo não foi detectado em embriões no tempo zero e ainda que esses grânulos de natureza proteica são metabolizados após esse tempo (72 h) pois não é mais detectada sua presença nas células parenquimáticas de radículas com 144 horas de embebição.

As extrações proteicas realizadas, com posterior coloração com XP evidenciaram a natureza do material salientado pelo corante. Sem dúvida, a remoção realizada por enzimas proteolíticas mostrou ser adequada a utilização do XP para a detecção de proteínas. Outro fator salientado nas

extrações, foi a propriedade de ser utilizado um fixador adequado para as mesmas, uma vez que a formação de pontes de metileno com o uso de paraformaldeído dificultariam, ou mesmo impediriam uma atuação mais efetiva das enzimas nos experimentos "in situ". O ácido acético mostrou seu poder de solubilização de proteínas já descrito anteriormente (DEITCH, 1966) pois o material pré-tratado com essa substância foi, em parte, removido.

Apesar da presença de substâncias anti-tripsina no material proteico, pelo menos "in situ" essas moléculas encontravam-se inativadas por algum fator, ou foram removidas durante o processo, uma vez que a remoção mais acentuada do material proteico ocorreu quando utilizada a tripsina. A associação dos polipeptídeos ao nível de membrana dos corpos proteicos ou ao nível da parede celular, com outros compostos pode ter sido a causa da resistência dos mesmos à extração enzimática.

No caso da extração pela pepsina, o material proteico das células adjacentes a vasos e no interior destes, revelou existirem alterações estruturais, agregacionais, ou em sua composição, pois a enzima foi menos eficiente na extração de proteínas localizadas nessas regiões.

Os valores para o conteúdo proteico nas células distantes do sistema vascular (CDV) vai aumentando até o 3º dia de embebição, decaindo a seguir, confirmando assim as fases aceitas para a germinação, com a síntese e/ou ativação de material proteico (principalmente enzimas) na fase I da respiração no processo de germinação, mantendo entretanto os

valores na quantidade de proteínas nas células adjacentes ao sistema vascular (CAV).

Na verdade, as quantificações "in situ" dos corpos proteicos, são instantâneos de momentos fisiológicos do processo contínuo da germinação. Ainda assim, com as peças do mosaico obtido (para auxílio vide Tabela 3), pode ser traçado um perfil de mobilização para as proteínas de reserva, amparados nos resultados obtidos e nas informações sobre mobilização existentes (BEWLEY & BLACK, 1978; LOTT, 1980; PERNOLLET, 1985), a saber: **inicialmente**, um alto teor proteico se encontra estocado nas células distantes do sistema vascular (CDVA). Nas células adjacentes a vasos (CAVA), o teor proteico é semelhante ao das células do sistema vascular (CSVA), que por sua vez é semelhante ao conteúdo existente no embrião (CVRE e CPRE), como se essas células, tivessem durante a maturação da semente, atingido um grau máximo de estocagem de proteínas. Com o início do processo da germinação, a ativação e hidratação do material enzimático (Fase I da respiração) faz com que, gradativamente o conteúdo proteico seja aparentemente aumentado nas CDV (24, 48 e 72 h de embebição, Tabela 1), quer seja pela síntese proteica e/ou pela ativação ou modificações em sua estrutura, expondo um maior número de radicais com afinidade pelo corante. O conteúdo de proteínas nas células do sistema vascular se mantém (CSVB72), mas nas células do parênquima da radícula (CPRB72), devido às constantes divisões sofridas por esse órgão, o conteúdo proteico/célula gradativamente vai diminuindo, tornando-se assim, diferente do valor inicial, mas

se mantendo a seguir (CPRB144). O Transporte no sentido CDV → CAV → CSV → CVR → CPR, se estabiliza (CAVB72 = CAVB144), mas o conteúdo das células distantes de vasos (CDVB144) começa a decair, demonstrando ser esse o ponto de manutenção do conteúdo proteico em CAV. Com o passar do tempo, o fato mencionado por YOMO & TAYLOR (1973), que apontam as células adjacentes aos vasos, estranhamente, como a última região a perder suas proteínas de reserva, representa, uma constância aparente em seu conteúdo proteico: enquanto perde proteína para CSV, as recebe de CDV, num equilíbrio dinâmico.

No presente trabalho a grande diminuição no conteúdo proteico das células do sistema vascular após 144 horas de embebição (CSVB144), pode estar relacionada com o instante em que houve mobilização do conteúdo proteico dessa região para o embrião, num tempo tendendo a zero e, ainda por isso, no momento da fixação do material sem ter transferência de CAV para esse local.

Um acompanhamento do processo para tempos superiores ao estudado, poderá elucidar, de forma mais contundente o trajeto apontado acima.

O método descrito por LISON (1953) para a determinação do ponto isoelétrico aparente se baseia na interação diferenciada de determinado substrato com corantes ácidos e básicos, em função do pH. Assim, o material a ser corado apresentará uma carga total positiva em valores de pH inferiores ao seu pI, ligando-se eletrostaticamente a corantes ácidos como o xileno cianol. A medida que esse pH se eleva, diminui a afinidade a esses corantes uma vez que, gradativa-

mente, há uma retirada de prótons do meio. Simultaneamente, a utilização de um corante básico como o azul de metileno, revelará um comportamento oposto, de tal maneira que, se confrontadas as curvas das absorbâncias dos dois corantes em diversos pHs, teremos o equivalente a curvas de titulação de um ácido com uma base (uso de corante básico) ou curvas de titulação de uma base com um ácido (uso de corante ácido). Uma grande vantagem desse método sobre os métodos bioquímicos usuais para a determinação do ponto isoeletrico se refere ao fato de não serem necessários processos de extração ou purificação, que fatalmente incluiriam proteínas de vários locais da semente enquanto que as detecções "in situ" possibilitam a escolha da região a ser analisada, mesmo quando bastante próximas.

Os resultados obtidos para o ponto isoeletrico aparente dos corpos proteicos "in situ", demonstraram a natureza ácida das proteínas de reserva ($pI \sim 4,2$) e foi coerente com sua riqueza em amino ácidos ácidos (ácido glutâmico e aspártico) conforme anteriormente descrito (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982).

Os perfis das curvas obtidas foi diferente para células distantes de vasos (CDV), adjacentes (CAV) e células da radícula (CVR e CPR) demonstrando haverem diferenças conformacionais e/ou na estrutura dessas proteínas durante o processo da germinação. Nas CDV as curvas se assemelham àquelas obtidas na titulação de ácido forte monoprotico com base forte, pois o ponto de inflexão das curvas é acentuado e único. Em CAV e em CR, há um atenuamento crescente na inflexão das curvas e mais de um ponto de inflexão, o que su-

gere uma diminuição da força ácida e um comportamento semelhante a ácidos polipróticos (OHLWEILER, 1974).

Além dos perfis das curvas obtidas, houve uma diminuição no ponto isoelétrico quando comparado o material antes de germinar e com 72 horas de embebição para a germinação, com uma diminuição acentuada para as células do parênquima da radícula e portanto, uma liberação de radicais acídicos durante a germinação.

Os valores de área e volume dos corpos proteicos foram maiores que os obtidos por CRAIG (1979) para Pisum sativum (~1 μm de diâmetro em sementes maduras), ficando ao redor de diâmetros com 4 μm /corpo proteico, o que está de acordo com os valores encontrados anteriormente em G. max.

Um reforço para a presença de um envoltório nos corpos proteicos foi dado pelas áreas calculadas para azul de toluidina (13,4 μm^2 ou seja, diâmetro = 4,1 μm) que foram ligeiramente maiores do que aqueles calculados com xylidine Ponceau (10,9 μm^2 ou seja, diâmetro = 3,7 μm). É de se esperar, pela natureza desses corantes, que XP se ligue fracamente às regiões de membrana e parede, justificando assim um resultado um pouco inferior ao obtido com AT. Assim, pelos dados obtidos, poderíamos supor a princípio, que a camada que envolve os corpos proteicos apresentou uma espessura entre 0,2 e 0,3 μm .

Os resultados das dosagens de proteínas, revelaram, como esperado (BEWLEY & BLACK, 1978), um decréscimo do conteúdo proteico ao nível do cotilédone e um aumento nesse conteúdo no embrião. Entretanto, se considerarmos as quantidades de proteína/célula e não da radícula como um todo, es-

ses valores decrescem do tempo zero para 144 horas de embebição, confirmando assim os resultados obtidos nas medições das absorbâncias "in situ" do material proteico corado com XP.

Nas eletroforeses, as semelhanças observadas entre cotilédones e embriões, denotam a existência de material proteico similar nesses órgãos. Durante a germinação, cotilédones após 6 dias de embebição (Fig.45, CT6) deixam de apresentar as bandas nº 9 e 10, possivelmente devido a degradação de proteínas durante o processo de germinação, sem entretanto rejeitar a hipótese, menos provável, das mesmas permanecerem agregadas a outras proteínas.

Como a quantidade de proteínas utilizadas para as frações de cotilédones foi a mesma, o fato da banda nº 10 não aparecer após 6 dias, ou aparecer com pequena intensidade no tempo zero, pode ser devido à maior quantidade dessa fração em relação ao total da amostra para a fração rica em lectinas.

As diferenças notadas nos dois tempos da fração rica em lectinas podem indicar mudanças de agregação dessa fração durante o processo da germinação.

Os testes de aglutinação levados a efeito, demonstraram o poder aglutinante existente nas frações proteicas obtidas, devido à presença de lectinas nos mesmos. Nas observações "in situ" os resultados foram significativamente menores, sugerindo um comprometimento dos sítios de ligação das lectinas, com os demais materiais presentes no cotilédone.

4.3.2. Radicais aniônicos totais:

Além das evidências apontadas no material corado pela Hematoxilina, a utilização do azul de toluidina a pH 4,0 foi de grande valia para a detecção de grupos aniônicos totais.

O azul de toluidina é um corante básico portador de radicais $-NH_3^+$ livres em sua molécula, ligando-se portanto a grupos aniônicos existentes no substrato conforme o pH utilizado, destacando-se grupos fosfato ($-PO_4^{--}$), carboxila ($-COO^-$) e sulfato ($-SO_3^-$) e que apresenta metacromasia como a maioria dos corantes básicos (VIDAL, 1977; KIERNAN, 1981).

O aspecto globular dos corpos proteicos foi salientado pelo corante, que se ligou eletrostaticamente ao material aniônico existente ao nível do envoltório desses corpos.

Nas paredes celulares, a presença de radicais negativos, possibilitou a ligação do corante e o aumento encontrado na metacromasia, indica uma gradativa liberação de grupamentos basófilos e ordenados durante a germinação, possibilitando um maior empilhamento das moléculas do corante e conseqüente diminuição no seu pico de absorção quando ligado ao material "in situ". Assim, pode-se concluir, pelos resultados obtidos (para auxílio vide Tabela 4), que devido ao aumento do I.M. em função do tempo, a liberação de sítios negativos pelo material de parede pode estar associado à transferência de substâncias de célula a célula durante o processo da germinação.

A partir do tempo zero, as paredes de CDVA e CRE gradativamente aumentam seu I.M., atingindo, após 72 horas, valores semelhantes às paredes das células adjacentes a vasos (CAV), que até então, se mantinham constantes (Tabela 6). Com o avanço do processo da germinação, começa a haver um distanciamento dos valores obtidos para as células distantes de vasos dos demais, sugerindo que um aumento no I.M. pode estar associado a um desarranjo na estrutura da parede, fato esse, posteriormente salientado nas curvas de birrefringência de forma. Além disso, uma maior polarizabilidade ao nível de parede poderia auxiliar no transporte do material de reserva das CDV até as CR.

Azul de alcian, corante básico de estrutura não totalmente conhecida, mas possuidor de quatro grupos tetrametilisotiurônico (SCOTT, 1972) tem sido utilizado para detecções de ânions diferenciadamente em pH 2,5 (ânions carboxila e sulfato) ou a pH 1,0 (sulfatos) presentes em polissacarídeos ácidos em tecidos animais (PEARSE, 1961, SCOTT, 1970; VIDAL, 1977) e no presente caso, ao nível de parede. O teor de glicosaminoglicanas ácidas totais se mantém mais ou menos constante durante a germinação, exceto para as células distantes de vasos (CDVA) e para as células da radícula após 72 horas (CRB72), reforçando a idéia de haverem alterações drásticas nas paredes nesses locais e tempos, associados ao processo da germinação com uma tendência à estabilização, a medida que a radícula se desenvolve (CRB144). O conteúdo de GAGA sulfatadas é mais constante, havendo diferenças apenas ao nível da radícula, durante a germinação (Tabela 9).

4.4. CURVAS DE BIRREFRINGÊNCIA DE FORMA:

Um meio de detectar variações na organização molecular e estados agregacionais em complexos de biopolímeros "in situ", tem sido a análise das curvas de birrefringência de forma (CBF) desses complexos (MELLO et alii, 1975; VIDAL, 1964; 1980; VIDAL et alii, 1975). Os conceitos básicos e a metodologia usada são os descritos por FREY-WISSLING e SCHIMIDT & KELL (VIDAL, 1982) e baseiam-se na equação de WIENNER. Tal equação foi deduzida a partir de sistemas coloidais em condições especiais e portanto, sua adequação ao estudo de materiais biológicos "in situ" tem sido questionada (VIDAL, 1980b). Ainda assim, o uso de CBF tem servido para ampliar os conhecimentos a nível de organização molecular, contendo inúmeras informações a esse respeito e ao estado de agregação das diversas substâncias formadoras de biopolímeros complexos como os feixes de colágeno, por exemplo.

Nas CBF, temos dois fatores que merecem uma atenção especial: primeiramente, a birrefringência intrínseca, que se refere às interações entre um dado biopolímero que apresente certa ordem molecular, com o feixe de luz polarizada que incide sobre o mesmo. Essa medida, se refere à organização intrínseca do material, como apropriadamente é substantivada e independe do meio de embebição em que o material se encontra. O segundo fator, denominado birrefringência textural, se refere aos efeitos da interação do material com um dado meio e o feixe de luz polarizada, refletindo, via de regra, em acréscimo à birrefringência intrínseca causado por um dado meio.

Os avanços nos estudos das CBF de tecidos animais não tiveram o correspondente acompanhamento em tecidos vegetais, nada existindo de similar ao que se tem conseguido com os primeiros.

Os estudos da composição química das paredes celulares primárias de vegetais têm revelado a presença de aproximadamente 30% de celulose, 60% de hemiceluloses e substâncias pecticas e 10% de proteínas e lipídios em termos de peso seco, e aproximadamente 12% de celulose, 60% de água e 24% de hemiceluloses e substâncias pecticas em termos de peso fresco. O conteúdo relativo de celulose na composição das paredes secundárias chega a atingir mais de duas vezes sua participação nas paredes primárias (CHAMBAT et alii, 1984; FREY-WISLING & MUHLETHALER, 1965; SELVENDRAN, 1975; SELVENDRAN et alii, 1975).

No presente trabalho, a forte birrefringência de cor branco de 1ª ordem apresentada pelas paredes celulares, confirma os resultados existentes a respeito, denotando um arranjo molecular ordenado das substâncias formadoras da mesma.

O material celulósico se distribui paralelamente ao sentido longitudinal das paredes, uma vez que é notada birrefringência máxima quando o material se encontra a 45° ou a 135° em relação ao azimute da luz polarizada e tem um ponto de extinção a 0° ou a 90° . As hemiceluloses e substâncias pecticas, pelo menos em parte, se encontram dispostas na parede na mesma direção das fibras celulósicas, pois há um aumento no porcentual da birrefringência intrínseca de paredes em relação à celulose pura.

Os biopolímeros formadores da parede, apresentam birrefringência positiva, ou seja, com o uso de compensador de quartzo, na posição em que o material se encontra com seu eixo paralelo à direção gama do compensador, há somatória dos retardos ópticos e a cor visualizada é o azul de 2ª ordem. Quando o eixo do material se encontra perpendicular, há subtração dos retardos e a cor visualizada é o amarelo de 1ª ordem (BARTELS, 1966; BENETT, 1967; CLARKE & GRAINGER, 1971).

A curva de birrefringência de forma obtida para a celulose pura apresentou-se mais regular que a dos demais materiais analisados, denotando um papel decisivo das hemiceluloses e substâncias pécticas no arranjo macromolecular das paredes, modificando em alguns aspectos o perfil da CBF. Entretanto, apesar de não se notar na celulose um aumento no retardo entre os índices de refração 1,357 e 1,392, há nesse intervalo uma menor diminuição em relação aos demais (Fig. 41) sugerindo que esse comportamento da celulose pura seja apenas acentuado quando de sua complexação com os demais componentes da parede.

A partir do menor retardo obtido para a celulose pura e sabendo-se a espessura do corte, pode ser calculada sua birrefringência intrínseca cujo valor encontrado foi de $B = 0,00467$, próximo portanto ao das fibras colagênicas (VIDAL, 1964).

Os diversos meios de embebição têm maior influência sobre o estado de agregação e organização molecular da celulose pura uma vez que para iguais variações nos índices de refração, houve maior alteração nos retardos ópticos desse material. A organização molecular da celulose nas paredes é

bastante influenciada pelas suas demais substâncias constituintes, fazendo com que os meios de embebição aquosos (exceção feita à água pura) alterem menos os valores dos retardos ópticos, comparativamente à celulose pura.

A comparação dos perfis das curvas obtidas para o material antes da germinação (cotilédones e radículas do embrião) apresentou grande semelhança, exceto quando o meio de embebição foi a água. Isto pode ser explicado pelo fato das células cotiledonares terem grande afinidade pela mesma, devido ao seu papel fisiológico no processo da germinação. As paredes das células cotiledonares no tempo zero apresentam uma birrefringência de forma maior, demonstrando um grau superior de compactação e orientação das macromoléculas que as compõem, em relação às paredes celulares dos demais locais e tempos analisados.

A birrefringência intrínseca correspondeu a 68,9% da birrefringência de forma máxima (maiores retardos ópticos) no caso das células cotiledonares em CDVA e 56,8% no caso das células da radícula do embrião (CRE), confirmando um grau superior de cristalinidade das células cotiledonares. No material germinado, esses valores decrescem bastante, atingindo 39,3% em CDVB144 e 35,7% em CRB144, valores bastante próximos ao obtido para a celulose pura (34,9%). Tal fato, que representa um grau de orientação inferior em relação às células antes da germinação, pode estar relacionado à ação de inúmeras celulasas e outras enzimas hidrolíticas responsáveis por alterações nas paredes dos cotilédones para a mobilização do material de reserva e, no caso da radícula, responsáveis pela digestão e posterior síntese

da parede para o crescimento da radícula por alongação ou por divisão celular.

Um fato que nos chamou a atenção, foi a maior irregularidade das CBF (Fig.43) para o material após 72 horas de embebição para a germinação, o que sugere um estado de ativação para as paredes, posteriormente estabilizado em níveis organizacionais menores (144 horas de embebição). Outro fator relevante, foi a comparação das birrefringências intrínsecas dos diversos locais e tempos analisados (Fig.44), de tal forma que nas células adjacentes a vasos (CAV), os valores foram iguais nos três tempos medidos, o que demonstra estarem as paredes desses locais, num estado organizacional semelhante. Nas células distantes de vasos (CDV), pode ser encontrada uma diminuição da birrefringência intrínseca em função do tempo, ou seja: durante o processo da germinação houve uma diminuição da ordem molecular das paredes de células cotiledonares distantes de vasos.

O nujol é um óleo com índice de refração 1,479 e portanto próximo ao do glicerol puro (1,472). Entretanto, por se tratar de molécula hidrofóbica, normalmente provoca uma retração do material birrefringente quando o mesmo é hidrofílico, aumentando de forma inequívoca a birrefringência do material. Esse fenômeno é notado em fibras colagênicas (VIDAL, 1977, 1979) e também se manifestou ao nível das paredes celulares. Essa retração causada pelo óleo foi mais intensa nas células distantes de vasos no tempo zero, que estão num estado conformacional que apresenta grande afinidade pela água.

4.4. Considerações finais:

Foi utilizada a análise de variância com dois fatores para as comparações efetuadas em material corado com xylidine Ponceau e azul de toluidina, pois os dados obtidos para cortes submetidos a esses métodos, apresentavam a princípio, os fatores posição e tempo como variáveis indistintamente importantes para a análise do processo de germinação "in situ". Com azul de alcian, a inclusão do pH como uma terceira variável importante, nos levou à realização de análise multifatorial da variância, para a determinação, através do teste de Tukey, dos valores cuja diferença se apresentasse com nível de 1% de probabilidade, normalmente aceito nos trabalhos biológicos em geral. As transformações utilizadas para cada método, distintas entre si, foram determinadas aleatoriamente a partir do pressuposto básico para a análise de variância, ou seja: a independência entre o crescimento das médias encontradas e seus desvios padrão ou variâncias correspondentes (BOX, 1976) não apresentando portanto, uma fórmula pré-determinada para seu cálculo, exceto o fato de se determinar valores relativamente constantes da variância para quaisquer valores obtidos a partir da população amostrada. A relativa estabilização nesses valores, pode não ter sido ideal mas apresentou-se satisfatória, como demonstram as Fig. 16, 21 e 24 do presente trabalho. Ainda assim, foram mantidos os dados originais obtidos para esses métodos e esses dados sofreram o mesmo tratamento estatístico dos valores transformados, demonstrando em sua grande maioria, uma manutenção das semelhanças e dife -

renças obtidas. Não temos a pretensão de questionar o procedimento apontado por BOX (1976), tanto que, ao nos referirmos às quantificações realizadas, sempre o fizemos aos valores após a transformação utilizada.

A aplicação de metodologia normalmente usada para tecidos animais, se mostrou adequada, a partir do fato que tais métodos não são específicos para determinado substrato biológico, mas atuam no mesmo através de ligações químicas e portanto, são dependentes da estrutura molecular apresentada pelo material e não ao Reino a que o mesmo pertence.

Finalmente, longe de tentarmos apresentar um "produto acabado" para o processo da germinação, o presente trabalho visou, a partir da utilização de diversas técnicas, contribuir para um aumento no volume de informações existentes a respeito desse processo em leguminosas, usando para isso sementes de G. max.

5. CONCLUSÕES:

1. Embora sem significado citoquímico, a coloração de sementes de Glycine max pela hematoxilina-eosina, permite uma visualização geral de sua morfologia, de extrema valia.
2. O material proteico de G. max é bem demonstrado pelo xy-
lidine Ponceau. Está presente nos corpos proteicos, nos
vasos, radícula e, fica claro mesmo a nível morfológico ,
que há um processo de mobilização desse material do coti-
lédone para o embrião durante a germinação.
3. As digestões enzimáticas permitem a afirmação de que o ma-
terial corado pelo XP, é proteína.
4. As diversas proteínas dos corpos proteicos se encontram
altamente agregadas e nesse estado, as lectinas perdem
muito seu poder de atividade aglutinante.
5. Os dados absorciométricos obtidos a partir da coloração
pelo XP permitiram traçar um perfil de mobilização do ma-
terial proteico das células distantes de vasos até o inte-
rior do sistema vascular do cotilédone e deste para a ra-
dícula do embrião, nos tempos de germinação analisados no
presente trabalho.
6. A presença de material proteico corado no interior dos
vasos sugere a mobilização de pelo menos algum material
proteico na forma de polipeptídeos, uma vez que os métodos
utilizados não evidenciam amino ácidos, que se solubili-
zam durante o processamento de inclusão do mesmo.

7. No envoltório dos corpos proteicos e nas paredes celulares há um grande número de radicais aniônicos. Esse número, nas paredes, aumenta durante o processo da germinação, do tempo zero até o 6º dia e tal fato é evidenciado pelas determinações do índice metacromático do material.
8. As paredes celulares, de forma geral, apresentam uma diminuição em seu estado de cristalinidade e de agregação durante o processo de germinação.
9. Nas células adjacentes ao sistema vascular do cotilédone, o estado de cristalinidade se mantém constante durante a germinação e apresenta valores inferiores ao das demais regiões.
10. As diminuições na ordem molecular apontadas nos itens 8 e 9, reforçam a idéia de um processo de mobilização de proteínas na germinação, pois as alterações sofridas modificam a fluidez ao nível dessas regiões, facilitando a passagem do material em trânsito do cotilédone para o embrião.

6. RESUMO:

Com o objetivo de estudar as diversas alterações no conteúdo proteico em sementes de Glycine max durante o processo de germinação, foram realizadas no presente trabalho, uma série de técnicas gerais e citoquímicas para a detecção "in situ" dos corpos proteicos dessa leguminosa, constatando-se a presença dos mesmos nas células cotiledonares a partir da coloração pela hematoxilina-eosina, impregnação pela prata e coloração com xyloidine Ponceau (XP). A quantificação do conteúdo proteico foi realizada através de medições absorciométricas do material corado pelo XP em diversos tempos e posições, indicando uma mobilização do material de reserva das células distantes do sistema vascular, para o interior dos vasos e destes, para a radícula do embrião. Os corpos proteicos apresentaram-se delimitados por membrana, evidenciada pelo azul de toluidina (AT), devido a presença de material basófilo nesse local. As paredes celulares dos cotilédones e radículas foram coradas pelo AT, apresentando-se metacromáticas. Durante o processo de germinação, houve um aumento no índice metacromático do material corado, indicando uma liberação de radicais negativos. A nível de organização molecular, foi constatada uma diminuição no estado de cristalinidade e de agregação das paredes durante a germinação e uma variação no conteúdo de glicosaminoglicanas nos diversos locais analisados. As lectinas presentes na semente de soja, encontram-se agregadas com o material proteico, de forma a perderem seu poder aglutinante no material "in situ".

7 ABSTRACT:

Seeking to study the various changes in the protein content in seeds of Glycine max during germination, a series of general and cytochemical techniques was performed in order to study the protein bodies of this legume "in situ", verifying the presence of these bodies in the cotyledon cells by hematoxilin-eosin and xyloidine-Ponceau stains and silver impregnation. The quantification of protein was made by absorption measurements of the specimens stained with XP at various times and positions, indicating a mobilization of the reserve material of the cells far from the vascular system, to the interior of this system and then to the radicle of the embryo. The protein bodies were found to be surrounded by a membrane, evidenced by toluidine blue (TB), due to the presence of basophilic material in this area. The cell walls of the cotyledon and radicle were stained by the TB, displaying metachromasy. During germination there was an increase in the metachromatic index of the stained substrate, indicating a decrease of negative radicals. In relation to the molecular organization there was a decrease in the cristality and agregation of the cell walls during germination along with a variation in the glycosaminoglycans content in the various areas analysed. The lectins present in the soybean seed are associated with the proteic material, thus losing their agglutinating properties in the " in situ " material

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALBERSHEIM, P. & VALENT, B.S. Host-pathogen interactions. VII. Plant pathogens secrete proteins which inhibit enzymes of the host capable of attacking the pathogen. Plant Physiol., 53: 684-7, 1974.

_____ & _____. Host-pathogen interaction in plants. J.Cell Biol., 78: 627-43, 1978.

_____ ; _____ ; DARVILL, A.G.; MCNEIL, M.; HAHN, M.; ROBERTSEN, B.K.; FRANZEN, L.E.; DESJARDINS, A.E.; ROSS, L. M. & SPELLMAN, M.N. Recognition between plant cells and microbes is regulated by complex carbohydrates. Schweiger, H.G., ed. Int.Cell Biol., 749-760, 1980.

ASHCROFF, N.J. & MURRAY, D.R. The dual functions of the cotyledons of Acacia iteaphylla F.Muell (Mimosidae). Aust.J.Bot., 27: 343-52, 1979.

BARONDES, S.H. Lectins: their multiple endogenous cellular functions. Ann.Rev.Biochem., 50: 207-31, 1981.

BARTELS, P.H. Principles of polarized light. In: Wied, G. L., ed. Introduction to quantitative cytochemistry. New York, Academic, 1966. part IV, p.519-538.

- BENETT, H.S. Methods applicable to the study of both fresh and fixed materials. In: Jones, R.M., ed. McClung's handbook of microscopical techniques. New York, Hafner Publ.Co., 1967. cap.IX, p.591-677.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Berlin, Springer-Verlag, 1978. v.1, 306p.
- BILS, R.F. & HOWELL, R.W. Biochemical and cytological changes in developing soybean cotyledons. Crop.Sci., 3: 304-8, 1963.
- BOX, G.E.P. & JENKINS, G.M. Time series analysis-forecasting and control. San Francisco, Holden-day, 1976. 575p.
- CATSIMPOOLAS, N.; CAMPBELL, T. G. & MEYER, E.. W. Immunochemical study of changes in reserve proteins of germinating soybeans seeds. Plant Physiol., 43:799-805, 1968.
- CHAMBAT, G.; BARNOUD, F. & JOSELEAU, J-P. Structure of the primary cell walls of suspension - cultured Rosa glauca cells. I.Polysaccharides associated with cellulose. Plant Physiol., 74: 687-93, 1984.

CHRISPEELS, M.J.; HIGGINS, T.J.V.; CRAIG, S. & SPENCER, D.
 Role of the endoplasmic reticulum in the synthesis of
 reserve proteins and the kinetics of their transport to
 protein bodies in developing pea cotyledons. J.Cell.Biol.,
93:5-14, 1982a.

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

CHRISTENSEN, C.M. Moisture and seed decay. In: Kozlowski,
 T.T., ed. Water and plant disease. New York, Academic,
 1978. cap.7. p.199-219 (Water deficits and plant growth,
 v.5).

CLARKE, D. & GAINGER, J.F. Polarized light and optical
 measurement. Braunschweig, Pergamon, 1971. 187p.

CRAIG, S.; GOODCHILD, D.J. & HARDHAM, A.R. Structural
 aspects of protein accumulation in developing Pea
 cotyledons. I. Qualitative and quantitative changes in
 parenchyma cell vacuoles. Aust.J.Plant Physiol., 6: 81-
98, 1979.

_____ ; _____ & MILLER, C. Structural aspects of
 protein accumulation in developing Pea cotyledons. II.
 Three-dimensional reconstructions of vacuoles and protein
 bodies from serial sections. Aust.J.Plant Physiol., 7:

- _____, MILLERD, A. & GOODCHILD, D. J. Structural aspects of protein accumulation in developing Pea cotyledons. III. Immunocytochemical localization of legumin and vicilin using antibodies shown to be specific by the enzyme-linked immunosorbent (ELISA). Aust.J.Plant Physiol., 7: 339- 51, 1980.
- DAUSSANT, J.; NEUCERE, N.J. & CONKERTON, E.J. Immunochemical studies on Arachis hypogaea proteins with particular reference to the reserve proteins. II. Protein modification during germination. Plant Physiol., 11:480-9, 1969.
- DAVIES, H.M. & DELMER, D.P. Seed reserve protein glycosylation in an in vitro preparations from developing cotyledons of Phaseolus vulgaris. Planta, 146:513-20, 1979.
- _____ & _____ Two kinds of protein glycosylation in a cell-free preparation from developing cotyledons of Phaseolus vulgaris. Plant Physiol., 68: 284-91, 1981.
- DAZZO, F.B. & TRUCHETT, G. L. Interaction of lectins and their saccharide receptors in the Rhizobium - legume symbiosis. J.Membr.Biol., 73: 1-16, 1983.
- DEITCH, A.D. Cytophotometry of nucleic acids. In: Wied, G.L., ed. Introduction to quantitative cytochemistry. New York, Academic, 1966. p.327-351.

- DERBYCHIRE, E.; WRIGHT, D.J. & BOULTER, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochemistry, 16: 3-24, 1976.
- DILWORTH, M.J. Dinitrogen fixation. Ann.Rev.Plant Physiol., 25:81-114, 1974.
- EREKEN-TUMER, N.; RICHTER, J.D. & NIELSEN, N.C. Structural characterization of the glycinin precursors. J.Biol.Chem., 257: 4016-8, 1982.
- FASSEAS, C. & BOWES, B.G. Ultrastructural observations on proliferating storage cells of mature cotyledons of Phaseolus vulgaris, L. cultured in vitro. Ann. Bot. 46: 143-52, 1980.
- FINCHER, G.B. & STONE, B.A. Arabinogalactan -proteins: structure, biosynthesis, and function. Ann.Rev. Plant Physiol., 34: 47-70, 1983.
- FREY-WISSLING, A. Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. Amsterdam, Elsevier, 1948. p.194-206.
- _____ & MUHLETHALER, J. Cell Wall. In: _____. Ultrastructural plant cytology with and introduction to molecular biology. Amsterdam, Elsevier, 1965. p.275-328.
- GALLYAS, F. Silver staining of collagen and reticulin fibers cerebral capillaries by means of Physical development. J.Microsc., 91: 119-24, 1970.

- GANESH, K. & VENKATARAMAN, L.V. Chickpea seed proteins: modification during germination. Biochemistry, 11:605-9, 1978.
- GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. São Paulo, Nobel, 1982. 430p.
- HARGREAVES, J.A. & SELBY, C. Phytoalexin formation in cell suspensions of Phaseolus vulgaris in response to an extract of bean hypocotyls. Phytochemistry, 17: 1099-102, 1978.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Ann.Biochem., 48: 422-7, 1972.
- HENRY, R.J.; CANNON, C.D. & WINKELMAN, J.W. Proteins. In: Clinical chemistry principles and technics. Maryland, Harper & Row, 1974. p.411-417.
- HUTTON, D. & STUMPF, P.K. Fat metabolism in higher plants. LXII. The pathway of ricinoleic acid catabolism in the germinating castor bean (Ricinus communis, L.) and Pea (Pisum sativum, L.). Arch.Biochem.Biophys., 142: 48 -60 , 1971.
- KIERNAN, J. A. Histological & Histochemical methods: theory & practice. London, Pergamon, 1981. 344 p.

- LANGSTON-UNKEFER, P.J. & GADE, W. A seed storage protein with possible self-affinity through lectin-like binding. Plant Physiol., 74: 675-80, 1984.
- LHOTKA, J.F. & MHYRE, B.A. Periodic-acid foot stain for connective tissues. Stain Technol., 28: 129, 1953.
- LISON, L. Histochimie et cytochimie animales. 2ed. Paris, Gauthier-Villars, 1953. 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).
- _____ & BUTTROSE, M.S. Globoids in protein bodies of legume seed cotyledons. Aust.J.Plant Physiol., 5:89-111, 1978.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. The germination of seeds. 3ed. Oxford, Pergamon, 1982. 211p.
- McCLUNG, J.R. McClung's handbook of microscopical technique. New York, Hafner Publishing, 1967. p.56.
- 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. Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero e eucromatinas. Dissertação de Livre Docência. Campinas, UNICAMP, 1976. 205p.

_____ ; GODO, C. · VIDAL, B.C. & ABUJADI, J.M. Changes in macromolecular orientation on collagen fibers during the process of tendon repair in the rat. Ann.Histochim., 20: 145-52, 1975.

_____ & VIDAL, B.C. Evaluation of dichroism and anomalous dispersion of the birefringence on collagen subjected to metal impregnations. Ann.Histochim., 17: 333-40, 1972.

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

_____ & _____. Práticas de Biologia Celular. Campinas, Edgar Blucher, 1980. 71p.

_____ ; _____ & VALDRIGHI, L. Anisotropy and isoelectrical point determination on collagen bundles of the rat periodontal fibers. Histochemistry, 42: 163-74, 1974.

MIALONIER, G.; PRIVAT, J.P.; MONSIGNY, M.; KARLEN, G. & DURANO, R. Isolement, propriétés physico-chimiques et localization "in vivo" d'une phytohéماغglutine (lectine) de *Phaseolus vulgaris*, L. (var.rouge). Physiol.Vég., 11:519-37, 1973.

- MILLERD, A. Biochemistry of legume seed proteins. Ann.Rev.Plant Physiol., 26: 53-72, 1975.
- _____ ; THOMSON, J.A. & SCHROEDER, H.E. Cotyledonary storage proteins in Pisum sativum. III. Patterns of accumulation during development. Aust.J.Plant Physiol., 5: 519-34, 1978.
- MORT, A.J. & BAUER, W.D. Composition of capsular and extracellular polysaccharides of Rhizobium japonicum. Changes with culture age and correlations with binding of soybean lectin to the bacteria. Plant Physiol., 66: 158-63, 1980.
- _____ & _____. Application of two new methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharide fragments. J.Biol.Chem., 257: 1870-5, 1982.
- OHLWEILER, O. A. Volumetria de neutralização. In: Química Analítica quantitativa. v.3. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1974. p.409-458.
- OSBORNE, T.B. The vegetable proteins. London, Longman - Green, 1924. 2ed. 321p.
- PAZUR, J.H.; SHADAKSHARASWAMY, M. & MEIDELL, G.E. The metabolism of oligosaccharides in germinating soybeans, Glycine max. Arch.Biochem.Biophys., 99: 78-85, 1962.

- PEARSE, E.A.G. Histochemistry: theoretical and applied.
London, J & A Churchill, Ltd., 1961. 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 protein in seeds. Physiol.Vég., 23: 45-59, 1985.
- PIMENTEL, E.R., RECCO, S.M. & GRACCHO Jr., M. Photometric studies on xylydine Ponceau - collagen interaction. Cell.Mol.Biol., 27: 347-52, 1981.
- POLICARD, A.; BESSIS, A. & LOCQUIM, M. Traité de microscopie - Instruments et techniques. Paris, Masson et Cie., 1957. 608p.
- PRESTON, R.D. Wall organization in plant cells. Int.Rev.Cytology, 8: 33-60, 1959.
- _____. Polysaccharide conformation and cell wall function. Ann.Rev.Plant Physiol., 30: 55-78, 1979.

RANDALL, P.J.; THOMSON, J.A. & SCHROEDER, H.E. Cotyledonary storage proteins in Pisum sativum. IV. Effects of sulfur, phosphorus, potassium and magnesium deficiencies. Aust.J.Plant Physiol., 6: 11-24, 1979.

ROBERTSON, J.G. & FARNDEN, K. J. Ultrastructure and metabolism of the developing legume root nodule. In: Mifflin, B.J., ed. Amino acids and derivatives. New York, Academic, 1980. cap.2, p.65-113 (The biochemistry of plants, v.5).

SCOTT, J.E. Histochemistry of alcian blue. I. Metachromasia of alcian blue, astrablau and other cationic phtalocyanin dyes. Histochemie, 21: 277-85, 1970.

_____. Histochemistry of alcian blue. II. The structure of alcian blue 8GX. Histochemie, 30: 215-34, 1972.

SELVENDRAN, R. R. Cell wall glycoproteins and polysaccharides of parenchyma of Phaseolus cocineus. Phytochemistry, 14: 2175-80, 1975.

_____; DAVIES, A.M.C. & TIDDER, E. Cell wall glycoproteins and polysaccharides of mature runner beans. Phytochemistry, 14: 2169-74, 1975.

SHARON, N. & LIS, H. Lectins: Cell-agglutinating and sugar specific proteins. Science, 177: 949-59, 1972.

- SIDDARAME, G. & PILLAY, D.T.N. Purification and characterization of elongation factor-2 from germinating of soybean cotyledons. Plant Sci.Lett., 20: 19-34, 1980.
- SIMPSON, D.L.; THORNE, D.R. & LOH, H.H. Lectins: endogenous carbohydrate - binding proteins from vertebrate tissues: functional role in recognition processes. Life Sci., 22: 727-48, 1978.
- SMITH, D.L. A histological and histochemical study of the cotyledons of Phaseolus vulgaris, L. during germination. Protoplasma, 79: 41-57, 1974.
- SPRAGG, S.P. & YEMM, E. W. Respiratory mechanisms and the changes of glutathione and ascorbic acid in germinating peas. J.Exp.Bot., 10: 409-25, 1959.
- STACEY, G.; PAAU, A.S. & BRILL, W.J. Host recognition in the Rhizobium - soybean symbiosis. Plant Physiol., 66: 609-14, 1980.
- TAIZ, L. Plant cell expansion: regulation of cell wall . Mechanical properties. Ann.Rev.Plant Physiol., 35: 585-657, 1984.
- THOMSON, J.A. & SCHROEDER, H. E. Cotyledonary storage proteins in Pisum sativum. II. Hereditary variation in components of the legumin and vicilin fractions. Aust.J.Plant Physiol., 5: 281-94, 1978a.

_____ ; SCHROEDER, H.E. & DUDMAN, W.F. Cotyledonary storage proteins in Pisum sativum. I. Molecular heterogeneity. Aust. J. Plant Physiol., 5: 263-79, 1978b.

THORNE, J.H. Morphology and ultrastructure of maternal seed tissues of soybean in relation to the import of photosynthate. Plant. Physiol., 67: 1016-25, 1981.

TOMBS, M.P. Protein bodies of the soybean. Plant Physiol., 42: 797-813, 1967.

VASSE, J.M. & TRUCHETT, G.L. The Rhizobium - legume symbiosis: observation of root infection by bright-field microscopy after staining with methylene blue. Planta, 161: 487-9, 1984.

VELICAN, C. & VELICAN, D. Silver impregnation techniques for the histochemical analysis of basement membranes and reticular fiber networks. In: Glick, D. & Rosenbaum, R.M., ed. Techniques of biochemical and biophysical morphology. New York, Wiley-Interscience, 1972, p.143-190.

VIDAL, B.C. Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. Protoplasma, 56: 529-536, 1963.

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

- _____. Interferometrical and histochemical investigation on collagen bundles: refractive indices and dry masses prior and after staining with orange G. Ann.Histochem., 15: 191-205, 1970a.
- _____. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R. Ann.Histochim., 15: 289-96, 1970b.
- _____. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. Cell.Mol.Biol., 22: 45-64, 1977.
- _____. Estabilidade físico química e organização estrutural de componentes dos feixes de colágeno. Ciênc.Cult., 30: 607-8, 1978a.
- _____. The use of the fluorescent probe 8-anilidonaphtalene sulfate (ANS) for collagen and elastin histochemistry. J. Histochem.Cytochem., 26: 196-201, 1978b.
- _____. Aorta elasticae and tendon collagen reactivity to 8-anilino-naphtalene sulphate (ANS) and dansylchloride. Cell.Mol.Biol., 26: 583-8, 1980a.
- _____. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. Cell.Mol.Biol., 26: 415-21, 1980b.

_____. Feixes de colágeno: detecção e quantificação de ordem molecular. I. Dicroísmo com corantes azóicos sulfatados (Orange G, Xylidine Ponceau e Sirius Red). Ciênc.Cult., 30: 60 -f, 1980c.

_____. Lectinas vegetais: detecção "in situ" por topoquímica e capacidade aglutinante. Conferência proferida na 7ª Reunião Científica de férias de Verão do Depto. de Biologia Celular. IB - UNICAMP - Campinas (SP), 28/02/83.

_____; MELLO, M.L.S.; GODO, C.; CASEIRO-FILHO, A.C. & ABU-JADI, J.M. Anisotropic properties of silver plus gold-impregnated collagen bundles: ADB and form birefringence curves. Ann.Histochim., 20: 15-26, 1975.

_____; _____ & PIMENTEL, E.R. Polarization microscopy and microspectrophotometric of Sirius Red, Picrosirius and chlorantine Fast Red aggregates and of their complexes with collagen. Histochem.J., 14: 857-78, 1982.

_____; _____ & VALDRIGHI, L. Histochemical and anisotropic aspects of the rat cementum. Acta Anat., 89:546-59, 1974.

_____. & PIMENTEL, E. R. Caracterização bioquímica, topoquímica e estrutural dos corpos proteicos do feijão macuco ou jacatupé (Pachyrhizus tuberosus (Lam.) Spreng). Revta. Bras.Bot. (no prelo), 1986.

YOMO, H. & SRINIVASAN, K. Protein breakdown and formation of protease in attached and detached cotyledons of Phaseolus vulgaris, l. Plant Physiol., 52: 671-3, 1973.

_____ & TAYLOR, M.P. Histochemical studies on protease formation in the Cotyledons of germinating bean seeds. Planta, 112: 35-44, 1973.

_____ & VARNER, J.E. Control of the formation of amylases and proteases in the cotyledons of germinating peas. Plant Physiol., 44: 480-9, 1969.

YOO, B.Y. & CHRISPPEELS, M.J. The origin of protein bodies in developing soybean cotyledons: a proposal. Protoplasma, 103: 201-4, 1980.

WILSON, K. The growth of plant cell walls. Int.Rev.Cytology, 16: 1-49, 1964.