

JOSE FRANCISCO HOFLING

Biólogo

REAÇÕES SEROLÓGICAS COM
ANTÍGENOS PRESENTES EM SEMENTES DE

Coffea arabica L.

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas, pa
ra obtenção do título de Mestre em Ciên
cias.*

Orientador:

Prof. Dr. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA

Campinas - São Paulo

1 9 7 5

UNICAMP
LIOTECA CENTRAL

Ao Professor Doutor AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA,
verdadeiro cientista e amigo que me proporcionou
além de toda orientação científica e profissional,
aquilo que só se pode esperar de um verdadeiro
Mestre.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado, os quais, quer pela orientação, incentivo, fornecimento de material, auxílio e sugestões, concorreram efetivamente para a execução e apresentação dessa Tese.

Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira
Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia da
UNICAMP;

Prof. Dr. Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da
Universidade Estadual de Campinas;

Prof. Dr. Walter August Hadler, Diretor do
Instituto de Biologia da UNICAMP;

Prof. Dr. Aldo Focesi Júnior
Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia da
UNICAMP;

Prof. Dr. Marconi Freire Montezuma
Diretor da Faculdade de Educação da UNICAMP;

Prof. Dr. Humberto de Araujo Rangel
Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de
Biologia da UNICAMP;

Prof. Dr. Alvaro Santos Costa
Seção de Virologia - Instituto Agronômico de Campinas;

Dr. Alcides Carvalho
Seção de Genética - Instituto Agronômico de Campinas;

Prof. Dr. Gerd Walter Müller
Seção de Virologia - Instituto Agronômico de Campinas;

Profa. Nilce Correa Meirelles

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia
UNICAMP;

Dra. Dixier Marozzi Medina

Seção de Citologia - Instituto Agronômico

Prof. Dr. Benedito A. Oliveira

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Biologia da UNICAMP;

Prof. Dr. Antonio Celso Novaes Magalhães

Departamento de Botânica, Instituto de Biologia
UNICAMP;

Prof. Dr. Quivo S. Tahin

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia
UNICAMP;

Demais bolsistas e funcionários do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP

Srta. Ione Salgado;

Srta. Kikyo Yamamoto;

Srta. Maria Helena Pompeu;

Sr. Antonio Frutuozo Leite;

Sr. Francisco Carlos de Freitas;

Em particular à minha esposa Eloisa de M. S. da Silva,
Faculdade de Educação da UNICAMP.

I N D I C E

	página
I - RESUMO	01
II - ABSTRACT	03
III - INTRODUÇÃO	05
IV - REVISÃO DE LITERATURA	07
V - MATERIAL E MÉTODOS	11
A. Fonte de material	11
1. Plantas utilizadas no experimento	11
B. Métodos	12
1. Preparo dos antígenos	12
2. Esquema de imunização	12
3. Sangria, preparo e conservação dos antissoro ros	13
4. Testes serológicos de dupla difusão e imuno eletroforese	13
5. Eletroforese das S-NaCl de C.a.A	14
6. Determinação de proteínas	14
VI - RESULTADOS	16
A. Determinação do título dos antissoros.....	18
B. Testes serológicos de dupla difusão e imuno eletroforese	17
C. Influência do tampão, distâncias entre os ori fícios e tempo de colocação dos reagentes em testes serológicos	17
D. Determinação do teor proteico	19
E. Eletroforese em gel de agar	20
VII - DISCUSSÃO	34
VIII - CONCLUSÕES	39
IX - LITERATURA CITADA	41

INDICE DAS FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
<p>1 Reações de dupla difusão em gel de agar a 1% (Veronal), mostrando as linhas de precipitação: A - antissoro C.a.A; (A-B) antissoro C.a.A (FD), (C-D) antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (2) Amarelo Botucatu, (3) Caturra Vermelho, (4) Mistura Arabica.....</p>	23
<p>2 Reações de imunoeletroforese em gel de agar a 1% (Veronal), mostrando as linhas de precipitação : AS - antissoro C.a.A; A - antissoro C.a.A(S-NaCl) , B - antissoro C.a.A (FD), C - antissoro C.a.A (FD); e antígenos (1) Arabica, (4) Mistura Arabica</p>	24
<p>3 Reações de dupla difusão em gel de agar a 1% (Veronal), mostrando as linhas de precipitação: A - antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (2) Amarelo Botucatu, (3) Caturra Vermelho; (4) Mistura Arabica; distância entre os orifícios (A-F) 5mm e (G-L) 7mm; intervalo de tempo entre colocação do antígeno e depois o antissoro 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas nas duas sequências de letras, respectivamente.....</p>	25
<p>4 Reações de dupla difusão em gel de agar a 1% (PBS), mostrando as linhas de precipitação: A - antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (2) Amarelo Botucatu, (3) Caturra Vermelho, (4) Mistura Arabica; distância entre os orifícios (A-F) 5 mm e (G-L) 7mm; intervalo de tempo</p>	

- entre colocação do antígeno e depois o antissoro 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas nas duas sequências de letras, respectivamente..... 26
- 5 Reações de dupla difusão em gel de agar a 1% (Salina), mostrando as linhas de precipitação: A - antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (2) Amarelo Botucatu, (3) Caturra Vermelho, (4) Mistura Arabica; distância entre os orifícios (A-F) 5 mm e (G-L) 7 mm; intervalo de tempo entre colocação do antígeno e depois o antissoro 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas nas duas sequências de letras; respectivamente 27
- 6 Reações de dupla difusão em agar a 1% (Salina) mostrando as linhas de precipitação: A - antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (2) Amarelo Botucatu, (3) Caturra Vermelho, (4) Mistura Arabica; distância entre os orifícios (a-f) 5 mm; intervalo de tempo entre colocação do antígeno e depois o antissoro 0, 1, e 4 horas; na sequência de letras (a-f); intervalo de tempo entre colocação do antissoro e depois o antígeno 0, 1 e 4 horas na sequência de letras (d-f)..... 28
- 7 Reações de imunoeletroforese em agar a 1% (Veronal), mostrando as linhas de precipitação: AS - antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (4) Mistura Arabica; distância entre

	os orifícios (A-C) 5mm; tempos de 60, 90 e 120 minutos de eletroforese; 5 miliampères/lâmina.....	29
8	Reações de imunoeletroforese em agar a 1% (Veronal), mostrando as linhas de precipitação AS - antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (4) Mistura Arabica; distância entre os orifícios (A-C) 7mm; tempos de 60, 90 e 120 minutos de eletroforese; 5 miliampères/lâmina.....	30
9	Reações de imunoeletroforese em agar a 1% (Veronal), mostrando as linhas de precipitação: AS - antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (4) Mistura Arabica; distância entre os orifícios (A-C) 9 mm; tempos de 60, 90 e 120 minutos de eletroforese; 5 miliampères/lâmina.....	31
10	Eletroforese comparada em gel de agar a 1% (1-2) S-NaCl de C.a.A em Veronal; (3-4) S-NaCl de C.a.A em PBS. Tempos de 30 e 60 minutos, respectivamente	32
11	Curvas obtidas em densitometria das eletroforeses em gel de agar à 1% em Tampão Veronal: (1) C.a.A tempo de 30'; (2) C.a.A tempo de 60'.....	33

INDICE DOS QUADROS

<i>Quadro</i>		<i>Página</i>
1	Resultado dos testes para determinação do título dos antissoros obtidos pela inoculação com antígenos de sementes de C.a.A	15
2	Valores de proteína solúvel em Cloreto de Sódio 2,5% obtidos de sementes de café pelo método de Folin-Lowry em relação ao peso seco da farinha delipidificada	22

I - RESUMO

Na tentativa do estabelecimento de correlação entre a taxonomia e a constituição proteica das plantas, substâncias extraídas de sementes do cultivar Arabica de *Coffea arabica*, especificamente a farinha delipidificada e a fração solúvel em cloreto de sódio 2,5% (FD e S-NaCl), foram utilizadas como antígenos no preparo de antissoros.

Os testes serológicos (dupla difusão e imunoeletroforese) permitiram a observação de linhas de precipitação típicas, indicando serem as substâncias empregadas como antígenos (FD e S-NaCl) capazes de reação imunológica específica com o homólogo cultivar Arabica de *Coffea arabica* e apresentam reação cruzada com os heterólogos (cultivar Amarelo Botucatu, Caturra Vermelho e mistura de plantas do cultivar Arabica).

Tais resultados, sugerem a existência de substâncias presentes nas sementes com valor imunogênico, isto é, induzem a formação de anticorpos quando utilizadas como antígenos.

Procurou-se identificar as substâncias solúveis em cloreto de sódio 2,5% extraídas da farinha delipidificada das sementes através de testes de eletroforese em gel de agar a 1% do cultivar Arabica (planta individual). Os resultados obtidos mostraram a presença de pelo menos dois componentes com mobilidade eletroforética. Essa mobilidade foi menor quando se utilizou tampão PBS 0,01 M p^H 7,0 comparado com tampão Veronal 0,025M p^H 8,6. Testes serológicos de dupla difusão e imunoeletroforese foram realizados para se verificar o comportamento imunológico dos antissoros para *Coffea arabica* contra os antígenos homólogo e heterólogos empregados. Os resultados obtidos sugerem a existência de pelo menos três (3) determinantes antigênicos comuns à todos os cultivares utilizados. Tais resultados indicam possibilidades de utilização da técnica em estudos de relações de afinidade filogenética.

Variações qualitativas foram verificadas nos testes serológicos de dupla difusão e imunoeletroforese quando se introduziram alterações nessas reações quanto ao tampão empregado, distâncias entre os orifícios e tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro). Os resultados indicam a importância da padronização dos testes para a sua aplicação em estudos de sistemática.

II - ABSTRACT

Antigens soluble in 2.5% NaCl (S-NaCl) and the de-lipified seed meal (FD) obtained from mature seeds of *Coffea arabica* were used for specific antisera preparations.

The results of cross serological reactions observed in agar double diffusion and immunoelectrophoresis tests between *Coffea arabica* cultivars allowed the observations of typical precipitation lines. These results showed that the substances employed as antigen (FD and S-NaCl) were able to give immunological cross reaction.

The presence of least two components were observed in veronal buffer 0.025M p^H 8.6 agar eletrophoresis and there was less mobility when a PBS 0.01M p^H 7.0 buffer was utilized.

Qualitative variations in the precipitation lines were observed in double diffusion and immunoelectrophoresis serological tests when changes in type of buffer, distances between orifices and time of addition of reagents (antigen and antisera) were introduced in the experiment.

III - INTRODUÇÃO

As pesquisas no campo da sistemática-química, evoluíram na medida em que se desenvolveram os trabalhos de química dos produtos naturais de bioquímica, de enzimologia, de imunoquímica, etc. Assim, espécies vegetais afins, que apresentam grande número de caracteres comuns, passaram a ser comparadas quimicamente, para melhor identificação. A aplicação de técnicas específicas para o estudo de padrões proteicos tem também contribuído para o conhecimento das relações inter e intra específicas.

O gênero *Coffea* vem sendo estudado por vários pesquisadores sob aspectos de sistemática, evolução, genética, citologia, etc. Estudos citológicos demonstraram que as espécies

de *Coffea* estudadas são diplóides, com 22 cromossomas somáticos, com exceção de *Coffea arabica* que é tetraplóide, embora se encontre também outras séries poliploides.

Modernamente procura-se agrupar as espécies com base na sua constituição proteica. O emprego das substâncias solúveis extraídas de sementes e folhas cotiledonares de café, tem indicado possibilidades de aplicação em Sistemática, OLIVEIRA *et al.* (1972), OLIVEIRA *et al.* (1973) e PAYNE *et al.* (1973).

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver técnicas para serem aplicadas à taxonomia do genero *Coffea* em geral e ao programa de melhoramento das variedades e cultivares em particular. Com a finalidade de contribuir, para o esclarecimento das origens de *Coffea arabica* foi feito, inicialmente, um estudo das técnicas de isolamento e identificação, assim como o preparo de antissoros específicos para as substâncias das sementes. Padronizada uma metodologia específica para *Coffea arabica*, introduziremos tais técnicas às demais espécies de *Coffea*. Tal procedimento nos dará um relacionamento interespecífico, indicando o grau de parentesco dos prováveis ancestrais de *Coffea arabica*. Nosso interesse, portanto, é um estudo filogenético dessas espécies, com base no isolamento e identificação das substâncias de sementes das espécies consideradas próximas à *Coffea arabica*.

IV - REVISÃO DE LITERATURA

A idéia de estabelecer relações entre a morfologia e os grupos de substâncias químicas para elaboração de um sistema de classificação das espécies vegetais, é antiga. PETIVER (1969), publicou um trabalho no qual menciona a correlação de "certas substâncias químicas" e certos grupos morfológicos em Umbelliferae, Labiatae, etc. (cf. SILBERSCHMIDT, 1936).

Um sistema de classificação que maior desenvolvimento atingiu, baseou-se em diferenças na estrutura da molécula proteica nas diferentes espécies de plantas. Essas diferenças não foram verificadas por métodos químicos, mas deduzidas a partir da reação do corpo animal à inoculação de extratos de plantas. HANNIG (1929), MORITZ (1932) e LINK (1933) em suas investiga

ções, sugeriram que métodos serológicos poderiam ser aperfeiçoados de modo a se tornarem um instrumento de valor para a sistemática de plantas. LISSITZIN & ALEXANDROWSKAJA (1935) e MOLISCH (1933), empregaram também métodos quimiosistemáticos para o reconhecimento de substâncias proteicas com ênfase em sistemática de plantas. (cf. SILBERSCHMIDT, 1936).

Com o desenvolvimento dos trabalhos sobre química dos produtos naturais, botânicos e químicos passaram a sugerir a possibilidade de se utilizar constituintes químicos em estudos taxonômicos. HANNIG (1929), MOLISCH (1933), MACNAIR (1934), WEEVERS (1936), CARLES (1935), (cf. SILBERSCHMIDT, 1936). Destacamos também, os trabalhos de KLOZ *et al.* (1966 a, b), KLOSOVA (1966) e MORITZ (1966).

KLOZ, (1964) e GHETIE (1966 a, b) sugeriram que as proteínas estruturais e de reserva poderiam ser empregadas em estudos de sistemática. STEWARD & BARBER (1964), trabalhando com proteínas de fungos do gênero *Neurospora*, verificaram que a técnica de eletroforese de disco era de grande utilidade quando aplicada a problemas de genética e de morfogenética. JOHNSON & FAIRBROTHERS (1964) estudaram proteínas dos gêneros e espécies de plantas pertencentes as famílias Magnoliaceae, Illiaceae e Schizandraceae e demonstraram que os dados sobre o relacionamento com base nas proteínas são utilizáveis e podem ser complementados com observações de outras disciplinas para avaliação em sistemática.

FAIRBROTHERS & JOHNSON (1964) verificaram que as proteínas solúveis em solução salina, de sementes de plantas das famílias Cornaceae e Nyssaceae induziram a formação de anticorpos específicos quando injetados em coelhos. Testes de precipitação indicaram que espécies de *Cornus* podem ser divididos em grupos serológicos. Um relacionamento serológico foi obtido com antígenos de *C. florida* e *C. Kousa*, respectivamente, de regiões geográficas distintas. Outros gêneros e espécies puderam ser avaliadas serologicamente. FAIRBROTHERS (1966) demonstrou também, que o estudo das proteínas de plantas do

gênero *Connus*, *Nyssa*, *Davidia* e *Carya* através de reações de precipitação e dupla difusão em gel de agar, fornecem dados importantes, que podem ser comparados e interpretados em relação a dados obtidos por outras investigações no campo da sistematização.

FAIRBROTHERS (1968), estudando proteínas, através de técnicas serológicas e de eletroforese de disco de diversos partes da planta, como esporos, polem, folhas e sementes do gênero *Thypha*, mostrou que as sementes são mais satisfatórias do que o polem e esporos para avaliações em estudos taxonômicos, não excluindo porém o uso das demais estruturas.

CHERRY *et al.* (1966) demonstraram que as proteínas de sementes do gênero *Gossypium*, determinadas pela técnica de gel de acrilamida, indicam possibilidades de uma aproximação de caráter filogenético entre seis grupos de genomas estudados, onde se verificaram maior aproximação entre certas espécies, pela observação dos padrões proteicos.

Segundo FAIRBROTHERS (1971), o emprego das substâncias solúveis presentes em extratos de plantas, tem indicado possibilidades de utilização em estudos taxonômicos. Muitas pesquisas têm demonstrado que extratos de sementes, polem, folhas, tubérculos e esporos, podem ser utilizados dependendo do procedimento empregado. Em sistematização, técnicas imunológicas quantitativas e qualitativas, tem indicado que os dados obtidos da combinação de ambos procedimentos podem ser complementadas. Assim, as pesquisas em quemossistematização tem fornecido dados que demonstram ser as características químicas, elementos valiosos para taxonomistas e sistematizadores.

Em *Coffea*, as isoenzimas obtidas de extratos de folhas e sementes, têm fornecido informações que indicam possibilidades para utilização em estudos taxonômicos. OLIVEIRA *et al.* (1972) investigaram proteínas e isoenzimas cotiledonares extraídas em cloreto de sódio 2,5%, e demonstraram que há pelo menos quatro isoenzimas da desidrogenase málica (MDH) presentes em *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. OLIVEIRA *et al.*

(1973), também demonstraram diferenças detectáveis entre espécies do gênero *Coffea* empregando proteínas totais e isoenzimas da desidrogenase malica (MDH) de extratos solúveis de folhas cotiledonares. PAYNE *et al.* (1973), analisaram isoenzimas e proteínas de sementes maduras de espécies, variedades e cultivares do gênero *Coffea*, demonstrando que esses dados são utilizáveis em estudos taxonômicos e comparáveis com observações de outras disciplinas.

V - MATERIAL E MÉTODOS

A. FONTE DE MATERIAL

1. Plantas utilizadas nos experimentos

As sementes dos cultivares testados foram cedidas pela Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas. Usaram-se sementes de planta individual do cultivar Arabica de *Coffea arabica* L. nº 10-20-16-7 (C.a.A); de uma mistura de plantas de *Coffea arabica* L. cv. Arabica (C.a.A. Mix); e das plantas individuais de *Coffea arabica* cv. Caturra Vermelho: nº 477-17 (C.a.CV); *Coffea arabica* cv. Amarelo Botucatu nº J-46-4 (C.a.A.Bot).

B. MÉTODOS

1. Preparo dos antígenos

A metodologia empregada na extração das substâncias solúveis em sementes de café, baseou-se naquela utilizada por JOHNSON & FAIRBROTHERS (1965), com modificações introduzidas por PAYNE *et al.* (1973).

As sementes foram resfriadas em nitrogênio líquido, trituradas em moinho tipo Wiley e transformadas em farinha. Esta foi delipidificada com éter de petróleo (1:4 P/V) durante 60 minutos (4°C - duas extrações cada) e leve agitação (Esquema 1 pág.15). Posteriormente fez-se a secagem das sementes (distribuídas uniformemente em papel de filtro à temperatura ambiente). Em seguida esse material foi colocado em acetona (1:4 P/V) durante 12-20 horas a 4°C e leve agitação. Posteriormente esse material foi secado a temperatura ambiente. A farinha delipidificada (FD) foi transformada em pó - partículas de 0,177 mm = peneira de 80 mesh (antígeno 1).

Parte do pó foi colocado em NaCl 2,5% (0,10 g/ml NaCl) e mantido no refrigerador (4°C durante 60 minutos) em agitação constante. Posteriormente esse material foi submetido a centrifugação (10.000 g. - 4°C) e o sobrenadante foi usado como antígeno (antígeno 2). A mesma metodologia foi empregada na preparação dos demais antígenos utilizados nos testes serológicos.

2. Esquema de imunização

A técnica de imunização utilizada para a obtenção de antissoros específicos para o cultivar Arabica de *Coffea arabica* (C.a.A) foi a inoculação diretamente no linfonóculo. Coelhos pesando em média 2,5 kg, foram inoculados com antígenos de sementes, (Oliveira, comunicação pessoal). As injeções foram feitas com antígenos solúveis em cloreto de sódio 2,5%

(S-NaCl) emulsionado em adjuvante de Freund incompleto (15% la nolina + 75% Nujol) em partes iguais (V/V). Alguns coelhos fo ram imunizados com o antígeno (FD), emulsionado em adjuvante de Freund incompleto (0,10 g/ml de adjuvante).

3. Sangria, preparo e conservação dos antissoros

Preliminarmente à injeção do antígeno, fez-se uma sangria e o soro normal (SN), foi conservado no congelador pa ra testes posteriores como controle nas reações serológicas . Dez a doze dias após a primeira inoculação do antígeno, inicia ram-se as sangrias a intervalos de tempos variados e preparou -se o antissoro (AS). Nas sangrias, fez-se um pequeno corte longitudinal na veia lateral da orelha do coelho e recolheu-se sangue (10 a 20 ml) em um frasco de vidro. O sangue foi deixa do em temperatura ambiente (1 a 2 horas) após o que permaneceu no refrigerador durante 24 horas. Em seguida separou-se o soro centrifugando-se durante 5 minutos à 10.000 g. (centrífuga - 3.200 - Eppendorf). Distribuiu-se o material em ampolas de plástico (2 a 3 ml por ampola), adicionou-se Mertiolato, numa concentração final de 1:10.000.

4. Testes serológicos de dupla difusão e imunoeletroforese

Para os testes serológicos de dupla difusão e imunoeletroforese com antissoros obtidos pela inoculação das subs tâncias solúveis em cloreto de sódio 2,5% (S-NaCl) da farinha delipidificada do cultivar Arabica de *Coffea arabica* e direta mente com a farinha delipidificada (FD), foram utilizados agar a 1% em veronal sódico 0,025M p^H 8,6, (Veronal), tampão fosfato 0,01M p^H 7,0 (PBS) e solução salina isotônica de p^H 7,2-7,4 (Sa lina) segundo DUCHTERLONY, 1949-1958, 1962, em lâminas de mi croscópio (3,5 ml de agar/lâminas de 75X25 mm). Foram feitos testes de distâncias entre os orifícios e tempos de colocação

dos reagentes (antígeno e antissoro). Essas três variáveis (tampão, distâncias dos orifícios e tempo de colocação dos reagentes) foram analisadas. Os testes de imunoelektroforese foram feitos em agar a 1% Tampão Veronal 0,025M p^H 8,6 (5 miliampéres/lâmina). Em todos os testes serológicos foram utilizados antissoros codificados e com a data da sangria em parênteses.

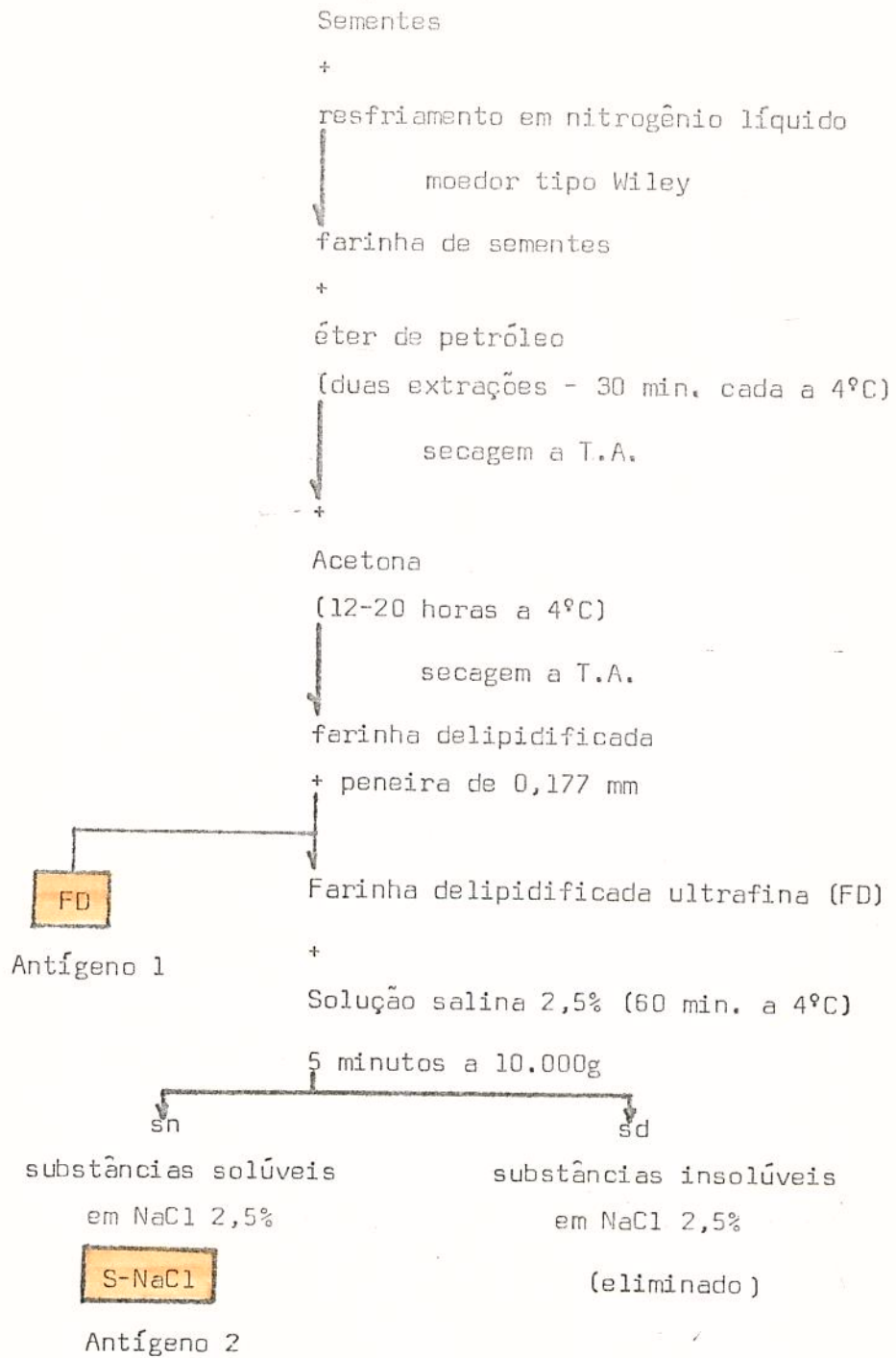
5. Eletroforese das S-NaCl de C.a.A

Nos testes de eletroforese com as substâncias solúveis em Cloreto de Sódio 2,5% (S-NaCl) obtidas da farinha delipidificada (FD) do cultivar Arabica de *Coffea arabica* (C.a.A), foi utilizado agar a 1% em tampão veronal sódico 0,025M p^H 8,6 (Veronal) e tampão fosfato 0,01M p^H 7,0 (PBS) em lâminas de 75 X 25 mm. As lâminas secas e com linhas de precipitação coradas com negro de amido (OLIVEIRA, 1967), foram desenhadas em ampliador fotográfico e fotografadas.

6. Determinação de proteínas

O teor de proteínas foi determinada empregando-se o método de Folin-Lowry segundo Lowry *et al.* (1951), com modificações (cf. AMORIM, 1972).

Esquema 1 - Preparo dos antígenos de sementes



VI - RESULTADOS

A. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DOS ANTISSOROS

Para determinar a concentração de anticorpos presentes nos soros dos coelhos imunizados (2 com as substâncias solúveis em cloreto de sódio 2,5% e 2 com a farinha delipidificada), respectivamente, antissoros para S-NaCl e FD, foram efetuados testes de dupla difusão em agar a 1%. Os resultados obtidos mostraram diferenças no título, de anticorpos tal como ilustra o Quadro 1 pág 21. Os títulos máximos obtidos, foram de 64 para os coelhos imunizados com as S-NaCl e 18 para os coelhos imunizados diretamente com FD. O soro normal (SN) utilizado como controle não apresentou reação.

B. TESTES SEROLÓGICOS DE DUPLA DIFUSÃO E IMUNOELETROFORESE COM ANTÍGENOS HOMÓLOGOS E HETERÓLOGOS

O objetivo desses testes foi o de verificar o comportamento imunológico dos antissoros para *Coffea arabica*, respectivamente antissoros para S-NaCl e FD. Os resultados dos testes serológicos de dupla difusão em agar com esses antissoros contra o homólogo *Coffea arabica* cv. Arabica (C.a.A.) e os heterólogos *Coffea arabica* cv. Amarelo Botucatu (C.a.A.Bot), *Coffea arabica* cv. Caturra Vermelho (C.a.CV) e a mistura de plantas de *Coffea arabica* cv. arabica (C.a.A. Mix), mostraram a formação de duas linhas de precipitação nas reações com os antissoros AS.C.a.A. 157 (16.1.74) e AS.C.a.A. 159 (12.2.74). Nas reações com os antissoros AS.C.a.A. 156 (3.1.74) e AS.C.a.A. 158 (3.1.74), observou-se três linhas de precipitação em ambas as reações, conforme se verifica pelos resultados da Figura 1 pág.23.

Nas experiências de imunoeletroforese, utilizando-se os antissoros já mencionados anteriormente, empregando-se porém, somente os antígenos C.a.A e C.a.A.Mix, nas reações verificou-se de 1 a 4 linhas de precipitação, no total dos testes feitos. Uma e duas linhas de precipitação foram verificadas nas reações com os antissoros AS.C.a.A. 157 e AS.C.a.A. 159. Nas reações com os antissoros AS.C.a.A. 156 e AS.C.a.A. 158 observaram-se duas e três linhas, respectivamente, como mostra a Figura 2 pág. 24.

C. INFLUÊNCIA DO TAMPÃO, DISTÂNCIAS ENTRE OS ORIFÍCIOS E TEMPO DE COLOCAÇÃO DOS REAGENTES EM TESTES SEROLÓGICOS

Como alguns testes serológicos feitos com os antígenos e antissoros obtidos demonstraram algumas variações nas reações, procurou-se determinar se as modificações introduzidas acima (item C) estavam correlacionadas especificamente com o material em questão.

Os testes serológicos de dupla difusão em agar a 1% com soro anti-S-NaCl foram efetuados, utilizando-se tampão veronal 0,025M p^H 8,6; tampão fosfato 0,01M p^H 7,0 e Salina (já descritos anteriormente) em que distâncias entre os orifícios (5 e 7 mm) em relação ao orifício central foram, associadas à diferentes tempos de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro), respectivamente à 0, 1, 2, 3, 4, e 5 horas de colocação do antissoro, após a colocação dos antígenos *Coffea arabica* cv. Amarelo Botucatu (C.a.A.Bot), *Coffea arabica* cv Caturra Vermelho (C.a.CV), *Coffea arabica* cv. Caturra Vermelho (C.a.CV), *Coffea arabica* cv. Arabica e a mistura de plantas do cultivar Arabica de *Coffea arabica* (C.a.A.Mix). Os resultados obtidos mostraram duas linhas de precipitação no suporte agar-Veronal e PBS nas distâncias de 5 e 7 mm Figuras 3 e 4 pág.25-26. Nos testes efetuados em agar-salina Figura 5 pág. 27 verificou-se uma única linha de precipitação. Em relação ao tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro) nos testes acima, não se observou alterações nos tempos empregados, quando comparados.

Testes similares de dupla difusão em agar, a 1% empregando-se outro antissoro AS.C.a.A. 156 (3.1.74) utilizando-se agar-salina como suporte, colocando-se à zero horas os antígenos C.a.A., C.a.A.Bot, C.a.CV e C.a.A.Mix e o antissoro somente nos tempos de zero horas, 1 e 4 horas após a colocação dos antígenos, mostraram o aparecimento de três linhas de precipitação à partir de 1 hora de colocação do antissoro, verificando-se uma reação nítida, somente à 4 horas após. A zero horas de colocação dos reagentes não se observou reação nítida. Pela comparação dos resultados expressos na Figura 6 pág. 28 experiências em que se inverteu o sistema, ou seja, colocando-se à zero horas o antissoro e os antígenos respectivamente a zero horas, 1 e 4 horas após a colocação do antissoro, não se verificaram linhas de precipitação visíveis.

Em sequência às modificações introduzidas nos testes serológicos, experiências de imunoeletroforese foram efe

tuadas utilizando-se antissoro AS.C.a.A. 158(18.12.74) contra somente os antígenos C.a.A. e C.a.A.Mix onde foram testados tempos de eletroforese associados às distâncias entre os orifícios (antígenos) de 5,7 e 9 mm em relação à canaleta central (antissoro). Conforme se observa pelos resultados da Figura 7 pág. 29 quatro linhas de precipitação foram verificadas nas reações feitas em tempos de 60, 90 e 120 minutos de eletroforese na distância de 5 mm, onde não se observaram, portanto, alterações nessas reações, quando (distância dos orifícios e tempos de eletroforese) foram comparadas. Para os testes feitos em 7 mm de distância, foram observadas nos tempos de 60 e 90 minutos, respectivamente, 3 e 4 linhas de precipitação para ambos os antígenos empregados. No tempo de 120 minutos de eletroforese, somente 2 linhas foram verificadas para o antígeno C.a.A. e três linhas para C.a.A.Mix, tal como demonstra a Figura 8 pág. 30. No sistema com 9 mm de distância, observaram-se duas linhas de precipitação para C.a.A e três para C.a.A.Mix em todos os tempos testados Figura 9 pág. 32, não se observando, portanto, influência das variáveis (distância e tempos de eletroforese) para esse teste.

D. DETERMINAÇÃO DO TEOR PROTEICO

Quando se trata da determinação do teor proteico, vários são os métodos descritos na literatura. Para o café algumas dificuldades são encontradas. Com o objetivo de se ter uma idéia da concentração de proteínas das substâncias solúveis de *Coffea arabica* cv. Arabica e da mistura de plantas desse mesmo cultivar (C.a.A.Mix), foi empregado o método de Folin-Lowry (1951) por parecer melhor adequado para o café. Os demais antígenos não foram testados.

Conforme se verifica pelos resultados apresentados do Quadro 2 pág.22 a análise de proteínas em relação ao peso seco do material, apresentou valores de 0,78% para C.a.A e de 1,13% para C.a.A.Mix.

E. ELETROFORESE EM GEL DE AGAR

Com o fito de se verificar o comportamento eletroforético das substâncias solúveis em cloreto de sódio 2,5% (S-NaCl) de *Coffea arabica* (C.a.A), foram feitos testes de eletroforese em tampão veronal 0,025M p^H 8,6 (veronal) e tampão fosfato 0,03M p^H 7,0 (PBS). Testou-se tempos de 30 e 60 minutos de eletroforese. Nos resultados obtidos com Veronal, observou-se a presença de pelo menos dois componentes com mobilidade eletroforética. As curvas obtidas em densitometria revelaram a existência desses componentes, em ambos os tempos testados, conforme demonstra a Figura 10 pág. 33.

Conforme se verifica pelos resultados da Figura 11 pág. 34 os testes comparativos feitos com Tampão Veronal e Tampão PBS, houve separação mais lenta dos componentes, com menor mobilidade eletroforética nos tempos testados (30 e 60 minutos), quando se utilizou Tampão PBS.

Quadro 1. Resultados dos testes para determinação do título dos antissoros obtidos pela inoculação com antígenos de sementes de C.a.A.

Coelho Nº	Antígeno	nº de injeções	Código do antissoro	Título	S N
156	S-NaCl	2	AS.C.a.A.156	16	—
157	FD	3	AS.C.a.A.157	8	—
158	S-NaCl	3	AS.C.a.A.158	64	—
159	FD	2	AS.C.a.A.159	8	—

(a) Os títulos determinados em testes de dupla difusão em agar, estão representados pelo inverso da diluição.

(SN) Soro Normal

Quadro 2. Valores de proteína solúvel em Cloreto de Sódio 2,5% obtidos de sementes de café (antígeno 2) pelo método de Folin-Lowry em relação ao peso seco da farinha delipidificada.

Material	Porcentagens de proteínas em três ali quotas das amostras indicadas		
	1a rep.	2a. rep.	3a. rep
C. a. A	0,78	0,80	0,78
C. a. A. Mix	1,13	1,13	1,15

C. a. A. - cultivar Arabica de *Coffea arabica*

C. a. A. Mix - mistura de plantas do cultivar Arabica de *Coffea arabica*

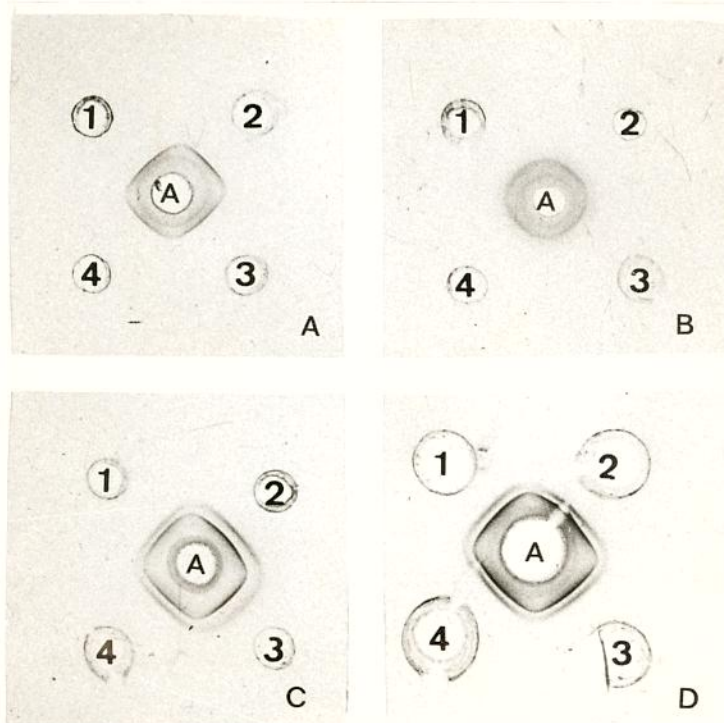


Figura 1. Reações de dupla difusão em gel de agar a 1% (Veronal), mostrando as linhas de precipitação: A - antissoro C.a.A; (A-B) antissoro C.a.A.(FD), (C-D) antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (2) Amarelo Botucatu, (3) Caturra Vermelho, (4) Mistura Arabica.

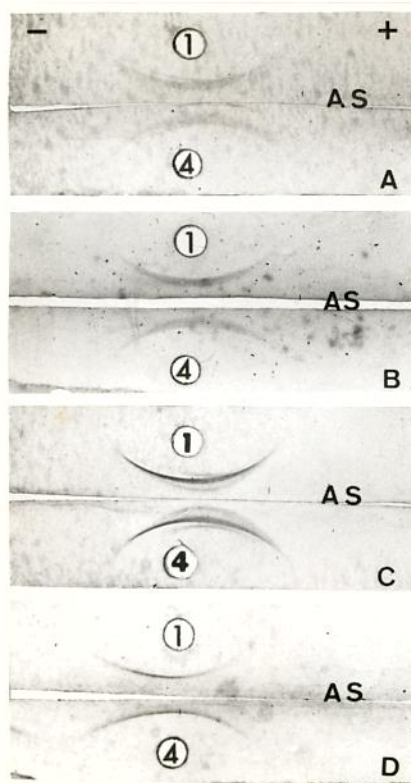


Figura 2. Reações de imunoelctroforese em gel de agar a 1% (Veronal, mostrando as linhas de precipitação: AS-antissoro C.a.A; A - antissoro C.a.A (S-NaCl), B - antissoro C.a.A (FD), C - antissoro C.a.A (S-NaCl), D - antissoro C.a.A (FD); e antígenos (1) Arabica, (4) Mistura Arabica.

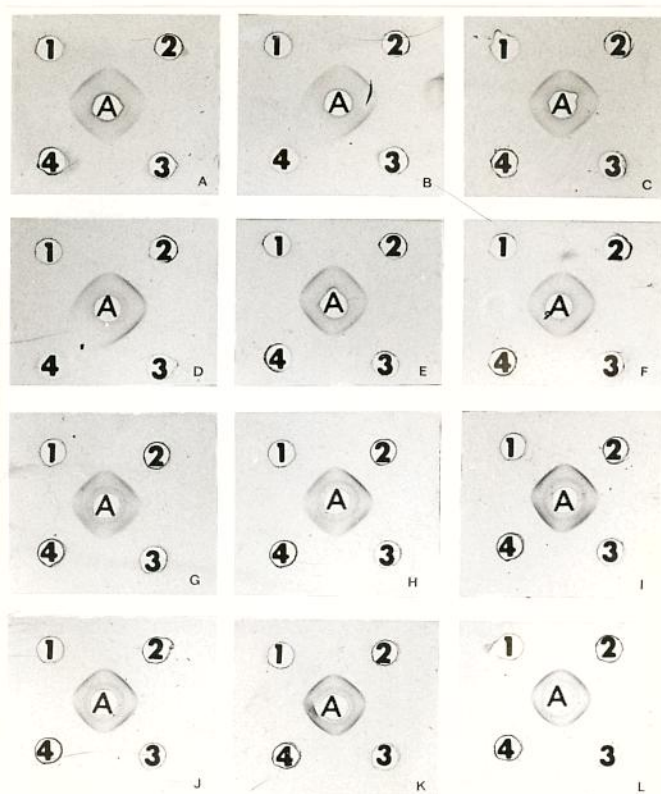


Figura 3. Reações de dupla difusão em gel de agar a 1% (Veronal), mostrando as linhas de precipitação: A - antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (2) Amarelo Botucatu, (3) Caturra Vermelho, (4) Mistura Arabica; distância entre os orifícios (A-F) 5 mm e (G-L) 7 mm; intervalo de tempo entre colocação do antígeno e depois o antissoro 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas nas duas seqüências de letras, respectivamente.

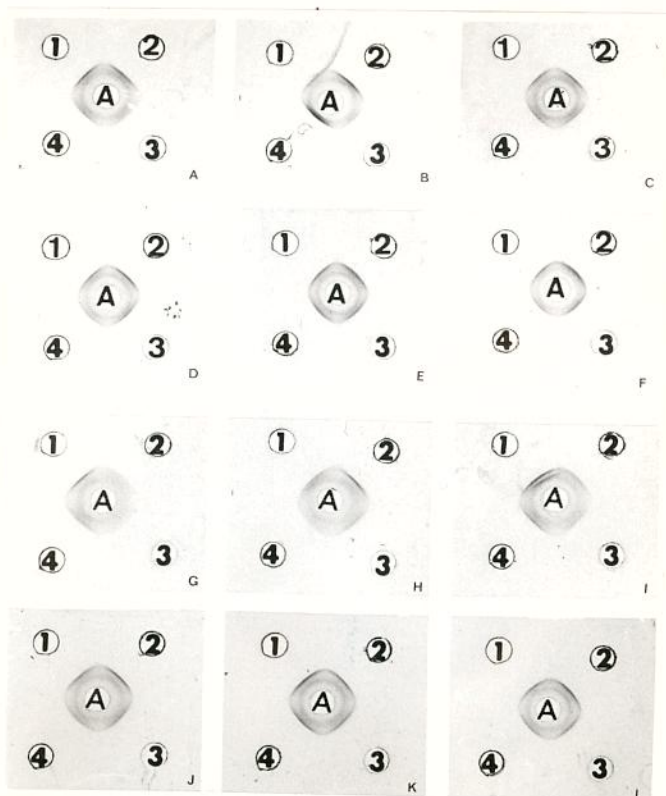


Figura 4. Reações de dupla difusão em gel de agar a 1% (PBS), mostrando as linhas de precipitação: A: antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (2) Amarelo Botucatu, (3) Caturra Vermelho, (4) Mistura Arabica; distância entre os orifícios (A-F) 5 mm e (G-L) 7 mm; intervalo de tempo entre colocação do antígeno e depois o antissoro 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas nas duas sequências de letras, respectivamente.

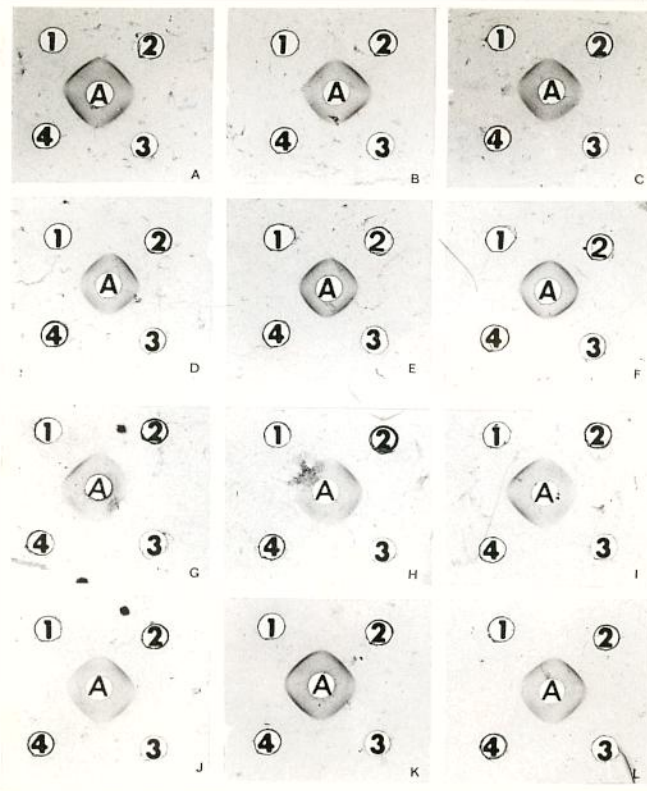


Figura 5. Reações de dupla difusão em gel de agar a 1% (Saline), mostrando as linhas de precipitação: A - antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (2) Amarelo Botucatu, (3) Caturra Vermelho; (4) Mistura Arabica; distância entre os orifícios (A-F) 5 mm e (G-L) 7 mm; intervalo de tempo entre colocação do antígeno e depois o antissoro 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas nas duas seqüências de letras, respectivamente.

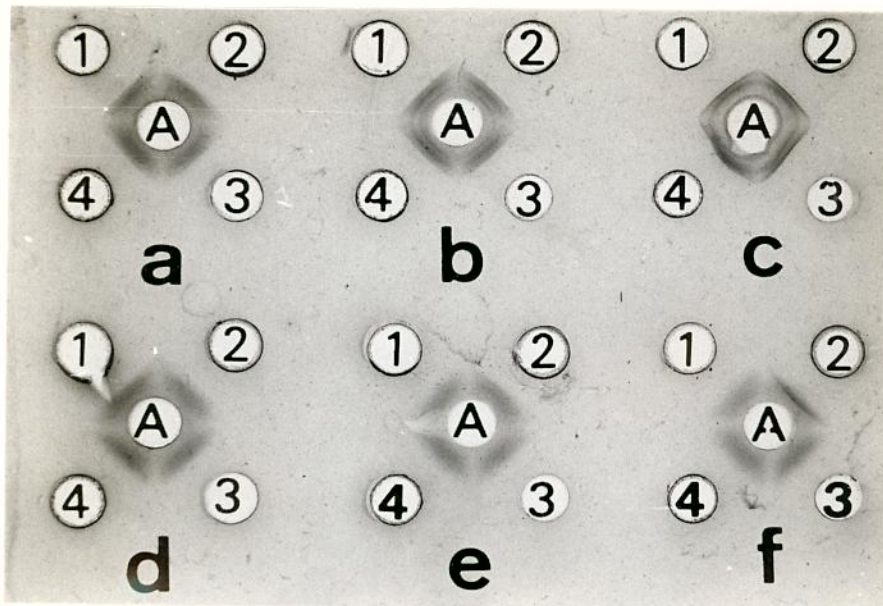


Figura 6. Reações de dupla difusão em agar a 1% (Salina), mostrando as linhas de precipitação: A - antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (2) Amarelo Botucatu, (3) Caturra Vermelho, (4) Mistura Arabica; distância entre os orifícios (a-f) 5 mm; intervalo de tempo entre colocação do antígeno e depois o antissoro 0, 1 e 4 horas na sequência de letras (a-f); intervalo de tempo entre colocação do antissoro e depois o antígeno 0, 1 e 4 horas na sequência de letras (d-f).

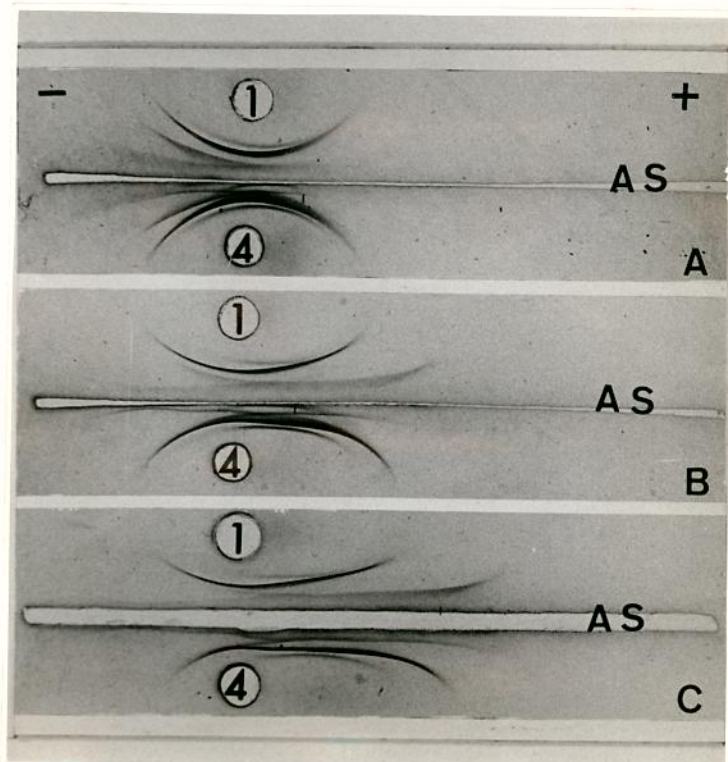


Figura 7. Reações de imunoeletroforese em agar a 1% (Veronal), mostrando as linhas de precipitação: AS - antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (4) Mistura Arabica; distância entre os orifícios (A-C) 5 mm; tempos de 60, 90 e 120 minutos de eletroforese; 5 miliampères/lâmina.

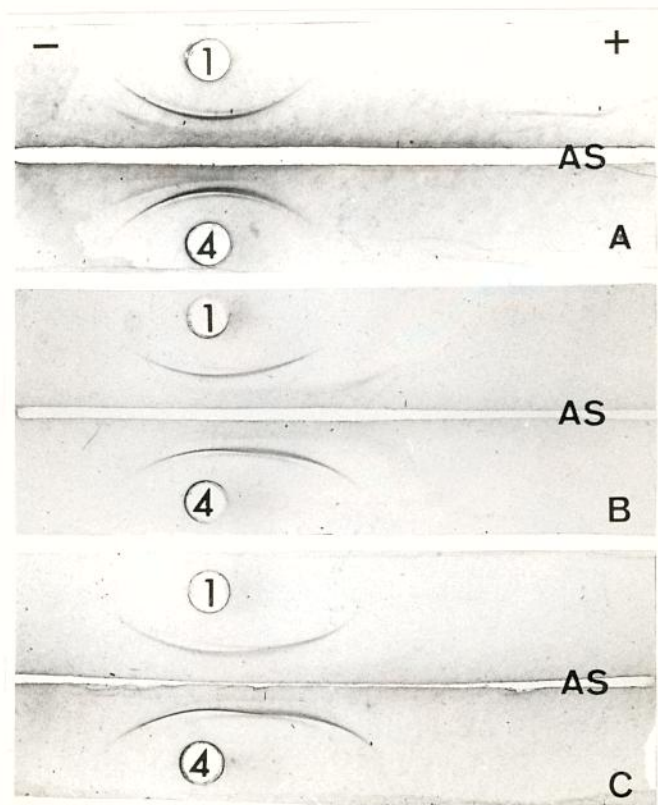


Figura 8. Reações de imunoeletroforese em agar a 1% (Veronal), mostrando as linhas de precipitação: AS - antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (4) Mistura Arabica; distância entre os orifícios (A-C) 7mm; tempos de 60, 90 e 120 minutos de eletroforese; 5 miliampères/lâmina.

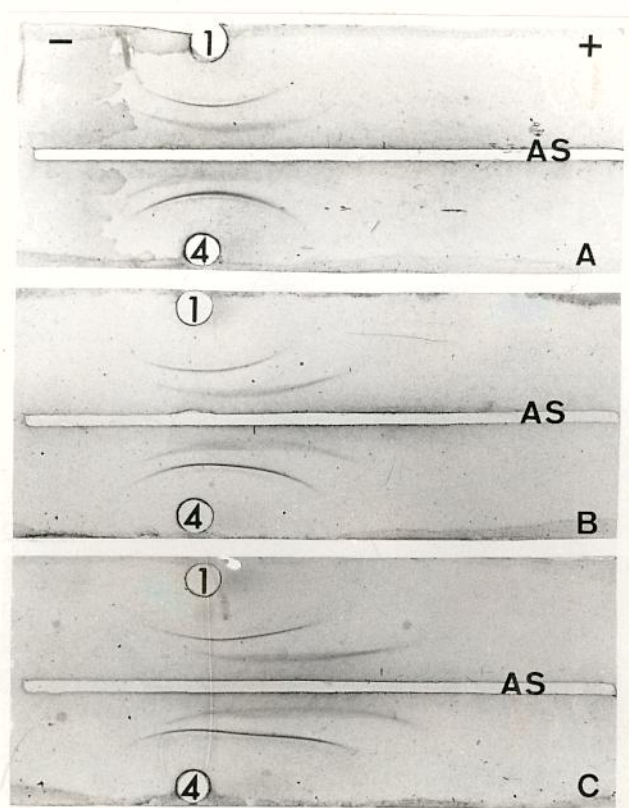


Figura 9. Reações imunoeletroforese em ágar a 1% (Veronal), mostrando as linhas de precipitação: AS - antissoro C.a.A (S-NaCl) e antígenos (1) Arabica, (4) Mistura Arabica; distância entre os orifícios (A-C) 9 mm; tempos de 60, 90 e 120 minutos de eletroforese; 5 miliampères/lâmina.

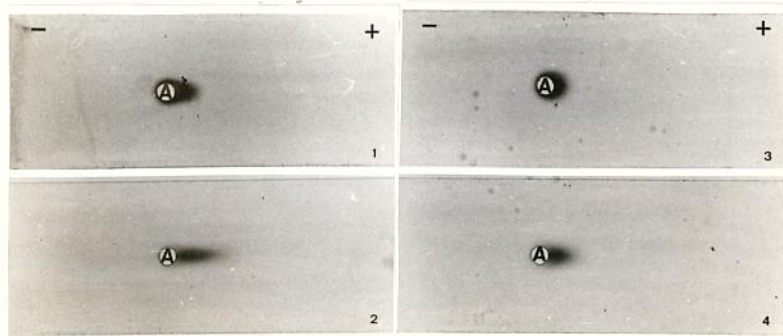


Figura 10. Eletroforese comparada em gel de agar a 1%: (1-2) S-NaCl de C.a.A em Veronal; (3-4) S-NaCl de C.a.A em PBS. Tempos de 30 e 60 minutos, respectivamente.

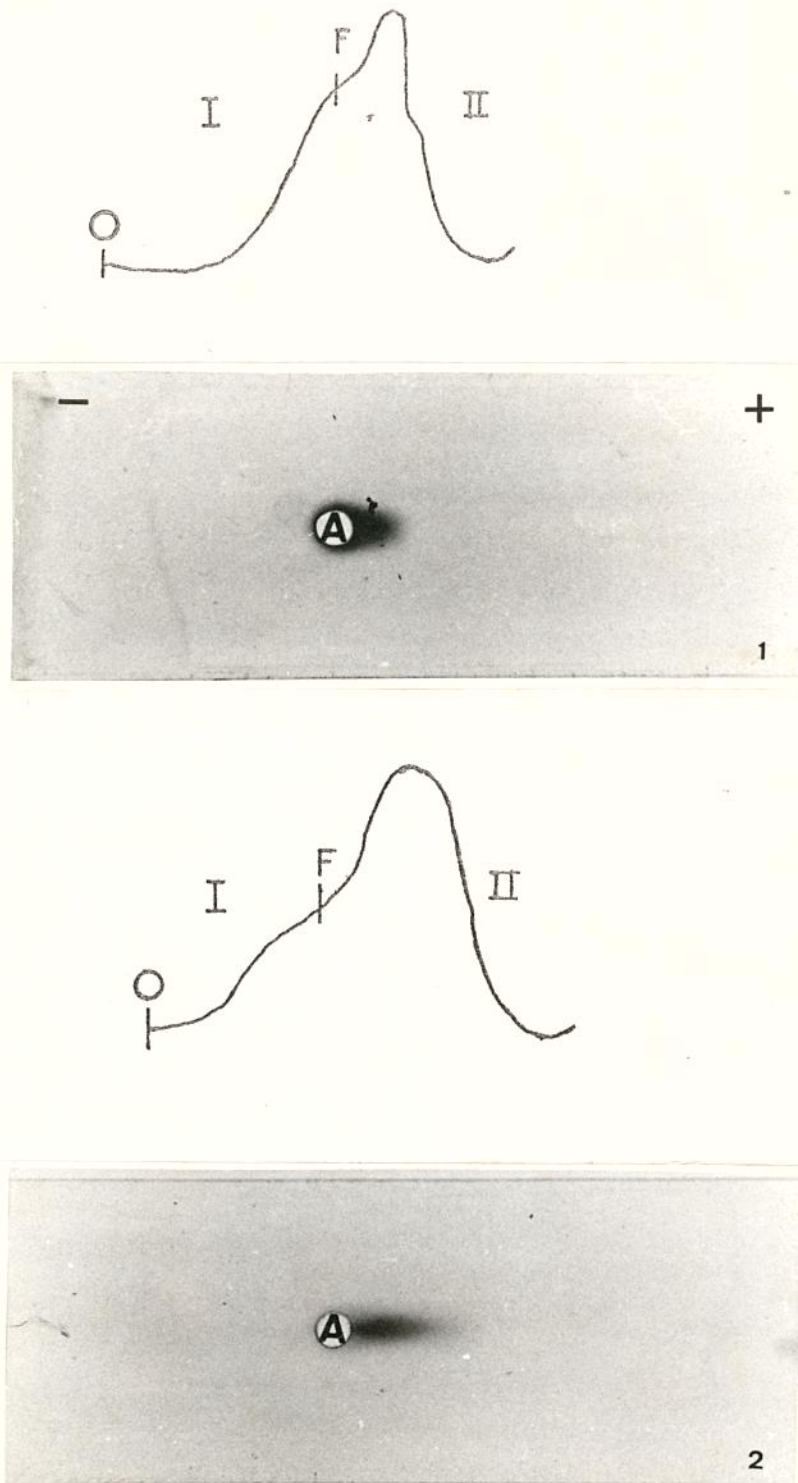


Figura 11. Curvas obtidas em densitometria das eletroforeses em gel de agar à 1% em Tampão Veronal: (1) C.a.A tempo de 30'; (2) C.a.A tempo de 60 minutos.

VII - DISCUSSÃO

Os resultados dos testes serológicos indicaram que antígenos podem ser obtidos a partir de extratos solúveis (em cloreto de sódio - 2,5%) de sementes de *Coffea arabica* para aplicação em estudos de relações de afinidade serológica. Estas observações vêm confirmar os resultados obtidos por PAYNE *et al.* (1973), os quais demonstraram que extratos solúveis em cloreto de sódio 2,5% de sementes, analisados pela técnica de eletroforese de disco, apresentaram um maior número de bandas proteicas do que a de outros extratos. Para folhas cotiledonares, melhores resultados foram obtidos empregando-se extratos solúveis em tampão borato 0,05M + 0,2% NaCl p^H 8,0. Os resultados aqui apresentados e os obtidos por PAYNE *et al.*, sugerem que tal valor antigênico, se deve, em grande parte, à presença de proteínas.

Alguns autores têm empregado extratos solúveis em estudos taxonômicos. FUKS & TOROS (1966) usaram extratos solúveis em cloreto de sódio 0,85% de sementes como antígenos para aplicação em estudos dos componentes antigênicos de *Coffea*. FAIRBROTHERS (1968), demonstrou que extratos de esporos, polem, folhas ou sementes solúveis em tampão borato p^H 8,0 + 0,2% NaCl podem ser empregados em estudos de relações de afinidade serológica. Essas observações, mostram que não há um senso comum em relação ao método empregado na obtenção de extratos solúveis, para aplicação em estudos serológicos.

Paralelamente ao emprego dos extratos solúveis de sementes como antígenos, experiências foram efetuadas diretamente com a farinha delipidificada ultrafina (FD). Os resultados obtidos nos testes serológicos de dupla difusão Figura 1 pág. 23 com antissoros para as substâncias solúveis e a farinha delipidificada em reação com antígenos (S-NaCl), demonstraram que os determinantes antigênicos observados apresentam identidade quando submetidos ao mesmo teste. Tal fato indica que os anticorpos obtidos como resposta aos determinantes antigênicos inicialmente são os mesmos, sugerindo que há vantagens em se utilizar a farinha delipidificada. Experiências anteriores têm demonstrado que, quer seja para polem, folhas, esporos ou sementes, o emprego de extratos solúveis na obtenção de antígenos é um processo seletivo para os determinantes antigênicos, estando na dependência do tipo de solução que se utiliza para a extração. Os antissoros assim obtidos, são formados somente em resposta àqueles determinantes antigênicos que foram solubilizados. O emprego da farinha de sementes deixa de ser seletivo, sendo que num processo contínuo de formação de anticorpos, haveria um reconhecimento da estrutura como um todo, tornando os antissoros assim obtidos, mais capazes para estabelecer diferenças específicas.

Os resultados aqui obtidos nos testes serológicos de dupla difusão e imunoeletroforese com antissoros para FD e S-NaCl, permitiram a identificação dos determinantes antigêni

cos nas reações. Os antissoros utilizados nas reações apresentaram títulos de 1:16, 1:32 e 1:64 quando determinados pelo teste de Ouchterlony. Tal fato sugere que antissoros de baixo título permite a obtenção de melhores resultados para aplicação em estudos de relações de afinidade serológica. Estes resultados vêm confirmar observações feitas por KAPALA *et al.* (1975), cujas análises demonstraram que a comparação dos antígenos em estudos serológicos aplicados à cevada, foi grandemente dificultada quando se utilizaram antissoros de alto título, sendo a complexidade dos sistemas imunoprecipitantes um fator limitante na identificação dos determinantes antigênicos.

O estudo dos sistemas imunoprecipitantes presentes nos testes serológicos de dupla difusão e imunoeletroforese com os antissoros obtidos e os antígenos (S-NaCl) sugerem, que pelo menos 3 determinantes antigênicos podem ser utilizados em estudos taxonômicos de *Coffea arabica*. O número de linhas de precipitação observados para dupla difusão e imunoeletroforese foi, respectivamente, de 2,3 e 3 linhas para o homólogo cultivar Arabica. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por FUKS & TOROS (1966), os quais trabalhando com espécies, variedades e cultivares do gênero *Coffea*, demonstraram que dentre as amostras, o cultivar Arabica apresentou 3 linhas de precipitação nas reações de dupla difusão e imunoeletroforese. É possível, no entanto, que os determinantes antigênicos aqui observados, e aqueles obtidos por FUKS & TOROS não sejam os mesmos, levando-se em conta que a metodologia empregada na obtenção dos antígenos não foi a mesma. Tais resultados sugerem que essas observações não são comparáveis, estando os resultados na dependência do tipo de antígeno que se emprega.

As experiências, em que foram introduzidas modificações nos testes serológicos de dupla difusão e imunoeletroforese indicam que há um gradiente de concentração envolvido em tais sistemas de reações, sendo que o tipo de tampão, tempo

de colocação dos reagentes (antígeno e antissoros) e distância entre os orifícios, podem constituir fatores limitantes nessas reações. Esta idéia se justifica pela variabilidade observada nas reações de dupla difusão Figura 6 pág.28, e nos testes de imunoeletroforese Figuras 8 e 9 pág.30-31, onde se verificou que o tempo de colocação dos reagentes e distâncias entre os orifícios influenciaram na interpretação dos resultados. A obtenção do ótimo de reação através de testes de diluição dos reagentes e utilização de distâncias adequadas entre os orifícios, mostra por outro lado que essa variabilidade pode ser evitada.

Os resultados obtidos na determinação do teor proteico dos extratos solúveis da planta individual e da mistura de plantas do cultivar Arabica estiveram entre valores de 0,75 e 1,13%. Esses resultados foram diferentes daqueles obtidos por AMORIM (1972). É possível, no entanto, que fatos como a coleta, extração e tratamento das substâncias das sementes tenham influenciado nos resultados obtidos. Aliás, esse mesmo autor mostra claramente em suas revisões a complexidade de tais determinações quando aplicadas ao material de café.

As experiências de eletroforese em gel de agar realizadas para a verificação de bandas proteicas, de substâncias solúveis do cultivar Arabica mostram que essa técnica tem um poder de resolução menor quando comparada com outras técnicas. Observações feitas por FUKS & TOROS (1966), analisando extratos solúveis de sementes pela técnica de eletroforese em agar e em papel, mostraram apenas uma fração dos componentes para o cultivar Arabica. PAYNE *et al.* (1973) referem-se às substâncias solúveis de C.a.A e Ca.a.Mix onde os resultados obtidos em eletroforese de disco mostraram a presença de 8 a 11 componentes com mobilidade eletroforética revelados pela técnica de coloração de proteínas.

O conjunto de dados apresentados no presente trabalho, particularmente o método de obtenção de antígenos, o preparo de antissoros e a padronização dos testes serológicos de dupla difusão e imunoeletroforese, indica que o emprego de téc

nicas simples e bem padronizadas, pode contribuir para o estudo de relações de afinidades sorológicas aplicáveis ao gênero *Coffea*.

VIII - CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- a injeção de S-NaCl e FD (farinha de sementes) de café, induzem a formação de anticorpos em coelhos. Os antissores obtidos pela inoculação desses antígenos, reagem com o antígeno homólogo e apresentam reações cruzadas com os antígenos heterólogos usados nos testes de dupla difusão e imunoeletroforese.

- o extrato solúvel em cloreto de sódio 2,5% (S-NaCl) obtido de sementes de café, contém pelo menos dois componentes de mobilidade eletroforética diferente.

- a variabilidade observada nas modificações introduzidas nos testes serológicos para o caso específico de

Coffea arabica demonstram a necessidade de se padronizar as reações. As modificações feitas quanto à colocação dos reagentes (antígeno e antissoro) em tempos pré-determinados sugerem um gradiente de concentração envolvido no sistema e a necessidade de se testarem diluições de ambos os reagentes, para se encontrar o ótimo da reação.

IX - LITERATURA CITADA

AMORIM, H.V. - 1972 - Relações entre alguns compostos orgânicos do grão do café verde com a qualidade da bebida. Tese de Doutorado ESALQ - USP, Piracicaba, 136 p.

CHERRY, J.P.; F.R.H. KATTERMAN & J.E. ENDRIZZI - 1969 - Comparative studies of seed proteins of species of *Gossypium* by gel electrophoresis. *Evolution* 24:431-447.

FAIRBROTHERS, D.E. - 1966 - The Comparison and Interpretation of Serological Data in Plant Systematics. In: Z.Landa (ed.) Mechanism of Mutation and Inducing factors. Proc.Sym. Mutational Process. Topic IV; Evolution of Protein characters. Czechoslovak Acad.Sci. Prague, Czechoslovakia, pp.458-464.

- FAIRBROTHERS, D.E.* - 1968 - Comparisons of proteins obtained from diverse plant organs for chemosystematic research; *Bioch.*, 6:95-103.
- FAIRBROTHERS, D.E.* - 1971 - The use of protein data in evaluating plant relationships and differentiation. In: Factors regulating the immune response. First Romanian Academy of Medical Science. Bucharest, Romania (Abstracts), 121-123.
- FAIRBROTHERS, D.E. and MARION A. JOHNSON* - 1964 - Comparative serological studies within the Families Cornaceae (Dogwood) and Nyssaceae (Sour Gum). In: Leone, Charles A. (ed.) *Taxon. Biochem. and Serol.* Ronald Press. New York.
- FUKS, A.M and EILER F. TOROS* - 1966 - Componentes antigênicos de *Coffea*. Diferenciação serológica entre espécies e variedades de sementes de café. *Anais de Microbiologia*, 14: 149-176.
- GHETIE, V.* - 1966a - Evolution of protein characters in ontogenesis of higher plants. In: Z. Landa (ed.) *Mechanism of Mutation and Inducing factors. Proc. Sym. Mutational Process. Topic IV; Evolution of Protein characters.* Czechoslovak Acad. Sci. Prague, Czechoslovakia, pp. 489-503.
- GHETIE, V.* - 1966 - A hypothesis on the mechanism of reserve proteins hydrolysis during seed germination. *Revue Roum. Bioch.*, 3:353-361.
- JOHNSON, M.A. and D.E., FAIRBROTHERS* - 1964 - Comparative phyto-serological studies as an aid in evaluating relationships, 10th Internat. Bot. Congr. Abstracts pp. 145-146.
- KAPALA, A., I. WIATROSZEAK and J. PRZYLSKA* - 1975 - Comparative Serological Studies in Barley *Hordeum Vulgare* 4.5.1; *Gen. Polonica* 16(1) 53-60.

- KLOSOVA, E.* - 1966 - Interrelations among several species of the genus *Phaseolus*. Studied by immunochemical methods. In: Z. Landa (ed.) Mechanism of Mutation and Inducing factors. Proc. Sym. Mutational Process. Topic IV; Evolution of Protein characters. Czechoslovak Acad. Sci. Prague, Czechoslovakia, pp. 485-487.
- KLOZ, J.* - 1964 - Chemotaxonomy of proteins with special reference to the genus *Phaseolus*. 10th Internat. Bot. Congr. (Abstracts), 145-146.
- KLOZ, J.; KLOSOVA, E. and TURKOVA, V.* - 1966a - Chemotaxonomy and genesis of protein characters with special reference of to the genus *Phaseolus*. *Preslia*, 38:229-236.
- KLOZ, J.; KLOSOVA, E. and TURKOVA, V.* - 1966b - Protein characters and relationship between *Phaseolus vulgaris* ssp. *aborigeneus*. Burk. and related taxa of the genus *Phaseolus*. *Biologia*, 6:187-196.
- LISSITZIN, M. A. und N.S. ALEXANDOWSKAJA* - 1935 - Über die chemische Zusammensetzung der Störprotamine. *Hoppe Seyler Zsch. F. phy. Chemie.*, 238:54-58.
- LOWRY, O. H.; N.J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R.J. RANDAL* - 1951 - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biol. Chem.* 193:265-295.
- MORITZ, O.* - 1966 - Revealing systematical distribution of protein characters by serological methods. In: Z. Landa (ed.) Mechanism of Mutation and Inducing factors. Proc. Sym. Mutational Process. Topic IV; Evolution of Protein characters. Czechoslovak Acad. Sci. Prague, Czechoslovakia, pp. 443-457.
- OLIVEIRA, A. R.* - 1967 - Serologia aplicada ao estudo do virus do anel do pimentão - Tese de Doutorado ESALQ - USP, Piracicaba, 40p.

- OLIVEIRA, A. R.; R. G. PAYNE and D.E. FAIRBROTHERS - 1972 -
Disc electrophoretic investigation of malate dehydrogenase
(MDH) isoenzymes and general protein (GP) extracted from
cotyledons of two *Coffea* species. *Brittonia* (Abstracts),
24:124.
- OLIVEIRA, A. R.; R. G. PAYNE and D.E. FAIRBROTHERS - 1973 -
Disc electrophoretic investigation of *Coffea arabica* and
Coffea canephora - general protein (GP) and malate dehydro-
genase of cotyledonary leaves. *Acta. Soc. Bot. Poloniae*,
42(2):301-308.
- OUCHTERLONY, O. - 1949 - Antigen:antibody reactions in gels.
Ark. Kemi. Geol., 266:14.
- OUCHTERLONY, O. - 1958 - Diffusion in gel methods for immuno-
logical analysis. In: *Progress in Allergy*. S. Karger, Basel,
New York, 5:1-78.
- OUCHTERLONY, O. - 1962 - Diffusion in gel methods for immuno-
logical analysis. In: *Progress in Allergy*. S. Karger, Basel,
New York. 6:30-154.
- PAYNE, R.C.; A.R. OLIVEIRA and D.E. FAIRBROTHERS - 1973 - Disc
electrophoretic investigation of *Coffea arabica* and *Coffea*
canephora: General protein malate dehydrogenase of mature
seeds. *Biochem. Syst.*, 1:59-61.
- PAYNE, R.C.; A.R. OLIVEIRA and D.E. FAIRBROTHERS - 1973 - Disc
electrophoretic investigation of *Coffea arabica* seed pro-
teins soluble in four extraction systems. *Rev. Roum.*
Biochem., 10:55-59.
- SILBERSCHMIDT, K. - 1936 - A importância da espécie no siste-
ma das plantas e a tentativa de sua delimitação por novos
métodos. *Arch. Inst. Biol.* 7(3).33:50.

STEWART, F.C. and J.T. BARBER - 1964 - The use of acrylamide gel electrophoresis in the investigation of the soluble proteins of plants. Ann. New York Acad. Sci., 121:525-531.