

LINO SAMUEL ALMEIDA LARANGEIRA

**ESTUDO DOS CITOCROMOS E DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM SOJA
(Glycine max. (L.) Merrill, var. Sta. Rosa)**

TESE DE MESTRADO APRESENTADA AO DEPARTAMENTO
DE BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ

CURITIBA - 1977

*Aos meus pais,
com gratidão, pela formação
que me conferiram.*

*A minha família,
com amor, por quem vivo e
realizo.*

Tese orientada pelo

Dr. DINOR OLEGÁRIO VOSS

ÍNDICE

1.0 - INTRODUÇÃO	2
2.0 - MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1.0 - Material	4
2.2.0 - Isolamento das mitocôndrias	4
2.3.0 - Polarografia	6
2.4.0 - Determinação de proteína	9
2.5.0 - Espectrofotometria Diferencial	9
2.6.0 - Microscopia eletrônica	10
RESULTADOS	11
3.1.0 - Polarografia	11
3.2.0 - Espectrofotometria	16
3.3.0 - Microscopia Eletrônica	18
4.0 - DISCUSSÃO	25
5.0 - CONCLUSÕES	31
6.0 - RESUMO	32
6.0 - SUMMARY	33
7.0 - AGRADECIMENTOS	34
8.0 - BIBLIOGRAFIA	35

1.0 - INTRODUÇÃO

A pesquisa sobre o sistema de transporte de electrons em mitocôndrias vegetais é relativamente recente.

Durante a década de 1950 à 1959, destaca-se o trabalho de SCHNEIDER (44), o qual fez uma ampla descrição do metabolismo mitocondrial animal e discute critérios para avaliação da integridade funcional das mitocôndrias. À esta década pertence, também, o trabalho de GREEN (22), o qual cobre extensa gama de aspectos do sistema de transporte de electrons.

HILL e HARTREE (24) em 1953, verificaram que são baixas as concentrações dos componentes da cadeia respiratória de mitocôndrias vegetais, relativamente aos valores conhecidos para as mitocôndrias de tecidos hepático e cardíaco.

O período de 1960 à 1969 é bem mais rico em pesquisa sobre mitocôndrias de origem vegetal. Assim em 1963, CHERRY (16), trabalhando com amendoim, estudou as modificações sofridas pelas mitocôndrias durante a germinação.

Em 1966, BREIDENBACH, CASTELFRANCO e PETERSON (10), publicaram um trabalho sobre biogênese de mitocôndrias e em 1968 SARKISSIAN e SRIVASTAVA (42), propuseram um método para isolamento de mitocôndrias de plântulas de trigo.

O trabalho de BONNER e VOSS (7), em 1961, com couve-flor e batata doce demonstrou a vantagem da utilização de tecidos aclorofilados para o isolamento de mitocôndrias firmemente acopladas.

É variável a natureza do material utilizado pelos autores de modo geral. WILSON e BONNER (48), estudaram a velocidade de consumo de oxigênio de suspensões mitocondriais preparadas a partir de embrião de amendoim, enquanto que, NAWA e ASAHII (38) o fizeram em sementes de ervilha, tendo sido constatada tanto pelos primeiros como pelos últimos autores, um aumento de atividade respiratória durante a germinação.

O uso de plântulas é bem mais generalizado do que o de outros tecidos de origem vegetal. O hipocótilo tem sido o material básico para o estudo da cadeia respiratória em vegetais, como o atestam os trabalhos de AKASAWA e BEEVERS (2) em 1957, EARNSHAW e TRUELOVE (18) em 1968, MALHOTRA e SPENCER (34) em 1970, NAWA e ASAHI (38) em 1971 e mais recentemente SATO e ASAHI (43) em 1975 e BOWMAN, IKUMA e STEIN (9) em 1976.

CHERRY (16) em 1963, demonstrou que há modificações estruturais em mitocôndrias de amendoim à medida que as sementes germinavam, Segundo este autor, a estrutura interna mitocondrial evolue e se aperfeiçoa durante a germinação. Este fato foi confirmado por NAWA e ASAHI (38) em 1971, observando um aumento da velocidade de consumo de oxigênio das suspensões mitocondrias de plântulas de ervilha, relativamente às suspensões mitocondriais de sementes.

BILS *et al* (4) em 1963 estudaram as atividades metabólicas de cotilédones de plântula de soja enquanto que ABUSHAKRA *et al* (1) em 1967 utilizaram o eixo da plântula (epicótilo, hipocótilo e raiz), removendo apenas os cotilédones. As relações ADP:O das suspensões mitocondriais de plântulas originadas de sementes estocadas há três anos, foram de 40 a 70% menores do que as relativas à sementes colhidas no ano.

BREIDENBACH, CASTELFRANCO e PETERSON (7), demonstraram que a atividade enzimática é bastante baixa em sementes de amendoim, aumentando ao longo da germinação.

Neste trabalho são estudados os citocromos, as velocidades de consumo de oxigênio e a fosforilação oxidativa da fração mitocondrial de soja (*Glycine max* (L.) Merrill, var. Sta. Rosa) isolada a partir de embriões sem germinação e de hipocótilos de plântulas com dois e cinco dias de germinação.

2.0 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1.0 - Material

O presente trabalho abrange o estudo de mitocôndrias isoladas da soja (*Glycine max* (L.) Merrill var. Sta. Rosa), não somente a partir de sementes, ou mais especificamente de seus embriões, mas também, de hipocótilos de plântulas de dois e de cinco dias de germinação.

Todas as sementes utilizadas pertenceram à safra de 1976, ano ao longo do qual, foram feitas as análises. Em virtude de seu ótimo estado de conservação, não sofreram tratamento com fungicida algum. Foram produzidas plântulas saudáveis com insignificante grau de contaminação. Uma cuidadosa seleção das mesmas para o isolamento de mitocôndrias, eliminou os poucos exemplares contaminados.

As sementes pesaram em média 0,15 g, com 12% de umidade e apresentaram um poder de germinação da ordem de 90%. Foram gentilmente cedidas pela Seção de Sementes do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná - I.B.P.T..

As siglas utilizadas correspondem aos seguintes produtos:

- ADP - 5'-difosfato de adenosina - (sigma)
- BSA - Soro-albumina bovina - (sigma)
- EDTA - Ácido etileno diaminotetracético - (sigma)
- HEPES - Ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina N'-2-etano sulfônico - (sigma)
- NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida - (sigma)
- P.A. - "Pro-analisi" ou quimicamente puro (a).

2.2.0 - Isolamento das mitocôndrias

O método utilizado foi baseado nos trabalhos de BONNER e VOSS (7), BONNER (6) e IKUMA (25), com modificações.

As sementes foram lavadas e embebidas com água destilada a fim de facilitar a extração dos embriões. Esta extra-

ção dos embriões. Esta extração é demorada, exigindo para 600 g de sementes, de 5 à 6 horas.

Exaustivamente foi experimentada a técnica de triturar as sementes inteiras mas os resultados obtidos não foram de modo algum satisfatórios.

Triturar a semente inteira conduz à inclusão de um conjunto de reservas e mesmo tecidos que não desempenharão papel significativo no processo do desenvolvimento (48).

Este procedimento metodológico está justificado pelo fato de que no embrião estão localizados os tecidos organizados, destinados à dar origem, através de seu desenvolvimento e complexas diferenciações, aos diversos órgãos da planta.

Para a obtenção das plântulas, as sementes foram germinadas à temperatura de 28°C (28), com umidade relativa de 50% (6) e em ausência de luz (28). Foram obtidas plântulas com idade de 2 e 5 dias. A inclusão do período de germinação de 2 dias é justificado pela finalidade de obtenção de maior número de dados e informações intermediárias entre o embrião e os hipocótilos de 5 dias, permitindo melhor apreciação de seu desenvolvimento. Este desenvolvimento está espelhado nos resultados das tabelas I à III e gráficos da Figura II à IV, e será objeto de discussão no capítulo 4.0.

A maioria dos autores trabalham, embora com outros vegetais, com hipocótilos de 5 à 7 dias (20, 26, 27, 28, 35).

A trituração foi feita manualmente em gral de porcelana, mantido em cuba de gelo (41), em mistura com solução de extração. A relação entre o volume de tecido para o de meio, foi mantida em torno de 1:2 (26). Esta fase é crítica, eis que está sempre presente o perigo de dano à integridade da membrana mitocondrial, resultando baixa capacidade de fosforilação da suspensão a ser obtida e conduzindo conseqüentemente, à relações ADP:O muito baixas. Neste trabalho foi constatado que maceração intensa permite a obtenção de um "pellet" mitocondrial com maior massa, mas com baixas relações ADP:O. Uma trituração cuida

dosa e delicada, conduz à menor rendimento de proteína mitocondrial, mas com melhores relações ADP:O.

A importância desta fase do trabalho está espelhada nas recomendações de IKUMA (25) o qual, entre outras, preconiza triturar perfazendo apenas 15 passagens giratórias - "giratory strokes" - com o pilão, para cada porção de hipocótilos.

A solução de extração utilizada, teve a seguinte composição: manitol 0,5 M, HEPES 20 mM, EDTA 1,0 mM, BSA 0,01% e cisteína 0,01%. O pH foi ajustado com solução 5 M de KOH para 7,2 - 7,3. Tanto a preparação da solução como a correção do pH foram sempre realizadas na ocasião da utilização.

Após triturado, o material foi então, filtrado em 6 camadas de gaze e após sofreu nova filtração. Antes da centrifugação o pH foi novamente ajustado para 7,2 - 7,3. Todas as operações, desde as preparações iniciais até ao presente momento, foram realizadas em banho de gelo a fim de que a temperatura fosse mantida sempre entre 0°C e 4°C.

A centrifugação diferencial foi realizada em centrífuga refrigerada, Sorvall RC-2B, em temperatura entre 0°C e 4°C. Foram testados muito esquemas de centrifugação, a maioria com resultados pouco satisfatórios. Na figura I está representado o resumo da técnica de fracionamento por centrifugação utilizada.

2.3.0 - Polarografia

As determinações do consumo de oxigênio foram realizadas com eletrodo de oxigênio, modelo fabricado pela firma "RANK-BROTHERS" (Cambridge - Inglaterra), à temperatura constante, de 25°C.

A solução de reação foi preparada segundo BONNER (6) e IKUMA (25), e teve a seguinte composição: manitol 0,5M KCl 10 mM, MgCl₂ 5mM, e tampão fosfato 10 mM com pH ajustado para 7,2 - 7,3. O volume final do meio de reação na cubeta do eletrodo foi de 2,8 ml. O meio acima difere, relativamente ao dos auto

res citados, pela modificação da concentração de manitol de 0,3 M para 0,5 M.

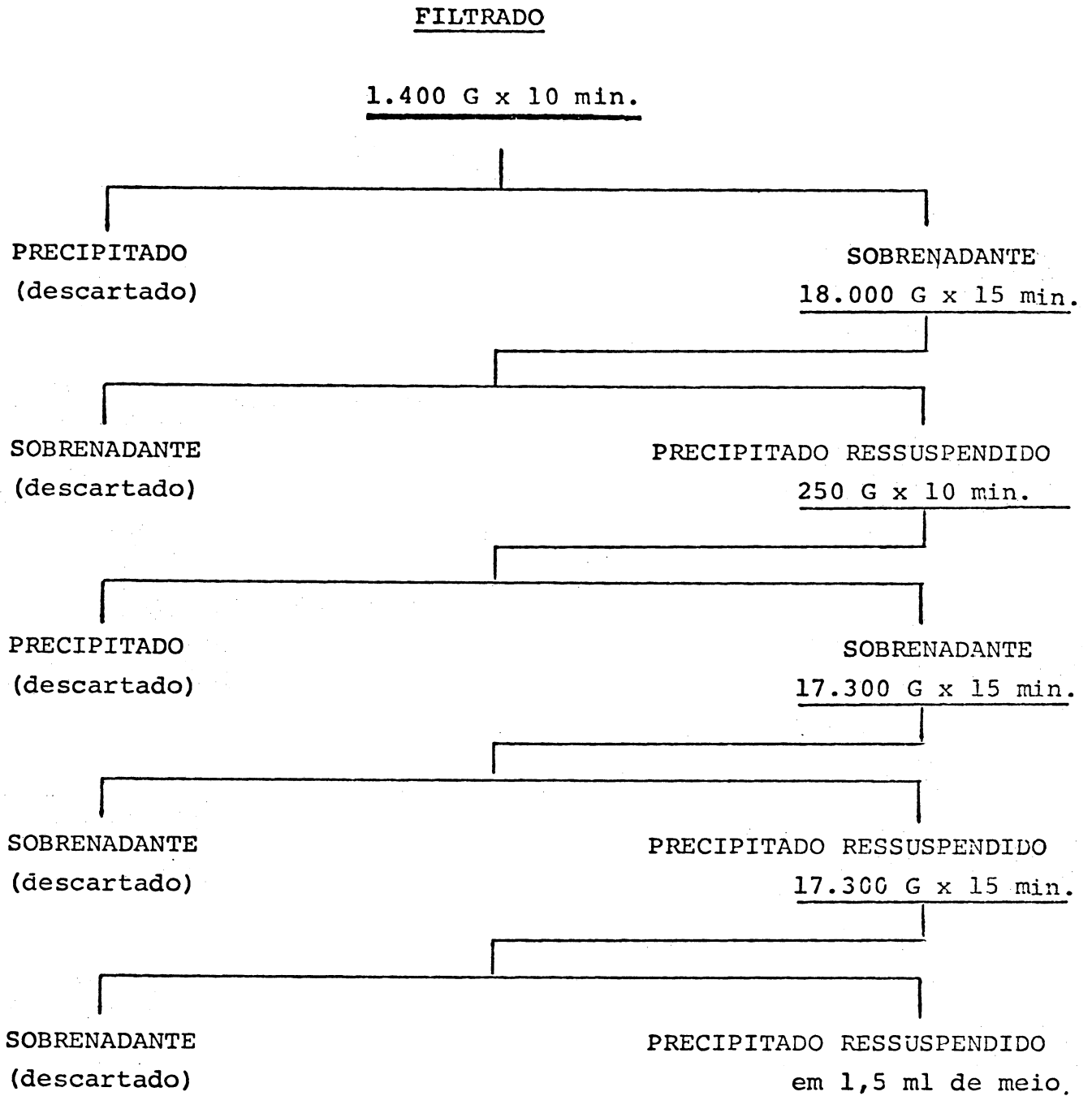


Figura I - Técnica utilizada de fracionamento por centrifugação.

A relação ADP:O foi expressa como a razão entre o número de micromoles de ADP adicionados ao meio de reação e o número de microatogramas de oxigênio consumidos durante o estado metabólico ativado 3 (19). Segundo CHANCE *et al.* (14), a quantidade de oxigênio consumido é proporcional à concentração de ADP presente na suspensão. Este fato implica em que, a duração da ativação da respiração mitocondrial, se relacione com a maior ou menor quantidade de ADP que foi fosforilado à ATP.

O coeficiente respiratório foi calculado como a razão entre a velocidade de consumo de oxigênio relativa ao estado metabólico ativado, número 3, em presença de ADP e a velocidade de consumo de oxigênio relativa ao estado metabólico 4, após o consumo de ADP (15)

Tanto a relação ADP:O como o coeficiente respiratório, são importantes parâmetros na avaliação da integridade funcional mitocondrial.

Para o teste "t" foi empregada a fórmula

$$\underline{t} = \frac{\bar{x}_i - \bar{x}_j}{\sqrt{\left(\frac{N_i s_i^2 + N_j s_j^2}{N_i + N_j - 2} \right) \left(\frac{1}{N_i} + \frac{1}{N_j} \right)}}$$

devido a que o número de amostras foi inferior a 30.

2.4.0 - Determinação de proteína

As concentrações de proteína, expressas em mg/ml foram determinadas pelo método de LOWRY *et al.*, usando albumina bovina como padrão (32). As leituras foram feitas com espectrofotômetro AUS-JENA.

2.5.0 - Espectrofotometria Diferencial

Os espectros diferenciais foram obtidos por meio

de Espectrofotômetro Registrador Diferencial, "split-beam" segundo o modelo descrito por CHANCE (13). Foi utilizada uma suspensão mitocondrial, com 20 mg/ml de proteína e passo de luz de 1 cm, contra uma alíquota da mesma, reduzida com ditionito de sódio (46). Antes de serem analisadas no espectrofotômetro as suspensões foram testadas em eletrodo de oxigênio para verificação de sua integridade funcional.

As proporções foram calculadas relativamente à concentração de citocromo a, a qual foi tomada como valor 1.

2.6.0 - Microscopia eletrônica

Depois de ensaiada no eletrodo de oxigênio, a suspensão mitocondrial foi colocada em solução de glutaraldeído a 4% e tampão cacodilato 0,15 M durante 2 horas. Após fixação foi feita em solução de tetróxido de ósmio a 2% e tampão cacodilato 0,30 M com cloreto de sódio a 0,2% por 15 min. e então colocada em acetato de uranila a 2%, assim passando a noite. Após sucessivas desidratações com soluções de concentrações progressivas e crescentes de álcool etílico absoluto, e posteriormente em acetona pura P.A. Após o material foi fixado em resina Polylite e os cortes foram realizados em ultra-micrótomo Porter-Blum-MT2-B. Os cortes foram observados e micrografados em microscópio eletrônico Philips EM-300, do Centro de Microscopia Eletrônica localizado no Centro Politécnico, da Universidade Federal do Paraná.

Com vistas a detectar uma eventual influência da osmolaridade da solução fixadora sobre o material em estudo foram preparadas e experimentadas soluções com osmolaridades que variaram entre 10% a menos e 10% a mais relativamente à solução base de 350 OsM. As variações em osmolaridade não influenciaram na qualidade das micrografias.

3.0 - RESULTADOS

3.1.0 - Polarografia

A tabela I apresenta as médias das velocidades de consumo de oxigênio, coeficiente de controle respiratório e relações ADP:O para os diversos substratos em diferentes tempos de germinação.

A análise estatística está apresentada nas tabelas II e III. Na primeira estão relacionadas os substratos, o tempo de germinação e as relações ADP:O, enquanto na segunda, estão os valores encontrados para o "t" de STUDENT. A análise foi feita com significância de 1% e 5%.

TABELA I

Médias de Velocidades Respiratórias, Coeficientes de Controle Respiratório e Relações ADP:O, de Suspensões Mitocôndriais de Embrião e Hipocótilos de Soja com Diversos Tempos de Germinação.

Substrato	Tempo (dias)	Respiração $\mu\text{MO}_2/\text{seg}/\text{mg P}$			C.R.	ADP:O	Nº exp.
		s/ADP	c/ADP	Após cons. ADP.			
Succinato	0	0,05	0,15	0,06	2,50	1,16	6
" "	2	0,14	0,32	0,16	2,00	1,33	8
" "	5	0,16	0,29	0,14	2,10	1,87	12
Alfa-ceto-glut.	0	0,05	0,11	0,05	2,20	1,76	6
" "	2	0,10	0,13	0,08	1,62	2,16	6
" "	5	0,09	0,16	0,09	1,78	2,88	7
Malato	0	0,11	0,19	0,12	1,58	1,41	10
" "	2	0,08	0,18	0,11	1,63	1,70	6
" "	5	0,09	0,19	0,08	2,37	2,65	6

$\mu\text{MO}_2/\text{seg}/\text{mg}$ proteína: unidades de velocidades de consumo de oxigênio medida em micromoles de oxigênio por litro, por segundo e por miligrama de proteína.

C.R.: coeficiente de controle respiratório.

s/ADP: o estado 4 ou "idle".

c/ADP: o estado 3 ou ativado.

Após cons. ADP: o estado após consumo do ADP adicionado.

Concentração de ADP = 180 μM , concentração de substrato = 18 mM

Volume final = 2,8 ml.

TABELA II

Dados Estatísticos da Relação ADP:O Relacionados com o Tempo de Germinação e Substratos Usados.

Substrato	Tempo (dias)	\bar{x}	s	s_x	Amplitude
Succinato	0	1,16	0,32	0,31	1,00 - 1,56
" "	2	1,33	0,30	0,11	1,04 - 1,80
" "	5	1,82	0,36	0,10	1,15 - 2,17
Alfa-ceto-glut.	0	1,76	0,46	0,19	1,35 - 2,40
" "	2	2,16	0,12	0,05	2,00 - 2,35
" "	5	2,88	0,19	0,07	2,60 - 2,89
Malato	0	1,41	0,22	0,07	1,20 - 1,74
" "	2	1,70	0,14	0,07	1,44 - 1,87
" "	5	2,65	0,59	0,24	1,92 - 3,32

\bar{x} : média aritmética simples;

s: desvio padrão;

s_x : erro padrão da média;

Amplitude: valores máximos e mínimos encontrados.

Na Tabela III estão relacionados os valores "t" encontrados com os diversos períodos de germinação, para cada um dos substratos utilizados.

TABELA III

Valores do "t" de STUDENT, Para os Diversos Substratos e Períodos de Germinação, das Relações da ADP:O.

Substrato	$t_0 \times t_2$	$t_0 \times t_5$	$t_2 \times t_5$
Succinato	- 0,89	- 3,34**	- 3,02**
Alfa-ceto-glutarato	- 1,71	- 5,43**	- 6,71**
Malato	- 0,93	- 6,60**	- 3,52**

t_0 , t_2 e t_5 períodos de germinação em dias;

** valor para o "t" significativo a nível de 5%.

Nos gráficos das figuras II, III e IV está espelhado o comportamento das suspensões mitocondriais com succinato, alfa-ceto-glutarato e malato respectivamente. Para cada substrato foram testados as suspensões mitocondriais de embrião, hipocótilo de 2 dias e hipocótilo de 5 dias.

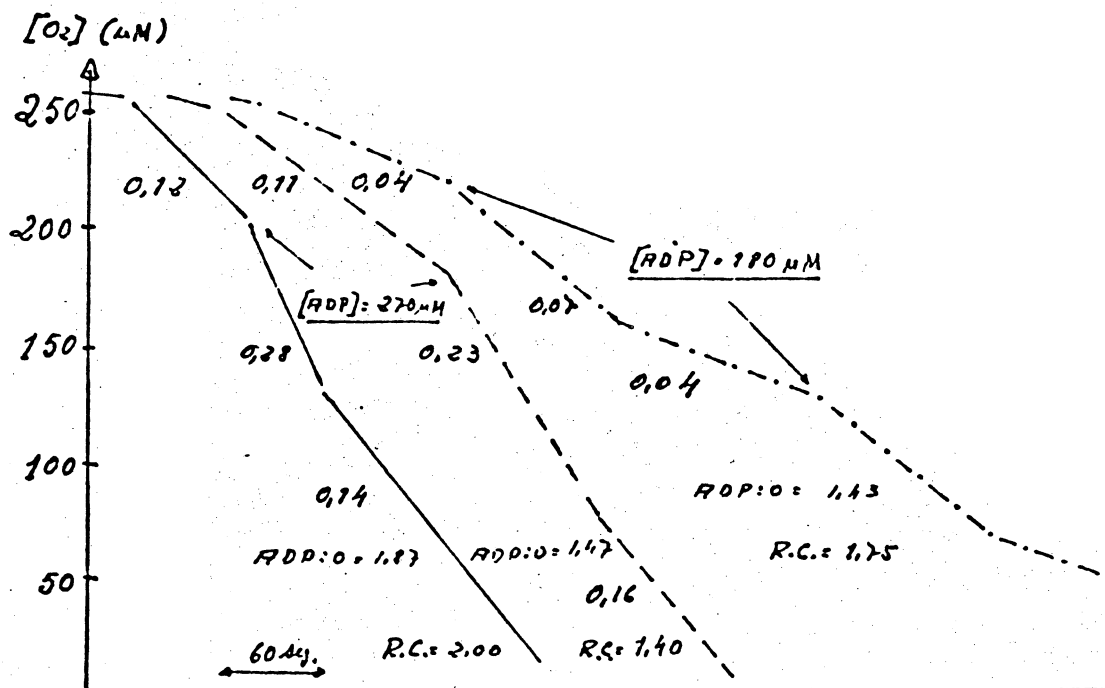


Figura II

Registro polarográfico da suspensão mitocondrial de soja.

Velocidade de consumo de oxigênio expressa em $\mu MO_2/\text{seg}/\text{mg}$ de proteína para succinato. 18 mM.

— hipocótilo de 5 dias.

--- hipocótilo de 2 dias.

-.-.- embrião.

Volume final na cubeta: 2,8 ml.

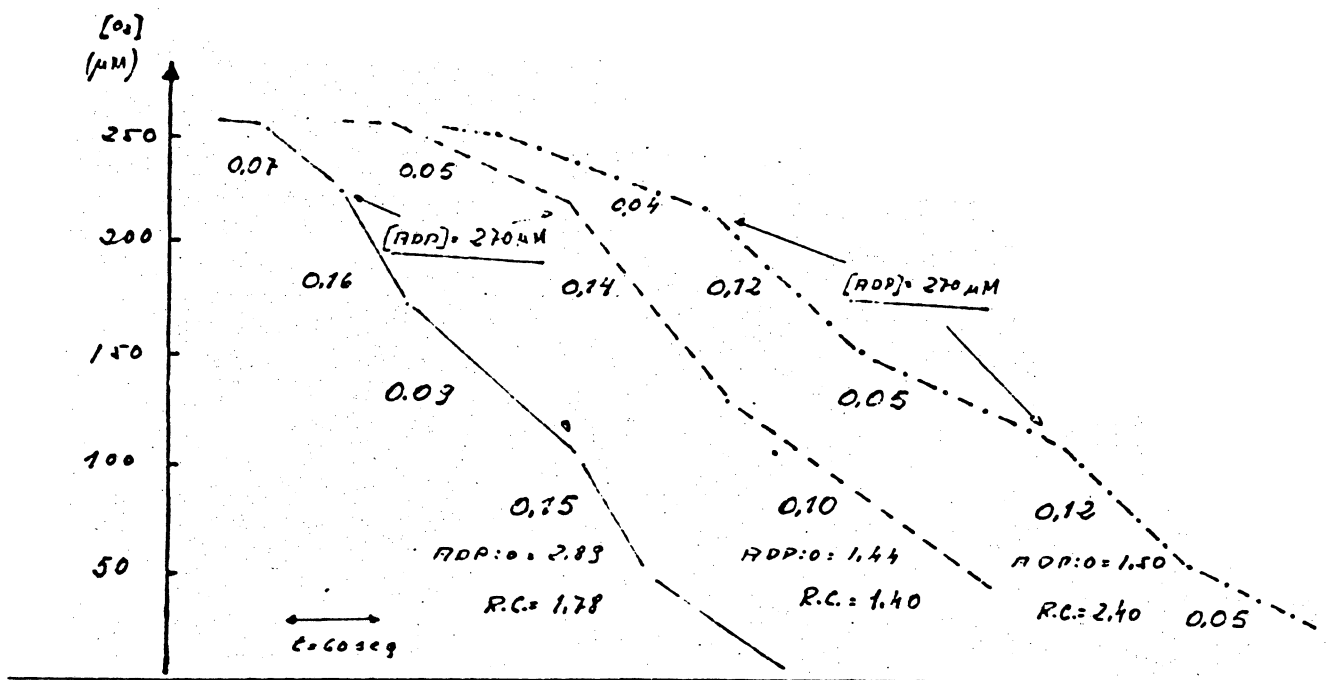


Figura III - Registro polarográfico da suspensão mitocondrial de soja.

Velocidade de consumo de oxigênio expressa em $\mu\text{MO}_2/\text{seg}/\text{mg}$ de proteína para alfa-ceto-glutarato. 18 mM.

— hipocótilo de 5 dias.

- - - - hipocótilo de 2 dias.

- . - . - embrião.

Volume final na cubeta: 2,8 ml.

84/4

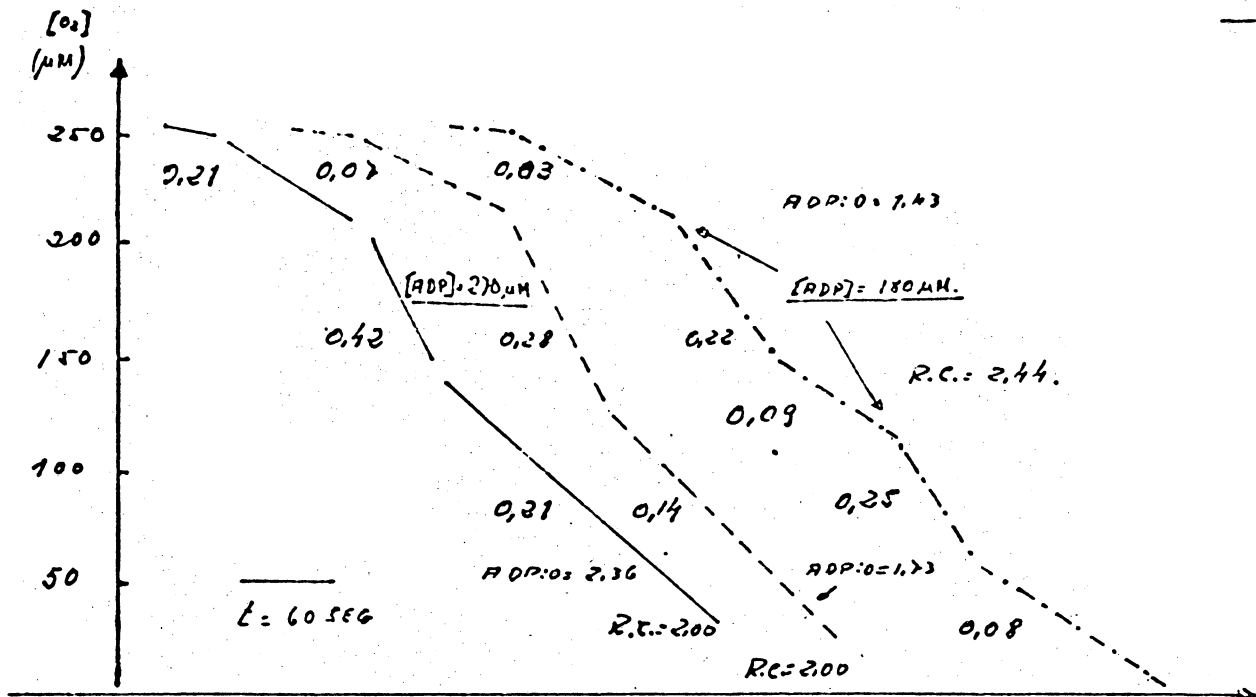


Figura IV - Registro polarográfico da suspensão mitocondrial de soja.

Velocidade de consumo de oxigênio expressa em $\mu MO_2/seg/mg$ de proteína para malato. 18 mM.

- hipocótilo de 5 dias.
- hipocótilo de 2 dias.
- .-.-.- embrião.

Volume final na cubeta: 2,8 ml.

3.2.0 - Espectrofotometria

Os cálculos das concentrações dos citocromos foram feitos com base nos coeficientes de extinção molar segundo CHANCE (11). Nas tabelas IV e V estão apresentados os valores encontrados para o Δ D.O., concentração dos citocromos e as suas proporções.

TABELA IV

Concentração de Citocromos em Mitocôndrias de Hipocótilo de Soja com 2 Dias de Germinação.

Citocromo	Δ D.O.	Epsilon	Concentração		Proporção
			x	y	
a	0,012	14	0,85	0,042	1,00
b	0,017	20	0,85	0,042	1,00
c	0,021	20	1,10	0,055	1,30
a ₃	0,035	91	0,38	0,019	0,45

Epsilon: em unidades: $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$.

Concentração x em unidades: μM .

Concentração y em unidades: 10^{-6} moles/g de prot.

Passo de luz: 1 cm.

TABELA V

Concentração de Citocromos em Mitocôndrias de Embrião de Soja com 0 Dias de Germinação.

Citocromo	Δ D.O.	Epsilon	Concentração		Proporção
			x	y	
a	0,009	14	0,64	0,032	1,00
b	0,014	20	0,70	0,035	1,09
c	0,020	20	1,00	0,050	1,56
a ₃	0,047	91	0,52	0,026	0,81

Epsilon: em unidades: $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$.

Concentração x em unidades: μM .

Concentração y em unidades: 10^{-6} /moles/g de prot.

Passo de luz: 1 cm.

As figuras V e VI, mostram respectivamente, os espectros diferenciais das suspensões mitocôndriais isoladas de embrião e hipocótilo com dois dias de germinação.

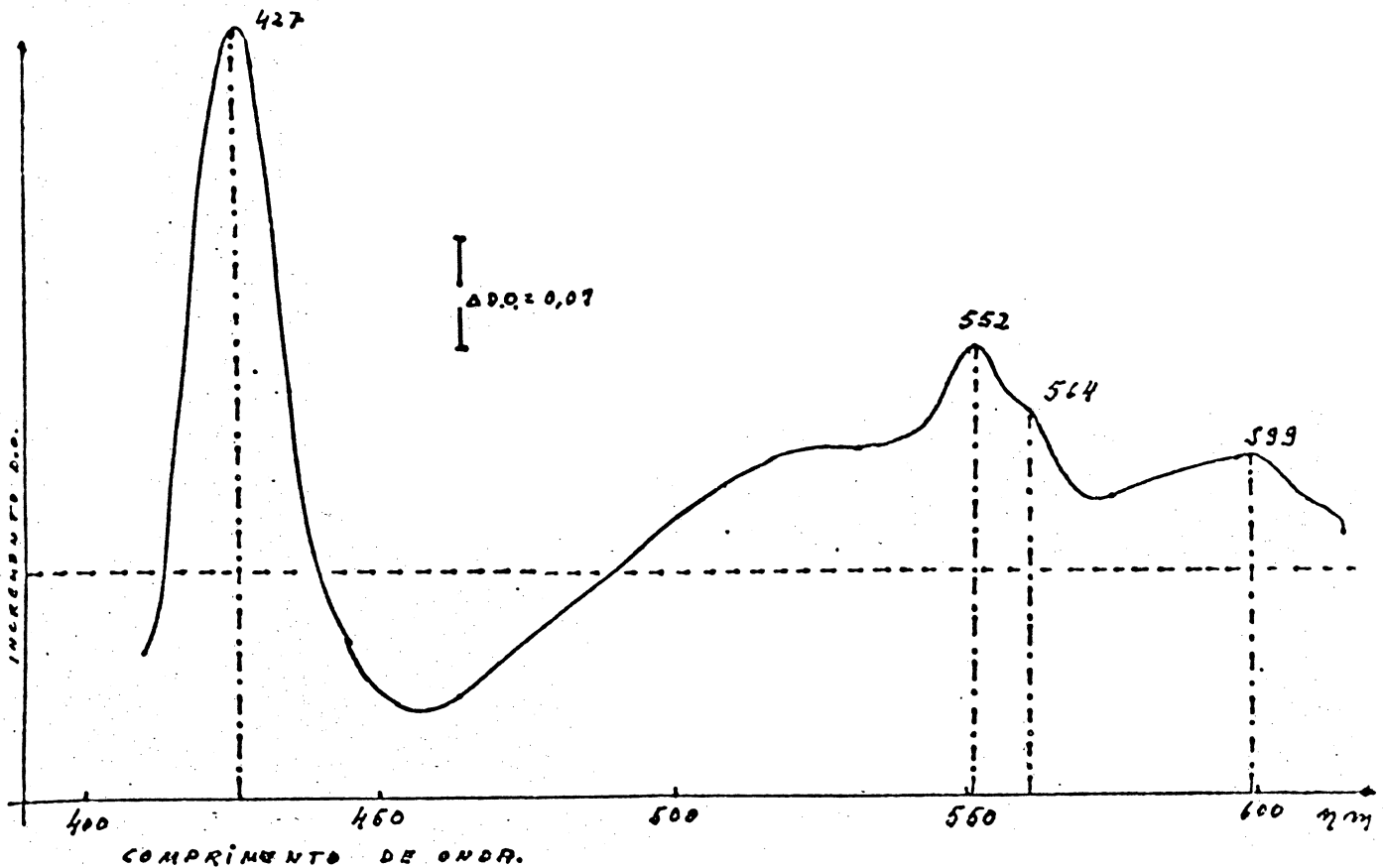


Figura V - Espectro diferencial de suspensão de mitocôndrias isoladas de embrião de soja. Temperatura ambiente. Redução com ditionito de sódio.

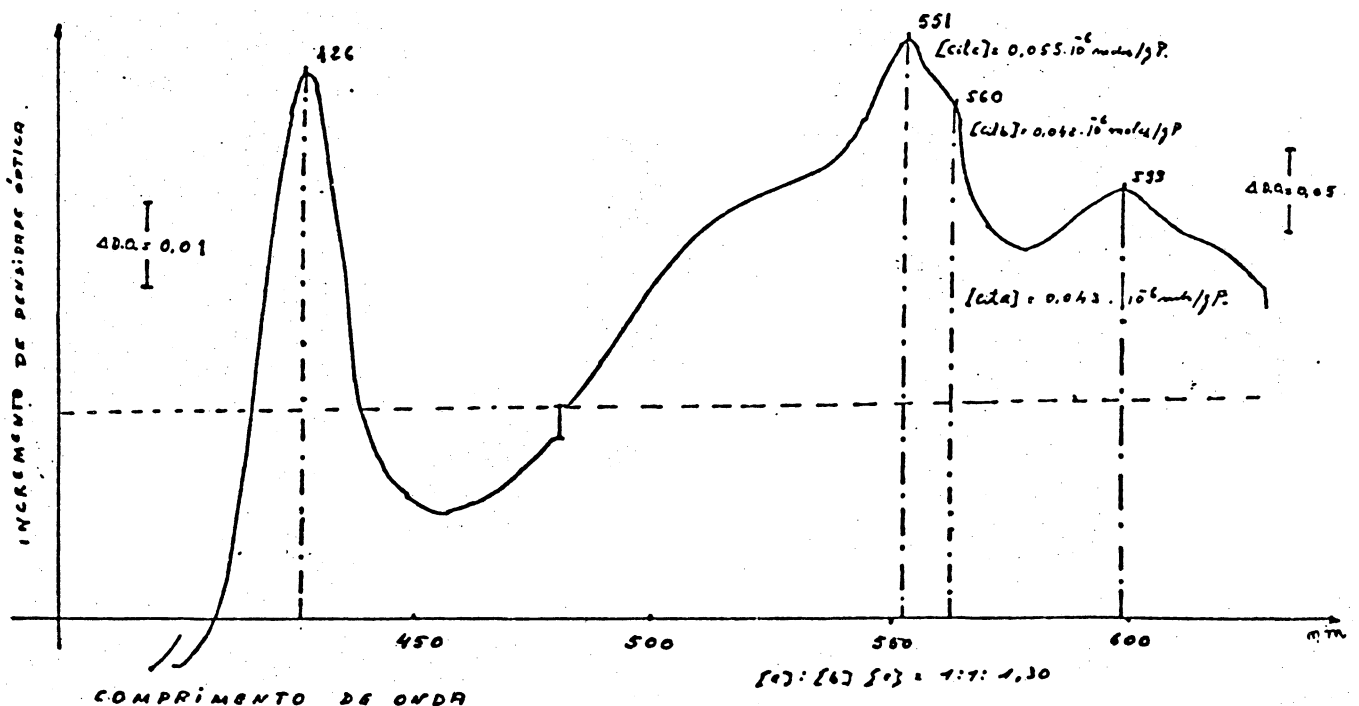


Figura VI - Espectro diferencial de suspensão de mitocôndrias isoladas de hipocótilo com dois dias de germinação de soja. Temperatura ambiente. Redução com ditionito de sódio.

3.3.0 - Microscopia Eletrônica

Todas as micrografias eletrônicas se referem à suspensões mitocondriais que foram previamente testadas no eletrodo de oxigênio, com succinato como substrato. Das suspensões foram retiradas alíquotas e a exigência estabelecida como critério foi de que a alíquota apresentasse relação ADP:O dentro dos limites das tabelas apresentadas.

Nas micrografias eletrônicas, as mitocôndrias se apresentam de modo geral, com a forma aproximada de uma elipse, o que revela possuírem em três dimensões uma forma variável entre um elipsóide de revolução e a ovóide. Foram identificados três tipos básicos, arbitrariamente denominados A, B e C. As três denominações tem a finalidade de facilitar a descrição e discussão do material.

As mitocôndrias pertencentes ao tipo A são menores que as demais de modo geral. São mais electron-densas. Não apresentam grânulos nem vesículas observáveis. Ocorrem em glóbulos de citoplasma. São menos numerosas que as do tipo B, descritas a seguir.

O tipo B é caracterizado por mitocôndrias maiores que as do tipo A.

Apresentam grânulos e vesículas. Nas suspensões elas estão presentes em frequência bem maior que as do tipo A. Suas cristas são mais sinuosas e irregulares. Aquelas enquadradas no tipo C são condensadas, sugerindo encontrarem-se no estado metabólico três.

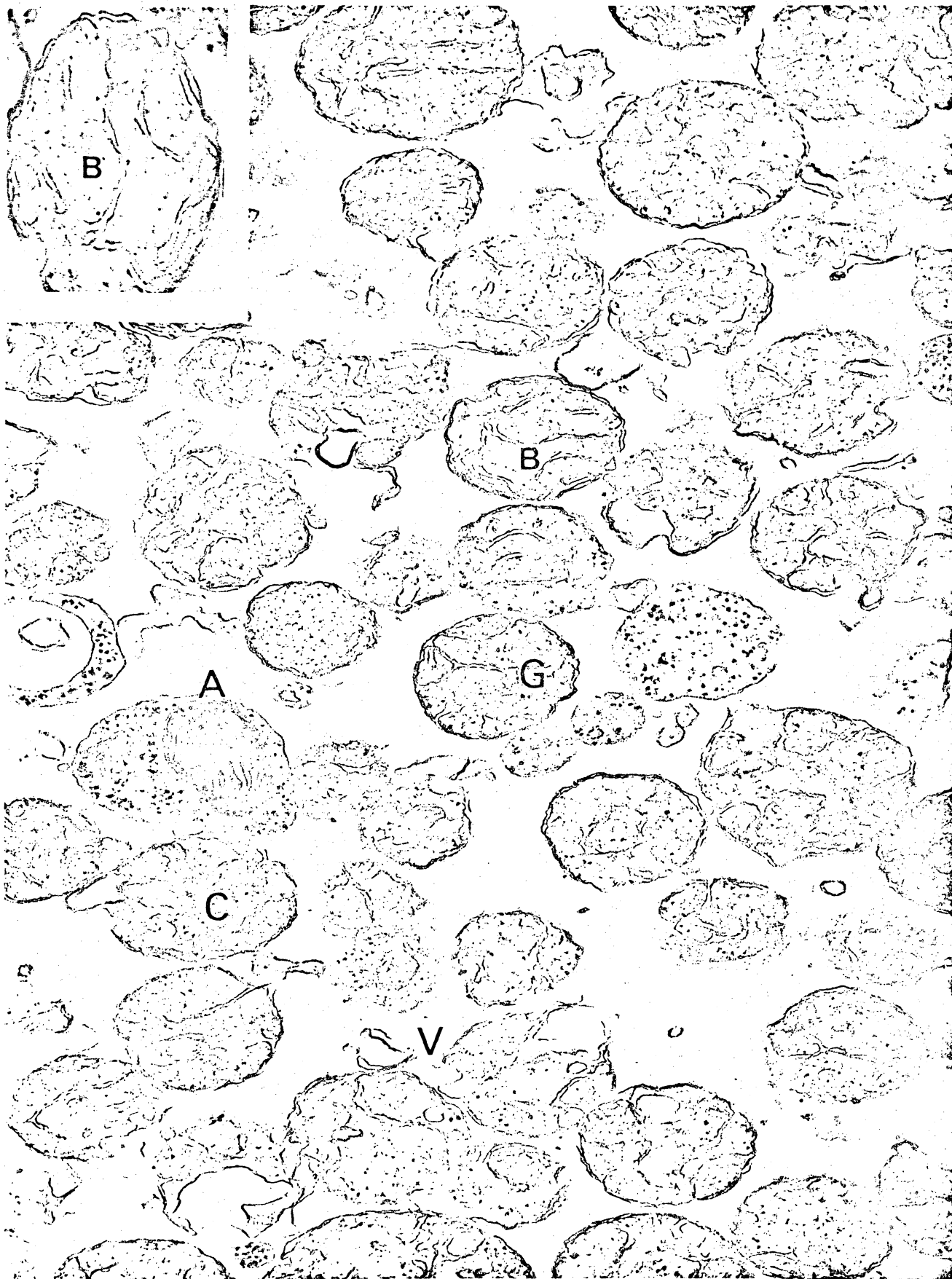


Figura VII - Mitocôndrias tipo B em campo maior. B: mitocôndria aumentada no destaque. G: grânulo. A: mitocôndria tipo A. Seta aponta para a vesícula ou crista (corte de secção).
Aumento final: 41.500 x destaque: 62.500 x
Hipocótilo de soja com 5 dias de germinação.

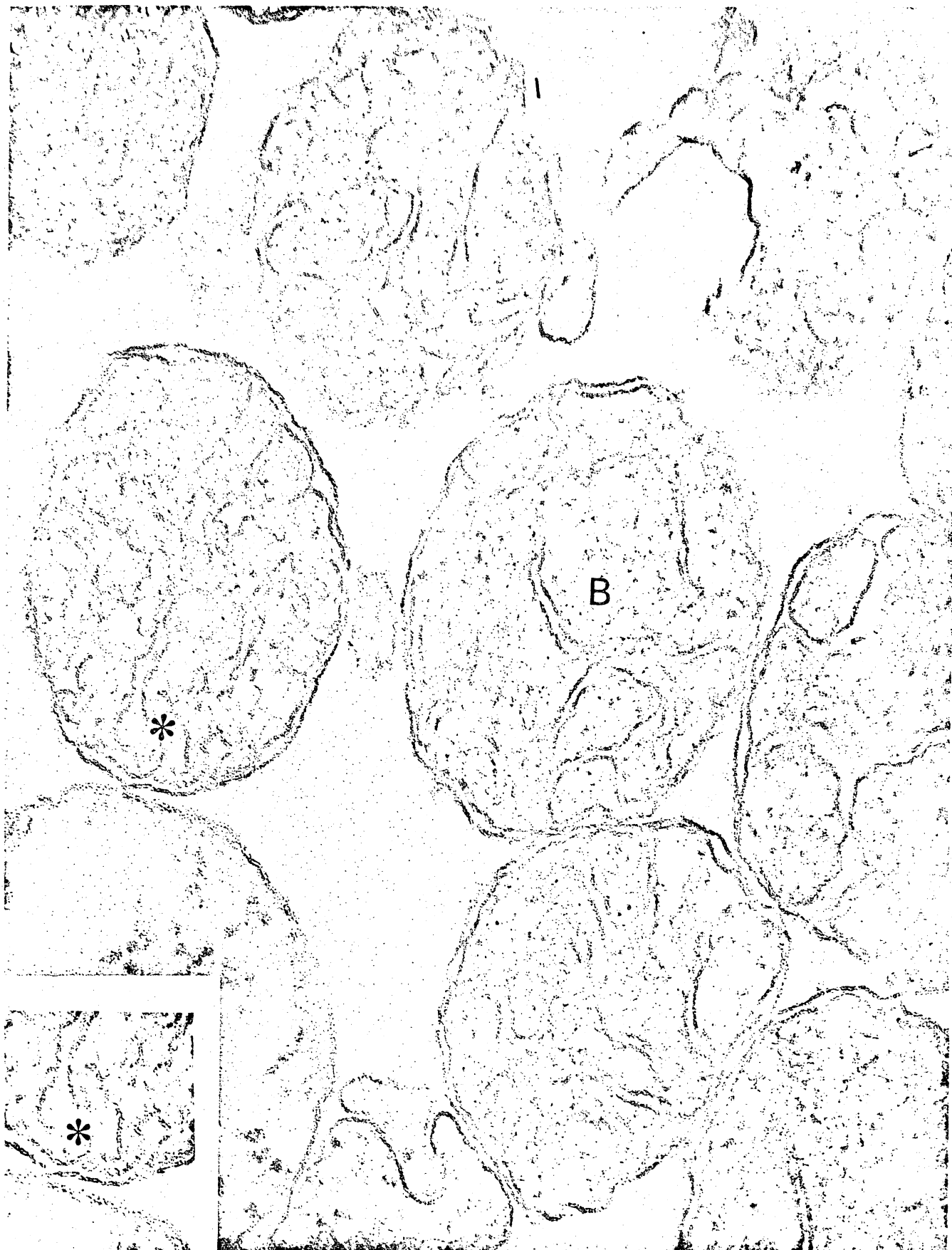


Figura VIII - Mitocôndrias tipo B. * mostra zona de destaque.
Aumento final: 103.700 x destaque: 139.600 x
Hipocótilo de soja com 5 dias de germinação.

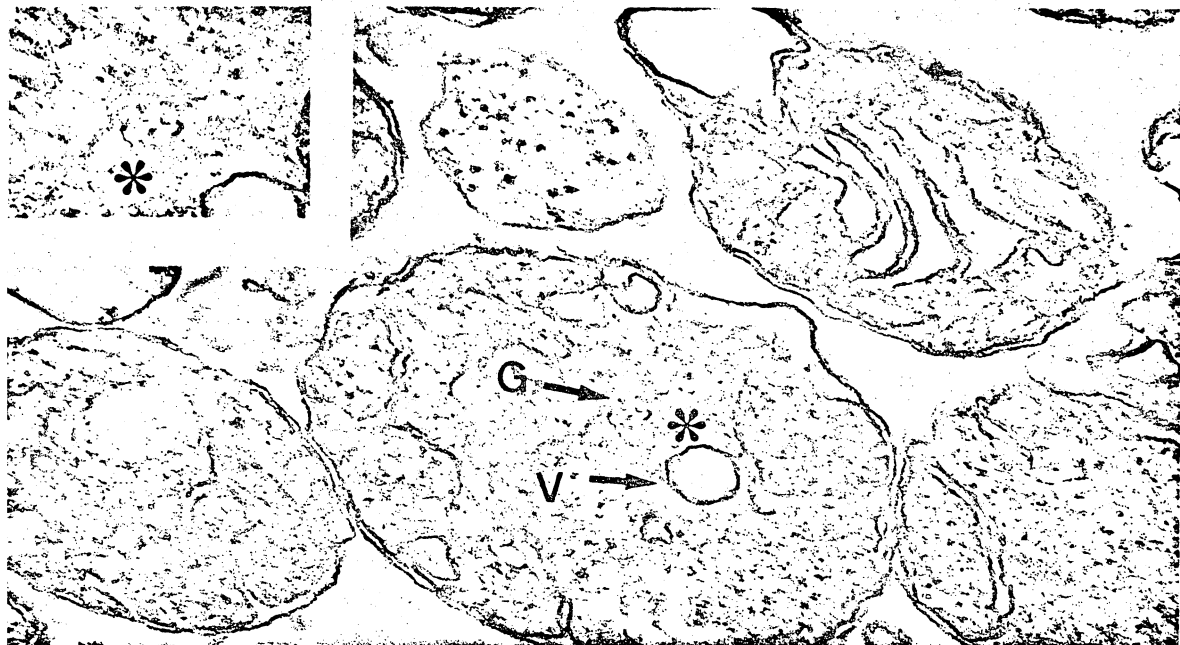


Figura IX - V: Vesícula. G: grânulos ampliados no destaque.
 Aumento final: 83.000 e destaque 127.700 x
 Hipocótilos de soja com 5 dias de germinação.



Figura X - Mitocôndrias do tipo B. e tipo C. Asterisco e seta
 mostram detalhe aumentado no destaque.
 Aumento final: 157.000 x e destaque: 181.300 x
 Hipocótilo de soja com 5 dias de germinação.

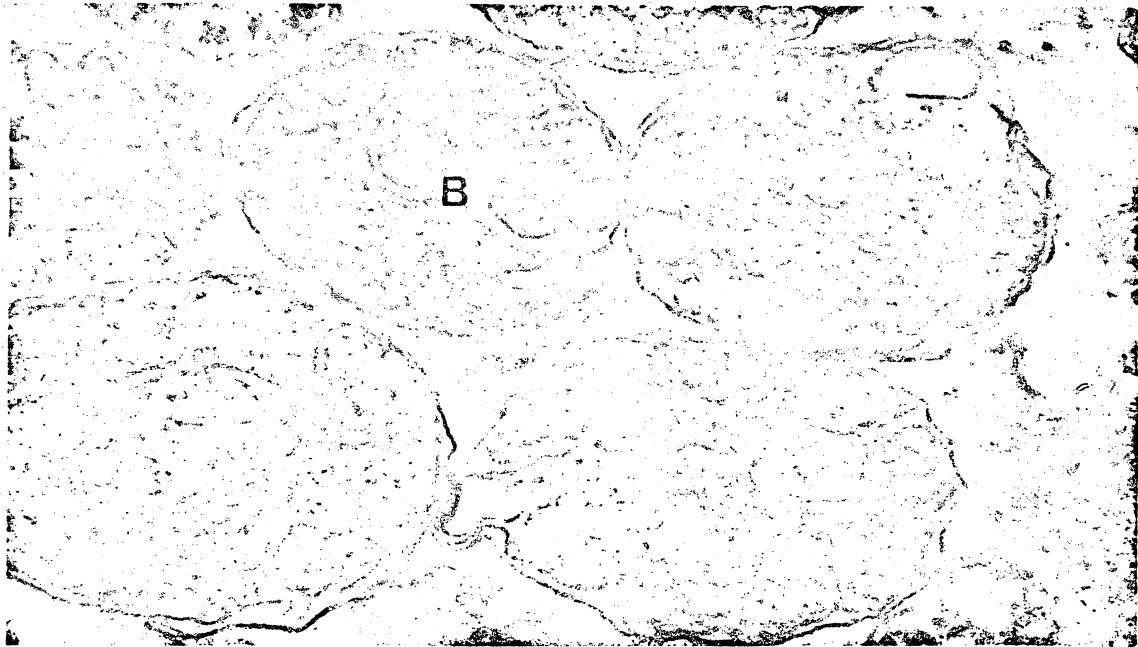


Figura XI - Mitocôndrias tipo B.

Aumento Final: 60.000 x

Hipocótilo de soja com 5 dias de germinação.

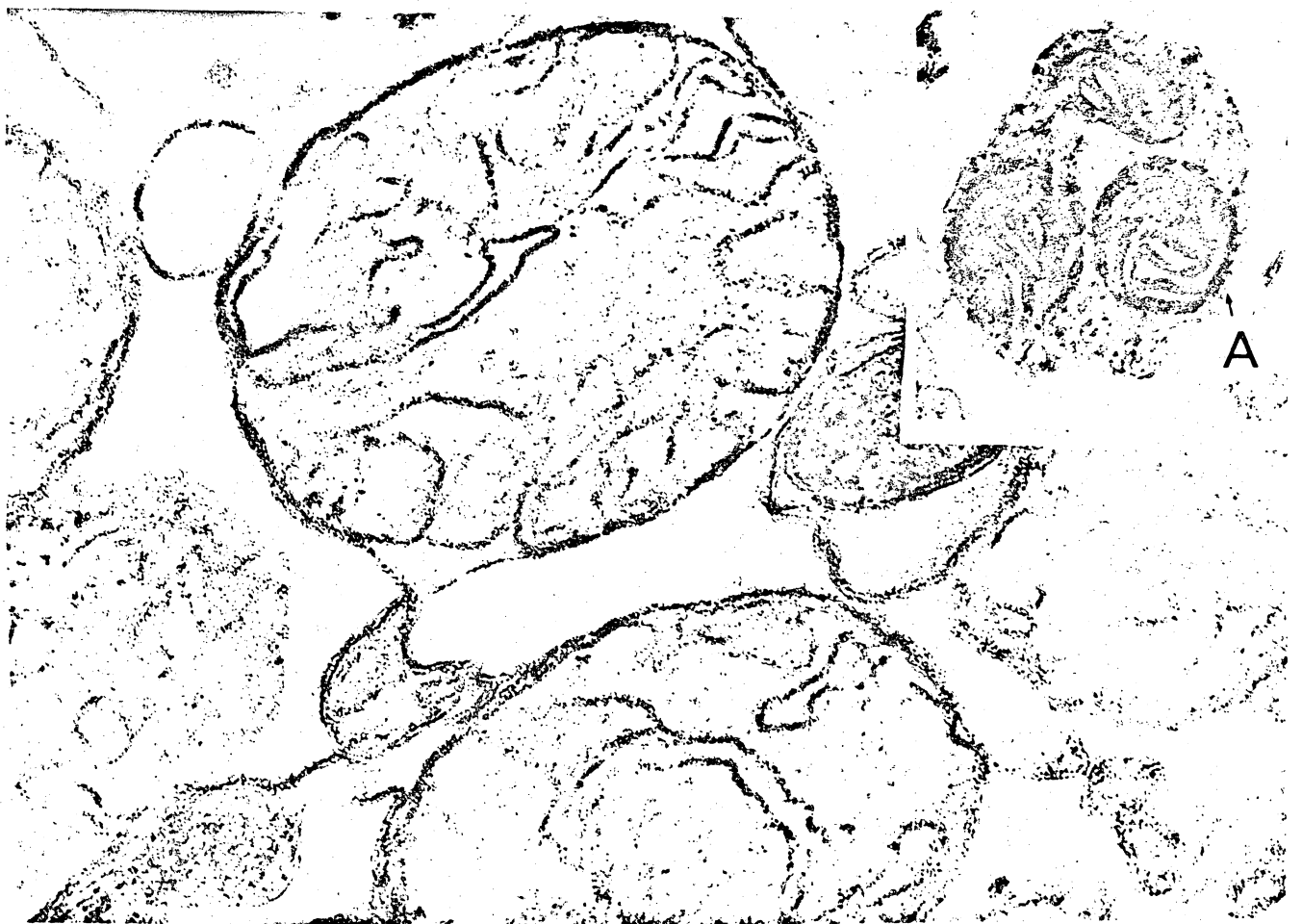


Figura XII - Mitocôndrias tipo B e tipo A.

Aumento final: 83.000 x Aumento no destaque: 76.900 x

Hipocótilo de soja com 2 dias de germinação.

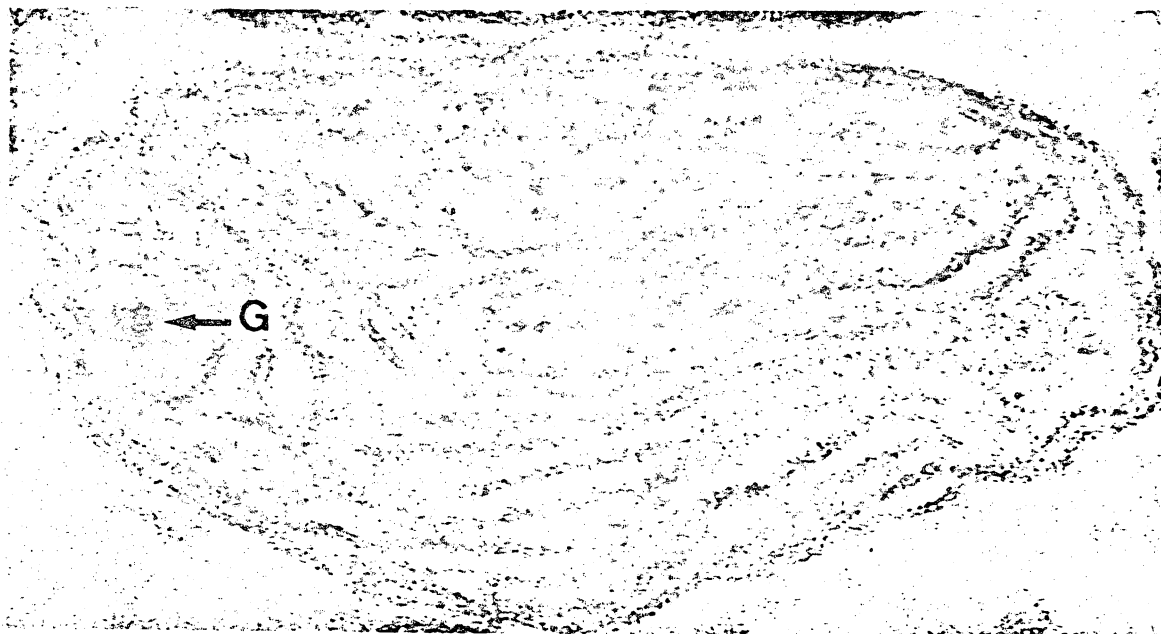


Figura XIII - Mitocôndria tipo B. G: Grânulo.
Aumento final: 207.500 x
Hipocótilo de soja com 2 dias de germinação.



Figura XIV - V: Vesícula. G: Grânulo.
Aumento final: 207.500 x
Destaque: 279.300 x
Hipocótilo de soja com 2 dias de germinação.



Figura XV - Mitocôndria tipo B.

Aumento final: 120.800 x

Hipocôtilo de soja com 2 dias de germinação.



Figura XVI - Vista de campo, mostrando diversas mitocôndrias tipo B e uma tipo C, condensada. Muitos grânulos.

Aumento final: 53.300 x

Hipocôtilo de soja com 5 dias de germinação.

4.0 - DISCUSSÃO

A atividade, desenvolvimento e mesmo a estrutura das mitocôndrias dependem não só do estado metabólico, como também do tipo de tecido original (2, 16, 38). Em plantas superiores, é sabido que os cotilédones estão destinados a perecer após a germinação da semente. Segundo AKAZAWA e BEEVERS (2), as relações ADP:O diminuem após certo período de germinação, em mitocôndrias de cotilédones refletindo a atividade de um tecido que serviu de reserva para o desenvolvimento da plântula. Já o hipocótilo tenderá a se desenvolver e se transformar no caule da planta. Por esta razão ele é frequentemente escolhido como fonte para o isolamento de mitocôndrias (25, 27, 28). É exatamente no hipocótilo onde estarão melhor representadas as modificações que se manifestarão paralelamente ao desenvolvimento do vegetal superior, desde a semente até a planta.

Há significativa correlação entre a integridade física das mitocôndrias e o desempenho de suas funções bioquímicas (30, 38). É decorrente deste fato, a importância da análise polarográfica e da espectrofotometria diferencial como formas de ensaio das atividades respiratórias e fosforilativas e dos componentes do sistema de transporte de elétrons, da cadeia respiratória. Estes ensaios são complementados com a microscopia eletrônica (14, 29, 30, 38) a qual é importante técnica para avaliar não somente o grau de integridade física das mitocôndrias, mas também a qualidade da técnica de isolamento que foi utilizada e os respectivos cuidados durante as operações da metodologia.

Os resultados apresentados nas tabelas I, II e III, sugerem que as funções bioquímicas de respiração, controle respiratório e fosforilação oxidativa estão em níveis razoáveis. A análise estatística para o "t" de STUDENT, relativa às razões ADP/O mostrou que há diferença significativa entre os dados para embrião e hipocótilo de 5 dias e entre os dados para hipocótilo de 2 e 5 dias. Não foi encontrada diferença significativa entre os testes para embrião e hipocótilo de 2 dias. Ao ser acrescentado o substrato, a velocidade de respiração caracteriza o chamado estado 4 ou "iddle" (31). A adição de ADP, ao meio de reação, aumen-

ta a velocidade de consumo de oxigênio, refletindo o chamado estado metabólico 3 ou excitado.

Neste estado a velocidade é determinada apenas pela concentração de oxigênio no meio (33). Após o consumo do aceptor, a velocidade volta aos valores normais, relativas ao estado 4. Note-se que, em algumas suspensões, o retorno ao estado 4 não se processou exatamente com a velocidade igual à inicial, mas conservou-se sensivelmente acima. Para as amostras de 5 dias, com succinato, como substrato, passou de 0,12 para 0,14 μMO_2 seg./mg/proteína com uma diferença de 0,02. Contudo, o controle obtido, embora não seja ideal, mostra que a fosforilação oxidativa está bem acoplada à cadeia respiratória atuante nestas suspensões mitocondriais.

Com a devida transformação de unidades, os valores das velocidades de consumo de oxigênio estão de acordo com os encontrados na literatura, de modo geral.

Relativamente ao succinato, os dados são aproximados aos obtidos por IKUMA (25), o qual utilizou hipocótilo de feijão (*Phaseolus aureus*), com 4 a 5 dias de germinação.

Ainda para o succinato, os resultados obtidos são aproximados aos de RIOS e VOSS (41), para semente de pinheiro (*Araucaria angustifolia*), BLACKMON e MORELAND (5), para feijão (*Phaseolus aureus*) e aos de BOURQUE e NAVLOR (8), para feijão (*Canavalia ensiformis* (L) D.C.).

Relativamente ao coeficiente de controle respiratório, para o succinato, os autores acima citados encontraram valores entre 1,4 e 2,5.

Os valores relativos ao succinato das relações ADP: O, obtidos para as mitocôndrias de soja, são concordantes com os resultados de IKUMA (25), para hipocótilos de feijão (*Phaseolus aureus*), situados entre 1,60 e 1,80. O mesmo pode ser dito em relação aos resultados de IKUMA e BONNER (26), que variaram entre 1,40 e 1,70 e os de KEY et al. (28), em torno de 1,59.

Para o alfa-ceto-glutarato foram encontrados os valores relacionados na tabela I. Estão coerentes com os resultados obtidos por MALHOTRA e SPENCER (34), para o estado quatro, relativos à feijão (*Phaseolus vulgaris* (L.) var. Kinghorn).

Também os valores das relações ADP:O para este substrato estão coerentes com os do autor acima citado, que variaram entre 1,5 e 2,0.

HOWELL (23) obteve valores decrescentes da relação ADP:O a partir do 5º dia de germinação para cotilédone e que pode ser explicado pelo fato que é um tecido de reserva declinando a quantidade ou a qualidade das mitocôndrias.

ABU-SHAKRA *et al* (1) entretanto trabalhando com o eixo total da plântula (rebentos, hipocótilo e raiz), de soja com quatro dias de germinação encontrou para este substrato relação ADP:O com valor $3,0 \pm 0,2$.

Ainda para o alfa-ceto-glutarato como substrato, o controle respiratório expresso em termos de coeficiente respiratório, C.R., que variou entre 1,78 e 2,40, está aproximado dos resultados obtidos pelos autores acima citados, que se situaram entre 1,5 e 2,5 e também aproximados aos dados obtidos por KEY *et al* (28) relativos à hipocótilo de soja em torno de 1,60.

Os resultados obtidos para as velocidades respiratórias, tendo malato como substrato, são pouco inferiores aos apresentados pela literatura, como seja, em relação aos dados de IKUMA (25), para hipocótilos de feijão (*Phaseolus aureus*) e de MALHOTRA e SPENCER (34) também para hipocótilos de feijão (*Phaseolus vulgaris* (L.) var. Kinghorn).

As relações ADP:O apresentadas nas tabela I para o malato, variaram de 1,43 à 2,36, estando coerentes com os valores obtidos por BLACKMON *et al* (5), em torno de 2,3, com os resultados de IKUMA (25) e com os de IKUMA e BONNER (26) variáveis entre 2,2 e 2,5. Estes dados bibliográficos citados, são relativos à mitocôndrias de hipocótilos de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

O aumento da velocidade de consumo de oxigênio e das relações ADP:O, observados nas tabelas I e II, refletem uma

crescente atividade metabólica mitocondrial, paralela ao desenvolvimento tissular. NAWA e ASAHI (38) constataram que a atividade respiratória, controle respiratório e capacidade fosforilativa de mitocôndrias de ervilhas aumentam durante a germinação, aspectos estes relacionados com o aumento do conteúdo de água.

O aumento das atividades respiratórias e de fosforilação com o período de germinação, sugere com o período de germinação, sugere um desenvolvimento de mitocôndrias (16,37,38), à medida que se processa a diferenciação tissular. É possível também, além de biogênese de mitocôndrias, um aperfeiçoamento interno, ou seja, mesmo nível de população mitocondrial, com aumento de concentração enzimática (16, 37, 45).

Por meio de espectrofotometria diferencial à temperatura ambiente, foram identificados os componentes mais facilmente detectáveis do sistema de transporte de electrons.

O pico de absorção encontrado para o citocromo oxidase, está situado em 599 nm para mitocôndrias dos hipocótilos de 2 dias e de embrião. Este pico de absorção tem sido localizado em 600 nm em mitocôndrias de pinhão (41), em 598 nm para mitocôndrias de feijão (47).

O valor entre 598 e 599 nm para a absorção máxima do citocromo oxidase, parece ter uma característica deste componente da cadeia respiratória dos vegetais, pois foi observado por outros autores (41, 47). É um desvio para menor comprimento de onda, relativamente aos 602-603 nm encontrados para mitocôndrias de origem animal (51).

O ombro de 560 nm caracteriza as absorções dos citocromos b. Este ombro, provavelmente seria resolvido em máximos de absorção com espectrofotometria em temperatura de nitrogênio líquido, em torno de - 192°C. (12).

Para as mitocôndrias isoladas de embrião este ombro se localizou em 564 nm.

O citocromo c teve sua banda alfa em 551 nm nas mitocôndrias isoladas de hipocótilos em 552 nm nas mitocôndrias isoladas de embrião. Na faixa de Soret, está o máximo de absorção do citocromo oxidase, localizado em 426 nm e 725 nm para as

mitocôndrias de hipocótilo e embrião, respectivamente (21).

As tabelas IV e V mostram as concentrações e as proporções dos diversos componentes encontrados.

A proporção relativa do citocromo c é mais alta que a dos demais citocromos (30, 41). As concentrações absolutas dos diversos citocromos são de modo geral baixas, o que está coerente com as baixas atividades respiratórias e fosforilativa dos vegetais (, 48).

As figuras nºs VII e VIII, cujas micrografias abrangem uma visão maior de campo, mostram um número bem razoável de mitocôndrias intactas, poucas degeneradas e alguma contaminação com restos de material celular.

Não foram observadas diferenças anatômicas que pudessem caracterizar mitocôndrias isoladas do material nos diversos períodos de germinação.

Apresentam membrana dupla e são perfeitamente visíveis as invaginações da membrana interna formando as cristas. As mesmas são onduladas e com nítida tendência às formações vesiculares, fato este também constatado por CHERRY (16) em sementes de amendoim.

A ocorrência na preparação, de mais de um tipo de mitocôndrias de hipocótilos de soja, está de acordo com os dados obtidos por BAXTER e HANSON (3), os quais trabalharam com hipocótilos de plântula de três dias, cujas mitocôndrias foram classificadas em x e y.

Não está afastada a hipótese de serem os grânulos electron-densos, que ocorrem nas mitocôndrias do tipo B, serem resultantes do acúmulo de cations alcalino-terrosos, atividade esta também acoplada ao sistema de transporte de electrons. (49).

As mitocôndrias do tipo C são bem mais raras que as demais. Seu aspecto sugere fortemente serem mitocôndrias no estado metabólico três. É sabido que mitocôndrias quando no estado metabólico três, no qual é ativa a respiração bem como elevada sua atividade de fosforilação, assumem uma configuração típi-

ca denominada conformação condensada, em oposição ortodoxa, durante o estado quatro. Tanto a conformação ortodoxa como a condensada, foram já identificadas em mitocôndrias de origem animal (31), como também em mitocôndrias de origem vegetal por BOURQUE e NAYLOR (8), PRING (40) e SOLOMOS *et al.* (45).

A análise integrada dos dados obtidos pelos três processos acima mencionados, sugere biogênese mitocondrial paralela ao desenvolvimento e diferenciações tissulares.

5.0 - CONCLUSÕES

Os métodos e operações metodológicas para isolamento de fração mitocondrial foram apropriados, para o material utilizado. As dificuldades iniciais foram devido à grande relação entre a massa de reservas e a massa de tecido organizado em se tratando de sementes.

O máximo de absorção do citocromo oxidase, desviado para menor comprimento de onda é característica para mitocôndrias isoladas de embrião e hipocótilo de dois dias, sugerindo ser uma característica de vegetais.

As concentrações dos diversos componentes da cadeia respiratória está em concordância com os dados da literatura, para vegetais.

Há aumento de atividade respiratória e de fosforilação das mitocôndrias isoladas de hipocótilo de soja, com a variação do período de germinação estudado.

6.0 - RESUMO

Foram estudadas as velocidades de consumo de oxigênio e as relações ADP:O em suspensões mitocondriais isoladas a partir de embrião e hipocótilo de soja (*Glycine max.* Merrill (L.) var. Santa Rosa).

As relações ADP:O, inicialmente baixas para mitocôndrias de embrião se aproximaram dos valores teóricos à medida que foi aumentando o período de germinação.

Foram traçados espectros diferenciais, com espectrofotômetro registrador "split-beam" e determinadas as concentrações dos citocromos a, b e c.

Micrografias foram obtidas e a estrutura mitocondrial foi observada.

A análise integrada dos dados obtidos pelos três processos acima mencionados, sugere biogênese de mitocôndrias, paralela ao desenvolvimento e diferenciação tissulares.

6.0 - SUMMARY

Rates of oxygen uptake, as well as ADP:O ratios of mitochondrial suspensions isolated from soybean embryos and hypocotyls (*Glycine max* Merrill (L.) var. Sta. Rosa), were studied.

The initially low values for ADP:O ratios of mitochondrial suspension from embryos, were closer to theoretical ones, as the germination period increased.

Differential spectra were obtained with a "split-beam" differential spectrophotometer and the concentration of cytochromes a, b and c were determined.

Electronic micrographs were obtained and the mitochondrial structure has been described.

The integrated analysis of data obtained by the three above cited processes, is suggestive of mitochondrial biogenesis, which occurred together with development and differentiation of plant tissues.

7.0 - AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. DINOR OLEGÁRIO VOSS, pelo apoio, incentivo e orientação.
- Ao Dr. ANNIBAL DE PAIVA CAMPELLO, pela orientação em meus primeiros passos na pesquisa e na técnica de laboratório.
- À Dra. GLACI THEREZINHA ZANCAN, pelo estímulo e encorajamento nas fases difíceis iniciais do trabalho.
- Ao Dr. AGUINALDO JOSÉ DO NASCIMENTO, pelas inúmeras sugestões apresentadas.
- Ao Dr. ORLANDO DE FREITAS e ao Prof. MARIO MÁRCIO NEGRÃO do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, pela elaboração das micrografias eletrônicas.
- Ao Dr. LUIZ JOSÉ BOVE KESIKOWSKI, pela sugestões à análise estatística.
- À Dra. ELCY SABÓIA ZAPPIA do Laboratório de Análise de Sementes do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná, pela disponibilidade de um germinador.
- À Universidade Católica de Pelotas, à Fundação para o Amparo e Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul e ao Conselho Nacional de Pesquisas, pelo suporte financeiro que possibilitou a concretização deste trabalho.

8.0 - BIBLIOGRAFIA

- 1 - ABU-SHAKRA, S.S. and CHING, T.M. Mitochondrial Activity in germinating New and Old Soybean Seeds. Crop Sci. 7:115-18, 1967.
- 2 - AKAZAWA, T. & BEEVERS, H. Mitochondria in the Endosperm of the Germinating Castor Bean: a Developmental - Study. Biochem. J. 67: 115-118, 1957.
- 3 - BAXTER, R. and HANSON, J.B. The Effect of 2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid upon the metabolism and Composition of Soybean Hypocoty Mitochondria. Planta, 82: 246-60, 1968. 82
- 4 - BILS, R.F. and HOWELL, R.W. Biochemical and Cytological changes in Developing Soybean Cotyledons. Crop Sci. 4: 304-8, 1963.
- 5 - BLACKMON, W.J. & MORELAND, D.E. Adenosine Triphosphatase Activity Associated with Mung Bean Mitochondria. Plant Physiol. 47: 532-6, 1971.
- 6 - BONNER, Jr. W.D. A General Method for the Preparations of Plant Mitochondria. In: ESTABROOK, R.W. & PULLMANN M.E. (ed.) Methods in Enzymol. X. New York-London. Acad. Press, 1967, p. 126-33.
- 7 - BONNER, Jr. W.D. & VOSS, D.O. Some characteristics of Mitochondria Extracted from Higher Plants. Nature 191: 682-4, 1961.
- 8 - BOURQUE, D.P. & NAYLOR, A.W. Changes in Mitochondrial Properties Associated with Chloroplast Development in Jack Bean (*Canavalia ensiformis* (L.) D.C.) Plant Physiol. 49: 826-35, 1972.
- 9 - BOWMAN, E.J., IKUMA, H. & STEIN, H.J. Citric Acid Cycle Activity in Mitochondria Isolated from Mung Bean Hypocotyls. Plant Physiol. 58: 426-32, 1976.

- 10 - BREIDENBACH, R.N., CASTELFRANCO, P. & PETERSON, C. Biogenesis of Mitochondria in Germinating Peanut Cotyledons. Plant Physiol. 41: 803-9, 1966.
- 11 - CHANCE, B, Spectra and Reactions Kinetics of Respiratory Pigments of Homogenized and Intact Cells. Nature 169: 215-21, 1952.
- 12 - CHANCE, B, Spectrophotometry of Intracellular Respiratory Pigments. Science 120: 767-75, 1954.
- 13 - CHANCE, B, Techniques for the Assay of the Respiratory Enzymes. In COLOWICK, P.S. & KAPLAN, N.O. Methods in Enzymol. IV. New York - London. Acad. Press. 1957, p. 273-329.
- 14 - CHANCE, B. & WILLIAMS, C.R. Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation. I Kinetics of Oxygen Utilization. J. Biol. Chem. 217: 383-93, 1955.
- 15 - CHANCE, B. & WILLIAMS, C.R. The Respiratory chain and Oxidative Phosphorylation. Advan. Enzymol. 17: 65-134. 1956.
- 16 - CHERRY, J.H. Nucleic Acid Mitochondria & Enzyme Changes in Cotyledons of Peanut Seeds during Germination. Plant Physiol. 38: 440-6, 1963.
- 17 - DOULE, R. CHRISTENSEN, E.L. & BONNER, W.D. Preparations of Intact Plant Mitochondria. Biochem. Biophys. Acta 275: 148-60, 1972.
- 18 - EARNSHAW, M.J. & TRUELOVE, B. Swelling and Contraction of Phaseolus Hypocotyl Mitochondria. Plant Physiol. 43: 121-9, 1968.
- 19 - ESTABROCK, R.W. Mitochondrial Respiratory Control and the Polarographic Measurement of ADP:O Ratios. In: Methods in Enzymol. X. New York - London. Acad. Press, 1967, p. 41-7.
- 20 - FLOWERS, T.J. & HANSON, J.B. The Effect of Reduced Water

- Potential on Soybean Mitochondria. Plant Physiol. 44: 939-45, 1969.
- 21 - FRIDMAN, C., LIS, H., SHARON, N. and KATCHALSKI, E. Isolation and Characterization of Soybean Cytochrome C. Arch. Biochem, Biophys. 126: 239-304, 1968.
- 22 - GREEN, D.E. Electron Transport and Oxidative Phosphorylation. Advan. Enzymol. 21: 73-129, 1959.
- 23 - HOWELL, R.W. Changes in Metabolic Characteristics of Mitochondria from Soybean Cotyledons During Germination. Physiol. Plantarum 14: 89-97, 1966.
- 24 - HILL, R. & HARTREE, E.F. Hematin Compunds in Plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. 4: 115-50, 1953.
- 25 - IKUMA, H. Necessary Conditions for Isolation of Tightly Coupled Higher Plant Mitochondria. Plant Physiol. 45: 773-81, 1970.
- 26 - IKUMA, H. & BONNER, Jr. W.D. Properties of Higher Plant Mitochondria. I Isolations and Some Characteristics of Tightly - Coupled Mitochondria from Dark Grown Mung Bean Hypocotyls. Plant Physiol. 42: 67-75, 1967.
- 27 - JOHNSON, H.M. & WILSON, R.H. Sr^{2+} Uptake by Bean (*Phaseolus vulgaris*) Mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 267: 398-408, 1972.
- 28 - KEY, J.L., HANSON, J.B. & BILS, R.F. Effect pf 2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid Application on Activity and Composition of Mitochondria from Soybeans Plant Physiol. 35: 177-183, 1960.
- 29 - KU, S.H., PRATT, H.K., SPURR, A.R. & HARRIS, W.M. Isolation of Active Mitochondria from Tomato Fruit. Plant Physiol. 43: 883, 1968.
- 30 - LANCE, C. & BONNER, Jr. W.O. The Respiratory Chain Compo

- nents of Higher Plant Mitochondria. Plant Physiol. 43: 756-66, 1968.
- 31 - LEHNINGER, A.L. Biochemistry. New York. Worth Publishers Inc. 1975, 1.104 p.
- 32 - LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J. & FARR, L. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-75, 1951.
- 33 - MAHLER, H.R. & CORDES, E.D. Biological Chemistry. New York, Harper and Row Publishers. 1971, 1.009 p.
- 34 - MALHOTRA, S.S. & SPENCER, M. Changes in the Respiratory, Enzymatic and Swelling and Contraction Properties of Mitochondria from Cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. during Germination. Plant Physiol. 46: 40-4, 1970.
- 35 - MALONE, C. KOEPPE, D.E. & MILLER, R.J. Corn Mitochondrial Swelling and Contraction: an Alternate Interpretation. Plant Physiol. 53: 918-27, 1974
- 36 - MAYER, A.M. & SHAIN, Y. Control of Seed Germination. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 167-93, 1974.
- 37 - NAWA, Y. & ASAHI, T. Rapid Development of Mitochondria in Pea Cotyledons during the Early Stage of Germination. Plant Physiol. 48: 671-4, 1971.
- 38 - NAWA, Y. & ASAHI, T. Biochemical Studies on Development of Mitochondria in Pea Cotyledons during the Early Stage of Germination. Plant Physiol. 51: 833-38, 1973.
- 39 - PRING, D.R. Maize Mitochondria: Purification and Characterizations of Ribosomal Nucleic Acid. Plant Physiol. 53: 677-83, 1974.
- 40 - PRING, D.R. Maize Mitochondria: Cytochromes of Fertile and Cytoplasmic Male Sterile lines. Plant Physiol. 55: 203-6. 1975.

- 41 - RIOS, J.M.C. & VOSS, D.O. Estudo dos Citocromos e da Oxidação Fosforilativa em Sementes de Pinheiro. Arq. Biol. Tecnol. 16: 111-22. 1973.
- 42 - SARKISSIAN, J. & SRIVASTAVA, M.K. On Methods of Isolation of Active Tightly Coupled Mitochondria of Wheat Seedlings. Plant Physiol. 43: 1406-10 1968.
- 43 - SATO, S. & ASAHI, T. Biochemical Properties of Mitochondrial Membrane from Dry Pea Seeds and Changes in the Properties during Imbibition, Plant Physiol. 56: 816-20, 1975.
- 44 - SCHNEIDER, W.C. Mitochondrial Metabolism. Advan. Enzymol. 21: 1-72, 1959.
- 45 - SOLOMOS, T., MALHOTRA, S.S. PRASAD, S. MALHOTRA, S.K. and SPENCER, M. Biochemical and Structural Changes of Pea Cotyledons during Germination. Can. J. Biochem. 50: 725-37, 1972.
- 46 - TZAGOLOFF, A., RUBIN, M.S. & SIERRA, M.F. Biosynthesis of Mitochondrial Enzymes. Biochim. Biophys. Acta 301: 71-104, 1973.
- 47 - WILSON, S.B. & BONNER Jr. W.D. Preparation and Some Properties of Sub-Mitochondrial Particles from Tightly Coupled Mung Bean Mitochondria. Plant Physiol. 46: 25-30, 1970.
- 48 - WILSON, S.B. & BONNER Jr. W.D. Studies of Electron Transport in Dry and Imbibed Peanut Embryos. Plant Physiol. 48: 340-4, 1971.
- 49 - WILSON, R.H. & MONTON, G.A. The comparative uptake of Ba^{2+} and other Alkaline Earth Metals by Plant Mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 333: 22-7. 1974.
- 50 - WILSON, R.H., THURSTON, E.L. & MITCHELL, R. Ultrastructural Transformations in Bean Inner Membranes. Plant Physiol. 51: 26-30, 1973.

- 51 - YONETANI, T. Studies of Cytochrome Oxidase. I Absolute and Difference Absorption Spectra. J. Biol. Chem. 235: 845-852, 1960.