

PAULO ARRUDA

O POTENCIAL OSMÓTICO EM MUTANTES DE ENDOSPERMA DE MILHO E SUA INTERAÇÃO  
COM CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E COM A ATIVIDADE DA RNase DA SEMENTE

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
da Universidade Estadual de Campinas para  
a obtenção do grau de Doutor em Ciência.

Orientador: Prof. Dr. William José da Silva

CAMPINAS

1982

Ar69p

4444/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

À minha esposa Regina e às minhas  
filhas Ana Paula e Fernanda.

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

O autor agradece a todos que colaboraram na realização deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. William José da Silva, Chefe do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela orientação, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa e sobretudo pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek, pelas sugestões e pela orientação na dosagem da atividade enzimática.

À minha esposa Regina, pelo auxílio nas análises.

Ao suporte oferecido pelo Conselho Nacional de Pesquisas através do Plano Integrado de Genética (PIG III).

Aos colegas e professores de curso, pelas discussões, que de alguma forma auxiliaram na condução deste trabalho.

## ÍNDICE

	Pag.
1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 - Efeito do estresse de água no metabolismo .....	3
2.2 - Atividade da Ribonuclease em milho .....	6
2.3 - Atividade da RNase em mutantes de endosperma de milho .....	7
2.4 - Contrôles genéticos da atividade da RNase em endosperma de milho .....	9
3 - MATERIAL E MÉTODOS .....	11
3.1 - Linhagens de milho .....	11
3.2 - Ensaio de campo .....	13
3.3 - Determinação do potencial osmótico .....	15
3.4 - Determinação da atividade da RNase .....	16
3.5 - Eletroforese da RNase .....	21
4 - RESULTADOS .....	23
4.1 - Peso fresco, peso seco e atividade da RNase em mutantes de endosperma de milho, durante o desenvolvimento da semente...	23
4.2 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em endospermas do híbrido simples HS 7777, durante o desenvolvimento da semente .....	26
4.3 - Influência da posição da semente, ao longo da espiga sobre o peso e o potencial osmótico do endosperma .....	28
4.4 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em mutantes de endosperma de milho .....	31
4.4.1 - Linhagem CP577, normal e <i>shrunk</i> .....	31
4.4.2 - Linhagem SRRD992, normal e <i>sugary</i> .....	35
4.4.3 - Linhagem ML674, normal e <i>shrunk-2</i> .....	38
4.4.4 - Linhagem ML649, normal e <i>opaque-2</i> .....	41

4.5 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes $F_1$ obtidas dos cruzamentos entre as linhagens SRRD992, ML649 e ML674 .....	44
4.6 - Atividade da RNase em endospermas normais e mutantes das linhagens CP577, ML649, ML674 e SRRD992, aos 25 DAP ....	48
4.7 - Atividade da RNase em endospermas $F_1$ obtidos de cruzamentos recíprocos entre as linhagens ML649, ML674 e SRRD992	51
4.8 - Associação entre a atividade da RNase e o potencial osmótico nos mutantes de endosperma de milho.....	51
4.9 - Eletroforese da RNase .....	54
5 - DISCUSSÃO .....	57
5.1 - A amostragem fenotípica na avaliação do efeito de genes em características físicas e metabólicas da semente ....	57
5.2 - Interrelação entre o peso, conteúdo de água e potencial osmótico da semente de milho .....	58
5.3 - Atividade da RNase em sementes de milho .....	66
5.4 - Associação entre o potencial osmótico e a atividade da RNase nos mutantes de endosperma de milho .....	70
6 - CONCLUSÕES .....	72
7 - RESUMO .....	74
8 - SUMMARY .....	76
9 - BIBLIOGRAFIA .....	78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pag.
1 - Sementes normais e mutantes das linhagens de milho ML649 , ML674, CP577 e SRRD992 .....	12
2 - Peso fresco, peso seco e atividade da RNase em endospermas normais (+) e mutantes das linhagens ML649, ML674, e CP577, durante o desenvolvimento da semente .....	24
3 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água, percentagem de <u>u</u> midade e potencial osmótico em sementes do híbrido simples HS 7777, durante o desenvolvimento .....	27
4 - Eletroforese da RNase em gel de poliacrilamida, dos endos- permas normais e mutantes das linhagens ML649, ML674, CP - 577 e SRRD992, aos 25 DAP (A), e de endospermas do híbrido simples HS 7777 durante o desenvolvimento da semente .....	56
5 - Mecanismo básico de pressão ou fluxo de massa de Munch ...	59
6 - Potencial osmótico (A) e peso seco (B) em sementes normais das linhagens ML649, ML674 e SRRD992 e em seus cruzamentos dialélicos, aos 25 DAP .....	64
7 - Atividade da RNase em sementes normais das linhagens ML64 9, ML674 e SRRD992 e em seus cruzamentos dialélicos, aos 25 DAP .....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA	Pag.
1 - Curva de calibração do osmômetro OSMETE com diferentes concentrações de sacarose .....	17
2 - Valores de potencial osmótico, em bar, de soluções de sacarose de diferentes molaridades.....	18
3 - Valores de potencial osmótico de endospermas do híbrido simples HS 7777 aos 15 DAP, correspondentes aos três métodos de medidas testados .....	19
4 - Efeito da posição da semente ao longo da espiga, no peso fresco e no potencial osmótico e coeficiente de correlação entre essas características e a posição da semente, em sementes normais da linhagem CP577 aos 25 DAP .....	29
5 - Efeito da posição da semente ao longo da espiga, no peso fresco e no potencial osmótico e coeficiente de correlação entre essas características e a posição da semente, em sementes <i>shrunken</i> da linhagem CP577, aos 25 DAP .....	30
6 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e <i>shrunken</i> da linhagem CP577, aos 25 DAP, em espigas segregantes.....	32
7 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e <i>shrunken</i> , da linhagem CP577, aos 25 DAP, em espigas homozigotas.....	33
8 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e <i>sugary</i> , da linhagem SRRD992, aos 25 DAP, em espigas segregantes.....	36
9 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e <i>sugary</i> , da linhagem SRRD992, aos 25 DAP, em espigas homozigotas.....	37
10 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico	

tico em sementes normais e <i>shrunken-2</i> , da linhagem ML674, aos 25 DAP, em espigas segregantes .....	39
11 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e <i>shrunken-2</i> , da linhagem ML674, aos 25 DAP, em espigas homozigotas .....	40
12 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e <i>opaque-2</i> , da linhagem ML649, aos 25 DAP em espigas segregantes .....	42
13 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e <i>opaque-2</i> , da linhagem ML649, aos 25 DAP em espigas homozigotas .....	43
14 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes F <sub>1</sub> dos cruzamentos recíprocos entre as linhagens ML649 e SRRD992, aos 25 DAP.....	45
15 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes F <sub>1</sub> dos cruzamentos recíprocos entre as linhagens ML674 e SRRD992, aos 25 DAP.....	46
16 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes F <sub>1</sub> dos cruzamentos recíprocos entre as linhagens ML649 e ML674, aos 25 DAP.....	47
17 - Atividade da RNase nos endospermas normais e mutantes das linhagens ML649, ML674, SRRD992 e CP577, aos 25 DAP, em espigas segregantes (A) e espigas homozigotas (B).....	49
18 - Atividade da RNase em endospermas normais de sementes F <sub>1</sub> obtidas dos cruzamentos entre as linhagens ML649, ML674 e SRRD 992, aos 25 DAP:.....	52
19 - Diferença de potencial osmótico e atividade da RNase entre os endospermas normais e mutantes, analisados aos 25 DAP .....	53

## 1 - INTRODUÇÃO

Alterações na atividade metabólica de tecidos vegetais devido a variações em características do ambiente, tem sido extensivamente estudadas pelos fisiologistas vegetais. Entre essas características, o efeito do estresse de água no metabolismo da planta tem merecido grande atenção. O estresse de água, leva a uma diminuição no potencial de água da planta, acarretando inúmeras modificações no seu metabolismo (Hsiao, 1973; Hsiao *et al* , 1976).

Os estudos abordando esses aspectos são conduzidos quase sempre submetendo-se a planta a condições artificiais de estresse de água. Isso pode ser conseguido, deixando-se de irrigar plantas cultivadas em potes por um determinado período, ou então incubando-se tecidos ou células em soluções de baixo potencial osmótico (Hsiao, 1973; Hsiao *et al* , 1976; Premecz *et al* , 1977; Premecz *et al* , 1978). Tratamentos de tecidos com soluções de baixo potencial osmótico, fazem com que a água sofra difusão de dentro para fora da célula, até que se estabeleça o equilíbrio. Assim, o potencial de água da célula fica igual ao potencial osmótico da solução.

Embora exista um grande número de trabalhos tratando do efeito do estresse de água no metabolismo da planta, pouca atenção tem sido dada a esse aspecto, sob o ponto de vista genético. Quando muito, encontramos estudos comparativos envolvendo variedades e/ou espécies diferentes de plantas. Entretanto, em várias espécies de plantas, são bastante comuns, mutações simples, que alteram tanto características físicas como metabólicas de determinados tecidos, proporcionando uma situação impar para o estudo do efeito de estresses no metabolismo.

Em milho e cevada, vários mutantes de endosperma, apresentam altas concentrações de açúcares, aminoácidos e íons na semente (Creech, 1965;

Misra *et al*, 1965; Goodsell, 1968; Creech, 1968; Ayers e Creech, 1969, Sodek e Wilson, 1971; Shanon e Creech, 1973; Hodges *et al*, 1977; Arruda *et al*, 1978; Tsai *et al*, 1978, Ullrich e Eslich, 1978<sub>a</sub>, 1978<sub>b</sub>, 1978<sub>c</sub>; Arruda e Silva, 1979). Esses mutantes apresentam alto grau de turgescência, que pode ser inferido pelo maior conteúdo de água em relação aos endospermas normais (Arruda, 1979), indicando uma provável alteração no potencial de água desse tecido. Por outro lado, esses mutantes apresentam uma série de modificações em certas características físicas e metabólicas, que podem estar associadas não com o efeito direto do gene, mas com modificações no potencial de água do endosperma, de maneira análoga ao que ocorre com plantas submetidas ao estresse de água.

O presente trabalho consiste num estudo sobre variações no potencial osmótico do endosperma, determinadas por mutações que afetam o metabolismo de carboidratos da semente, e sua associação com algumas características físicas e com a atividade da RNase do endosperma. A RNase foi escolhida tendo em vista os inúmeros estudos sobre a ação gênica na atividade dessa enzima em endosperma de milho. Vários autores tem demonstrado que a atividade da RNase é aumentada pela presença de alguns mutantes de endosperma. Esse aumento, entretanto, pode ser devido a diminuição no potencial de água do endosperma, determinada por esses mutantes, uma vez que em vários tecidos, de várias espécies de plantas existe uma correlação negativa entre o potencial de água e a atividade da RNase. Constitue-se objetivo deste trabalho também, o estudo da atividade da RNase em mutantes de endosperma diferentes daqueles já relatados na literatura.

## 2 - REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 - Efeito do estresse de água no metabolismo.

Em condições de estresse de água, tem sido observadas mudanças bastante peculiares nas concentrações de alguns hormônios em plantas. Com a redução do potencial de água do tecido, o nível de ácido abscísico aumenta drasticamente (Arad *et al*, 1973; Hsiao, 1973; Hsiao *et al*, 1976). O aumento na concentração desse hormônio, ocorre aparentemente devido à síntese de novo (Miborrow, 1974). Com o retorno ao potencial normal, o nível de ácido abscísico diminui rapidamente até atingir a concentração normal do tecido. O inverso ocorre com a citocinina. Em condições de estresse de água, o nível desse hormônio diminui, voltando ao nível normal, apenas com a reidratação da planta (Hsiao, 1973; Hsiao *et al*, 1976).

O aminoácido prolina tem sido considerado como um indicador de falta de água, em várias espécies de plantas. Discos de folhas ou protoplastos de tabaco, em soluções de manitol de baixo potencial osmótico, acumulam altos níveis de prolina (Premecz *et al*, 1977; Huang e Cavalieri, 1979). Tymms e Gaff (1979), também encontraram acúmulo de prolina em folhas de várias espécies de plantas, submetidas à condições de estresse de água.

O efeito do estresse de água no metabolismo enzimático, é bem conhecido em várias espécies de plantas. Hsiao(1973) num artigo de revisão verificou que vários sistemas enzimáticos são alterados em função da diminuição no potencial de água da planta. Pelo menos 25 enzimas são afetadas, sendo que a maioria delas apresenta menor atividade em condições de estresse de água(Hsiao, 1973; Mills e Todd, 1973). Excessões são feitas para a ribonuclease e para a  $\alpha$ -amilase, que aumentam a atividade em condições de bai-

xo potencial de água (Hsiao, 1973).

Alterações no metabolismo enzimático associadas a modificações no potencial osmótico, também foram encontradas em *Oeromonas*. Com a diminuição no potencial osmótico da célula, ocorre um aumento na atividade da enzima isofloridosídeo fosfato sintase, com um conseqüente aumento na concentração de galactosilglicerol. Esse efeito parece estar envolvido com o sistema de regulação osmótica dessa alga (Kauss, 1973; Quader e Kauss, 1975; Kauss e Quader, 1976; Kauss, 1979; Kauss *et al*, 1979).

Uma das enzimas mais estudadas em plantas submetidas a condições de estresse de água é a ribonuclease. Muito embora, não seja ainda bem conhecido o papel fisiológico dessa enzima em plantas, tem sido constatado que a atividade da RNase aumenta em tecidos submetidos a estresses de água longos e severos. Esse aumento em alguns casos está correlacionado com uma diminuição no conteúdo de polirribossomos no citoplasma (Dove, 1971; Hsiao 1973; Arad *et al*, 1973; Arad e Richmond, 1976; Hsiao *et al*, 1976; Bleckhman, 1978). O efeito do potencial osmótico na atividade da RNase parece ocorrer de modo diferente em sistemas ou espécies diferentes. Premecz *et al*, (1977) verificaram que protoplastos de tabaco, incubados em soluções de manitol de baixo potencial osmótico, aumentam em 100% a atividade da RNase. Esse aumento ocorre devido a síntese de novo da enzima, uma vez que a adição de 1 mg/ml de cicloheximida no meio de incubação, inibe completamente o aumento da atividade da enzima. Todd e Yi (1979) constataram que o estresse de água, aumenta a atividade da RNase em folhas de trigo. Entretanto, em contraste com os resultados de Premecz *et al*, (1977), esse aumento não ocorre devido a síntese de novo, mas sim devido ao desaparecimento de um inibidor da enzima.

Como foi dito anteriormente, o estresse de água afeta a concentração de hormônios, diminuindo o nível de citocinina e aumentando o do ácido abscísico. Coincidentemente, esses dois hormônios tem efeitos antagônicos

sobre a atividade da RNase. Sodek e Wright (1969) verificaram que o aumento da atividade da RNase em folhas de trigo é totalmente inibido pela citocinina. Por sua vez, o aumento na atividade da RNase em protoplastos de tabaco submetidos a soluções com baixo potencial osmótico é estimulado pelo ácido abscísico e inibido pela citocinina (Premecz *et al*, 1977). Em algumas espécies de plantas, a atividade da RNase é inibida por ribosídeos de citocinina (Rijven, 1979). Associações entre o potencial de água da folha, o nível de ácido abscísico e a atividade da RNase também foram encontradas por Arad *et al* (1973). Leshem (1971), acha que o ácido abscísico atua como promotor da atividade da RNase. Assim, com a diminuição do potencial de água do tecido, o nível de ácido abscísico é aumentado. Esse aumento por sua vez é que deve ser o responsável pelo aumento na atividade dessa enzima.

Durante o processo de senescência das plantas, tem sido verificado um aumento na atividade da RNase. Esse aumento pode ser acelerado ou inibido pelo ácido abscísico e pela citocinina, respectivamente (Srivastava, 1968 ; De Leo e Sacher, 1970).

Muito embora não se tenha correlação direta entre a atividade da RNase e o conteúdo de proteínas e RNA do tecido, o estresse de água, quase sempre afeta essas características simultaneamente. A incorporação de precursores marcados de RNA e proteína em protoplastos de tabaco, diminui, quando estes são submetidos a soluções de baixo potencial osmótico (Premecz *et al*, 1978). Bourque e Naylor (1971), verificaram que uma diminuição no potencial de água de -5 para -8 bar acarreta uma diminuição na síntese de RNA em folhas de feijão. Os autores sugerem que esse efeito pode ser devido a hidrólise do RNA no citoplasma. Em plântulas de milho, a diminuição na quantidade de RNA devido ao estresse de água, afeta principalmente a formação de polirribossomos. Com a recuperação do potencial de água, o nível de polirribossomos aumenta novamente. (Hsiao, 1970). Folhas de trigo submetidas a baixos potenciais de água apresentam menor conteúdo de proteínas solúveis de baixo pe

so molecular (Todd *et al*, 1970). Esses autores sugerem que aparentemente ocorre hidrólise de proteínas durante o tratamento que induz o estresse de água. Em adição, Arad *et al*, (1973), encontraram maior atividade de proteases em folhas submetidas ao estresse de água.

A atividade da RNase é afetada também em tecidos infectados por patógenos ou em tecidos submetidos a injúrias mecânicas (Wilson, 1975).

## 2.2 - Atividade da Ribonuclease em milho.

A atividade da RNase em endosperma de milho, tem sido extensivamente estudada por C.M. Wilson. Esse autor constatou inicialmente, a existência no milho de três tipos de nucleases; RNase I, RNase II e nuclease I (Wilson, 1968). As duas ribonucleases são endonucleases específicas para RNA e liberam nucleotídeos cíclicos de purina e pirimidina a partir de dinucleotídeos monofosfatos ou a partir do próprio RNA. A nuclease I, atua tanto em DNA como em RNA, liberando 5'-nucleotídeos. A RNase I, apresenta-se solúvel na célula, enquanto que a RNase II está associada à fração microssômica. A RNase I possui um peso molecular de aproximadamente 23000 daltons, a RNase II de 17000 e a nuclease I de 31000 daltons (Wilson, 1975). Tanto a RNase I como a RNase II em milho, são mais ativas em dinucleotídeos de purina em relação a dinucleotídeos de pirimidina (Wilson, 1975). Em outras espécies de plantas, parece também ocorrer especificidades para RNases. Uma RNase encontrada em células de germen de centeio, hidroliza preferencialmente sítios de nucleotídeos de adenina (Kuligowska *et al*, 1980). Pietrzak *et al*, (1980), verificaram que RNases de sementes de cevada, são mais específicas para RNAs poli A e poli U, e não hidrolizam RNAs poli G.

A RNase do endosperma de milho, purificada 41000 vezes apresentou

uma mesma e única banda em eletroforese de poliacrilamida, em dois híbridos analisados (Wilson, 1967).

Em 1971, Wilson num estudo eletroforético mais detalhado, verificou que a RNase I apresenta somente uma banda e é a enzima predominante no endosperma de milho. Entretanto, a RNase II apresentou duas isoenzimas enquanto que a nuclease I de mitocôndria apresentou três isoenzimas. Várias linhagens e os mutantes *opaque-2* e *floury-2* apresentaram a mesma banda de RNase I no endosperma.

O papel fisiológico, bem como a localização da RNase no citoplasma ainda é desconhecido. Especula-se que a enzima poderia estar em lisossomos que seriam rompidos durante o processo de homogenização do tecido, realizado para a dosagem da atividade (Wilson, 1975).

Em sementes de trigo, arroz, milho e sorgo, a atividade da RNase aumenta com o desenvolvimento do endosperma, permanecendo em altas concentrações até o final da maturação da semente (Dalby e Davies, 1967; Dalby e Cagampang, 1970; Wilson, 1975). Ao mesmo tempo, tanto o conteúdo de RNA como o de proteínas também aumentam com o desenvolvimento da semente (Wilson, 1975)

### 2.3 - Atividade da RNase em mutantes de endosperma de milho.

O estudo da atividade da RNase em mutantes de endosperma de milho teve seu início, após a descoberta efetuada por Mertz *et al* (1964) do alto conteúdo de lisina no mutante *opaque-2*, numa tentativa de se elucidar o efeito desse gene na síntese de proteínas da semente. Assim, Wilson (1967) verificou que sementes maduras de milho *opaque-2* nas linhagens 07N, 0h43 e 0h45, apresentavam de 1,7 a 4,4 vezes mais atividades da RNase em relação

as versões normais dessas linhagens. Entre as linhagens normais o autor encontrou uma variação de 730 a 1560 unidades da enzima por grama de peso fresco. O autor sugeriu nessa época que a alta atividade da RNase no endosperma *opaque-2* poderia inibir a síntese de zeína, digerindo especificamente o seu mRNA, embora a atividade da enzima nas sementes normais fosse alta o suficiente para digerir todo o RNA do endosperma em 10 minutos.

Simultaneamente ao trabalho de Wilson (1967), Dalby e Davies (1967), publicaram resultados semelhantes. Utilizando-se da linhagem W64A, esses autores verificaram que a atividade da RNase no endosperma *opaque-2* era 6 vezes maior do que no tipo normal, durante o desenvolvimento da semente. Dalby e Davies (1967) verificaram também a existência de efeito de dosagem para o alelo *opaque-2*. A existência desse efeito foi confirmada posteriormente por Dalby e Cagampang (1970). Esses autores também sugeriram uma associação entre a maior atividade da RNase e o menor conteúdo de zeína no endosperma *opaque-2*.

O mutante de endosperma *floury-2*, ao contrário do gene *opaque-2* não revelou nenhuma associação entre o conteúdo de zeína e a atividade da RNase. Embora o conteúdo de zeína desse mutante seja menor que no tipo normal, a atividade da RNase foi semelhante (Dalby e Cagampang, 1970).

Recentemente, Tsai *et al* (1978) reexaminaram a hipótese de associação entre a atividade da RNase e o conteúdo de zeína em mutantes de endosperma de milho. Utilizando os mutantes *opaque-2* e *brittle-2* e o duplo mutante *opaque-2brittle-2*, esses autores verificaram que os endospermas mutantes reduziam em cerca de 50% o conteúdo de zeína e possuíam 2,5 vezes mais RNase que o endosperma normal. A combinação *o2bt2*, produziu um efeito sinérgico, reduzindo quase que totalmente a zeína do endosperma. A atividade da RNase no duplo mutante aumentou cerca de 7,5 vezes em relação ao endosperma normal. Por outro lado, enquanto no endosperma normal e *opaque-2*, o conteúdo de sacarose oscilou em torno de 10% do peso seco, o mu

tante *brittle-2* e o duplo mutante *opaque-2brittle-2* apresentaram cerca de 30 e 40% de sacarose no endosperma, respectivamente, aos 22 dias após a polinização (DAP). A análise do conteúdo de polissomos nesses mutantes revelou uma redução de 20% nos mutantes *opaque-2* e *brittle-2*, enquanto que no duplo mutante a redução foi de 40%. Os autores, embora não tenham encontrado evidências mais concretas, sugeriram que a alta atividade da RNase deve estar associada de alguma maneira com a diminuição do mRNA específico da zeína. Os autores sugeriram também que a alta concentração de sacarose encontrada principalmente no duplo mutante *o2bt2*, pode dificultar a associação de mRNAs e ribossomos, para a formação dos polissomos.

#### 2.4 - Controle genético da atividade da RNase em endosperma de milho.

Wilson (1973 e 1980), encontrou uma variação de 285 a 1305 unidades de RNase entre endospermas normais em várias linhagens analisadas. Além disso, algumas linhagens apresentaram variações na atividade da enzima, de um ano para outro. Nove versões *opaque-2* dessas linhagens apresentaram de 1288 a 5110 unidades de RNase. No  $F_2$  de linhagens heterozigotas para o gene *opaque-2*, o autor encontrou segregação de 3:1, para baixa e alta atividade respectivamente, aos 22 DAP. O cruzamento entre linhagens normais de alta e baixa atividade, mostrou, nas gerações  $F_1$ ,  $F_2$  e  $F_3$  e nos retrocruzamentos, atividades semelhantes ou menor que a média das atividades parentais. Por outro lado, cruzamentos recíprocos revelaram efeitos bastante acentuados da planta mãe. Com base nesses resultados o autor concluiu que devem existir três diferentes grupos de genes que controlam a atividade da RNase em endosperma de milho. Um primeiro grupo, controlaria a síntese da RNase em endospermas normais. Um segundo, controlaria a duração da síntese da RNase

durante o desenvolvimento do endosperma e finalmente, o gene *opaque-2* , que em homozigose aumentaria a atividade dessa enzima. Essa conclusão, en tretanto, não parece adequada, uma vez que o gene *brittle-2* também aumenta a atividade da RNase do endosperma (Tsai *et al*, 1978). Por outro lado, na da se sabe sobre a atividade dessa enzima em outros mutantes de endosperma de milho. Além disso, pouca ênfase tem sido dada às associações entre características físicas e atividade metabólica do endosperma, que não somente no caso da RNase, mas também para outros aspectos do metabolismo da semente, pode ser fundamental para a compreensão da ação gênica no desenvolvimento desse tecido.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Linhagens de milho

Para a realização deste trabalho, foram escolhidas 4 linhagens de milho, com endospermas normais e mutantes, cada uma segregando para um loco diferente. Os mutantes foram escolhidos em função dos seus efeitos na síntese de amido, com vistas a se obter diferenciais no potencial osmótico do endosperma. Para tanto, foram escolhidos os mutantes *shrunk*, *shrunk-2* e *sugary* bem como o mutante *opaque-2* o qual foi incluído como referencial, devido os inúmeros estudos sobre seu efeito na atividade da RNase. As linhagens utilizadas foram as seguintes:

<u>Linhagem</u>	<u>Tipos de endosperma</u>
ML649	normal e <i>opaque-2</i>
ML674	normal e <i>shrunk-2</i>
CP577	normal e <i>shrunk</i>
SRRD992	normal e <i>sugary</i>

Essas linhagens são isogênicas, possuindo um mínimo de 10 ciclos sucessivos de autofecundação e pertencem à coleção de germoplasma do Prof. William José da Silva do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP.

A Figura 1, mostra as sementes normais e mutantes dessas linhagens.

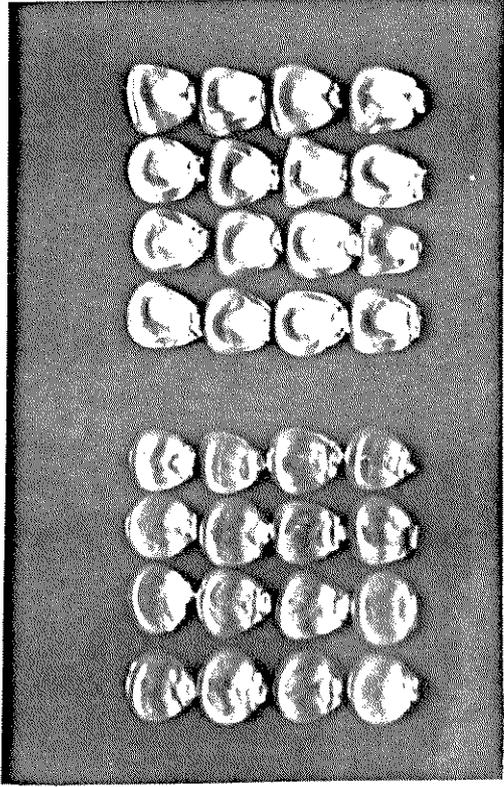
Para complementar o trabalho, foram também estudadas sementes normais da geração  $F_1$ , obtidas de cruzamentos dialélicos envolvendo as linha -

Figura 1 - Sementes normais e mutantes das linhagens de milho ML649,  
ML674, CP577 e SRRD992.

CP577

norma l

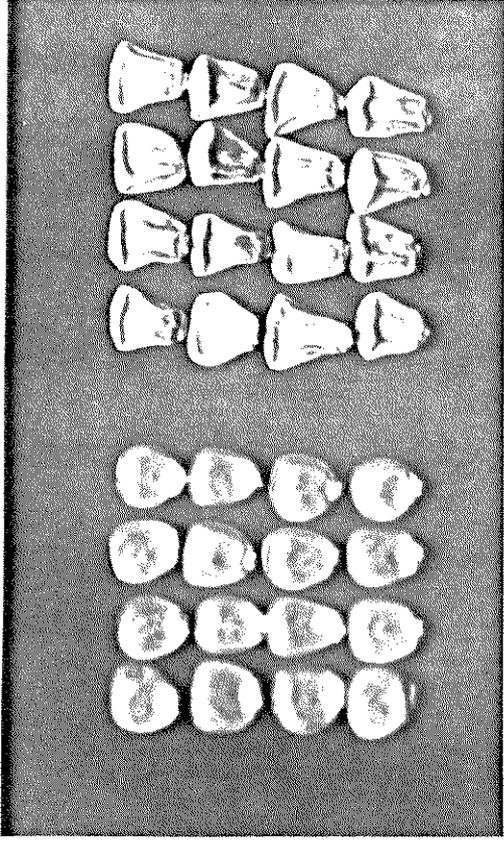
shrunk en



ML674

norma l

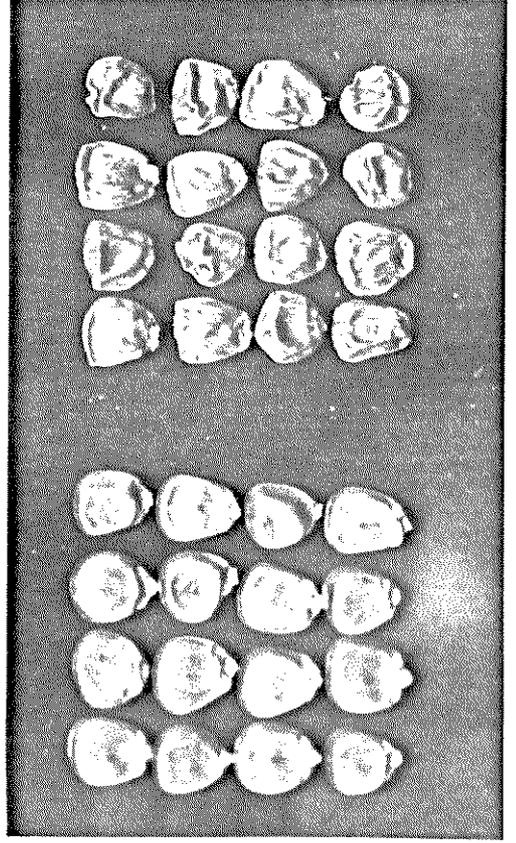
shrunk en-2



SRRD992

norma l

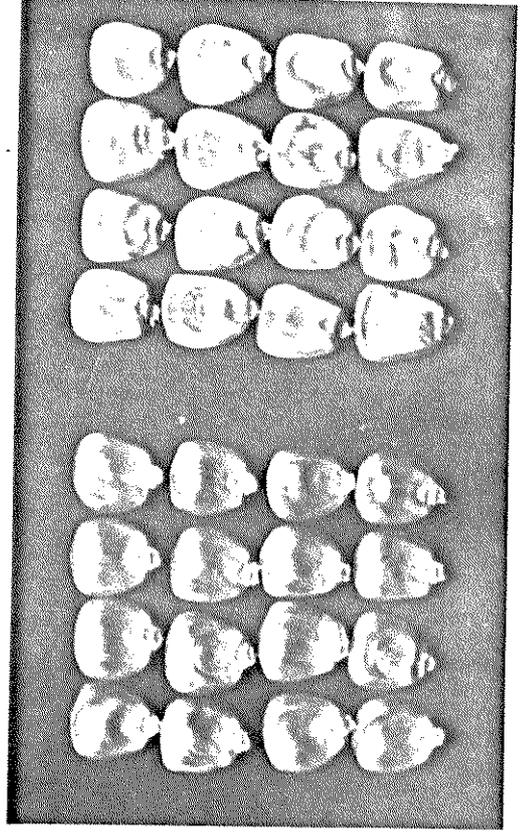
sugary



ML649

norma l

opaque-2



gens ML649, ML674 e SRRD992. Neste grupo foi também incluído o híbrido simples HS 7777 do tipo dentado, selecionado no Instituto Agronômico de Campinas (Paterniani, 1978).

### 3.2 - Ensaios de campo.

Para a realização deste trabalho, foram efetuados dois experimentos. No primeiro, para a determinação da curva de crescimento das sementes e da atividade da RNase, sementes normais e mutantes das linhagens ML649, ML674 e CP577 foram plantadas na forma de ensaio com duas repetições. O ensaio constituiu-se de dois blocos de linhas, de 10 metros de comprimento, no espaçamento de 1,0 x 0,4 metros, numa densidade de plantio de 50000 plantas por hectare. As versões mutantes foram plantadas adjacientemente às plantas normais da mesma linhagem. As parcelas experimentais foram adubadas com N,  $P_2O_5$  e  $K_2O$  na proporção de 60, 80 e 40 Kg/ha, respectivamente. Foram coletadas 4 espigas por repetição de cada material, das quais efetuou-se uma amostra composta. As espigas foram coletadas semanalmente, ao longo do desenvolvimento, a partir da 2ª semana após a polinização (SAP). Imediatamente após a coleta, uma parte das sementes foi utilizada para as determinações de peso fresco e seco, e o restante foi armazenado em congelador a  $-20^{\circ}C$ .

Paralelamente a esse ensaio, foram plantadas, nas condições descritas acima, sementes do híbrido simples HS 7777, no qual estudou-se a curva de crescimento e o potencial osmótico da semente, ao longo do desenvolvimento.

No segundo experimento, as quatro linhagens foram plantadas em linhas adjacentes de 15 m de comprimento, em apenas um bloco, obedecendo as mesmas condições descritas para o primeiro experimento. Neste caso foram

efetuados dois sistemas de polinização, visando a obtenção de dois tipos diferentes de amostragem de material para análise. Num deles, os genótipos normais e mutantes de cada linhagem, foram produzidos numa mesma espiga utilizando-se a técnica descrita por Arruda e Silva (1979). Essa técnica consiste na polinização de espigas das plantas mutantes com uma mistura de pólen normais e mutantes na proporção de 1:1. Com essa técnica, obtém-se o máximo de precisão na comparação do efeito de genes, uma vez que os genótipos contrastantes se desenvolvem no mesmo ambiente, isto é, na mesma posição da mesma espiga. Entretanto, como alguns autores demonstraram a existência de efeito de dosagem para certos genes que atuam no endosperma (Dalby e Davies, 1967; Paez *et al*, 1970 ; Dalby e Cagampang, 1970), foram efetuadas também polinizações de espigas normais e mutantes em plantas separadas. Para isso, as plantas foram simplesmente autofecundadas. Nesse caso, os genótipos dos endospermas foram necessariamente homocigotos recessivos ou homocigotos dominantes, obviamente obtidos em plantas diferentes. Todas as polinizações foram efetuadas num mesmo dia para cada linhagem. Foram amostradas três espigas por tratamento aos 25 DAP. Esse estágio foi escolhido, em função dos estudos preliminares da curva de crescimento e da atividade da RNase de cada material. Nesse estágio, o alto conteúdo de água dos endospermas facilitou sobremaneira o trabalho de homogeneização das sementes. Nesse experimento, foram efetuados também os cruzamentos dialélicos e recíprocos das linhagens normais ML649, ML674 e SRRD992. De cada um desses cruzamentos foram coletadas 3 espigas aos 25 DAP. Imediatamente após a coleta uma parte das sementes foi utilizada para as determinações dos pesos fresco e seco e do potencial osmótico dos endospermas, sendo o restante das sementes armazenado em congelador a -20°C, para a determinação, posteriormente, da atividade da RNase.

### 3.3 - Determinação do potencial osmótico.

Para a determinação do potencial osmótico das sementes, foi efetuado inicialmente um estudo para o estabelecimento da metodologia, utilizando-se algumas alternativas de medidas. Inicialmente, 10 sementes com 15 DAP do híbrido simples HS 7777 foram maceradas em almofariz. O extrato obtido, foi centrifugado a 1000xg e o sobrenadante foi utilizado para a determinação do potencial osmótico. Foram efetuadas medidas diretas nesse extrato bruto, e também medidas no extrato diluído 1:5. Num outro sistema, endospermas individuais foram macerados com 2 ml de água destilada, num homogenizador de vidro de 10 ml. Em seguida o extrato foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para a medida do potencial osmótico. Neste caso, foram determinados os pesos fresco e seco dos endospermas individuais, para se saber o conteúdo de água dos mesmos no momento da extração. O potencial osmótico,  $\Psi_s$ , nos endospermas individuais foi calculado a partir da seguinte expressão:

$$\Psi_s = \frac{V1 + V2}{V1} \cdot \Psi_{sd}$$

onde

$$V1 = PF - PS$$

PF = peso fresco do endosperma, em gramas

PS = peso seco do endosperma, em gramas

V1 = volume de água do endosperma, em ml, considerando-se a densidade da água igual a 1.

V2 = volume de água adicionada, em ml

$\Psi_{sd}$  = potencial osmótico do extrato

O potencial osmótico foi medido num osmômetro OSMETE, calibrado com soluções de sacarose de diferentes molaridades (Tabela 1). Posteriormente essas medidas foram transformadas em bar segundo a Tabela 2.

A Tabela 3, mostra os dados de potencial osmótico dos diferentes extratos obtidos de endospermas do híbrido simples HS 7777, coletados aos 15 DAP. Como pode ser visto, os resultados entre os diferentes métodos de medida foram semelhantes, quando se compara os valores obtidos no extrato bruto com aqueles obtidos em endospermas individuais. Foram efetuadas também comparações entre os extratos centrifugados e sem centrifugar, obtendo-se resultados idênticos. Como neste trabalho, procurou-se analisar sementes individuais, optou-se pelo método descrito abaixo.

De uma mesma região da espiga, foram retiradas duas sementes, de preferência localizadas adjacientemente. Uma delas foi utilizada para as determinações de peso fresco e seco e a outra teve seu endosperma macerado com 2 ml de água. Essa operação foi efetuada em banho de gelo, para se evitar a atividade de enzimas hidrolíticas, que poderiam alterar a osmolalidade do meio. O potencial osmótico foi medido diretamente nesse extrato, utilizando-se cubetas de 2 ml.

#### 3.4 - Determinação da atividade da RNase.

A atividade da RNase foi determinada essencialmente como descrito por Sodek e Wright (1969). Endospermas individuais foram macerados com 2 ml de solução tampão de acetato de sódio 100 mM pH 6,0 em um homogenizador de vidro de 10 ml. Esse passo foi realizado em banho de gelo, para se diminuir a atividade metabólica do tecido durante a homogeneização. O extrato foi centrifugado a  $1000 \times g$  por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para os ensai-

Tabela 1 - Curva de calibração do osmômetro OSMETE com diferentes concentrações de sacarose.

Sacarose (mM)	Leitura (unid. arbit)
50	56
100	110
200	222
300	342
400	469
500	600
600	758

Tabela 2 - Valores de potencial osmótico, em bar, de soluções de sacarose de diferentes molaridades. Esses dados foram extraídos de Milburn (1979).

Sacarose (mM)	Potencial osmótico (bar)
100	- 2,6
200	- 5,2
300	- 8,0
400	-11,0
500	-14,1
600	-17,6

Tabela 3 - Valores de potencial osmótico de endospermas do híbrido simples HS 7777 aos 15 DAP, correspondentes aos tres métodos de medida testados.

Espiga (nº)	Extrato bruto (bar)	Extrato diluído (bar)	Endospermas individuais (bar)
1	-10,1	-11,3	- 9,8
2	- 9,5	-11,4	- 9,5

os.

A dosagem da atividade da RNase foi efetuada utilizando-se o RNA de levedura como substrato. Esse RNA foi purificado na forma de sal sódico, como se segue. Um grama de RNA foi dissolvido em água com um mínimo de NaOH. Em seguida o volume foi elevado para 100 ml com água, num pH final em torno de 6,0. A essa solução adicionaram-se 4 ml de solução de acetato de sódio 50%, mantendo-se a solução em agitação constante. Em seguida, adicionaram-se pouco a pouco, 250 ml de etanol. Essa solução foi mantida em geladeira até a sedimentação do precipitado. O precipitado foi coletado por centrifugação e lavado 2 vezes com etanol 95%, 2 vezes com etanol absoluto e finalmente 2 vezes com eter etílico. Em seguida, o precipitado foi seco ao ar.

A solução para o ensaio foi efetuada dissolvendo-se 4,8 mg/ml do RNA purificado, em solução tampão de acetato 100 mM pH 6,0. Essa solução foi mantida em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

O ensaio para a dosagem da atividade da enzima foi efetuado adicionando-se 1 ml da solução de RNA, 0,4 ml do extrato do endosperma e 0,6 ml de solução tampão de acetato 100mM pH 6,0, num volume final de 2 ml. A mistura foi incubada a  $37^{\circ}\text{C}$ . Meio ml da solução foi retirado aos 0, 10 e 20 minutos após a incubação e transferido para um tubo contendo 0,5 ml de solução 0,25% de acetato de uranila em ácido perclórico 5%. Os tubos foram colocados em banho de gelo e o precipitado foi retirado por centrifugação a  $1000\times g$ . Em seguida o sobrenadante foi diluído 20 vezes com água e a absorbância medida a 260 nm. Uma unidade da enzima, equivale a produção de  $0,1 \mu\text{mol}$  de nucleotídeos por hora, assumindo uma medida de  $A_{260}^{1 \text{ cm}} = 10$ , para  $1 \mu\text{mol}$  de nucleotídeos.

### 3.5 - Eletroforese da RNase.

A eletroforese da RNase foi efetuada em gel de poliacrilamida, se gundo Wilson (1971).

O gel foi preparado dissolvendo-se 7,5g de acrilamida e 0,22g de bisacrilamida em 100 ml de solução tampão de tris-HCl 71 mM pH 7,5. A essa mistura adicionaram-se 0,2 ml de TEMED e 1,0 ml de solução de persulfato de amônio a 5%. A mistura foi colocada rapidamente em placas de acrílico de 20 x 20 x 0,2 cm. Após a polimerização o gel foi armazenado em geladeira até ser usado.

A enzima para eletroforese foi preparada homogenizando-se endos - permas individuais com 0,5 ml de solução tampão de tris-HCl 71 mM pH 7,5. O extrato foi centrifugado a 1000xg por 10 minutos, e o sobrenadante utilizado para eletroforese. Para a eletroforese, papéis de filtro Whatman nº 3 (3 x 2 mm) foram embebidos com o sobrenadante e inseridos no gel. Papéis de filtro embebidos em azul de bromofenol foram inseridos nas extremidades horizontais do gel para servirem como guia da frente de corrida. A eletroforese foi desenvolvida por 2 horas à 160 volts e 50 mA, utilizando-se barbital 30 mM + HEPES 4,2 mM pH 7,5 como tampão do eletrodo.

Após a corrida o gel foi incubado por 13 minutos em solução tampão de citrato 50 mM pH 5,0 a 37°C. Em seguida esse tampão foi retirado e o gel foi incubado por 1 hora a 37°C com solução tampão de acetato 50 mM pH 5,4 contendo 4 mg/ml de RNA. Após a incubação esse tampão foi retirado, sen do novamente adicionado ao gel, a solução de citrato 50 mM por 5 minutos. Em seguida, essa solução foi retirada, e o gel foi incubado em uma solução de azul de toluidina 0,2% em ácido acético 0,5% por 30 minutos. Após a colo ração, o gel foi colocado em uma solução de ácido acético 0,5% pH 3,0. O ácido acético foi trocado por 2 a 3 vezes. Depois de 1 hora no ácido acético,

o gel foi lavado com água e colocado em um recipiente contendo ácido perclórico 5%. Depois de algum tempo, bandas incolores, indicando a atividade da enzima, aparecem num fundo azul. As bandas ficam incolores em função da ausência de coloração do RNA hidrolizado.

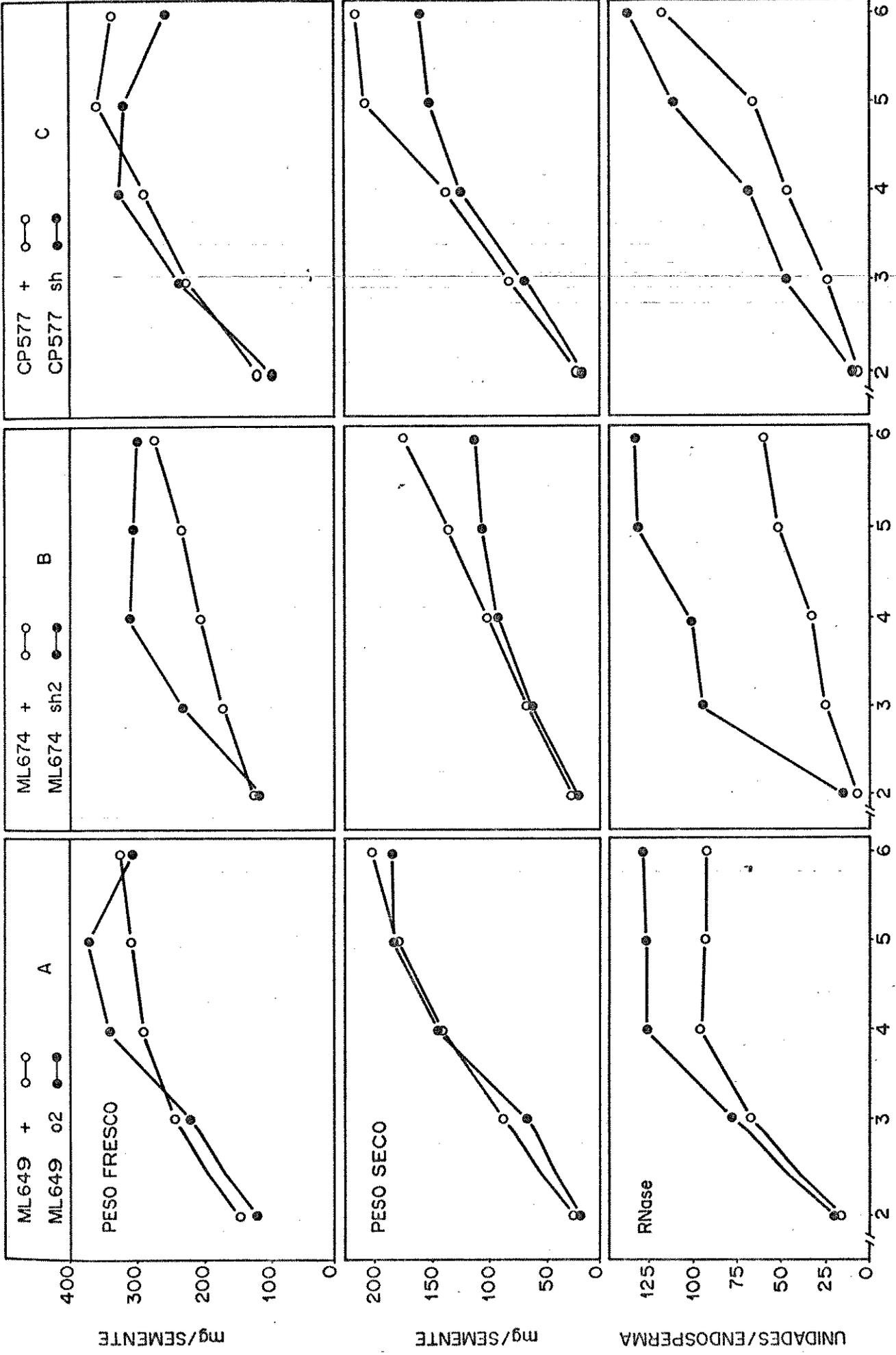
#### 4 - RESULTADOS

##### 4.1 - Peso fresco, peso seco e atividade da RNase em mutantes de endosperma de milho, durante o desenvolvimento da semente.

A Figura 2, mostra os pesos fresco e seco e a atividade da RNase em endospermas normais e mutantes, durante o desenvolvimento da semente. A Figura 2A, mostra os dados referentes à linhagem ML649, versões normal e *opaque-2*. O peso fresco do endosperma mutante foi menor em relação ao endosperma normal, durante as primeiras 3 semanas após a polinização (SAP). Entretanto, os valores tornam-se mais elevados na 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> SAP, diminuindo novamente na 6<sup>a</sup> SAP. Nas 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> SAP, o peso fresco do endosperma *opaque-2* foi, respectivamente, 16 e 19% maior que o do endosperma normal. Por outro lado, enquanto no endosperma normal o peso fresco aumenta sempre até a 6<sup>a</sup> SAP, o endosperma *opaque-2* mostrou valores crescentes até a 5<sup>a</sup> SAP, diminuindo posteriormente na 6<sup>a</sup> SAP. Esses resultados indicam que o processo de retenção de água pela semente, deve ser diferente entre os dois genótipos. Quanto ao peso seco, não houve diferenças significativas entre os dois genótipos, durante todo o desenvolvimento da semente. A atividade da RNase aumentou com o desenvolvimento da semente nos dois genótipos e foi sempre maior no endosperma mutante. As diferenças na atividade da enzima entre os endospermas normais e mutantes, foram aparentemente constantes a partir da 4<sup>a</sup> SAP. Desse estágio em diante o endosperma *opaque-2* apresentou uma atividade 25% mais elevada que o endosperma normal.

A Figura 2B, mostra os pesos fresco e seco e a atividade da RNase para a linhagem ML674, versões normal e *shrunk-2*. O peso fresco do endosperma mutante foi bem maior que o do endosperma normal durante pratica-

Figura 2 - Peso fresco, peso seco e atividade da RNase em endospermas normais (+) e mutantes das linhagens ML649, ML674 e CP577, durante o desenvolvimento da semente.



SEMANAS APÓS A POLINIZAÇÃO

mente todo o desenvolvimento da semente. A partir da metade da 2<sup>a</sup> SAP, o endosperma *shrunk-en-2* apresentou peso fresco em torno de 40% mais elevado que o endosperma normal. A semelhança da linhagem ML649 *opaque-2*, o endosperma *shrunk-en-2* atingiu o máximo de seu peso fresco nos estádios intermediários do desenvolvimento da semente, enquanto que o endosperma normal apresentou valores crescentes até a 6<sup>a</sup> SAP. A diminuição no peso fresco nos estádios finais da maturação, no endosperma *shrunk-en-2*, deve-se provavelmente a perda de água, indicando também, à semelhança do endosperma *opaque-2*, que a retenção de água pelo endosperma mutante se processa de maneira diferente do endosperma normal. Quanto ao peso seco, entretanto, as posições se inverteram. O endosperma mutante apresentou peso seco bem menor que o endosperma normal, principalmente nos estádios finais do desenvolvimento da semente. Nas 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> SAP, o endosperma *shrunk-en-2* apresentou uma redução no peso seco da ordem de 20 e 35%, respectivamente, em relação ao endosperma normal. A atividade da RNase foi muito maior no endosperma mutante em relação ao normal, durante todo o desenvolvimento da semente. A partir da 3<sup>a</sup> SAP a atividade da enzima foi 200% mais elevada no endosperma *shrunk-en-2*.

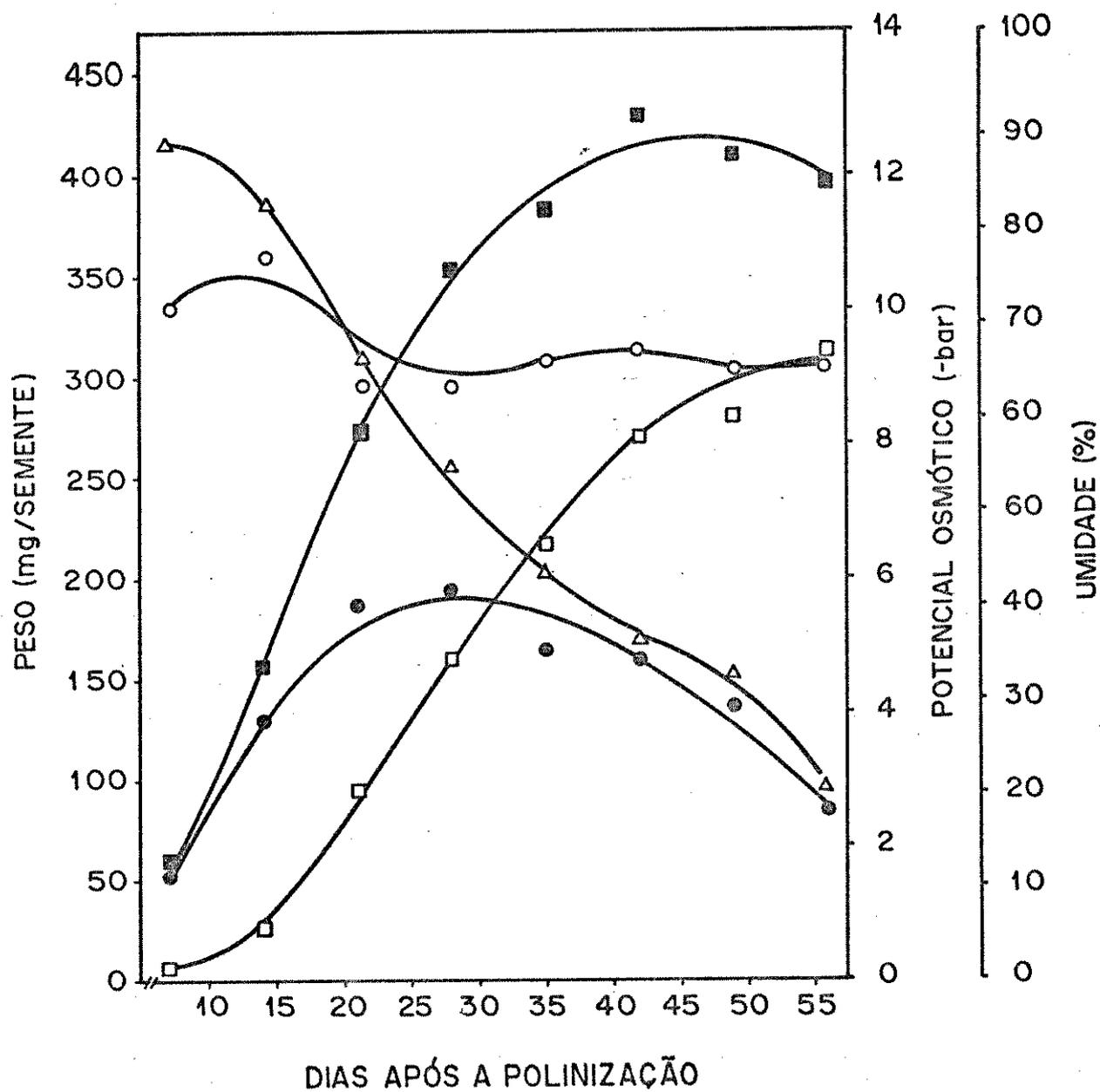
A Figura 2C, mostra os dados de peso fresco e peso seco e atividade da RNase para a linhagem CP577, versões normal e *shrunk-en*. O peso fresco do endosperma mutante atingiu o valor máximo ao redor da 4<sup>a</sup> SAP, diminuindo em seguida até a 6<sup>a</sup> SAP. O endosperma mutante apresentou peso fresco maior na 4<sup>a</sup> SAP, e menor nas 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> SAP em relação ao endosperma normal. Nesse caso também, os resultados indicam processos diferentes de retenção de água entre os dois genótipos, à semelhança do que ocorreu para os outros dois mutantes analisados. Quanto ao peso seco, o endosperma *shrunk-en* foi sempre menor que o endosperma normal durante todo o desenvolvimento da semente. Nas 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> SAP, o endosperma *shrunk-en* apresentou uma redução no peso seco ao redor de 28% em relação ao endosperma normal.

A atividade da RNase, à semelhança do que ocorreu para os outros mutantes estudados, foi sempre maior no endosperma *shrunken*, durante todo o desenvolvimento da semente. A diferença na atividade da enzima entre o endosperma mutante e o normal, foi maior nos estádios intermediários do desenvolvimento da semente.

#### 4.2 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em endospermas do híbrido simples HS 7777, durante o desenvolvimento da semente.

A Figura 3, mostra as interrelações entre o peso, conteúdo de água e o potencial osmótico do endosperma do híbrido simples HS 7777, durante o desenvolvimento da semente. Como pode ser visto, o peso seco da semente, apresentou uma fase exponencial de crescimento entre os 15 e 40 DAP. A partir desse estágio, o crescimento em termos de peso seco praticamente não se alterou até o final da maturação da semente. O peso fresco também apresentou uma fase exponencial até os 30 DAP. A partir dos 45 DAP, iniciou-se um decréscimo no peso fresco, que se manteve até o final da maturação da semente. Essa queda corresponde à perda líquida de água por parte da semente, processo esse que se verifica a partir dos 30 DAP. Em termos percentuais, o conteúdo de água da semente é mais elevado no início do desenvolvimento, diminuindo então, quase que linearmente até o final da maturação. Apesar das grandes alterações que ocorreram no peso e no conteúdo de água da semente, alterações essas que chegam a quase 10 vezes em relação aos valores iniciais, o potencial osmótico do endosperma permaneceu constante, durante todo o desenvolvimento da semente. Algumas pequenas alterações ocorreram nas duas primeiras semanas do desenvolvimento da semente onde ob

Figura 3 - Peso fresco (■), peso seco (□), conteúdo de água (●), porcentagem de umidade (Δ) e potencial osmótico (O) em sementes do híbrido simples HS 7777, durante o desenvolvimento. Cada valor representa a média de 10 repetições.



servou-se oscilações para o potencial osmótico entre -9,0 e -11,0 bar. Nos outros estádios do desenvolvimento do endosperma, o potencial osmótico permaneceu ao redor de -9,0 bar.

Uma vez estabelecido o padrão de potencial osmótico durante o desenvolvimento da semente e considerando-se as curvas de crescimento em peso e os padrões de atividade da RNase nos diferentes genótipos, foi realizado o segundo experimento, com o objetivo de se obter informações um pouco mais precisas a respeito das associações entre essas características no endosperma de milho.

#### 4.3 - Influência da posição da semente, ao longo da espiga sobre o peso e o potencial osmótico do endosperma.

Inicialmente, com o objetivo de se determinar a posição da espiga na qual as sementes seriam amostradas para análise, foram medidos o potencial osmótico e o peso fresco de endospermas individuais ao longo do comprimento da espiga, em três espigas normais (Tabela 4) e três espigas *shrunk* (Tabela 5), da linhagem CP577. Para isso, 10 sementes foram retiradas de uma mesma fileira, alternando-se uma sim, uma não, a partir da base da espiga, cobrindo todo o seu comprimento.

Como pode ser visto, o tamanho da semente diminui gradualmente a partir da base (Tabelas 4 e 5, primeiras linhas) apresentando na extremidade superior da espiga (Tabelas 4 e 5, últimas linhas), uma redução no peso fresco em torno de 25% em relação as sementes da base, tanto para as espigas normais como para as mutantes. Essa redução de peso a partir da base para a ponta da espiga, determinou um coeficiente de correlação entre o peso fresco e a posição da semente de -0,92 para as sementes normais (Tabela 4) e

Tabela 4 - Efeito da posição da semente ao longo da espiga, no peso fresco (PF) e no potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) e coeficiente de correlação (r) entre essas características e a posição da semente, em sementes normais da linhagem CP577 aos 25 DAP.

Posição da semente	Número da espiga					
	1		2		3	
	PF (mg/ste)	$\Psi_s$ (bar)	PF (mg/ste)	$\Psi_s$ (bar)	PF (mg/ste)	$\Psi_s$ (bar)
1	182,3	-12,7	182,8	-11,6	169,8	-11,1
3	178,2	-11,0	171,7	-13,1	173,5	-10,6
5	170,0	-11,5	170,5	-10,6	168,6	-9,5
7	179,5	-10,9	166,7	-10,7	157,0	-11,7
9	164,5	-11,2	172,3	-11,4	168,7	-10,6
11	154,3	-10,7	171,3	-11,2	147,4	-9,8
13	159,9	-9,8	159,3	-8,8	144,7	-11,2
15	148,7	-9,2	146,4	-12,1	141,4	-11,5
17	147,8	-9,9	147,3	-10,0	127,5	-10,7
19	144,5	-8,8	141,7	-9,3	144,2	-9,0
r	-0,95	-0,92	-0,92	-0,58	-0,89	-0,22

Tabela 5 - Efeito da posição da semente ao longo da espiga, no peso fresco (PF) e no potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) e coeficiente de correlação (r) entre essas características e a posição da semente, em sementes *shrunken* da linhagem CP577 aos 25 DAP.

Posição da semente	Número da espiga					
	1		2		3	
	PF (mg/ste)	$\Psi_s$ (bar)	PF (mg/ste)	$\Psi_s$ (bar)	PF (mg/ste)	$\Psi_s$ (bar)
1	214,3	-16,0	232,3	-16,3	210,0	-13,5
3	220,5	-15,7	218,0	-15,4	203,5	-13,7
5	206,6	-16,2	190,0	-13,4	191,2	-14,2
7	212,8	-15,8	196,2	-13,0	180,8	-13,8
9	196,0	-15,4	203,3	-15,3	204,5	-13,5
11	190,6	-15,6	199,5	-14,2	181,4	-12,9
13	185,2	-16,3	207,1	-15,2	186,8	-14,8
15	169,1	-15,0	179,5	-14,1	178,9	-13,9
17	168,2	-16,5	181,6	-15,8	176,5	-14,4
19	165,3	-15,1	180,7	-15,0	168,2	-13,4
r	-0,96	-0,25	-0,79	-0,00	-0,84	-0,10

de -0,88 para as sementes mutantes (Tabela 5). O potencial osmótico do endosperma aparentemente não sofre influência da posição da semente na espiga. O coeficiente de correlação entre essas duas variáveis foi muito baixo ou nulo, com exceção para o valor encontrado para a espiga 1 de endosperma normal, cujo coeficiente de correlação foi de -0,92 (Tabela 4).

Como as variações encontradas para o peso e o potencial osmótico, foram menores no terço médio da espiga, escolheu-se esse local para a amostragem das sementes. Nas espigas segregantes, as sementes normais e mutantes, além de serem amostradas na região central da espiga, foram retiradas de posições adjacentes.

#### 4.4 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em mutantes de endosperma de milho.

##### 4.4.1 - Linhagem CP577, normal e *shrunk*.

As Tabelas 6 e 7, mostram os valores de peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes da linhagem CP577, versões normal e *shrunk*, aos 25 DAP. As determinações do peso e do conteúdo de água, foram efetuadas em 10 sementes individuais por espiga, em três espigas. Para a determinação do potencial osmótico, foram utilizadas 5 sementes individuais de cada uma das três espigas.

O peso fresco das sementes de ambos os genótipos foi bastante homogêneo dentro de uma mesma espiga ou mesmo entre espigas diferentes, apresentando desvios padrão muito pequenos. Entretanto, comparando-se os pesos entre os dois genótipos contrastantes, verificamos que as sementes do mutan

Tabela 6 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e *shrunk* da linhagem CP577, aos 25 DAP, em espigas segregantes.

Caracte- rística	Nº da espiga	Endospermas		Dif.* (%)
		normal	<i>shrunk</i>	
Peso Fresco (mg/semente)	1	221,6 ± 9,3	268,6 ± 14,2	21,2
	2	223,6 ± 10,1	266,0 ± 15,4	19,0
	3	233,8 ± 9,6	263,9 ± 6,9	12,9
Peso seco (mg/semente)	1	97,7 ± 3,1	95,8 ± 4,7	- 1,9
	2	98,9 ± 4,2	97,0 ± 5,0	- 1,9
	3	98,0 ± 3,8	90,0 ± 4,9	- 8,2
Água (%)	1	55,9 ± 0,7	64,3 ± 0,6	15,0
	2	55,8 ± 0,8	63,5 ± 0,8	13,8
	3	58,1 ± 0,6	65,9 ± 1,5	13,4
Água (mg/semente)	1	123,9 ± 6,4	172,8 ± 9,7	39,5
	2	124,7 ± 6,5	169,0 ± 10,8	35,5
	3	135,8 ± 6,2	173,9 ± 5,9	28,1
Peso fresco (mg/ endo)	1	136,9 ± 16,2	177,2 ± 14,8	29,4
	2	141,1 ± 9,3	178,0 ± 2,9	26,2
	3	141,0 ± 10,2	187,9 ± 13,0	32,6
Potencial osmótico ( bar)	1	- 11,1 ± 0,9	- 14,8 ± 0,8	33,3
	2	- 12,6 ± 1,8	- 16,8 ± 1,1	33,3
	3	- 13,4 ± 1,1	- 14,5 ± 1,1	8,2

\* Dif. = ( mutante - normal ) / normal x 100

Tabela 7 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e *shrunken*, da linhagem CP577, aos 25 DAP, em espigas homozigotas.

Caracte- rística	Nº da espiga	Endospermas		Dif.* (%)
		normal	<i>shrunken</i>	
Peso fresco (mg/semente)	1	244,7 ± 13,2	272,6 ± 11,4	11,4
	2	229,1 ± 15,3	278,6 ± 14,5	21,6
	3	219,4 ± 14,0	265,2 ± 11,7	20,9
Peso seco (mg/semente)	1	103,3 ± 5,1	90,2 ± 2,7	-12,6
	2	101,6 ± 8,8	94,0 ± 6,5	- 7,5
	3	95,5 ± 7,3	93,2 ± 3,0	- 2,4
Água (%)	1	57,8 ± 0,6	66,5 ± 1,0	15,1
	2	55,7 ± 1,2	66,3 ± 0,9	19,0
	3	56,5 ± 1,4	64,8 ± 0,8	14,7
Água (mg/semente)	1	141,5 ± 8,5	181,4 ± 9,4	28,2
	2	127,4 ± 7,3	184,6 ± 8,7	44,9
	3	123,9 ± 8,1	172,0 ± 9,3	38,8
Peso fresco (mg/ endo)	1	161,4 ± 11,7	190,7 ± 15,9	18,2
	2	153,2 ± 12,0	197,1 ± 10,7	28,7
	3	145,9 ± 14,9	188,9 ± 9,7	29,5
Potencial osmótico ( bar)	1	- 11,6 ± 0,5	- 16,4 ± 1,5	41,4
	2	- 11,7 ± 1,1	- 14,5 ± 1,5	23,9
	3	- 11,0 ± 0,8	- 13,3 ± 1,0	20,9

\* Dif. = ( mutante - normal ) / normal x 100

te *shrunk* apresentaram peso fresco 17% mais elevado que as sementes normais. Esses dados, obtidos em espigas segregantes (Tabela 6), não diferem daqueles obtidos em espigas homozigotas (Tabela 7), sugerindo a ausência de efeito de dosagem para essa característica. Por outro lado, o grau de variabilidade nos dois tipos de amostragem foram comparáveis.

Os resultados observados para o peso seco, tanto para as sementes normais como para as mutantes, também mostraram desvios padrão muito baixos. Ao contrário do que ocorreu para o peso fresco, o peso seco das sementes mutantes foi cerca de 6% menor do que o das sementes normais. Essa diferença foi maior entre as sementes analisadas em espigas homozigotas.

O conteúdo de água da semente está representado de duas formas ; como percentagem do peso fresco e como quantidade absoluta por semente. Os valores percentuais foram utilizados para a estimativa do conteúdo de água dos endospermas na determinação do potencial osmótico. É interessante verificar que a utilização desse dado na estimativa do potencial osmótico é bastante válida, uma vez que os valores percentuais são muito pouco variáveis entre sementes de um mesmo genótipo, tanto dentro de uma mesma espiga como entre espigas diferentes. O conteúdo de água da semente, como percentagem , foi a característica que apresentou o menor desvio padrão. Dada a precisão das medidas, as diferenças entre os genótipos contrastantes, em ambos os tipos de amostragem, são bastante evidentes. A semente do mutante *shrunk* apresentou um percentual de água 15% mais elevado que a semente normal. Quando o conteúdo de água da semente é expresso em mg/semente, as diferenças entre os dois genótipos são maiores. A semente *shrunk* apresentou um conteúdo de água 35% mais elevado que a semente normal.

Os valores de peso fresco por endosperma, correspondem aos dados utilizados para o cálculo do potencial osmótico. Como pode ser visto, aos 25 DAP o endosperma representa, aproximadamente, de 60 a 70% do total da semente em ambos os genótipos. É interessante notar que a diferença de peso

fresco entre os dois genótipos é maior quando se compara apenas os endospermas, ao invés das sementes. Isso se deve, muito provavelmente, ao fato do gene expressar-se apenas no endosperma, pois as sementes são formadas também por outros tecidos que não manifestam o efeito do gene.

O potencial osmótico dos endospermas foi mais variável em relação às outras características analisadas, tanto dentro, como entre espigas de uma mesmo genótipo. Comparando-se os dois genótipos, entretanto, verificamos que o potencial osmótico do endosperma mutante foi cerca de 30% menor do que o do endosperma normal.

#### 4.4.2 - Linhagem SRRD992, normal e *sugary*

As Tabelas 8 e 9, mostram o peso fresco, o peso seco, o conteúdo de água e o potencial osmótico em sementes da linhagem SRRD992, versões normal e *sugary*, aos 25 DAP. As condições de amostragem foram as mesmas daquelas da linhagem CP577. Os dados observados mostram que na amostragem efetuada em espigas segregantes (Tabela 8), o peso fresco das sementes *sugary*, foi cerca de 11% maior que o das sementes normais. Entretanto os dados obtidos em espigas homozigotas (Tabela 9), não são tão evidentes quanto a esse aspecto. Nesse caso, ocorreram espigas *sugary* cujas sementes apresentaram peso fresco maiores ou menores que as sementes normais. O peso seco das sementes, levando-se em conta apenas os dados obtidos em espigas segregantes, foi menor para as sementes *sugary*. Entretanto os dados não são muito consistentes, tendo em vista que, para a espiga 2 praticamente não houve diferença entre os dois genótipos.

O efeito do gene *sugary* no conteúdo de água da semente, foi muito mais acentuado em relação as outras características analisadas. Em ter-

Tabela 8 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e *sugary*, da linhagem SRRD992, aos 25 DAP, em espigas segregantes.

Caracte- rística	Nº da espiga	Endospermas		Dif.* (%)
		normal	<i>sugary</i>	
Peso fresco (mg/semente)	1	200,9 ± 12,5	224,4 ± 15,7	11,7
	2	171,5 ± 9,8	196,2 ± 13,7	14,4
	3	177,1 ± 15,1	189,9 ± 18,8	7,2
Peso seco (mg/semente)	1	82,4 ± 6,1	73,1 ± 3,9	-11,3
	2	69,7 ± 5,4	70,0 ± 4,1	0,4
	3	70,5 ± 5,5	63,4 ± 5,5	-10,1
Água (%)	1	59,2 ± 0,8	67,4 ± 1,1	13,9
	2	59,4 ± 1,4	64,3 ± 1,7	8,2
	3	60,2 ± 1,6	66,6 ± 1,1	10,6
Água (mg/semente)	1	119,5 ± 6,7	151,3 ± 12,4	26,6
	2	101,8 ± 5,2	126,3 ± 11,0	24,1
	3	106,7 ± 10,5	126,5 ± 13,7	18,6
Peso fresco (mg/ endo)	1	130,9 ± 6,4	176,4 ± 14,2	34,8
	2	123,7 ± 16,5	140,8 ± 17,9	13,8
	3	129,6 ± 6,8	147,6 ± 4,3	13,9
Potencial osmótico ( bar)	1	- 8,1 ± 0,6	- 11,6 ± 1,1	43,2
	2	- 9,8 ± 0,6	- 13,3 ± 1,4	35,7
	3	- 10,0 ± 0,1	- 11,9 ± 0,7	19,0

\* Dif. = ( mutante - normal ) / normal x 100

Tabela 9 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e *sugary*, da linhagem SRRD992, aos 25 DAP, em espigas homozigotas.

Caracte- rística	Nº da espiga	Endospermas		Dif.* (%)
		normal	<i>sugary</i>	
Peso fresco (mg/semente)	1	163,4 ± 6,0	210,6 ± 13,7	28,9
	2	191,4 ± 5,9	190,9 ± 12,8	- 0,3
	3	200,5 ± 9,4	218,7 ± 14,4	9,1
Peso seco (mg/semente)	1	66,1 ± 2,6	70,6 ± 5,9	6,8
	2	76,2 ± 2,1	67,6 ± 4,3	-11,3
	3	76,1 ± 3,3	76,5 ± 5,7	0,5
Água (%)	1	59,7 ± 0,7	66,5 ± 0,9	11,4
	2	60,2 ± 0,4	64,6 ± 1,8	7,3
	3	62,0 ± 0,8	65,0 ± 1,6	4,8
Água (mg/semente)	1	97,3 ± 3,8	139,9 ± 8,1	43,8
	2	115,2 ± 3,9	123,3 ± 9,4	7,0
	3	124,4 ± 6,7	142,2 ± 10,5	14,3
Peso fresco (mg/ endo)	1	111,4 ± 7,0	162,2 ± 12,6	45,6
	2	130,6 ± 9,2	136,6 ± 9,1	4,6
	3	136,6 ± 5,8	143,5 ± 19,5	5,1
Potencial Osmótico ( bar)	1	- 10,6 ± 1,2	- 13,9 ± 0,6	31,1
	2	- 10,2 ± 0,3	- 11,7 ± 0,4	14,7
	3	- 10,3 ± 0,4	- 13,8 ± 1,4	34,0

\* Dif. = ( mutante - normal ) / normal x 100

mos percentuais as sementes *sugary* apresentaram um conteúdo de água 6% mais elevado que as sementes normais. Esses dados são válidos tanto para as sementes obtidas em espigas segregantes (Tabela 8) como para aqueles obtidos em espigas homozigotas (Tabela 9). Em valores absolutos, o conteúdo de água das sementes normais foi cerca de 25% menor do que o das sementes *sugary*.

O peso fresco do endosperma para essa linhagem oscilou entre 70 e 75% do total da semente para ambos os genótipos, sendo cerca de 20% mais elevado para o endosperma mutante. Aqui também, a diferença de peso fresco entre os dois tipos de endosperma foi maior do que aquela obtida entre as sementes correspondentes.

O potencial osmótico, a exemplo do que foi verificado para o mutante *shrunk*, foi menor nos endospermas *sugary*. Enquanto os endospermas normais apresentaram potencial osmótico ao redor de -10,0 bar, os endospermas *sugary* apresentaram valores em torno de -12,0 bar.

#### 4.4.3 - Linhagem ML674, normal e *shrunk-2*

Os efeitos dos genes *shrunk* e *sugary* no peso, conteúdo de água e potencial osmótico do endosperma, foram essencialmente semelhantes, revelando para os endospermas mutantes, valores maiores para o peso fresco e menores para o peso seco e potencial osmótico. Essas alterações ocorreram no mesmo sentido e foram muito mais acentuadas no mutante *shrunk-2* em relação ao endosperma normal da linhagem ML674.

As Tabelas 10 e 11, mostram os resultados para essas características na linhagem ML674, versões normal e *shrunk-2*, aos 25 DAP. O peso fresco das sementes foi muito mais elevado para o tipo mutante. Nas es-

Tabela 10 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e *shrunken-2*, da linhagem ML674, aos 25 DAP em espigas segregantes.

Caracte- rística	Nº da espiga	Endospermas		Dif.* (%)
		normal	<i>shrunken-2</i>	
Peso fresco (mg/semente)	1	176,9 ± 10,4	235,1 ± 11,8	32,9
	2	195,5 ± 10,8	268,6 ± 13,4	37,4
	3	201,3 ± 10,7	258,9 ± 13,2	28,6
Peso seco (mg/semente)	1	79,1 ± 4,6	68,9 ± 2,5	-12,9
	2	94,1 ± 4,6	84,0 ± 3,7	-10,7
	3	91,3 ± 4,4	76,8 ± 4,0	-15,9
Água (%)	1	55,3 ± 0,9	70,7 ± 0,9	27,8
	2	51,8 ± 1,6	68,7 ± 0,7	32,6
	3	54,6 ± 1,0	70,3 ± 0,5	28,8
Água (mg/semente)	1	97,8 ± 6,4	166,3 ± 9,8	70,0
	2	101,4 ± 6,9	184,6 ± 10,3	82,1
	3	110,0 ± 6,9	182,0 ± 9,5	65,5
Peso fresco (mg/ endo)	1	122,2 ± 2,4	182,9 ± 7,3	49,7
	2	151,0 ± 6,6	211,4 ± 18,9	40,0
	3	146,9 ± 13,7	212,6 ± 10,2	44,7
Potencial osmótico ( bar)	1	- 9,0 ± 1,5	- 16,3 ± 0,7	81,1
	2	- 10,5 ± 0,9	- 17,9 ± 1,0	70,5
	3	- 8,5 ± 1,0	- 18,6 ± 0,5	118,8

\* Dif. = ( mutante - normal ) / normal x 100

Tabela 11 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e *shrunken-2*, da linhagem ML674, aos 25 DAP em espigas homozigotas.

Caracte- rística	Nº da espiga	Endospermas		Dif.* (%)
		normal	<i>shrunken-2</i>	
Peso fresco (mg/semente)	1	155,0 ± 9,3	236,8 ± 10,9	52,8
	2	187,6 ± 8,8	252,2 ± 20,2	34,4
	3	184,7 ± 8,7	274,9 ± 11,0	48,8
Peso seco (mg/semente)	1	78,1 ± 4,1	68,9 ± 2,1	-11,8
	2	88,4 ± 4,3	79,1 ± 5,2	-10,5
	3	85,9 ± 3,4	78,3 ± 0,4	- 8,8
Água (%)	1	49,6 ± 0,9	70,9 ± 0,6	42,9
	2	52,8 ± 3,0	68,6 ± 0,6	29,9
	3	53,8 ± 1,8	71,5 ± 0,4	32,9
Água (mg/semente)	1	76,9 ± 6,1	167,9 ± 9,2	118,3
	2	99,2 ± 8,8	173,1 ± 15,1	74,5
	3	98,8 ± 6,5	196,7 ± 7,9	99,1
Peso fresco (mg/semente)	1	115,2 ± 5,6	195,3 ± 8,0	69,5
	2	138,6 ± 9,6	217,6 ± 12,5	57,0
	3	142,2 ± 11,1	229,7 ± 11,7	61,5
Potencial osmótico ( bar)	1	- 11,4 ± 1,0	- 15,6 ± 0,4	36,8
	2	- 9,6 ± 0,9	- 18,5 ± 1,5	92,7
	3	- 8,9 ± 0,9	- 17,8 ± 0,5	100,0

\* Dif = ( mutante - normal ) / normal x 100

pigas segregantes (Tabela 10) as sementes mutantes apresentaram peso fresco em torno de 33% mais elevado que as sementes normais, enquanto que nas espigas homozigotas a diferença foi de 45% (Tabela 11).

O peso seco das sementes, por sua vez, foi cerca de 13% menor no mutante em relação ao normal.

As maiores diferenças entre as sementes mutantes e normais, foram observadas para o conteúdo de água e o potencial osmótico. Em termos percentuais as sementes *shrunk-en-2* apresentaram um teor de água em torno de 30% mais elevado que as sementes normais. Em valores absolutos, por sua vez, a diferença oscilou em torno de 70%. O peso fresco do endosperma foi 45% mais elevado nas sementes mutantes, novamente mostrando que o efeito do gene é melhor avaliado, quando analisamos apenas o endosperma.

O potencial osmótico das sementes, foi bastante contrastante nos dois genótipos. Os endospermas *shrunk-en-2* apresentaram uma redução da ordem de 90% no potencial osmótico, em relação aos endospermas normais.

Esses resultados indicam que nos endospermas mutantes, apesar do conteúdo de água ser mais elevado que nos endospermas normais, está ocorrendo estresse osmótico. Isso porque o estresse é caracterizado pelo potencial osmótico, e não pelo conteúdo de água do tecido.

#### 4.4.4 - Linhagem ML649, normal e *opaque-2*

As Tabelas 12 e 13, mostram o peso fresco, peso seco, o conteúdo de água e o potencial osmótico para a linhagem ML649, versões normal e *opaque-2*, aos 25 DAP. A exemplo do que ocorreu para a linhagem SRRD992, a diferença de peso fresco entre as sementes mutantes e normais não são muito evidentes quando comparamos espigas homozigotas (Tabela 13). O peso fresco

Tabela 12 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e *opaque-2*, da linhagem ML649, aos 25 DAP em espigas segregantes.

Característica	Nº da espiga	Endospermas		Dif.* (%)
		normal	<i>opaque-2</i>	
Peso fresco (mg/semte)	1	257,8 ± 18,0	282,4 ± 26,3	9,5
	2	284,5 ± 11,1	323,7 ± 12,9	13,8
	3	278,1 ± 17,8	311,2 ± 19,9	11,9
Peso seco (mg/semte)	1	97,2 ± 4,2	100,2 ± 6,8	3,1
	2	107,2 ± 3,2	108,6 ± 3,5	1,3
	3	102,1 ± 4,1	100,0 ± 4,6	- 2,1
Água (%)	1	62,2 ± 1,6	64,4 ± 1,4	3,5
	2	62,3 ± 1,4	66,4 ± 0,8	6,6
	3	63,2 ± 1,1	67,8 ± 0,7	7,3
Água (mg/semte)	1	160,6 ± 14,8	182,2 ± 20,0	13,4
	2	177,4 ± 10,1	215,1 ± 10,4	21,3
	3	176,0 ± 14,1	211,2 ± 15,4	20,0
Peso fresco (mg/ endo)	1	203,2 ± 18,2	221,9 ± 10,6	9,2
	2	224,5 ± 8,7	260,8 ± 14,4	16,2
	3	212,4 ± 12,9	140,4 ± 17,2	13,2
Potencial osmótico ( bar)	1	- 10,1 ± 0,7	- 11,4 ± 1,1	12,9
	2	- 10,2 ± 1,7	- 11,7 ± 0,6	14,7
	3	- 11,2 ± 0,7	- 13,1 ± 1,0	17,0

\* Dif. = ( mutante - normal ) / normal x 100

Tabela 13 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes normais e *opaque-2*, da linhagem ML649, aos 25 DAP em espigas homozigotas.

Característica	Nº da espiga	Endospermas		Dif.* (%)
		normal	<i>opaque-2</i>	
Peso fresco (mg/semente)	1	226,6 ± 11,6	200,0 ± 15,0	-11,7
	2	257,3 ± 14,2	267,4 ± 8,6	3,9
	3	313,3 ± 13,8	229,4 ± 15,8	-26,8
Peso seco (mg/semente)	1	100,9 ± 5,8	83,8 ± 9,6	-16,9
	2	107,2 ± 7,0	105,5 ± 3,2	- 1,6
	3	118,1 ± 3,9	95,3 ± 6,5	-19,3
Água (%)	1	55,5 ± 0,8	58,9 ± 2,1	6,1
	2	57,5 ± 1,8	60,5 ± 0,4	5,2
	3	62,3 ± 0,8	58,5 ± 1,5	- 6,1
Água (mg/semente)	1	125,7 ± 6,4	119,9 ± 12,8	- 4,6
	2	148,1 ± 10,2	161,8 ± 5,7	9,3
	3	195,2 ± 10,5	134,1 ± 10,7	-31,3
Peso fresco (mg/ endo)	1	164,7 ± 10,3	153,9 ± 7,7	- 6,6
	2	184,9 ± 13,8	297,8 ± 7,2	12,4
	3	209,3 ± 7,6	159,2 ± 7,4	-23,9
Potencial osmótico	1	- 10,6 ± 0,7	- 11,2 ± 2,1	5,7
	2	- 12,1 ± 1,0	- 13,4 ± 0,7	10,7
	3	- 10,6 ± 2,1	- 9,8 ± 0,3	- 7,5

\* Dif. = ( mutante - normal ) / normal x 100

das sementes obtidas em espigas segregantes, entretanto, foi em torno de 12% mais elevado para as sementes *opaque-2* em relação as sementes normais.

O peso seco das sementes foi praticamente idêntico para os dois genótipos. O conteúdo de água, tanto em valores percentuais como em valores absolutos foi maior para as sementes *opaque-2*. O potencial osmótico foi em torno de 20% menor no endosperma *opaque-2* em relação ao endosperma normal.

#### 4.5 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes $F_1$ obtidas dos cruzamentos entre as linhagens SRRD992, ML649 e ML674.

As versões normais das linhagens SRRD992, ML649 e ML674, foram cruzadas entre si, e as sementes  $F_1$  foram analisadas quanto ao peso fresco, peso seco, potencial osmótico e atividade da RNase, aos 25 DAP.

A Tabela 14, mostra algumas dessas características nas sementes  $F_1$  provenientes do cruzamento entre as linhagens ML649 e SRRD992. Como pode ser visto através dos cruzamentos recíprocos, parece haver um efeito significativo do genótipo da planta mãe nas características da semente. O peso fresco das sementes foi maior quando a linhagem ML649 foi utilizada como fêmea. O mesmo ocorreu para o peso seco e para o conteúdo de água em termos absolutos. Em termos percentuais o conteúdo de água foi semelhante para os cruzamentos nos dois sentidos. O peso fresco do endosperma também foi maior quando a linhagem ML649 foi utilizada como fêmea. O efeito do genótipo da planta mãe também foi observado para o potencial osmótico. Os endospermas obtidos na linhagem SRRD992 apresentaram um potencial de -6,5 bar, enquanto que nos endospermas obtidos na linhagem ML649 o potencial

Tabela 14 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes  $F_1$  dos cruzamentos recíprocos entre as linhagens ML649 e SRRD992, aos 25 DAP.

Característica	Nº da espiga	♀ ML649 x SRRD992 ♂		♀ SRRD992 x ML649 ♂	
Peso fresco (mg/semente)	1	248,7	± 13,2	228,2	± 15,5
	2	272,8	± 28,0	245,2	± 11,8
	3	267,1	± 13,2	222,9	± 8,3
Peso seco (mg/semente)	1	105,9	± 4,3	93,0	± 11,1
	2	117,5	± 9,5	107,2	± 5,8
	3	110,0	± 6,0	97,7	± 3,2
Água (%)	1	57,4	± 0,8	59,4	± 2,3
	2	56,8	± 1,1	56,4	± 2,1
	3	58,8	± 1,1	56,2	± 0,6
Água (mg/semente)	1	142,7	± 9,2	135,2	± 4,7
	2	155,4	± 18,6	138,7	± 9,9
	3	157,1	± 8,6	125,3	± 5,4
Peso fresco (mg/ endo)	1	185,9	± 13,5	159,6	± 9,6
	2	207,7	± 19,0	170,6	± 11,7
	3	196,1	± 9,3	164,0	± 8,6
Potencial osmótico ( bar)	1	- 7,8	± 1,4	- 6,5	± 1,0
	2	- 7,6	± 1,6	- 7,1	± 1,1
	3	- 7,9	± 0,8	- 5,8	± 1,3

Tabela 15 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes  $F_1$  dos cruzamentos recíprocos entre as linhagens ML674 e SRRD992, aos 25 DAP.

Caracte- rística	Nº da espiga	♀ ML674 × SRRD992 ♂		♀ SRRD992 × ML674 ♂	
Peso fresco (mg/semente)	1	200,4	± 3,7	182,7	± 9,0
	2	193,9	± 8,2	207,8	± 10,5
	3	204,0	± 4,5	185,6	± 8,4
Peso seco (mg/semente)	1	96,3	± 2,4	76,2	± 4,0
	2	94,0	± 3,3	85,8	± 4,8
	3	97,5	± 1,8	77,4	± 3,6
Água (%)	1	51,9	± 0,7	58,3	± 0,4
	2	51,5	± 0,7	58,2	± 0,6
	3	52,2	± 0,8	58,3	± 0,5
Água (mg/semente)	1	104,1	± 2,2	106,5	± 5,0
	2	99,9	± 5,1	121,0	± 6,0
	3	106,6	± 3,6	108,2	± 5,6
Peso fresco (mg/ endo)	1	154,1	± 10,4	123,9	± 6,1
	2	149,4	± 6,8	145,1	± 10,5
	3	147,6	± 7,4	128,6	± 9,4
Potencial osmótico ( bar)	1	- 7,5	± 1,1	- 9,3	± 0,9
	2	- 7,9	± 1,1	- 9,0	± 0,5
	3	- 6,9	± 0,9	- 8,5	± 0,4

Tabela 16 - Peso fresco, peso seco, conteúdo de água e potencial osmótico em sementes  $F_1$  dos cruzamentos recíprocos entre as linhagens ML649 e ML674, aos 25 DAP.

Característica	Nº da espiga	♀ ML649 x ML674 ♂	♀ ML674 x ML649 ♂
Peso fresco (mg/semente)	1	277,0 ± 14,1	195,0 ± 14,0
	2	301,1 ± 7,4	187,2 ± 9,8
	3	346,8 ± 26,0	189,3 ± 10,5
Peso seco (mg/semente)	1	107,7 ± 3,2	89,6 ± 6,0
	2	117,0 ± 4,5	92,4 ± 4,3
	3	136,2 ± 5,4	90,5 ± 6,8
Água (%)	1	61,1 ± 1,2	54,0 ± 1,8
	2	61,2 ± 1,1	50,6 ± 0,9
	3	60,6 ± 1,7	52,2 ± 0,4
Água (mg/semente)	1	169,3 ± 11,5	105,4 ± 10,8
	2	183,9 ± 5,3	94,8 ± 5,9
	3	210,6 ± 21,4	98,8 ± 6,2
Peso fresco (mg/ endo)	1	190,5 ± 12,6	144,4 ± 8,2
	2	225,6 ± 14,3	133,9 ± 6,6
	3	232,9 ± 17,7	139,2 ± 7,4
Potencial osmótico ( bar)	1	- 8,4 ± 0,8	- 5,1 ± 0,7
	2	- 8,4 ± 1,0	- 4,3 ± 0,6
	3	- 8,2 ± 0,5	- 5,3 ± 0,4

foi de -7,5 bar.

A Tabela 15, mostra o peso fresco, peso seco, conteúdo de água e o potencial osmótico das sementes  $F_1$  provenientes do cruzamento entre as linhagens ML674 e SRRD992. O peso fresco das sementes  $F_1$  foi semelhante nos cruzamentos recíprocos. Entretanto, o peso seco e o conteúdo de água em termos absolutos foi maior quando a linhagem ML674 foi utilizada como fêmea. Em termos percentuais o teor de água foi maior quando a linhagem SRRD992 foi utilizada como fêmea. O peso fresco do endosperma por sua vez foi maior quando a linhagem ML674 foi utilizada como fêmea. O potencial osmótico, foi menor nas sementes  $F_1$  obtidas na linhagem SRRD992 em relação as sementes obtidas na linhagem ML674, mostrando claramente o efeito do genótipo da planta mãe.

O efeito do genótipo da planta mãe nas características das sementes  $F_1$  foi muito mais acentuado nos cruzamentos entre as linhagens ML649 e ML674 (Tabela 16). O peso fresco, peso seco, conteúdo de água e o peso fresco do endosperma foram muito maiores, quando a linhagem ML649 foi utilizada como fêmea. O potencial osmótico, por sua vez foi bem menor quando a linhagem ML649 foi utilizada como fêmea.

#### 4.6 - Atividade da RNase em endospermas normais e mutantes das linhagens CP577, ML649, ML674 e SRRD992, aos 25 DAP.

A Tabela 17, mostra a atividade da RNase em endospermas normais e mutantes, nas quatro linhagens estudadas, aos 25 DAP. Foram analisados 5 endospermas individuais por espiga em três espigas. Nas espigas segregantes, as sementes normais e mutantes foram retiradas de posições adjacentes.

Como pode ser visto, na linhagem CP577 a atividade da RNase vari-

Tabela 17 - Atividade da RNase (Unidades/endosperma), nos endospermas normais e mutantes das linhagens ML649, ML674, SRRD992 e CP577, aos 25 DAP, em espigas segregantes (A) e espigas homozigotas(B).

Linhagem	Tipo de espiga	Endosperma	Número da espiga		
			1	2	3
CP577	A	<i>Shshsh</i>	76,6 ± 3,2	72,2 ± 5,6	64,8 ± 4,8
		<i>shshsh</i>	82,4 ± 8,3	105,7 ± 6,1	78,8 ± 6,7
	B	<i>ShShSh</i>	51,5 ± 4,5	52,0 ± 5,2	54,9 ± 5,1
		<i>shshsh</i>	103,0 ± 7,3	63,0 ± 4,5	82,7 ± 6,2
ML649	A	<i>O2o2o2</i>	86,7 ± 7,9	76,4 ± 14,0	104,6 ± 6,7
		<i>o2o2o2</i>	145,6 ± 4,5	146,6 ± 2,9	148,0 ± 6,8
	B	<i>O2O2O2</i>	70,6 ± 3,4	69,6 ± 7,4	85,3 ± 8,4
		<i>o2o2o2</i>	144,7 ± 9,5	152,1 ± 8,6	152,3 ± 4,7
ML674	A	<i>Sh2sh2sh2</i>	66,8 ± 6,3	49,1 ± 8,3	57,5 ± 10,4
		<i>sh2sh2sh2</i>	103,3 ± 5,9	120,0 ± 5,0	132,0 ± 7,2
	B	<i>Sh2Sh2Sh2</i>	42,6 ± 2,3	39,7 ± 1,4	32,9 ± 1,9
		<i>sh2sh2sh2</i>	125,4 ± 7,6	139,1 ± 3,9	134,1 ± 8,2
SRRD992	A	<i>Susus</i>	30,5 ± 3,6	23,5 ± 2,8	20,2 ± 2,4
		<i>susus</i>	39,7 ± 3,2	37,1 ± 4,2	34,0 ± 3,5
	B	<i>SuSuSu</i>	33,3 ± 2,5	26,8 ± 3,1	34,5 ± 1,9
		<i>susus</i>	42,6 ± 3,1	41,8 ± 2,3	49,9 ± 3,2

ou bastante entre espigas, tanto para os endospermas normais como para os endospermas *shrunk*. Essa variação ocorreu em ambos os tipos de espiga. Entretanto, independentemente do tipo de amostragem, o endosperma mutante apresentou uma atividade mais elevada. Nas espigas segregantes (A), a atividade da enzima foi 25% maior nos endospermas mutantes. Nas espigas homozigotas (B) a diferença foi maior, oscilando em torno de 57%. A diferença encontrada nesse caso, deveu-se principalmente à diferença de atividade entre os endospermas normais de ambos os tipos de amostragem, uma vez que a atividade da RNase nos endospermas mutantes foi semelhante, oscilando em torno de 89 unidades/endosperma nas espigas segregantes (A) e 83 unidades/endosperma nas espigas homozigotas (B). Nos endospermas normais as atividades foram de 71 e 53 unidades/endosperma, respectivamente, para as espigas segregantes (A) e homozigotas (B). Esses resultados indicam claramente um efeito de dosagem para a atividade da RNase, uma vez que os endospermas normais, em espigas segregantes, são heterozigotos (Shshsh).

A atividade da RNase entre espigas, nas três linhagens restantes foi menos variável. Na linhagem ML649, o endosperma *opaque-2* apresentou aumentos de 66 e 99% na atividade da RNase em relação aos endospermas normais em espigas segregantes (A) e homozigotas (B), respectivamente. Aqui também observou-se efeito de dosagem, uma vez que a atividade da enzima no endosperma *opaque-2* foi semelhante em ambos os tipos de amostragem. A maior diferença na atividade da RNase entre endospermas normais e mutantes foi observada para a linhagem ML674. Nessa linhagem, o endosperma *shrunk-2* apresentou uma atividade em torno de 130 unidades/endosperma nos dois tipos de amostragem, correspondendo a aumentos de 120% em relação ao endosperma heterozigoto (Sh2sh2sh2) e de 240% em relação ao endosperma homozigoto dominante (Sh2Sh2Sh2). Como pode ser visto, nessa linhagem o efeito de dosagem foi muito mais acentuado, pois o endosperma heterozigoto apresentou cerca de 58 unidades/endosperma, enquanto que no homozigoto a atividade

de da enzima oscilou em torno de 35 unidades/endosperma.

#### 4.7 - Atividade da RNase em endospermas $F_1$ obtidos de cruzamentos recíprocos entre as linhagens ML649, ML674 e SRRD992.

A Tabela 18, mostra a atividade da RNase em endospermas  $F_1$  obtidos de cruzamentos recíprocos entre as linhagens ML649, ML674 e SRRD992. Para cada tipo de cruzamento, foram analisados 5 endospermas individuais por espiga, em três espigas, aos 25 DAP. Como pode ser visto, a atividade da RNase depende do genótipo da planta em que as sementes  $F_1$  são produzidas. Nos cruzamentos entre as linhagens ML649 e ML674, observou-se uma atividade em torno de 69 e 56 unidades/endosperma, respectivamente. Nos cruzamentos entre as linhagens ML649 e SRRD992 os valores foram de 59 e 38 unidades/endosperma. Por sua vez, nos cruzamentos entre as linhagens ML674 e SRRD992 os valores correspondentes foram de 41 e 28 unidades/endosperma.

#### 4.8 - Associação entre a atividade da RNase e o potencial osmótico nos mutantes de endosperma de milho.

A Tabela 19, mostra as diferenças percentuais para o potencial osmótico e para a atividade da RNase, entre os endospermas normais e mutantes das quatro linhagens analisadas. Os valores correspondentes ao potencial osmótico representam a média das espigas dos dois tipos de amostragem realizados, enquanto que os valores correspondentes a atividade da RNase representam a média das espigas homocigotas. Os valores obtidos em espi -

Tabela 18 - Atividade da RNase em endospermas normais de sementes  $F_1$  obtidas dos cruzamentos entre as linhagens ML649, ML674 e SRRD992, aos 25 DAP.

Tipo de cruzamento		Número da espiga		
		1	2	3
♀	♂			
ML649	x ML674	63,7 ± 12,5	79,4 ± 4,8	63,1 ± 8,3
ML674	x ML649	48,9 ± 7,6	67,9 ± 9,6	51,2 ± 1,0
ML649	x SRRD992	50,3 ± 10,4	81,2 ± 14,3	44,2 ± 2,9
SRRD992	x ML649	41,6 ± 7,9	33,9 ± 6,7	38,9 ± 3,5
ML674	x SRRD992	40,6 ± 7,1	47,4 ± 6,2	35,7 ± 4,5
SRRD992	x ML674	19,8 ± 2,1	35,8 ± 6,9	27,0 ± 2,9

Tabela 19 - Diferença de potencial osmótico e atividade da RNase entre os endospermas normais e mutantes, analisados aos 25 DAP.

Linhagem	Diferença de potencial osmótico (%)	Diferença de atividade da RNase (%)
CP577	26,8	57,3
SRRD992	29,6	42,8
ML674	83,3	250,6
ML649	8,9	100,7

Diferença = (mutante - normal) / normal x 100.

gas segregantes não foram utilizados em função do efeito de dosagem observado. Como pode ser visto, existe uma certa proporcionalidade entre as diferenças observadas para o potencial osmótico e para a atividade da RNase, principalmente para os mutantes que produzem alterações no metabolismo de carboidratos. Assim, quanto maior a diferença no potencial osmótico, maior também foi a diferença observada para a atividade da RNase. Entretanto, para o mutante *opaque-2*, essa correlação não foi muito clara, uma vez que a diferença no potencial osmótico entre esse mutante e o tipo normal foi a menor observada enquanto que a diferença para a atividade da RNase foi intermediária entre os valores observados para os mutantes *sugary* e *shrunk* e *shrunk-2*.

#### 4.9 - Eletroforese da RNase.

A eletroforese da RNase foi efetuada para as linhagens ML649, ML674, CP577 e SRRD992, versões normais e mutantes, aos 25 DAP e também para o híbrido simples HS 7777, durante o desenvolvimento da semente, com o objetivo de se verificar se as diferenças encontradas, entre os diferentes genótipos analisados ou durante o desenvolvimento da semente, eram a isoenzimas ou a quantidades diferentes de uma mesma enzima.

A Figura 4A, mostra a eletroforese da RNase em gel de poliacrilamida de endospermas normais e mutantes das linhagens ML649, ML674, CP577 e SRRD992. Como pode ser visto, todos os indivíduos analisados apresentaram a mesma banda da enzima, de mobilidade intermediária, diferindo somente em relação à quantidade da mesma.

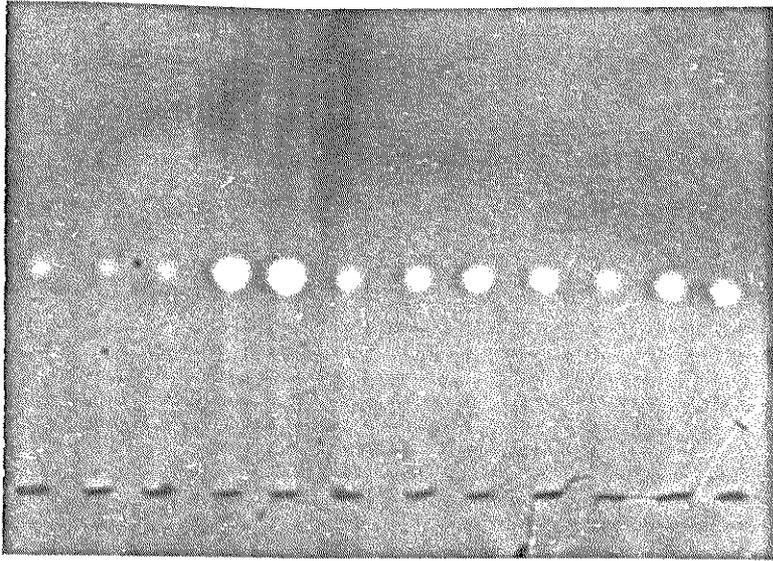
A Figura 4B, mostra o padrão eletroforético dos endospermas do híbrido simples HS 7777, durante o desenvolvimento da semente. Aqui também

em todos os estádios analisados encontrou-se apenas uma banda da enzima. A mobilidade dessa banda foi idêntica àquela observada para as linhagens, ver sões normais e mutantes, mostrando que a enzima é aparentemente a mesma em todo o material analisado.

Figura 4 - Eletroforese da RNase em gel de poliacrilamida, dos endospermas normais e mutantes das linhagens ML649, ML674, CP577 e SRRD992, aos 25 DAP (A), e de endospermas do híbrido simples HS 7777 durante o desenvolvimento da semente.

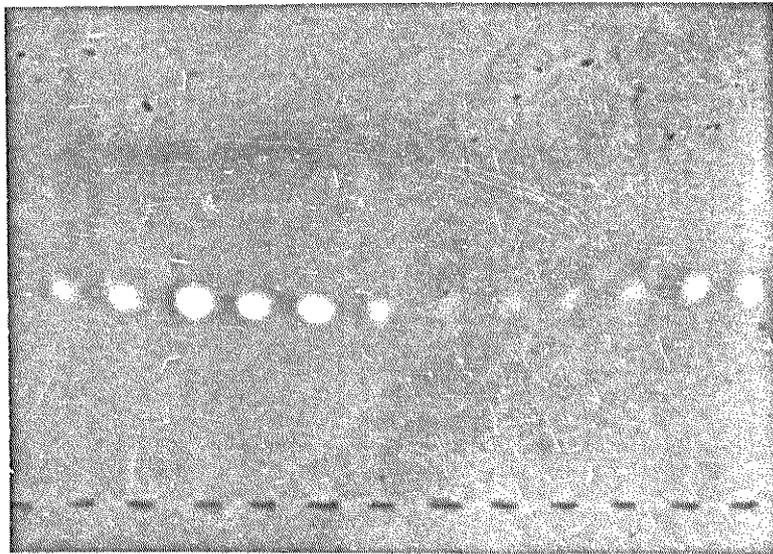
(A)		(B)	
Nº	Genótipo	Nº	DAP
1	<i>Sususu</i>	1 e 2	7
2	<i>sususu</i>	3 e 4	14
3	<i>SuSuSu</i>	5 e 6	21
4	<i>O2o2o2</i>	7 e 8	28
5	<i>o2o2o2</i>	9 e 10	35
6	<i>O2O2O2</i>	11 e 12	49
7	<i>Shshsh</i>		
8	<i>shshsh</i>		
9	<i>ShShSh</i>		
10	<i>Sh<sup>2</sup>sh<sup>2</sup>sh<sup>2</sup></i>		
11	<i>sh<sup>2</sup>sh<sup>2</sup>sh<sup>2</sup></i>		
12	<i>Sh<sup>2</sup>Sh<sup>2</sup>Sh<sup>2</sup></i>		

(A)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

(B)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

## 5 - DISCUSSÃO

### 5.1 - A amostragem fenotípica na avaliação do efeito de genes em características físicas e metabólicas da semente.

Em estudos sobre o efeito de genes nas características físicas e metabólicas do endosperma de milho, realizados em nosso laboratório, tem sido utilizadas técnicas de obtenção de genótipos contrastantes numa mesma espiga (Arruda *et al* , 1978; Arruda, 1979; Lovato, 1979). Esse tipo de amostragem pode ser obtido através de polinização dupla (Silva e Santoro, 1972) ou através da polinização com mistura de pólen dos genótipos contrastantes (Arruda, 1979; Lovato, 1979). Com isso, maximiza-se a precisão nas comparações, uma vez que esse tipo de amostragem possibilita a comparação entre da dos pareados, onde a influência do ambiente é praticamente a mesma para os genótipos contrastantes. Assim, pode-se reduzir o número de repetições nos ensaios, o que, para certas comparações a nível bioquímico é fundamental , tendo em vista o alto custo das análises. Entretanto, para que esse tipo de amostragem possa ser bem empregado é necessário a existência de dominância completa para o loco em estudo, pois o efeito do gene é avaliado pela diferença nos efeitos fenotípicos do tipo normal (heterozigoto) e do tipo mutante (homozigoto recessivo). A presença de dominância incompleta, resultaria em super ou subestimação dos efeitos desses genes.

No presente trabalho, os resultados observados para a atividade da RNase, mostraram efeito de dosagem em pelo menos três mutantes de endosperma, em linhagens diferentes (Tabela 17). A atividade da enzima foi maior nos endospermas portadores de dois alelos recessivos, em relação aos endospermas normais homozigotos. Entretanto, para as outras características

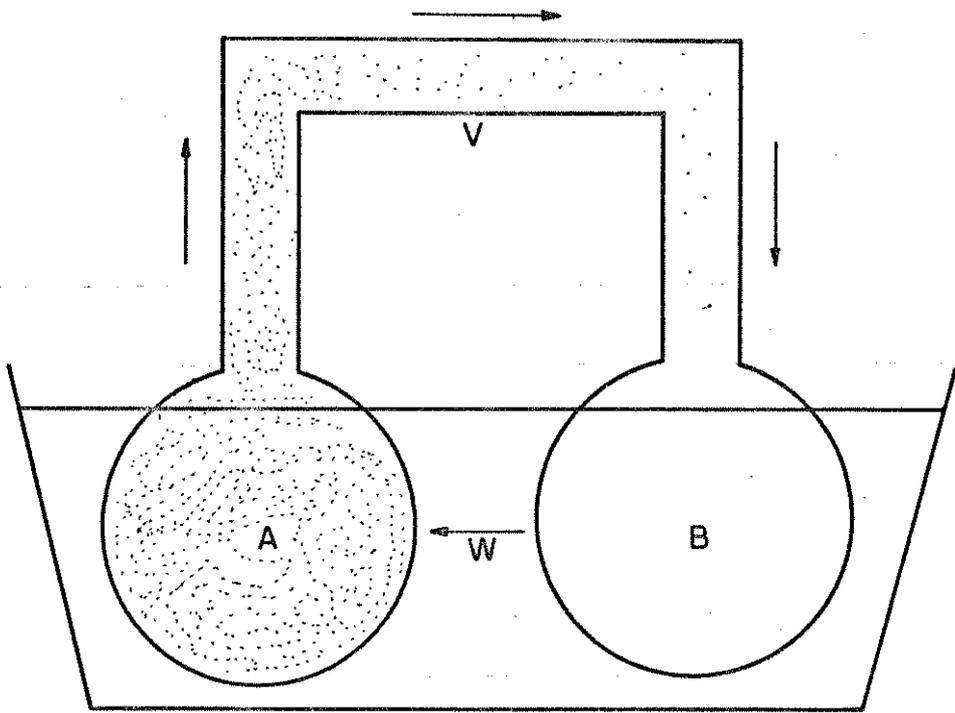
analisadas, não se detectou qualquer efeito de dosagem em nenhuma das quatro linhagens. Além disso, para o peso, conteúdo de água e potencial osmótico da semente, foi bastante evidente a maior precisão nas comparações entre endospermas normais e mutantes obtidos numa mesma espiga (Tabelas 6, 8, 10 e 12). Esses resultados mostram que a vantagem da utilização de técnicas de obtenção de genótipos contrastantes numa mesma espiga, para o estudo do efeito de genes no endosperma, depende da ação gênica que condiciona a característica a ser analisada.

## 5.2 - Interrelações entre o peso, conteúdo de água e potencial osmótico da semente de milho.

Nos estádios iniciais do desenvolvimento da semente, o endosperma apresenta cerca de 90% de água (Figura 3). Nesse período, a massa da semente em termos de peso seco, constitui-se praticamente de substâncias solúveis, tais como açúcares, aminoácidos e ions (Creech, 1968; Arruda *et al*, 1978; Arruda, 1979). A medida que essas substâncias são incorporadas em amido e proteínas de reserva (substâncias insolúveis), o conteúdo de água diminui, fazendo com que a relação solutos/água permaneça constante, o que pode ser inferido pela constância no potencial osmótico observada durante todo o desenvolvimento da semente (Figura 3). Esse mecanismo evolui sempre da mesma maneira, até o final da maturação da semente. O potencial osmótico da semente deve permanecer sempre no mesmo nível, provavelmente para facilitar o transporte de solutos da planta para a semente. O que muda durante o desenvolvimento, é a resistência ao fluxo oferecida pelos feixes vasculares (Arruda, dados não publicados). O sistema fica bem mais fácil de ser entendido, se considerarmos o modelo de Munch (1930) para o transporte de solu -

Figura 5 - Mecanismo básico de pressão ou fluxo de massa de Munch (1930) .

A e B são células osmóticas, estando A com maior concentração de solutos que B. Na planta, A seria a fonte de produção (folhas) e B representaria uma fonte de consumo. V é o conduto que conecta A e B. Na planta, V seria representado pelo floema. W é o recipiente condutor de água. Na planta W seria o xilema.



tos através da planta (Figura 5). Segundo Munch, um sistema osmótico compreendendo uma fonte de produção e uma fonte de consumo, pode dirigir um fluxo de massa ao longo de um gradiente de turgescência nos feixes vasculares. Assim, os assimilados são sintetizados nas folhas e transportados para os sítios de consumo via floema, ao longo de um gradiente de turgescência desenvolvido osmoticamente. Nesse mecanismo, a água do xilema move-se para o floema estabelecendo uma alta pressão de turgescência. Com isso, os assimilados das células se difeundem para o floema, diminuindo o seu potencial osmótico. Em seguida esses solutos são dirigidos em fluxo osmótico para os sítios de consumo que estão com o potencial osmótico mais elevado, através de um gradiente de pressão hidrostática. Nos sítios de consumo e armazenamento, a medida que os assimilados são armazenados na forma de substâncias insolúveis, a água retorna para o xilema em função do potencial de água criado com a remoção dos solutos do floema. (Crafts e Crisp, 1971; Nobel, 1974).

O entendimento do sistema de transporte de solutos para o endosperma, à luz do modelo de Munch, fica mais claro quando se utiliza mutantes que bloqueiam a síntese de amido nesse tecido (Tabelas 6 a 11). Esses mutantes alteram a síntese de amido no endosperma em vários pontos. O mutante *shrunkens-2*, tem sido reconhecido como um gene estrutural que bloqueia a síntese de amido, pela ausência de atividade da enzima ADP-glicose pirofosforilase (Tsai e Nelson, 1966; Dickinson e Preiss, 1969; Tsai *et al*, 1970; Hannah e Nelson, 1976; Bryce e Nelson, 1979). Com o bloqueio na síntese de amido, o gene *shrunkens-2* determina um acúmulo de até 20% de açúcares no endosperma no estágio de semente seca (Creech, 1968). O acúmulo de açúcares, entretanto, é muito mais acentuado nos estádios intermediários do desenvolvimento da semente (Tsai e Nelson, 1966; Tsai *et al*, 1978). O mutante *shrunkens* também bloqueia a síntese de amido no endosperma, porém seu efeito é bem menos acentuado que o mutante *shrunkens-2* (Creech, 1968): Esse mu-

tante parece estar envolvido com a ausência de atividade da sacarose sintetase no endosperma (Chourey e Nelson, 1976; Bryce e Nelson, 1979). O mutante *sugary*, por sua vez, bloqueia a síntese de amido do endosperma de maneira distinta dos genes *shrunk* e *shrunk-2*. Ao invés de açúcares simples, o endosperma *sugary* acumula um polissacarídeo solúvel, denominado de fitoglicogênio (Creech, 1965). Esse gene parece estar envolvido com a deficiência numa enzima do metabolismo de amido (Shanon e Creech, 1973).

O efeito dessas alterações no metabolismo de amido pode ser detectado, através da determinação do potencial osmótico do endosperma (Tabelas 6 a 11). Os genes mutantes determinam uma diminuição no potencial osmótico do endosperma. Com a redução do potencial osmótico, a tendência é aumentar a absorção de água pela semente, visando o reestabelecimento do potencial normal do tecido. Isso pode ser verificado, através do aumento no conteúdo de água da semente. Este, foi sempre maior nos endospermas mutantes em relação aos endospermas normais, e está diretamente associado ao grau de diminuição no potencial osmótico. Assim, quanto menor for o potencial osmótico do endosperma mutante em relação ao normal, maior será também a diferença no conteúdo de água da semente. Entretanto, como o tamanho ou o volume da semente é previamente estabelecido pelo genótipo da planta mãe, a absorção de água pelo endosperma é fisicamente limitada. Em função disso, mesmo que o conteúdo de água seja aumentado em até 70% em relação ao endosperma normal, não ocorre aumento no potencial osmótico do endosperma mutante. A redução no potencial osmótico do endosperma, muito provavelmente diminui o gradiente de turgescência entre esse tecido e os feixes vasculares, diminuindo a taxa de incorporação de matéria seca pela semente. Isso pode ser constatado, através da diminuição observada no peso seco das sementes mutantes em relação às normais. Uma vez que o potencial osmótico permanece constante até a maturação da semente (Figura 3), o efeito final dos genes mutantes será uma drástica diminuição no peso seco da semente, o que pode

ser verificado visualmente (Figura 1), ou através do peso das sementes (Figura 2). As sementes mutantes se enrugam, devido a perda de água, que ocorre nos estádios finais do desenvolvimento (Figura 2).

Baseando-se nesse modelo pode-se prever que quanto mais drástico for o bloqueio na síntese de amido no endosperma, menor será o potencial osmótico e o peso seco e maior será o conteúdo de água da semente. O efeito do gene *shrunk-2* é o maior exemplo disso. O bloqueio na síntese de amido nesse endosperma, diminui em 80% o seu potencial osmótico, aumenta em 70% o seu conteúdo de água e diminui em 13% o peso seco da semente aos 25 DAP. A redução no peso seco da semente foi de 25% no estágio de semente madura (Figura 2). Esses resultados podem ser de grande valia para trabalhos de melhoramento de milho doce. Isso porque, a redução no potencial osmótico, aumenta o poder de retenção de água pelo endosperma, aumentando o período de colheita do material para o processamento industrial.

A redução no potencial osmótico do endosperma *opaque-2* deve-se muito provavelmente ao efeito desse gene na síntese de proteínas (Mertz *et al*, 1964; Nelson, 1967; Misra *et al*, 1972; Tsai e Dalby, 1974; Misra *et al* 1975a, 1975b), uma vez que a síntese de amido nesse endosperma é essencialmente normal (Creech, 1968). Além disso, esse mutante apresenta maiores concentrações de íons no endosperma (Goodsell, 1968; Arnold *et al*, 1977).

Se o potencial osmótico pode ser reduzido em função de mutações que diminuem a eficiência metabólica do endosperma, um sistema que condicione um aumento na eficiência metabólica deve produzir um efeito contrário. Assim, podemos supor que quanto mais eficiente for a síntese de substâncias de reserva no endosperma, maior será o seu potencial osmótico e maior será também o peso seco da semente. Os resultados observados para essas características em sementes  $F_1$  confirmam essa hipótese. Para uma melhor visualização do efeito de sementes  $F_1$ , no potencial osmótico e no peso seco, os resultados para essas características em sementes normais das

linhagens ML649, ML674 e SRRD992, bem como dos  $F_1$  obtidos de cruzamentos dialélicos e recíprocos dessas três linhagens foram agrupados na Figura 6. Os cruzamentos recíprocos, mostraram claramente que tanto o peso seco como o potencial osmótico das sementes dependem do genótipo da planta mãe. Entretanto, a maneira com que o genótipo da planta mãe afeta essas características, aparentemente difere de uma para outra característica. Os efeitos da planta mãe no peso seco das sementes podem ser explicados pelo tipo de semente originalmente produzida pela linhagem. A ML649, por exemplo, é uma linhagem que apresenta semente dentada, de endosperma grande e amido mole, enquanto que a linhagem SRRD992 apresenta sementes do tipo *flint*, de endosperma menor e amido duro. A linhagem ML674, por sua vez, apresenta sementes do tipo dentada, porém de tamanho reduzido (Figura 1). Essas características são determinadas previamente pelo tipo de ovário produzido pela planta mãe, predeterminando assim o tamanho da semente, mesmo antes da fertilização. Assim, quando uma linhagem de semente *flint* (SRRD992) é utilizada como fêmea no cruzamento com uma linhagem de semente dentada grande (ML649), o tamanho das sementes  $F_1$  tende para o da linhagem materna. Quando a linhagem de sementes grandes foi utilizada como fêmea, o peso da semente  $F_1$  foi próximo ao da linhagem materna, só que nesse caso o peso da semente  $F_1$  foi sempre maior que o peso da semente da linhagem materna.

No caso do potencial osmótico, entretanto, as diferenças encontradas para as sementes  $F_1$ , entre os cruzamentos recíprocos, não pode ser explicadas apenas pelo tipo de semente produzido pela planta mãe, embora os resultados sugiram isso (Figura 6B). As variações encontradas para o potencial osmótico entre as linhagens parentais, foram muito menores que aquelas encontradas para os cruzamentos recíprocos. Além disso, o potencial osmótico, deve ser afetado apenas pela concentração de solutos dos endospermas, independentemente do seu tamanho. O que deve ocorrer muito provavelmente entre os cruzamentos recíprocos, é uma diferença na eficiência me

Figura 6 - Potencial osmótico (A) e peso seco (B) em sementes normais das linhagens ML649, ML674 e SRRD992 e em seus cruzamentos dialélicos, aos 25 DAP. Os valores ao lado das barras representam a % de heterose. As cores identificam as linhagens envolvidas no  $F_1$ . A metade superior corresponde ao macho e a inferior à fêmea.

A POTENCIAL OSMÓTICO (bar)

GERMOPLASMA

ML649

SRRD992

ML674

ML649 x SRRD992

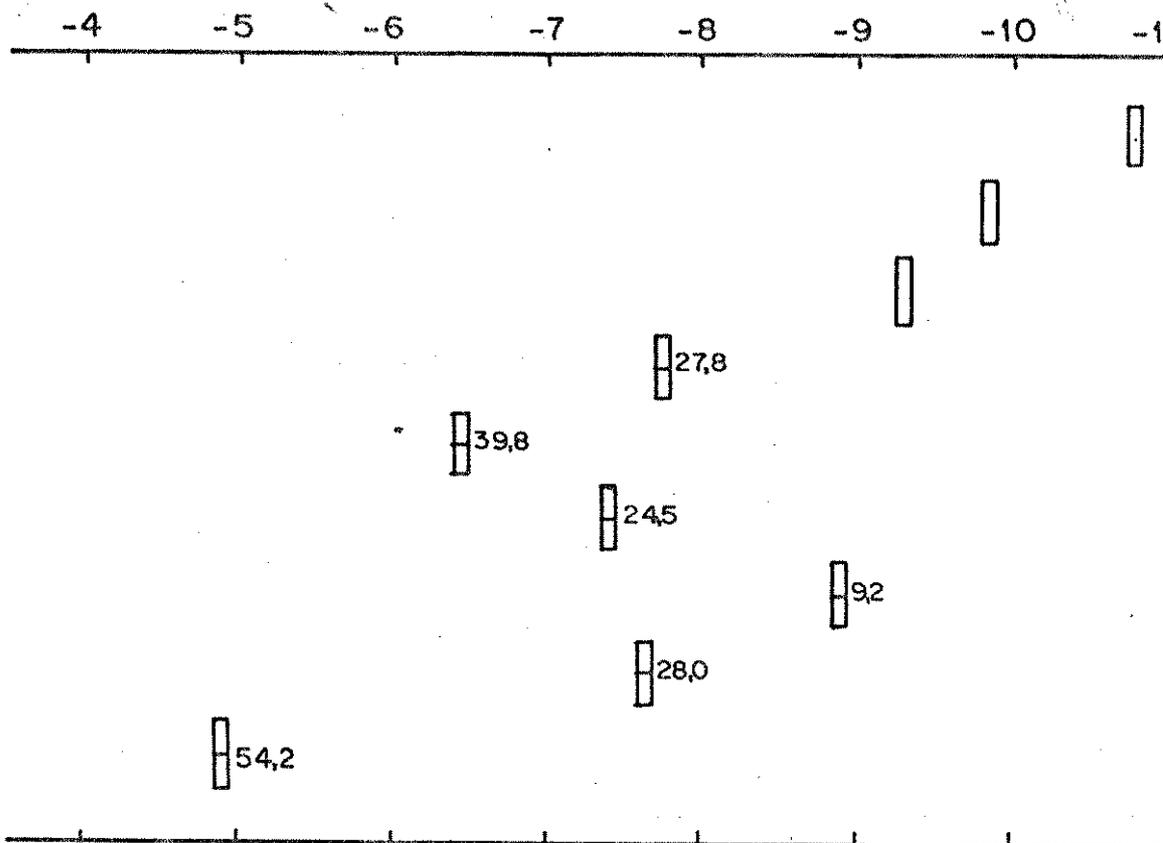
SRRD992 x ML649

ML674 x SRRD992

SRRD992 x ML674

ML649 x ML674

ML674 x ML649



B PESO SECO (mg/SEMENTE)

GERMOPLASMA

ML649

SRRD992

ML674

ML649 x SRRD992

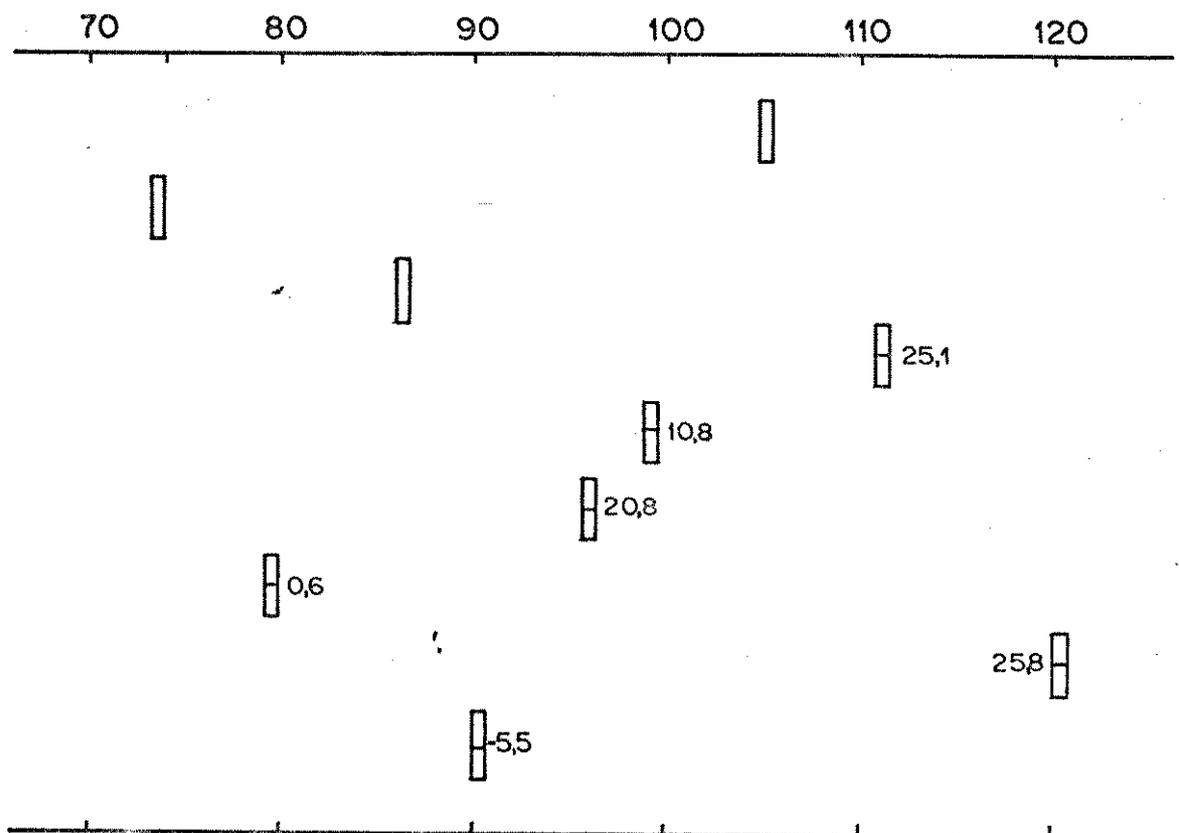
SRRD992 x ML649

ML674 x SRRD992

SRRD992 x ML674

ML649 x ML674

ML674 x ML649



tabólica na transformação de solutos em substâncias insolúveis (produtos de reserva). Assim, combinações do tipo AAa podem ser metabolicamente diferentes de combinações do tipo aaA. Esse tipo de efeito é bastante comum em casos de ocorrência de isoenzimas, onde combinações do tipo AAa produzem atividade enzimática diferente de combinações do tipo aaA (Scandális, 1979).

Independentemente do efeito do genótipo da planta mãe, os resultados mostram a existência de um significativo efeito heterótico tanto para o potencial osmótico (Figura 6A) como para o peso seco das sementes  $F_1$  (Figura 6B). Os números ao lado das barras na Figura 6, representam a percentagem de heterose. Para o potencial osmótico a heterose variou entre 9,2 e 54,2% nos vários cruzamentos, enquanto que para o peso seco a heterose variou entre 0,6 e 25,8%.

Sob o ponto de vista metabólico, o efeito heterótico, pode ser visualizado como um aumento líquido na eficiência metabólica dos indivíduos  $F_1$ . A maior eficiência no metabolismo, é que deve determinar o aumento na conversão de energia em biomassa.

A medida do potencial osmótico do endosperma pode auxiliar na compreensão do fenômeno da heterose para o peso seco da semente de milho. A semente, ou mais precisamente o endosperma de milho, constitui-se num tecido de reserva com aproximadamente 80% de amido e 10% de proteínas (Sprague, 1977). Assim, os endospermas de um determinado genótipo, serão mais pesados quanto maior for a eficiência na transformação de sacarose e aminoácidos em amido e proteínas respectivamente. Por outro lado, quanto maior for essa eficiência, maior será o potencial osmótico da semente, uma vez que substâncias solúveis, sacarose e aminoácidos, são transformadas em substâncias insolúveis, amido e proteínas. Por sua vez, quanto maior for o potencial osmótico do endosperma, maior será o gradiente de turgescência criado entre esse tecido e os feixes vasculares da planta. Uma vez aumentado o gradiente, de acordo com o modelo de Munch (Figura 5), maior será a eficiência no trans -

porte de solutos da planta para o endosperma, resultandó no final, sementes com maior peso. Esse mecanismo poderia explicar os resultados encontrados para o efeito heterótico no potencial osmótico e no peso seco das sementes  $F_1$  (Figura 6). Possivelmente a correlação entre o potencial osmótico e o peso seco nos cruzamentos realizados foi prejudicada em função dos tipos de sementes, *flint* ou dentada, encontradas nas linhagens estudadas. Nos próximos trabalhos a hipótese levantada deverá ser analisada rigorosamente em sementes que apresentem o mesmo tipo de estrutura de endosperma.

### 5.3 - Atividade da RNase em sementes de milho.

A atividade da RNase no endosperma de milho aumentou continuamente com o desenvolvimento, atingindo o pico máximo, no final da maturação da semente (Figura 2). Esse padrão de atividade é bem conhecido, não somente em sementes de milho, mas também em sementes de outras espécies de plantas (Wilson, 1975). A presença de qualquer um dos mutantes de endosperma estudados aumentou a atividade da RNase em relação aos endospermas normais. Para as linhagens ML649 e ML674 (Figura 2, A e B), a diferença na atividade da RNase entre os endospermas mutantes e normais, deve-se principalmente a maiores incrementos na atividade da enzima durante as três primeiras semanas após a polinização. Isso pode ser deduzido, pelas modificações nas declividades das curvas nesse período. As declividades das curvas dos endospermas mutantes foram maiores que aquelas observadas para os endospermas normais. Esse efeito foi muito mais acentuado para a linhagem ML674. A partir da quarta semana após a polinização as declividades das curvas foram semelhantes para ambos os genótipos nas duas linhagens. Resultados semelhantes, foram encontrados por Dalby e Cagampang (1970), para o gene *opaque-2*. Es-

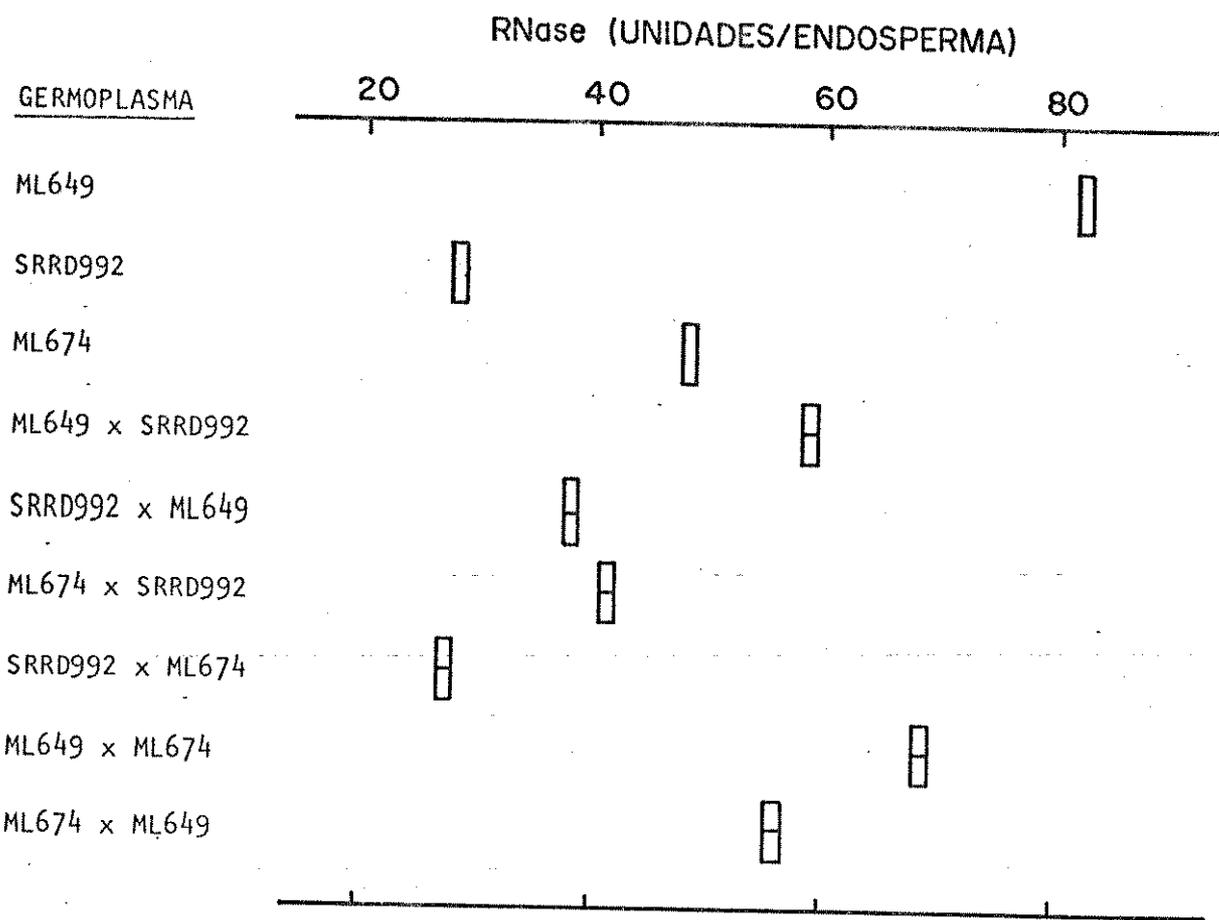
ses resultados sugerem que o efeito desses genes mutantes na atividade da RNase, ocorre apenas nos estádios iniciais do desenvolvimento da semente, hipótese essa já sugerida por esses autores para o gene *opaque-2*. Entretanto, o mesmo não pode ser dito para o gene *shrunk* (Figura 2C), uma vez que a declividade da curva de atividade da RNase para esse mutante foi sempre diferente daquela observada para o endosperma normal durante todo o desenvolvimento do endosperma.

O padrão eletroforético da RNase durante o desenvolvimento do endosperma do híbrido simples HS 7777, mostrou a mesma e única banda em todos os estádios analisados (Figura 5B). O mesmo ocorreu para o padrão eletroforético das várias linhagens estudadas, tanto para as versões normais como para as versões mutantes. Essa banda de RNase é aparentemente a mesma em todo o material analisado, sugerindo que todo o germoplasma estudado apresenta o mesmo alelo para essa enzima. Wilson (1971), também encontrou uma mesma banda de RNase em sementes normais e *opaque-2* em várias linhagens estudadas. Esses resultados sugerem que as diferenças encontradas na atividade da RNase, entre linhagens, durante o desenvolvimento do endosperma e também entre versões normais e mutantes dentro de uma mesma linhagem devem ser devidas à diferenças na expressão desse alelo. Provavelmente, outros fatores, genéticos ou fisiológicos, devem estar envolvidos com a expressão desse alelo.

Wilson e Alexander (1967) e Wilson (1973 e 1980), mostraram que o efeito do gene *opaque-2* na atividade da RNase depende do restante do genótipo da linhagem. É provável que isso também ocorra para outros mutantes de endosperma, uma vez que os resultados encontrados no presente trabalho também mostraram diferenças entre os endospermas normais das linhagens analisadas (Figura 7).

Os resultados encontrados neste trabalho, mostraram a existência de efeito de dosagem para a atividade da RNase, envolvendo os genes *shrunk*

Figura 7 - Atividade da RNase em sementes normais das linhagens ML649, ML674 e SRRD992 e em seus cruzamentos dialélicos, aos 25 DAP. As côres identificam as linhagens envolvidas no  $F_1$ . A metade superior cor responde ao macho e a inferior à fêmea.



*ken*, *shrunken-2* e *opaque-2*. Os endospermas contendo dois alelos para cada um desses genes, apresentaram maior atividade da enzima que os endospermas homocigotos dominantes (Tabela 17). Resultados semelhantes foram encontrados por Dalby e Davies (1967) e Dalby e Cagampang (1970), para efeito de dosagem do gene *opaque-2*.

Os resultados encontrados para a atividade da RNase nos cruzamentos entre as linhagens ML649, ML674 e SRRD992 se ajustariam perfeitamente a um modelo de um loco, com dois alelos e presença de efeito de dosagem. Para uma melhor visualização desse modelo, os dados da Tabela 17, referentes a atividade da RNase dos endospermas normais das três linhagens, foram agrupados aos resultados das sementes  $F_1$ , Tabela 18, e mostrados na Figura 7. Os resultados encontrados para os cruzamentos entre as linhagens ML649 e SRRD992 mostraram que a atividade da RNase do endosperma  $F_1$ , foi intermediária quando a linhagem ML649 foi utilizada como fêmea e bastante próxima daquela observada para a linhagem SRRD992, quando esta foi utilizada como fêmea. O mesmo ocorreu para os cruzamentos entre as linhagens ML674 e SRRD992. A atividade da enzima foi aproximadamente intermediária nos dois cruzamentos recíprocos. Nos cruzamentos entre as linhagens ML649 e ML674, o  $F_1$  apresentou atividade intermediária quando a linhagem ML649 foi utilizada como fêmea e próxima da linhagem ML674, quando esta foi fêmea. Esses resultados se adaptariam bem a um modelo de codominância com efeito de dosagem, pois o endosperma é triploide. Resultados semelhantes foram encontrados por Wilson (1973 e 1980). Analisando  $F_1$  de linhagens de alta e baixa atividade, o autor também verificou atividades intermediárias. Entretanto analisando sementes  $F_2$  de linhagens heterocigotas para o gene *opaque-2*, Wilson (1973), encontrou segregação de 3:1 para baixa e alta atividade respectivamente. Provavelmente essa segregação para a atividade da RNase foi devida a segregação do gene *opaque-2* e não segregação de alelos diferentes da enzima. Por outro lado, o modelo de codominância para a ati-

vidade da RNase deve ser descartada, uma vez que, como foi demonstrado, o padrão eletroforético para as linhagens é único. A codominância para genes da RNase só seria possível se houvesse alelos diferentes da enzima, atuando no endosperma.

As diferenças encontradas para a atividade da enzima, entre endospermas mutantes e normais dentro de uma mesma linhagem e entre endospermas normais das diferentes linhagens, podem ser devidas a alterações a nível fisiológico, em função das alterações específicas no metabolismo, produzidas pelos mutantes ou outros genes em endospermas normais.

#### 5.4 - Associação entre o potencial osmótico e a atividade da RNase nos mutantes de endosperma.

A atividade da RNase pode ser estimulada ou inibida pelo ácido abscísico e pela citocinina respectivamente ( Srivastava, 1968 ; Sodek e Wright, 1969; De Leo e Sacher, 1970; Leshem, 1971; Arad *et al*, 1973; Premecz *et al*, 1977). Os níveis desses hormônios, por sua vez, parece estar estreitamente relacionados com o potencial osmótico do tecido ( Hsiao, 1973; Hsiao *et al* 1976). Altas concentrações de ácido abscísico e baixas concentrações de citocinina, são encontradas em tecidos submetidos a estresse de água.

Os resultados encontrados neste trabalho, mostram que os mutantes de endosperma produzem alterações na atividade da RNase e no potencial osmótico simultaneamente. Todos os mutantes analisados apresentaram menor potencial osmótico e maior atividade da enzima, em relação aos endospermas normais. Além disso, o mutante *shrunk-en-2*, que apresentou a maior redução no potencial osmótico, foi também o que apresentou o maior aumento na ati-

vidade da RNase em relação ao endosperma normal (Tabela 19). Os mutantes *shrunk* e *sugary* apresentaram menor redução no potencial osmótico e também menor incremento na atividade da RNase. O mutante *opaque-2*, embora tenha aumentado em 100% a atividade da RNase, apresentou pouca redução no potencial osmótico do endosperma.

De uma maneira geral, os resultados sugerem que o potencial osmótico do endosperma encontra-se bastante associado a atividade da RNase. A associação entre o potencial osmótico e níveis de ácido abscísico e citocinina no endosperma, entretanto, precisa ainda ser demonstrada. É possível, que uma modificação nos níveis desses hormônios, devido a alterações no potencial osmótico, afete a atividade da RNase no endosperma de milho, à semelhança do que ocorre em outras espécies de plantas submetidas a estresse de água.

## 6 - CONCLUSÕES

O estudo das interrelações entre o peso, o conteúdo de água e o potencial osmótico em sementes de milho, permitiu as seguintes conclusões:

- Durante o desenvolvimento da semente do híbrido simples HS 7777, apesar da redução que ocorre no conteúdo de água, o potencial permanece constante.

- Endospermas homocigotos recessivos para os genes *sugary*, *shrunken*, *shrunken-2* e *opaque-2*, apresentam uma redução significativa no potencial osmótico, em relação aos endospermas normais. A redução no potencial osmótico parece ser proporcional à alteração no metabolismo do endosperma, determinada por esses mutantes. Quanto mais drástico o bloqueio desses genes na síntese de amido e/ou de proteínas, menor será o potencial osmótico do endosperma.

- Quanto menor for o potencial osmótico do endosperma mutante, maior será o conteúdo de água e menor será o peso seco em relação às sementes normais.

- A análise de sementes  $F_1$  revelou a existência de efeito heterótico tanto para o peso seco como para o potencial osmótico do endosperma. Ao contrário dos endospermas mutantes, as sementes  $F_1$  apresentaram maior potencial osmótico e maior peso seco em relação às linhagens parentais. Esses resultados ajustam-se bem ao modelo de Munch para explicar o transpor-

~~Mostram ainda a possibilidade de manipulação de genes que controlam esse mecanismo, o que sem dúvida pode ser importante na seleção de milho de maior produtividade, uma vez que o peso seco da semente é uma de suas importantes componentes.~~

O estudo da atividade da RNase, por sua vez, permitiu as seguintes conclusões:

- O padrão de atividade da enzima durante o desenvolvimento da semente pode ser alterado pelos genes *opaque-2*, *shrunk*, *shrunk-2* e *sugary*.

- O efeito dos genes *shrunk-2* e *opaque-2* na atividade da RNase deve ocorrer somente nos estádios iniciais do desenvolvimento da semente, uma vez que a partir da quarta semana após a polinização (estádio leitoso) os incrementos na atividade da enzima foram semelhantes entre os endospermas mutantes e normais.

- A atividade da RNase em endospermas está sujeita a efeito de dosagem para os loci *shrunk*, *shrunk-2* e *opaque-2*. Nas três linhagens portadoras desses genes a atividade da RNase foi sempre maior nos endospermas heterozigotos em relação aos homozigotos dominantes.

- A análise eletroforética da RNase tanto em endospermas normais e mutantes das quatro linhagens, como para o endosperma normal do híbrido simples HS 7777, revelou a existência de uma mesma banda da enzima, mostrando que todo o material analisado apresenta o mesmo alelo para a RNase. Assim, as diferenças encontradas entre as versões normais e mutantes dentro de uma mesma linhagem, ou as diferenças entre sementes normais das quatro linhagens se devem, provavelmente, à diferenças na expressão do mesmo alelo.

- Os resultados mostraram uma estreita associação entre o potencial osmótico e a atividade da RNase nos endospermas mutantes. Assim, o mutante que apresentou a maior redução no potencial osmótico, foi o que apresentou também o maior aumento na atividade da RNase. As diferenças na atividade da enzima entre os endospermas mutantes e normais poderiam ser explicadas pela alteração no potencial osmótico, à semelhança do que ocorre para a atividade dessa enzima em tecidos submetidos a tratamentos com soluções de baixo potencial osmótico, ou em plantas submetidas a estresse de água.

7 - RESUMO

Quatro linhagens isogênicas de milho, ML649, ML674, CP577 e SRRD 992, com endospermas normais e endospermas homozigotos para os genes *opa-que-2*, *shrunken-2*, *shrunken* e *sugary*, respectivamente, foram utilizadas para o estudo do efeito desses genes no potencial osmótico, peso seco, conteúdo de água e atividade da RNase no endosperma. Foram utilizadas também, sementes de endosperma normal do híbrido simples HS 7777, selecionado no Instituto Agrônomo de Campinas. Os ensaios foram realizados, na Área Experimental do Departamento de Genética e Evolução do IB-UNICAMP. Cruzamentos artificiais foram feitos, de tal modo a produzir sementes normais e mutantes em espigas segregantes e em espigas homozigotas, para permitir também o estudo do efeito de dosagem desses genes nas características analisadas.

A presença de qualquer um dos genes mutantes, produziu alterações em todas as características analisadas. O potencial osmótico foi sempre menor nos endospermas mutantes, em relação aos endospermas normais. O potencial osmótico apresentou uma correlação negativa com o conteúdo de água e positiva com o peso seco da semente. A redução no potencial osmótico depende do grau de alteração no metabolismo de carboidratos e/ou de proteínas do endosperma, determinado pelos genes mutantes. Assim, o mutante *shrunken 2*, que apresenta um drástico bloqueio na síntese de amido do endosperma, apresentou uma redução de cerca de 90% no potencial osmótico da semente. Com isso, o conteúdo de água foi aumentado em cerca de 80%, e o peso seco, foi reduzido em 30% em relação ao endosperma normal. Por outro lado, sementes F<sub>1</sub> obtidas de cruzamentos entre as linhagens ML649, ML674 e SRRD992, apresentaram maior potencial osmótico e maior peso seco em relação às linhagens parentais.

A atividade da RNase, foi maior em todos os mutantes analisados , em relação aos endospermas normais. A atividade da enzima foi diferente tam bém para endospermas normais, entre as linhagens. A atividade da RNase nos endospermas está sujeita a efeito de dosagem pelos loci *shrunken*, *shrunken-2* e *opaque-2*. Nas três linhagens portadoras desses genes a atividade da RNase foi sempre maior nos endospermas heterozigotos em relação aos homozigotos dominantes. A análise eletroforética da RNase, revelou uma mesma e única banda, para todas as linhagens, tanto para as versões normais como para as versões mutantes, mostrando que todo o material apresenta o mesmo alelo para a RNase. Assim, as diferenças encontradas, entre os diferentes genótipos devem-se provavelmente a diferenças na expressão desse alelo.

A atividade da RNase nos mutantes de endosperma, mostrou uma estreita associação com o potencial osmótico. Assim, quanto maior a diferença no potencial osmótico do mutante em relação ao endosperma normal, maior tam bém foi a diferença encontrada para a atividade da enzima. A redução no potencial osmótico do endosperma poderia explicar o aumento na atividade da RNase, a exemplo do que ocorre para a atividade da enzima em tecidos submetidos a tratamentos com soluções de baixo potencial osmótico, ou em plantas submetidas a estresse de água.

## 9 - SUMMARY

Four near isogenic inbreds of maize single mutants homozygous for the *opaque-2*, *shrunk*, *shrunk-2* and *sugary* genes, and their normal counterparts, as well as the single cross HS 7777, were used to study the relationship among osmotic potential, dry weight, water content and RNase activity in the endosperm. The plants were grown on adjoining plots at the Experimental Field of Universidade Estadual de Campinas. The plots, with a density of 50000 plants/ha were fertilized with N,  $P_2O_5$  and  $K_2O$  at 80, 80 and 30 Kg/ha respectively. The plants were self or split pollinated to yield respectively homozygous or segregant ears, to allow the study of dosage effect of these genes on endosperms characteristics.

All characteristics were altered in the same way in the mutants endosperm in comparison with their normal counterparts. The osmotic potential decreased in the mutants and was negatively correlated with water content and positively correlated with dry weight of seeds. The *shrunk-2* mutant showed a reduction of about 90% in the osmotic potential of endosperm. As a consequence, water content increased 80% and dry weight 30% in relation to normal endosperm.

$F_1$  seeds from diallelic crosses of three inbreds with normal endosperm, showed a significant heterotic effect on osmotic potential and dry weight.

All mutants showed an increase in RNase activity in relation to the normal endosperms. The pattern of RNase activity in the *shrunk*, *shrunk-2* and *opaque-2* endosperms indicated that these genes are not fully recessive. The inbreds, when heterozygous for these genes showed higher RNase activity than the homozygous dominant endosperms.

The electrophoretic pattern of RNase showed the presence of a same

enzyme in the four inbreds and in the single cross HS 7777. This result indicates that the germplasm presents the same allele for RNase. Thus, the difference observed mutant and normal endosperms might be due to difference in the expression of this allele.

Rnase activity was closed related with the osmotic potential in the endosperm. Mutants showing great reduction in osmotic potential also showed a great increase in RNase activity. The relationship between osmotic potential and RNase activity would to explain at least in part, the increase of RNase activity in the mutants endosperm, as it occurs with RNase activity in water-estressed tissue of plants.

9 - BIBLIOGRAFIA

ARAD, S.M., MIZRAHI, Y. e RICHMOND, A.E. 1973. Leaf water content and hormone effects on ribonuclease activity. *Plant Physiol.* 52: 510 - 512.

ARAD, S.M. e RICHMOND, A.E. 1976. Leaf water and enzyme activity. *Plant Physiol.* 57:656 - 658.

ARNOLD, J.M., BAUMAN, L.F. e MAKONNED, D. 1977. Physical and chemical characteristics of normal and *opaque-2* endosperm maize hybrids. *Crop Sci.* 17: 362 - 366.

ARRUDA, P., SILVA, W.J.S. e TEIXEIRA, J.P.F. 1978. Protein and free amino acids in a high lysine maize double mutant. *Phytochem.* 17:1217 - 1218.

ARRUDA, P. 1979. Síntese de aminoácidos e proteínas, e características físicas e químicas em endospermas normal e *sugary opaque-2*, durante o desenvolvimento da semente de milho. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 118 p.

ARRUDA, P. e SILVA, W.J.S. 1979. Relationship among maize endosperm characteristics of normal and *sugary opaque-2* kernels during development. *J. Agric. Food Chem.* 27:802 - 805.

AYERS, J.E. e CREECH, R.G. 1969. Genetic control of phytylglycogen accumulation in maize (*Zea mays L.*). *Crop Sci.* 9:739 - 741.

BLECKMAN, G.I. 1978. Factors behind changes of ribonuclease activity and

characteristics of manifestation of this activity during dehydration of plants. *Soviet Plant Physiol.* 26: 754 - 762.

BOURQUE, D.P. e NAYLOR, A.W. 1971. Large effects of small water deficits on chlorophyll accumulation and ribonucleic acid synthesis in etiolated leaves of jack bean (*Canavalia ensiformes*). *Plant Physiol.* 47:591-594.

BRYCE, W.H. e NELSON, O.E. 1979. Starch-synthesizing enzymes in the endosperm and pollen of maize. *Plant Physiol.* 63: 312 - 317.

CHOUREY, P.S. e NELSON, O.E. 1976. The enzymatic deficiency conditioned by the *shrunk* mutation in maize. *Biochem. Genet.* 14: 1041 - 1055.

CRAFTS, A.S. e CRISP, C.F. 1971. Phloem transport in plants. *W.H. Freeman Company, New York.* 480 p.

CREECH, R.G. 1965. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. *Genetics*, 52: 1175 - 1186.

CREECH, R.G. 1968. Carbohydrate synthesis in maize. *In Advances in Agronomy*, 20: 275 - 322.

DALBY, A. e DAVIES, I.I. 1967. Ribonuclease activity in the developing seeds of normal and *opaque-2* maize. *Science*, 155: 1573 - 1576.

DALBY, A. e CAGAMPANG, G.B. 1970. Ribonuclease activity in normal, *opaque-2* and *floury-2* maize endosperm during development. *Plant Physiol.* 46: 142 - 144.

De LEO, P. e SACHER, J.A. 1970. Control of ribonuclease and acid phosphatase by auxin and abscisic acid during senescence of *Rhoeo* leaf sections. *Plant Physiol.* 46: 805 - 811.

DICKINSON, D.B. e PREISS, J. 1969. Presence of ADP - glucose pyrophosphorilase in *shrunken-2* and *brittle-2* mutants of maize. *Plant Physiol.* 44 : 1058 - 1062.

DOVE, L.D. 1971. Short term response and chemical control of ribonuclease activity in tomato leaflets. *New Phytol.* 70: 397 - 401.

GOODSELL, S.F. 1968. Potassium in mature kernels of normal and *opaque-2* maize. *Crop Sci.* 8: 281 - 282.

HANNAH, L.C. e NELSON, O.E. 1976. Characterization of ADP-glucose pyrophosphorilase from *shrunken-2* and *brittle-2* mutants of maize. *Biochem. Genet.* 14:547 - 559.

HODGES, H.F., CREECH, R.G. e LOERCH, J.D. 1977. Biosynthesis of phytylglycerin in maize endosperm. The branching enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 185: 70 - 79.

HSIAO, T.C. 1970. Rapid changes in levels of polyribosomes in *Zea mays* in response to water stress. *Plant Physiol.* 46: 281 - 285.

HSIAO, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 519 - 570.

HSIAO, T.C., ACEVEDO, E., FERERES, E. e HENDERSON, D.W. 1976. Stress meta-

bolism. Water stress, growth, and osmotic adjustment. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 273: 479 - 500.

HUANG, A.H.C. e CAVALIERI, A.J. 1979. Proline oxidase and water stress - induced proline accumulation. *Plant Physiol.* 63:531 - 535.

KAUSS, H. 1973. Turnover of galactosylglycerol and osmotic balance in *Ochromonas*. *Plant Physiol.* 52: 613 - 615.

KAUSS, H. 1979. Osmotic regulation in algae. *Progress in Phytochemistry*, 5: 1427.

KAUSS, H. e QUADER, H. 1976. *In vitro* activation of galactosyl transferase involved in the osmotic regulation of *Ochromonas*. *Plant Physiol.* 58: 295 - 298.

KAUSS, H., THONSON, K.S. e JEBLICK, W. 1979. Osmotic regulation. Physiological significance of proteolytic and nonproteolytic activation of isofloridoside phosphate synthase. *Plant Physiol.* 63: 455 - 459.

KULIGOWSKA, E., KLARKOWSKA, D. e SZARKOWSKI, J.W. 1980. An acid ribonuclease from rye germ cytosol. *Phytochem.* 19:31 - 35.

LESHEM, Y. 1971. Abscisic acid as a ribonuclease promoter. *Physiol. Plant.* 24 : 85 - 89.

LOVATO, M.B. 1979. Características físicas e conteúdo de proteínas de endospermas normal e *sügary opaque-2* em espigas segregantes. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 80 p.

MERTZ, E.T., BATES, L.S. e NELSON, O.E. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. *Science*, 145: 279 284.

MILBORROW, B.V. 1974. The chemistry and physiology of abscisic acid. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 259 - 307.

MILBURN, J.A. 1979. Water flow in plants. *Longman Inc. New York.* 225 p.

MILLS, V.W. e TODD, G.W. 1973. Effects of water stress on the indolacetic acid oxidase in wheat leaves. *Plant Physiol.* 51: 1145 - 1146.

MISRA, P.S., JANBUNATHAN, R., MERTZ, E.T., GLOVER, D.V. BARBOSA, H.M. e Mc WHIRTER, K.S. 1972. Endosperm protein synthesis in maize mutants with increased lysine content. *Science*, 176:1425 - 1426.

MISRA, P.S., MERTZ, E.T. e GLOVER, D.V. 1975a. Studies on corn proteins

VIII. Free amino acid content of *opaque-2* double mutants. *Cereal Chem.* 52: 844 - 848.

MISRA, P.S., MERTZ, E.T. e GLOVER, D.V. 1975b . Studies on corn proteins VII. Developmental changes in endosperm proteins of high-lysine mutants. *Cereal Chem.* 52: 734 - 739.

NELSON, O.E. 1967. A mutant gene affecting protein synthesis in the maize endosperm. *Maydica*, 12: 81 - 96.

NOBEL, P.S. 1974. Biophysical plant physiology. *W.H. Freeman Company*. 580 pp.

PAEZ, A.V., HELM, J.L. e ZUBER, M.S. 1970. Dosage effects of *opaque-2* and *floury-2* on lysine, protein and light transmission of maize endosperm. *Z. Pflanzen.* 63: 119 - 124.

PATERNIANI, E. 1978. Melhoramento e produção do milho no Brasil. Piracicaba ESALQ , 650 p.

PIETRZAK, M. CUDNY, H. e MALUSZYNSKI, M. 1980. Purification and properties of ribonucleases and nucleases from barley seeds. *Biochim. Biophys. Acta.* 614: 102 - 112.

PREMECZ, G., OLÁH, T., GULIÁS, A., NYTRAI, A., PÁLFI, G. e FARKAS, G.L. 1977. Is the increase in ribonuclease level in isolated protoplasts due to osmotic stress? *Plant Sci. Lett.* 9: 195 - 200.

PREMECZ, G., RUZICKA, P., OLÁH, T. e FARKAS, G.L. 1978. Effect of osmotic

stress on protein and nucleic acid synthesis in isolated tobacco proto-  
plasts. *Planta*, 141: 33 - 36.

QUADER, H. e KAUSS, H. 1975. Die rolle einiger zwischenstoffe des galacto-  
sylglyzerinstoffwechsels bei der osmoregulation in *Ochromonas malhamen-  
sis*. *Planta*, 124: 61 - 66.

RIJVEN, A.H.G.C. 1979. Cytokinin ribosides as inhibitors of ribonuclease  
activity on ribosomes from *Trigonella fenum-graecum* L. *Aust. J. Plant  
Physiol.* 6: 621 - 627.

SCANDALIOS, J.G. 1979. Physiological Genetics. *Academic Press. New York.*,  
280 p.

SHANON, J.C. e CREECH, R.S. 1973. Genetics of storage polyglucosides in  
*Zea mays* L. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 210: 279 - 289.

SILVA, W.J.S. e SANTORO, L.G. 1972. Técnica para estudo do efeito de genes  
que condicionam características do endosperma de milho. *Ciência e Cul-  
tura*, vol p 172.

SODEK, L. e WRIGHT, S.T.C. 1969. The effect of kinetin on ribonuclease,  
acid phosphatase, lipase and sterase levels in detached wheat leaves.  
*Phytochem.* 8: 1629 - 1640.

SODEK, L. e WILSON, C.M. 1971. Aminoacid composition of proteins isolated  
from normal, *opaque-2* and *floury-2* corn endosperm by a modified Osbor-  
ne procedure. *J. Agric. Food Chem.* 19: 1144 - 1150.

SPRAGUE, G.F. 1977. Corn and corn improvement. 2<sup>o</sup> edition, Agron. Soc. Am.  
500 p.

SRIVASTAVA, B.I.S. 1968. Acceleration of senescence and of the increase of  
chromatin associated nucleases in excised barley leaves by abscisin II  
and its reversal by kinetin. *Biochim. Biophys. Acta*, 169: 534 - 535.

TODD, G.W. e YI, C. 1979. Changes in ribonuclease activity of wheat plants  
during water stress. *Physiol. Plant.* 46: 13 - 18.

TODD, G.W., VICK, P. and TSAI, S.D. 1970. Some further observation on pro-  
tein fractions isolated from wheat leaves subjected to moisture stress.  
*Proc. Okla. Acad. Sci.* 50: 106 - 109.

TSAI, C.Y. e NELSON, O.E. 1966. Starch-deficient maize mutant lacking ade-  
nosine diphosphate glucose pyrophosphorilase activity. *Science*, 151:  
341 - 342.

TSAI, C.Y. e DALBY, A. 1974. Comparison of the effect of *shrunken-4*, *opa-*  
*que-2*, *opaque-7* and *floury-2* genes on the zein content of maize during  
endosperm development. *Cereal Chem.* 51: 825 - 829.

TSAI, C.Y., SALAMINI, F. e NELSON, O.E. 1970. Enzymes of carbohydrate meta-  
bolism in the developing endosperm of maize. *Plant Physiol.* 46: 299 -  
306.

TSAI, C.Y., LARKINS, B.A. e GLOVER, D.V. 1978. Interaction of the *opaque-2*  
gene with starch-forming genes on the synthesis of zein in maize endos-  
perm. *Biochem. Genet.* 16: 883 - 895.

- TYMMS, M.J. e GAFF, D.F. 1979. Proline accumulation during water stress in resurrection plants. *J. Exp. Bot.* 30: 165 -168.
- ULLRICH, S.E. e ESLICK, R.F. 1978<sub>a</sub>. Lysine and protein characterization of spontaneous *shrunk* endosperm mutants of barley. *Crop Sci.* 18: 809 - 812.
- ULLRICH, S.E. e ESLICK, R.F. 1978<sub>b</sub>. Inheritance of the associated kernel characters, high lysine and *shrunk* endosperm, of the barley bomi, ri-sø 1508. *Crop Sci.* 18: 828 - 831.
- ULLRICH, S. E. e ESLICK, R.F. 1978<sub>c</sub>. Lysine and protein characterization of induced *shrunk* endosperm mutants. *Crop Sci.* 18: 963 - 966.
- WILSON, C.M. 1967. Purification of a corn ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 242: 2260 - 2263.
- WILSON, C.M. 1968. Plant nucleases II. Properties of corn ribonucleases I and II and corn nuclease I. *Plant Physiol.* 43: 1339 - 1346.
- WILSON, C.M. 1971. Plant nucleases III. Polyacrilamide gel eletrophoresis of corn ribonucleases isoenzymes. *Plant Physiol.* 48: 64 - 68.
- WILSON, C.M. 1973. Plant nucleases IV. Genetic control of ribonuclease activity in corn endosperm. *Biochem. Genet.* 9:53 - 62.
- WILSON, C.M. 1975. Plant nucleases V. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 187-208
- WILSON, C.M. 1980. Plant nucleases VI. Genetic and developmental variabili

ty in ribonuclease activity in inbred and hybrid corn endosperms.

*Plant Physiol.* 66: 119 - 125.

WILSON, C.M. e ALEXANDER, D.E. 1967. Ribonuclease activity in normal and *opaque-2* mutant endosperm of maize. *Science*, 155: 1575 - 1576.