

CARMEN MARIA DE CARO MARTINS

ESTUDO DE EFEITOS DOS GENES *opaque-2*, *shrunk* E
shrunk-2 DURANTE A GERMINAÇÃO DO MILHO

Orientador: Prof. Dr. William José da Silva

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

CAMPINAS
1983

A meus pais

Basilio e

Carmen

dedico.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

A autora agradece a todos que colaboraram na realização deste trabalho, especialmente:

Ao professor Dr. *William José da Silva*, pelo estímulo, orientação e oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa.

Ao professor Dr. *Paulo Arruda*, pelas sugestões e orientação no trabalho prático.

À amiga *Abigail Dorigatti*, pelo auxílio nas análises.

Ao amigo e colega *Sergio Zaborowsky*, pela amizade, apoio e valiosas sugestões.

Ao professor Dr. *Hilton S. Pinto*, pela permissão do uso do computador.

Aos professores *Ladaslav Sodek*, *Rolf Dieter Hillg* e *Antonio Celso Novaes Magalhães* pela análise prévia desta tese e valiosas sugestões.

Ao *Rogério*, companheiro e amigo, pelo grande apoio e compreensão durante todo o curso de pós-graduação.

ÍNDICE

	PÁGINA
1. - INTRODUÇÃO -----	1
2. - REVISÃO DA LITERATURA -----	4
2.1. Alterações químicas durante a germinação ----	4
2.2. Efeito de genes do endosperma durante o desenvolvimento das sementes -----	9
2.3. Composição química da semente ao longo da germinação -----	14
3. - MATERIAL E MÉTODOS -----	17
3.1. Germoplasma -----	17
3.2. Faixa de peso das sementes -----	20
3.3. Curva de crescimento -----	21
3.4. Determinação do nitrogênio -----	22
3.5. Determinação de aminoácidos -----	23
4. - RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	27
4.1. Embebição e peso fresco do endosperma durante a germinação -----	27
4.2. Variações no peso seco de endospermas e plântulas durante a germinação -----	32
4.3. Alterações no conteúdo de nitrogênio no endosperma e na plântula durante a germinação -----	38

4.4. Variação nas quantidades de aminoácidos durante a germinação -----	45
5. - CONCLUSÕES -----	69
6. - RESUMO -----	73
7. - SUMMARY -----	77
8. - BIBLIOGRAFIA -----	81

ÍNDICE DAS TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1 - Composição de Aminoácidos em 100 ml de padrão -----	26
Tabela 2 - Período (dias) de utilização de 50% do nitrogênio e matéria seca pelas diferentes linhagens durante a ger- minação -----	36
Tabela 3 - Porcentagem de nitrogênio no endos- perma das diferentes linhagens, du- rante a germinação -----	43
Tabela 4 - Porcentagem de nitrogênio na plân- tula das diferentes linhagens, duran- te a germinação -----	44
Tabela 5 - Aminoácidos ($\mu\text{mol } \%$) no endosperma das linhagens, antes da germinação-	48
Tabela 6 - Aminoácidos ($\mu\text{mol } \%$) em plântulas de 3 a 9 dias, da linhagem ML 649--	50
Tabela 7 - Aminoácidos ($\mu\text{mol } \%$) em plântulas de 3 a 9 dias, da linhagem ML 674--	51
Tabela 8 - Aminoácidos ($\mu\text{mol } \%$) em plântulas de 3 a 9 dias, da linhagem CP 577--	53

ÍNDICE DAS FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 - Peso fresco de endospermas normais e mutantes das linhagens ML 649, CP 577 e ML 674 durante os primeiros 10 dias de crescimento -----	29
Figura 2 - Peso seco de endospermas e plântulas das linhagens estudadas, durante a germinação -----	34
Figura 3 - Quantidades totais (plântula endos- perma), em mg, de peso seco e nitro <u>g</u> ênio durante a germinação e in <u>í</u> cio do desenvolvimento das linhagens <u>es</u> tudadas -----	40
Figura 4 - Conteúdo de nitrogênio (mg) em endos <u>per</u> mas e plântulas durante a germina <u>a</u> ção das linhagens estudadas -----	41
Figura 5 - Alterações no conteúdo de cada amino <u>ác</u> ido (mg) no endosperma da linhagem ML 649 e <i>opaque-2</i> durante a germina- ção -----	54

Figura 6 - Alterações no conteúdo de cada aminoácido (mg) no endosperma da linhagem ML 674 normal e <i>shrunk-en-2</i> durante a germinação -----	56
Figura 7 - Alterações no conteúdo de cada aminoácido (mg) no endosperma da linhagem CP 577 normal e <i>shrunk-en</i> durante a germinação -----	57
Figura 8 - Quantidade total (endosperma + plântula) de cada aminoácido (em mg) na linhagem ML 649 normal e <i>opaque-2</i> , durante a germinação -----	59
Figura 9 - Quantidade total (endosperma + plântula) de cada aminoácido (em mg) na linhagem ML 674 normal e <i>shrunk-en-2</i> durante a germinação -----	60
Figura 10 - Quantidade total (endosperma + plântula) de cada aminoácido (em mg) na linhagem CP 577 normal e <i>shrunk-en</i> durante a germinação -----	61
Figura 11 - Alterações na quantidade de cada aminoácido (mg) durante o crescimento inicial de plântulas da linhagem ML 649 normal e <i>opaque-2</i> -----	65

Figura 12 Alterações na quantidade de cada aminoácido (mg) durante o crescimento inicial de plântulas da linhagem ML 674 normal e *shrunk-en-2* ----- 66

Figura 13 Alterações na quantidade de cada aminoácido (mg) durante o crescimento inicial de plântulas da linhagem CP 577 normal e *shrunk-en* ----- 67

I - INTRODUÇÃO

As alterações na composição química da semente, devido à presença de genes que atuam no endosperma, têm sido extensivamente estudadas por geneticistas e bioquímicos vegetais. As características que tem merecido maiores atenções referem-se às mudanças na qualidade proteica e quantidade de polissacarídeos no endosperma, uma vez que são condicionadas por sistemas genéticos simples.

Em milho são conhecidos vários mutantes de endosperma que alteram a constituição de carboidratos, aminoácidos e íons na semente (MERTZ e BATES, 1964; CREECH, 1965;

CREECH, 1968; MURPHY e DALBY, 1971; SODEK e WILSON , 1971 ; SHANNON e CRRECH, 1973; MISRA *et alii*, 1975; ARRUDA *et alii*, 1978; TSAI *et alii*, 1978; ARRUDA e SILVA, 1979). Estes mutantes apresentam variação no peso e quantidade de polissacarí - deos ou na constituição proteica, em níveis bem distintos dos encontrados em endospermas normais.

As investigações sobre a síntese de proteínas e aminoácidos de endospermas mutantes têm sido realizadas em sementes maduras, ou durante o desenvolvimento. O endosperma é um tecido de reserva, fundamental para a sobrevivência da plântula nos primeiros dias de germinação. Durante a germinação as proteínas de reserva dos cereais são hidrolisadas em aminoácidos por enzimas proteolíticas. A maioria destes aminoácidos são translocados para o embrião em desenvolvimento e usados para a síntese de proteínas estruturais e enzimas, ou ainda para a síntese de compostos não nitrogenados (ASHTON , 1976).

Vários trabalhos tem sido feitos para demonstrar que o conteúdo de proteínas e o tamanho da semente estão diretamente relacionados com o desenvolvimento da plântula. Tais estudos tem sido realizados em sementes com alterações físicas e químicas induzidas por adubação nitrogenada em lotes experimentais (SHWEIZER e RIES, 1969; LOWE e RIES, 1973; METIVIER e DALE , 1977).

Por outro lado, o estudo do efeito fisiológico de genes que atuam no endosperma do milho no processo de germinação, tem merecido pouca atenção dos pesquisadores, restringindo-se a trabalhos envolvendo os mutantes *opaque-2* (TSAI *et alli* , 1975; JONES e TSAI, 1977; CHIBBER *et alli*, 1977 ; MONTEIRO, 1980), e os mutantes *shrunk-2*, *brittle* e *sugary* (STYER *et alli*, 1980).

Este trabalho é uma tentativa para se estudar mais detalhadamente a influência dos genes *opaque-2*, *shrunk* e *shrunk-2*, notadamente na utilização das reservas nitrogenadas do endosperma. Desse modo, analisou-se a utilização de matéria seca, nitrogênio e aminoácidos, durante os dez primeiros dias de germinação. O objetivo é analisar o efeito das alterações na composição de polissacarídeos (*shrunk* e *shrunk-2*) e a composição de proteínas (*opaque-2*) do endosperma, contrastando-as com as alterações no metabolismo de nitrogênio , condicionadas pelos mesmos genes, durante a germinação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. - Alterações químicas durante o processo de germinação

Em cereais, o endosperma é o principal tecido responsável pelo acúmulo de reservas que serão utilizadas, pelo embrião, no início de seu desenvolvimento. Estas reservas compreendem carboidratos, proteínas, lipídeos e outros componentes necessários para o crescimento inicial do embrião.

Na semente madura de milho, os carboidratos representam cerca de 75% das reservas da semente, enquanto que

proteínas e lipídeos correspondem aproximadamente a 10 e 5% respectivamente (EARLE *et alii*, 1956). Porém a distribuição das reservas no grão é variável (SODEK e WILSON, 1971). O eixo embrionário e escutelo apresentam cerca de 34,8% de lipídeos e 18,8% de proteínas, enquanto que o endosperma tem aproximadamente 0,8% de lipídeos e 9,4% de proteínas (SODEK 1973 ; TOSELLO, 1978).

As proteínas de reserva foram originalmente estudadas em plantas por OSBORNE (1897), que classificou-as de acordo com a sua solubilidade em soluções aquosas. As proteínas solúveis em água, são as albuminas; as solúveis em soluções salinas, as globulinas; as solúveis em álcool, as prolaminas e finalmente as solúveis em soluções básicas, as glutelinas. As albuminas e globulinas tem função notadamente enzimática na semente, sendo mais abundantes no eixo embrionário e escutelo. As prolaminas e glutelinas são principalmente proteínas de reserva e estruturais do endosperma (MERTZ *et alii*, 1958; PAULIS *et alii*, 1969).

O carboidrato mais abundante no endosperma de cereais é o amido, um polissacarídeo constituído por dois polímeros de glicose, um de cadeia linear, a amilose, e outro de cadeia ramificada, amilopectina. A proporção destas duas cadeias varia com o material estudado. No milho normal encontra-se cerca de 25% do amido na forma de amilose e o restante co

mo amilopectina (DURE, 1960a).

O processo de germinação inicia-se com a embebição, que em seguida, desencadeia a hidrólise das reservas da semente. Os produtos hidrolisados são utilizados pelo eixo embrionário para a síntese de protoplasma e componentes estruturais que conseqüentemente, trazem o crescimento da plântula (ASHTON, 1976). Esse crescimento é caracterizado por uma diminuição do material armazenado no endosperma e um aumento do material da plântula, sugerindo, obviamente, que as reservas do endosperma estão sendo utilizadas para o crescimento e desenvolvimento do eixo embrionário.

Nas primeiras horas de crescimento, os lipídeos do escutelo são catabolizados (DURE, 1960a; INGLE *et alii*, 1964) e podem ser transformados em açúcares no eixo embrionário (OAKS e BEEVERS, 1964). Porém as maiores modificações ocorrem no endosperma devido a grande quantidade de reservas que este tecido acumula. A degradação do endosperma é feita por enzimas (proteases e amilases) que podem ser encontradas na semente antes da embebição ou ainda, serem sintetizadas *de novo* no início da germinação como no caso da α -amilase (OKAMOTO e AKASAWA, 1979 e 1980).

A degradação das reservas amiláceas é feita principalmente pelas α -amilases e β -amilases, enquanto que a degradação das proteínas é feita pelas proteases, que quebram

as proteínas em vários peptídeos que serão reduzidos a aminoácidos pelas peptidases (YOMO e VARNER, 1973; HARVEY e OAKS, 1974; ASHTON, 1976; FELLER, 1979; MOUREAUX, 1979; ADAMS *et alii*, 1980; BOSE e SRIVASTAWA, 1980).

Em aveia, SUTCLIFFE e BASET (1973) mostraram que a taxa de degradação de proteína é mais rápida que a de amido, sendo que a atividade das proteases é iniciada em 24 horas, antes das amilases. Resultados semelhantes foram encontrados em arroz (OKAMOTO e AKASAWA, 1979) e em ervilha (YOMO e VARNER, 1973).

As mudanças no peso seco do endosperma e plântula são acompanhadas por mudanças na quantidade de nitrogênio. Assim, a diminuição do peso seco do endosperma é acompanhada por um decréscimo na quantidade de nitrogênio neste tecido. Ao mesmo tempo, o peso seco da plântula é aumentado com um paralelo aumento na quantidade de nitrogênio (ELMORE e KING, 1978; ADAMS *et alii*, 1980; ROSSI, 1980).

Em milho o crescimento da plântula é acompanhado por um decréscimo na quantidade de proteínas e carboidratos do endosperma. O conteúdo de proteína solúvel na plântula aumenta progressivamente com a germinação (INGLE *et alii*, 1964). HARVEY e OAKS (1974) mostraram que o período principal de hidrólise no milho, ocorre entre o 3º e 8º dias de germinação, e que a zeína e a glutelina são as frações proteicas degradadas mais rapidamente.

Como a composição de aminoácidos do endosperma é diferente da encontrada na plântula, devem ocorrer interconversões dos aminoácidos liberados no endosperma durante a hidrólise proteolítica (CHITTENDEN *et alii*, 1891; FOLKES e YEMM, 1956; BOUTHER e BARBER, 1963; SPLITTSTOESSER, 1967). FOLKES e YEMM (1958) mostraram que no endosperma de cevada as fontes mais importantes de nitrogênio para a síntese de outros aminoácidos são o ácido glutâmico, a prolina e as amidas.

Nessa mesma linha, DUPUY *et alii* (1971) mostraram, em endosperma normal de milho, que as quantidades absolutas de ácido aspártico, glicina e lisina aumentam durante a germinação enquanto que o ácido glutâmico, leucina, prolina e alana decrescem. JOY e FOLKES (1965) mostraram, também, que em cevada, os aminoácidos intimamente relacionados ao metabolismo de carboidratos eram convertidos a outros compostos ou CO₂, enquanto que os de via biossintética mais longa, como a lisina e leucina eram utilizados, sem mudanças, pelo eixo embrionário. Posteriormente, SODEK e WILSON (1973) utilizando sementes que haviam sido marcadas com ¹⁴C durante o desenvolvimento do grão, mostraram que na germinação, a síntese de leucina é restrita e que o excesso deste aminoácido é catabolizado, enquanto que lisina, presente em quantidades insuficientes no grão, deve ser sintetizada.

Complementando, TSAI *et alii* (1975) verificaram

que durante a germinação do milho há um aumento no nível total de lisina e triptofano com um correspondente declínio na zeína. Posteriormente, JONES e TSAI (1977) confirmaram este fato, concluindo que as proteínas necessárias para o cresmento e desenvolvimento do embrião requerem níveis de lisina superiores aos oferecidos pelas proteínas do endosperma, sugerindo que os precursores necessários para a biossíntese deste aminoácido poderiam derivar da zeína.

2.2. - Efeito de genes do endosperma durante o desenvolvimento das sementes

A composição química da semente de milho tem sido muito estudada, devido principalmente ao seu valor na alimentação animal.

Apesar deste cereal atuar como uma excelente fonte de carboidratos, suas proteínas são de baixo valor nutrititivo, pois apresentam níveis inadequados de lisina e triptofano.

São conhecidos cerca de 13 mutantes de endosperma, todos condicionados por genes recessivos, que apresentam alterações na composição química, notadamente carboidratos ou proteínas, elevando a qualidade nutritiva do milho. Estes mu

tantes tem merecido grande atenção dos bromatologistas, químicos e geneticistas, pois além da aplicação imediata na alimentação animal e no melhoramento, são procurados pelo interesse científico que apresentam para o estudo de vias biossintéticas, ou mesmo, para o estudo da regulação da síntese de proteínas e carboidratos no cereal.

Entre os genes que alteram a síntese de carboidratos no endosperma, destacam-se o *shrunk* (*sh*), *shrunk-2* (*sh2*), *shrunk-4* (*sh4*), *brittle* (*bt*), *brittle-2* (*bt2*) e *brittle-4* (*bt4*), que reduzem drasticamente a síntese de amido, acumulando maiores quantidades de sacarose do que os tipos normais. Na maturação completa, estes mutantes apresentam-se com endospermas leves e enrugados, e quantidade de lisina bastante superior à encontrada nos tipos normais.

O mutante *shrunk* foi descrito primeiramente por HUTCHINSON (1921). Este gene bloqueia a síntese de amido (CREECH, 1968) e aparentemente está envolvido com a ausência de atividade da sacarose sintetase no endosperma (CHOUREY e NELSON, 1976; BRYCE e NELSON, 1979).

Durante o desenvolvimento da semente, ARRUDA (1982) mostrou que o peso fresco do endosperma deste mutante é 17% maior que o normal, na 4a. semana após a polinização, e que apresentava também, maior atividade da RNase que o en

dosperma normal. Paralelamente, verificou que o potencial osmótico desse endosperma mutante foi cerca de 30% menor que o do endosperma normal.

O gene *shrunk-2*, descrito por BURNHAN (1944) é responsável pela síntese de uma quantidade de amido equivalente a 30% da encontrada no endosperma normal, causando, consequentemente, uma redução de 30 a 50% no peso seco da semente (LAUGHMAN, 1953; CREECH, 1965; CREECH e McARDLE, 1966; JENNINGS e McCOMBS, 1969; HOLDER *et alii*, 1974). Este bloqueio na síntese de amido está relacionado à baixa atividade da enzima ADPG-Pirofosforilase (TSAI e NELSON, 1966; DICKINSON e PREISS, 1969; SHANNON e CREECH, 1973). Este mutante possui cerca de 20% do peso seco do endosperma atribuído à açúcares, sendo que 16% é sacarose (LAUGHMAN, 1953). ARRUDA (1982) mostrou que durante a maturação da semente, o endosperma *shrunk-2* apresenta teor de água e atividade da RNase, respectivamente 40 e 20% mais elevados que os valores encontrados para o endosperma normal, enquanto que o potencial osmótico desse mutante é reduzido em 90% em relação aos endospermas normais.

Entre os genes que atuam na síntese de proteínas do endosperma encontram-se o *opaque-2* (*o2*) e o *fluory-2* (*fl2*) que elevam o teor de lisina no endosperma. O mutante *opaque-2* foi descoberto por SINGLETON e JONES (1935) e recebeu esse

nome porque as sementes apresentavam-se sem brilho devido à textura farinácea do endosperma. O peso seco da semente e a produção de grãos são reduzidos em 17 e 7% em relação dos tipos normais (NELSON, 1967; ELMORE, 1970; BAUMAN, 1975; ARNOULD *et alii*, 1977b), enquanto que o teor de umidade é aumentado (WILSON e ALEXANDER, 1967).

Análises químicas do endosperma o2 mostram que há uma drástica mudança no padrão de aminoácidos em relação ao endosperma normal. A quantidade de zeína é diminuída em cerca de 50%, as albuminas + globulinas e fração de aminoácidos livres aumenta em 2, 3 vezes, enquanto que as glutelinas são aumentadas em cerca de 45% (JIMENES, 1966; MOSSE, 1966; MOSSE *et alii*, 1966; MURPHY e DALBY, 1971; SODEK e WILSON, 1971; MISRA *et alii*, 1972; TSAI e DALBY, 1974; DALBY e TSAI, 1975; MISRA *et alii*, 1975a; LEE *et alii*, 1976; BAENZIGER e GLOVER, 1977; LODHA *et alii*, 1977; RIGUETTI *et alii*, 1977). A baixa quantidade de zeína, proteína pobre em lisina (LANDRY e MOUREAUX, 1970; SODEK e WILSON, 1971; GIANAZZA *et alii*, 1977), e o decorrente aumento nas outras frações proteicas, que possuem níveis mais elevados de lisina, principalmente glutelinas e fração de aminoácidos livres, faz com que este mutante apresente uma elevação de aproximadamente 70% na quantidade deste aminoácido, em relação ao endosperma normal (MERTZ e BATES, 1964; JIMENES, 1966; MOSSE *et alii*, 1966; MURPHY e

DALBY, 1971).

Além da alteração nas proporções das diferentes frações proteicas, o gene *opaque-2* também aumenta a quantidade de aminoácidos livres no endosperma (SODEK e WILSON, 1971; MISRA *et alii*, 1975; ARRUDA *et alii*, 1978). ARRUDA (1982) mostrou que a partir da 4a. semana após a polinização, o peso fresco de sementes *opaque-2* é 12% mais elevado que o de sementes normais, e o potencial osmótico e atividade da RNase são, respectivamente, 20 e 25% mais elevados no mutante em relação ao endosperma normal.

Através da injeção de lisina, marcada com ^{14}C , no endosperma em desenvolvimento, SODEK e WILSON (1970) mostraram que no endosperma normal uma grande parte da lisina foi quase totalmente convertida em ácido glutâmico e prolina, enquanto que no endosperma *opaque-2* esta conversão foi bastante reduzida. BRANDT (1975) trabalhando com cevada, encontrou resultados semelhantes, mostrando que o controle genético da conversão de lisina deve ser um mecanismo importante para a determinação do nível deste aminoácido na semente.

2.3. - Composição química da semente ao longo da germinação.

A taxa de crescimento da plântula em cereais pode ser influenciada pelo tamanho da semente, conteúdo de proteína e genótipo da semente (EVANS e BHATT, 1977). Vários trabalhos tem sido feitos para demonstrar que o tamanho e conteúdo de proteína da semente estão diretamente relacionados com o desenvolvimento da plântula (KAUFMANN e GUITARD , 1967 ; SHWEIZER e RIES, 1969; LOWE e RIES, 1973; METIVIER e DALE , 1976). KAUFMANN e GUITARD (1967) mostraram que em cevada a taxa de crescimento da plântula e tamanho das duas primeiras folhas, dependem da quantidade de nutrientes e tamanho da semente. Resultados semelhantes foram observados em trigo (LOWE e RIES, 1972; LOWE e RIES, 1973; RIES e EVERSON, 1973; EVANS e BAHTT, 1977), onde encontrou-se uma significativa correlação positiva entre vigor da plântula e tamanho e conteúdo de proteína na semente. O estudo da correlação entre quantidade de proteína e vigor da plântula tem sido feito com sementes obtidas em lotes experimentais que recebem quantidades diferentes de nitrogênio (LOWE e RIES, 1972; LOWE e RIES, 1973; METIVIER e DALE, 1977a). A alta correlação de proteínas na semente e matéria seca da plântula pode ser explicada pela grande quantidade de proteínas no endosperma que pode suprir diferentes

níveis de substratos respiratórios para a síntese de novas proteínas (LOWE e RIES, 1972).

Por outro lado tem sido mostrado, em alguns cereais, que o crescimento da plântula é influenciado pelo genótipo da semente. DUNWELL (1981) trabalhando com embriões de cevada, isolados de diferentes cultivares, encontrou que o crescimento das raízes era influenciado pelo genótipo. Resultados semelhantes foram encontrados por MURPHY e LONG (1979), para o crescimento de plântulas de diferentes genótipos de aveia, em solução de Hoagland.

Como foi demonstrado anteriormente, o efeito do gene *opaque-2* durante o desenvolvimento da semente de milho tem sido estudado por vários autores nos últimos anos. O efeito deste gene durante a germinação foi estudado por CHIBBER *et alii* (1977), que mostraram que em plântulas de endosperma normal há um aumento na quantidade total de lisina, enquanto que em plântula *opaque-2* o nível total deste aminoácido diminui durante a germinação. O aumento na quantidade deste aminoácido durante a germinação de sementes normais pode ser atribuído à síntese *de novo* de lisina, enquanto que no mutante *opaque-2* o catabolismo deste aminoácido deve ocorrer rapidamente. Este fato foi confirmado por JONES e TSAI (1977) que estudaram não só o efeito do gene *opaque-2*, como também o *floury-2* e o duplo mutante *opaque-2floury-2*, durante a germi-

nação. Foi demonstrado que a presença do gene *opaque-2* causa uma redução na taxa de crescimento da plântula. Além disso, os níveis totais de lisina e triptofano na plântula aumentam rapidamente nos tipos normais, enquanto que nos mutantes *opaque-2* e *floury-2* e no duplo mutante, o aumento destes aminoácidos foi mínimo (TSAI *et alii*, 1975; JONES e TSAI, 1977). Estes resultados sugerem que o nível de lisina requerido pela plântula em desenvolvimento deve ser maior do que aquele oferecido pelas proteínas do endosperma normal (JONES e TSAI, 1977).

Outros mutantes de endosperma tem sido investigados durante a germinação. STYER *et alii* (1980) utilizando os mutantes de carboidratos *shrunk-2*, *brittle* e *sugary*, notaram que quando o nível de carboidratos é baixo o suprimento de ATP pode ser reduzido, e conseqüentemente a germinação e vigor da plântula podem ser afetados. O mutante *shrunk-2* foi o que apresentou porcentagem de germinação, comprimento de radícula e pesos fresco e seco mais reduzidos em relação aos tipos normais. Isto pode ser explicado pela baixa quantidade de polissacarídeos na semente que fornece, assim, uma fonte de energia inadequada para o desenvolvimento da plântula.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. - Germoplasma

Para este trabalho foram utilizadas tres linhagens isogênicas de milho, cada uma com dois tipos de endospermas: o endosperma normal, do tipo selvagem, condicionado pelo alelo dominante e o endosperma mutante, homozigoto para alelo recessivo. Desse modo, uma linhagem tem alelos contrastantes dentro do loco *shrunk*en (*Sh*, *sh*), outra, dois alelos dentro do *shrunk*en-2 (*Sh*2, *sh*2), e finalmente a terceira dois alelos

dentro do loco *opaque-2* (02, o2). Como já foi mostrado, todos esses genes recessivos elevam a qualidade proteica do endosperma. O material experimental, ou seja, sementes normais e respectivos mutantes, foram obtidos em uma mesma espiga, com segregação do tipo 3:1, através da autofecundação de plantas heterozigotas, cultivadas em parcelas experimentais, que receberam fertilizante na proporção de 60Kg de Nitrogênio; 60Kg de P_2O_5 e 60Kg de K_2O por hectare. As sementes de endospermas normais e mutantes foram facilmente identificadas nas espigas maduras, graças aos efeitos fenotípicos bem claros apresentados por essas mutações.

As linhagens utilizadas pertencem à coleção de germoplasma do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP, e possuem um mínimo de 10 ciclos sucessivos de autofecundação de plantas heterozigotas para apenas um dos loco citados. São as seguintes:

Linhagem	Endosperma	Genótipo
ML 674	<i>shrunk-2 (sh2)</i>	<i>sh2sh2sh2</i>
	normal	<i>Sh2sh2sh2</i>
ML 649	<i>opaque-2 (o2)</i>	<i>o2o2o2</i>
	normal	<i>O2o2o2</i>
CP 577	<i>shrunk (sh)</i>	<i>shshsh</i>
	normal	<i>Shshsh</i>

3.2. - Faixa de peso das sementes

Devido à variação de peso seco que normalmente ocorre na semente ao longo da espiga, as semente utilizadas foram escolhidas dentro de uma faixa de peso, previamente estabelecida para cada material, de acordo com as freqüências das várias classes na distribuição.

O estabelecimento destas faixas de peso teve como objetivo minimizar o efeito não-genético da quantidade de matéria seca contida no endosperma de cada semente.

As seguintes faixas de peso foram utilizadas para cada linhagem:

Linhagem	Endosperma	Faixa de Peso
ML 674	<i>shrunk-en-2</i>	90 - 110 mg
	normal	170 - 190 mg
ML 649	<i>opaque-2</i>	210 - 250 mg
	normal	280 - 310 mg
CP 577	<i>shrunk-en</i>	190 - 210 mg
	normal	200 - 230 mg

3.3. - Curva de Crescimento

Para o estabelecimento das curvas de crescimento, dez sementes de cada um dos seis materiais foram plantadas em potes plásticos de 1 litro, contendo vermiculita, irrigados com água destilada e colocados em uma estufa a 27°C no escuro. As plântulas receberam água em intervalos de 48 horas até o fim do experimento. Diariamente, durante 10 dias consecutivos, as plantas eram coletadas, o embrião ou plântula (parte aérea + sistema radicular) separados do endosperma e pesados individualmente em balança analítica. As curvas de crescimento foram feitas com as médias de 10 plântulas e com as de 10 endospermas.

Para a determinação do peso seco, o material foi colocado em estufa a 60°C por um período de 5 dias e pesadas.

Tanto endospermas, como plântulas, foram pulverizados em moinho de bola para preparação de farinhas que foram usadas na determinação do nitrogênio total.

3.4. - Determinação do Nitrogênio

Para cada amostra, duas repetições de 100 mg de farinha foram digeridas segundo o método de KJELDAHL (AOAC ; 1965); usando 3 ml de ácido sulfúrico concentrado à temperatura de 380 - 400°C. Quando o extrato ficava claro a digestão era completada com 6 gotas de peróxido de hidrogênio 30%. O extrato digerido era em seguida diluído em água destilada até o volume final de 100 ml.

A determinação da quantidade de nitrogênio total foi feita colorimetricamente segundo o método de SMITH (1980) automatizado. Para tanto, utilizou-se uma bomba peristáltica para pipetagem de amostra e reagentes. Este sistema foi acoplado a um espectrofotometro, modelo UV 634 S (Varian), e este a um registrador magnético. A quantidade de nitrogênio foi determinada graficamente e comparada com uma curva padrão de sulfato de amônia.

Os reagentes utilizados foram os seguintes:

Reagente I: 10 g de fenol, 50 mg de nitroprussiato de sódio, completado para 1 litro com água destilada.

Reagente II: 5% de NaOH, 8% de hipoclorito de sódio (comercial), completado para 1 litro com água destilada.

Quantidades iguais de amostra e reagentes foram

misturadas. Em primeiro lugar a amostra foi misturada com o Reagente I e logo após com o Reagente II. A reação ocorreu à temperatura de 47°C e a leitura foi feita a 640 nm.

3.5. - Determinação de Aminoácidos

Para a determinação de aminoácidos durante a germinação, o material foi preparado de maneira análoga à de terminação de nitrogênio. Durante 10 dias consecutivos as diferentes partes da plântula foram coletadas, separadas, pesadas e armazenadas a -20°C . Após a última coleta, o material foi liofilizado, pulverizado em moinho de bola e guardado em dessecador para posteriores análises.

A determinação de aminoácidos foi feita utilizando-se 50 mg de farinha, segundo o método de KIRKMAN (1974), com algumas modificações. A farinha foi hidrolisada com 5 ml de HCl 6N durante 22 horas a 110°C em tubos de ensaio de 10 x 1 cm, com rosca. O oxigênio destes tubos foi substituído por nitrogênio gasoso para evitar a oxidação de alguns aminoácidos. Após a hidrólise, 0,5 ml de uma solução de nor-leucina (0,5mg/ml) foi adicionada aos tubos para servir como padrão interno.

Esta mistura foi centrifugada e 2 ml do sobrenadante pipetado em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, para serem totalmente evaporados em dessecador contendo NaOH e CaCl_2 .

Após a evaporação completa do HCl, o extrato foi retomado em 5 x 1 ml de água destilada e os aminoácidos separados em uma coluna Dowex-50 equilibrada com HCl 1N. Os aminoácidos foram eluídos com hidróxido de amônia 50% e coletados em um bequer de 100 ml. A amônia foi evaporada completamente em banho-maria a 50°C, os aminoácidos retomados em 3 x 1 ml de água destilada e colocados em um tubo de ensaio de 10x1 cm com rosca. Após evaporação completa da água, em banho-maria 50°C, com fluxo de ar ou nitrogênio, 1 ml de HCl 3,5M em n-propanol, livre de água, foi pipetado nos tubos para ser efetuada a primeira derivação, em estufa a 110°C, durante 40 minutos.

A segunda derivação foi feita utilizando-se 0,5ml do primeiro derivado em frascos Silli-Vials de 1,5 ml da Varian. Este volume foi evaporado com fluxo de nitrogênio a 90°C. Após evaporação completa, 0,05 ml de acetonitrila e 0,1 ml de anidrido heptafluorrbutílico foram adicionados. A reação se processou a 150°C durante 6 minutos. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás modelo 2440 SS da Varian, equipado com: detector de ionização de chama, coluna

de vidro de 1m x 0,2 cm (d.i) contendo Chromosorb WHP em 3% SE. A velocidade do gás de arraste (N_2) foi de 40 ml/min. e a temperatura da coluna foi programada para variar de 50 a 250°C, aumentando 6°C/min.

Os aminoácidos foram comparados com um padrão simulado, contendo quantidades de aminoácidos semelhantes à composição do milho normal.

A composição de aminoácidos do padrão é apresentada na Tabela 1.

TABELA 1 - Composição de Aminoácidos em 100 ml de padrão.

Aminoácido	Sigla	Quantidade (μmol)
Alanina	<i>ALA</i>	1200
Glicina	<i>GLY</i>	500
Valina	<i>VAL</i>	500
Treonina	<i>TRE</i>	400
Serina	<i>SER</i>	600
Leucina	<i>LEU</i>	1500
Isoleucina	<i>ILE</i>	400
Norleucina	<i>NOR</i>	380
Prolina	<i>PRO</i>	1000
Metionina*	<i>MET*</i>	400
Ácido aspártico	<i>ASX</i>	600
Phenilalanina	<i>PHE</i>	400
Ácido Glutâmico	<i>GLX</i>	2000
Lisina	<i>LYS</i>	200
Tirosina	<i>TYR</i>	200
Arginina	<i>ARG</i>	300
Cisteína*	<i>CYS*</i>	200

* Nas análises efetuadas não foram tomados os devidos cuidados contra a oxidação de metionina e cisteína. Assim, não houve recuperação destes dois aminoácidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. - Embebição e peso fresco de endosperma durante a germinação.

O período inicial da germinação é caracterizado por uma entrada de água na semente que irá depender das características físicas e químicas do endosperma. Assim, a composição de carboidratos, íons, proteínas e aminoácidos livres irá determinar a quantidade de água que o grão irá absorver neste período. Com a embebição os tecidos se hidratam e o peso

fresco da semente aumenta até atingir um patamar para depois decrescer (LEOPOLD e KRIEDEMANN, 1975). Estas oscilações no peso fresco irão depender da quantidade de água que entra na semente e da matéria seca que está sendo utilizada para o crescimento da plântula.

As figuras 1A, 1B e 1C mostram as curvas de peso fresco dos endospermas normais e mutantes das linhagens estudadas, durante os 10 primeiros dias de germinação.

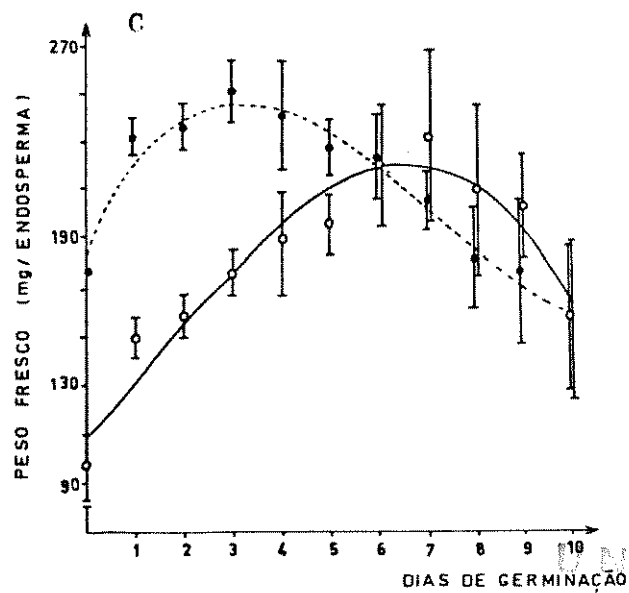
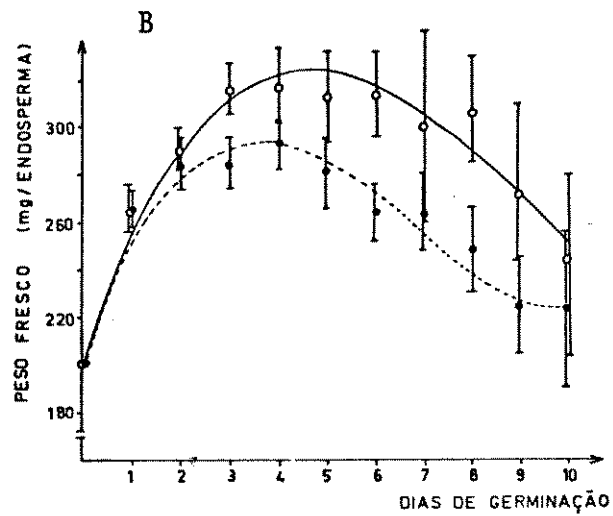
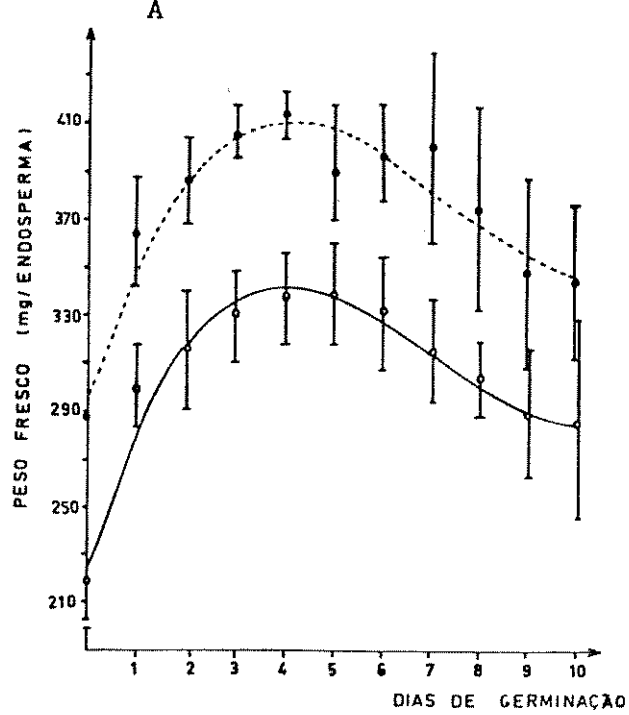
A análise da figura 1A mostra que na linhagem ML 649 o padrão das curvas dos tipos normal e *opaque-2* é praticamente o mesmo, sendo que o mutante tem seu peso fresco máximo no 4º dia de embebição, representando um aumento de 56% em relação ao peso fresco inicial. Por outro lado, o peso fresco máximo do endosperma normal foi alcançado também no 4º dia de embebição, correspondente a um aumento de 43% em relação ao peso fresco inicial.

Na linhagem CP 577, tanto o endosperma *shrunk*, como o normal, aumentaram o peso fresco até o 4º ou 5º dia de embebição (Fig. 1B), quando o mutante apresentou um peso fresco 68% mais elevado que o inicial, enquanto que no endosperma normal o aumento foi de 38%.

Na linhagem ML 674 (Fig. 1C), foram encontradas diferenças ainda mais marcantes entre os endospermas normal e

FIGURA 1 - Peso fresco de endospermas normais (●--●) e
mutantes (○--○) das linhagens ML 649 (A) ,
CP 577 (B) e ML 674 (C) durante os primei -
ros 10 dias de crescimento.

- Para cada ponto, as barras indicam o inter-
valo de confiança a 95% de probabilidade.



mutante, durante o período de embebição. O endosperma *shrunk-en-2*, no 7º dia de embebição, teve seu peso fresco aumentado em 130% em relação ao peso inicial. Por outro lado, no endosperma normal, o peso fresco máximo foi alcançado no 3º dia de embebição, aumentando em 42% em relação ao peso inicial.

Estes resultados indicam claramente que a quantidade de água que o endosperma pode absorver, depende das características físicas e químicas de suas reservas. Assim, alterações nestas características causadas por essas mutações, no período de formação dos grãos, interferem também no comportamento do endosperma no período inicial da germinação.

ARRUDA (1982) estudando o desenvolvimento do endosperma durante a maturação da semente, mostrou que o bloqueio na síntese de amido, condicionado pelos genes *shrunk-en* ou *shrunk-en-2*, determina um acúmulo de açúcares no endosperma e é responsável pela diminuição no potencial osmótico deste tecido, conseqüentemente, a capacidade de absorção de água pela semente é aumentada. Esta redução no potencial osmótico levaria a uma diminuição na taxa de incorporação de matéria seca pela semente em desenvolvimento, resultando numa redução do peso seco da semente madura dos mutantes em relação às sementes normais. Esse autor notou, também, que o gene *opaque-2* condiciona uma diminuição no potencial osmótico da semente, que não foi atribuído aos carboidratos, como no caso do *shrunk-en*

e *shrunken-2*, mas sim ao efeito deste gene na alteração da síntese de proteínas (BEEVERS, 1976), e/ou ao maior acúmulo de íons no endosperma (GOODSELL, 1968; ARNOULD *et alii*, 1977b; ARRUDA e SILVA, 1979b) que poderia atuar como agentes osmóticos.

A linhagem ML 674, portadora do gene *sh2*; (Fig. 1 C) foi a que apresentou as maiores diferenças para peso fresco de endosperma, entre os tipos normais e mutantes. Isto provavelmente deve-se ao drástico bloqueio na síntese de amido causado por este gene, resultando num aumento da quantidade de açúcares, principalmente sacarose. Esta alteração levaria este endosperma a apresentar um potencial osmótico bastante reduzido, possibilitando uma maior entrada de água no tecido durante a germinação. Observa-se, ainda, que a quantidade de açúcares no endosperma condicionada pelos genes em estudo, está diretamente relacionada com o aumento do peso fresco na embebição. Assim, endospermas com maiores quantidades de açúcares foram os que revelaram os maiores aumentos no peso fresco, em ordem decrescente, *sh2*, *sh* e *o2*. Por outro lado, os tipos normais das linhagens estudadas comportaram-se de maneira semelhante, apresentando um aumento máximo que variou de 38 a 43% em relação ao peso fresco inicial.

Os resultados das determinações do peso fresco de sementes, durante a germinação, mostram-se portanto, perfei

tamente compatíveis com os acontecimentos ocorridos no processo de enchimento do grão, durante a maturação. Estes efeitos poderiam ser atribuídos aos baixos e altos potenciais osmóticos apresentados, respectivamente, pelos endospermas mutantes e normais correspondentes.

4.2. - Variações no peso seco de endospermas e plântulas durante a germinação.

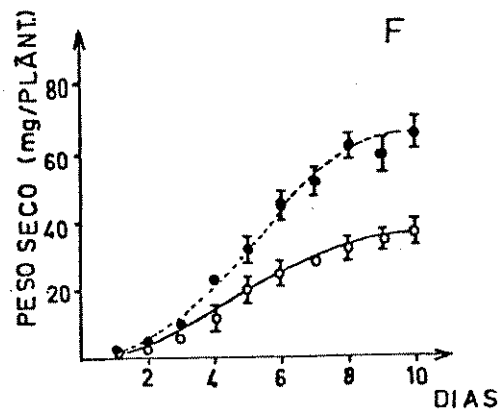
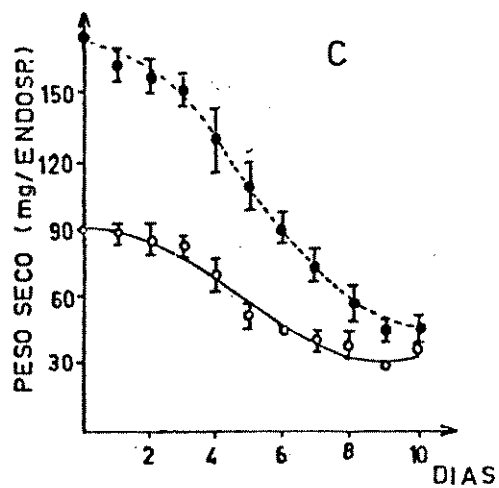
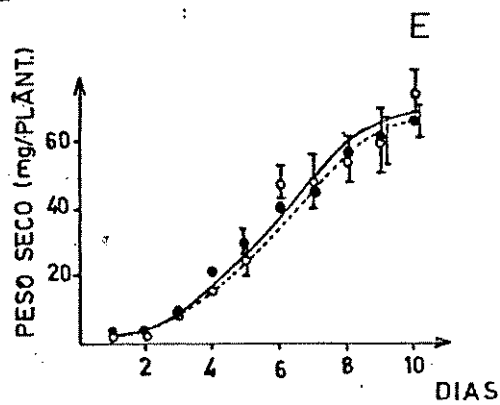
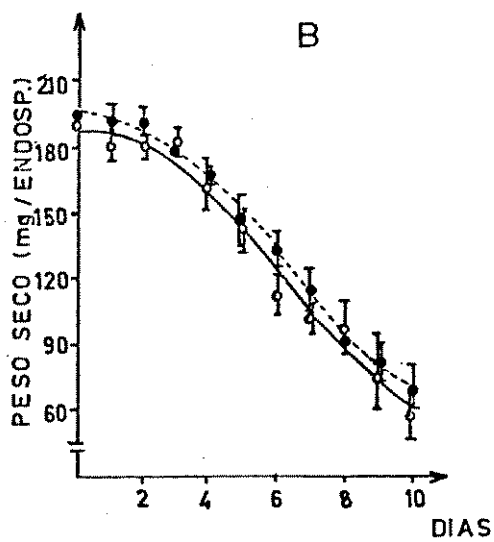
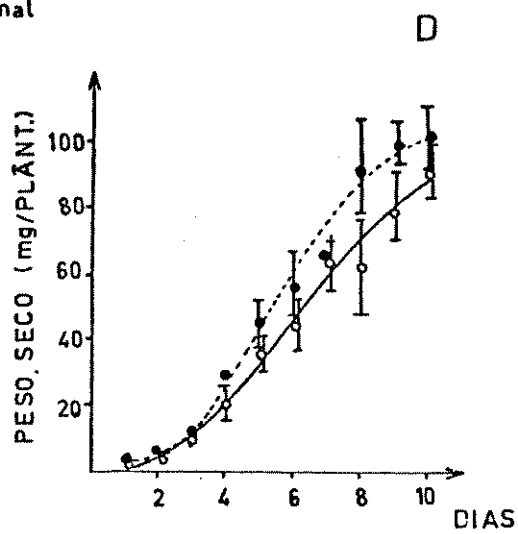
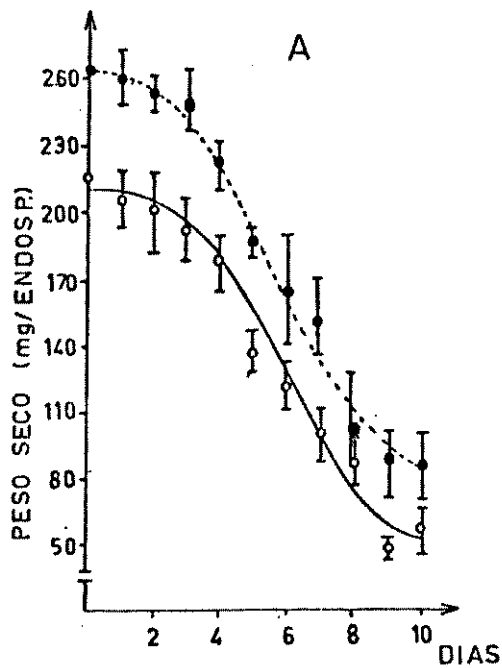
O crescimento inicial da plântula foi caracterizado por uma diminuição no peso seco do endosperma, acompanhado pelo aumento no peso da plântula, indicando que as reservas do endosperma foram degradadas e utilizadas para o desenvolvimento do embrião.

As curvas de utilização de matéria seca do endosperma pela plântula em desenvolvimento (Fig. 2) são bastante semelhantes nas linhagens envolvendo os genes *opaque-2* e *shrunk* e seus respectivos normais. Assim ao longo de 10 dias, a plântula do mutante *opaque-2* (Fig. 2A) usou 74% da matéria seca do endosperma e seu normal 68%, em taxas semelhantes, pois as curvas são indistinguíveis. Do mesmo modo, o mutante *shrunk* (Fig. 2B) usou 70% e seu normal 64%, também em

taxas iguais de transferência. O mutante *shrunk-2* (Fig. 2C) e seu normal, entretanto, embora tenham usado 60 e 73% das reservas dos endospermas, respectivamente, o fizeram em taxas diferentes, conforme coeficientes angulares diferentes, facilmente observados nas figuras 2C e 2F. Embora nas três linhas estudadas, o peso seco das plântulas no 10º dia tenha correspondido a aproximadamente 40% do peso seco inicial do endosperma, o mutante *shrunk-2* e seu correspondente normal são bastante distintos, com as reservas do endosperma normal sendo hidrolisadas mais rapidamente que as do mutante. O mutante *sh2* apresentou um peso seco de plântula (Fig. 2F) 50% inferior ao do correspondente normal e também bastante inferior aos outros mutantes estudados. STYER *et alii* (1980) sugeriram que a redução do peso seco de plântulas *sh2* seria devido à quantidades inadequadas de reservas que este endosperma oferece para o desenvolvimento da plântula. Isso parece indicar que o fator determinante para o desenvolvimento e consequente acúmulo de matéria seca na plântula, é o efeito desses genes no acúmulo de matéria seca no endosperma em desenvolvimento. Embora a transferência de material do endosperma *sh2*, no presente caso, tenha ocorrido em taxa bastante inferior aos demais endospermas em todos os tipos analisados, o peso seco das plântulas ficou sempre na faixa de 40% do peso seco inicial do endosperma. Essa resposta uniforme em mutantes tão

FIGURA 2 - Peso seco de endospermas (A, B e C) e plân-
tulas (D, E e F) das linhagens estudadas ,
durante a germinação.

- Para cada ponto, as barras indicam o inter-
valo de confiança a 95% de probabilidade.



diferentes, indica a existência de um outro sistema genético de ação mais ampla que o condicionando pelo mutantes estuda
dos.

A tabela 2 mostra o período em que 50% da maté
ria seca e nitrogênio do endosperma são utilizados pela plân-
tula durante a germinação. Este ponto foi escolhido arbitra -
riamente, e usado somente como referência para se poder compa
rar a taxa de utilização de nitrogênio com a de carboidratos,
já que estes últimos perfazem 80% do peso da matéria seca do
endosperma. Os resultados mostram que tanto para a utilização
do nitrogênio, como da matéria seca, os tipos normais das
tres linhagens são bastante semelhantes, utilizando 50% do ni
trogênio ao redor do 5º dia e 50% da matéria seca, ao redor
do 7º dia. Nos mutantes, o período de utilização de 50% do ni
trogênio variou de 4 a 9 dias, dependendo do genótipo estuda
do. Para o uso de 50% da matéria seca, houve uma variação de
6 a 8 dias. De um modo geral, também nos mutantes, as reser
vas nitrogenadas foram utilizadas mais rapidamente que as re
servas de carboidratos. Este fato foi observado por outros au
tores e parece ser comum em cereais (FOLKES *et alii*, 1952 ;
INGLE *et alii*, 1964; SUTCLIFFE e BASET, 1973; MONTEIRO, 1980).
Esse último autor observou, em milho, que a maior atividade
amilolítica ocorre ao redor do sexto dia de germinação, en
quanto que o pico da atividade proteolítica ocorre entre o 3º

Tabela 2 - Período (dias) de utilização de 50% do nitrogênio e matéria seca pelas diferentes linhagens durante a germinação.

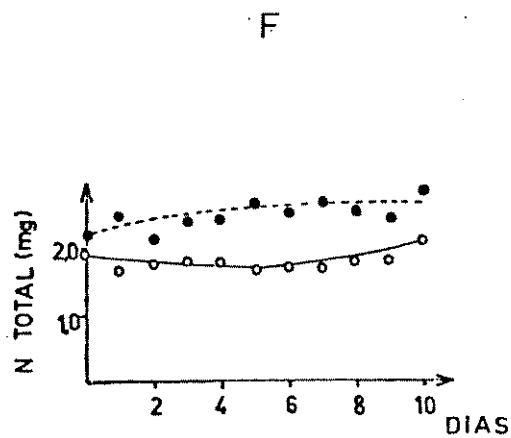
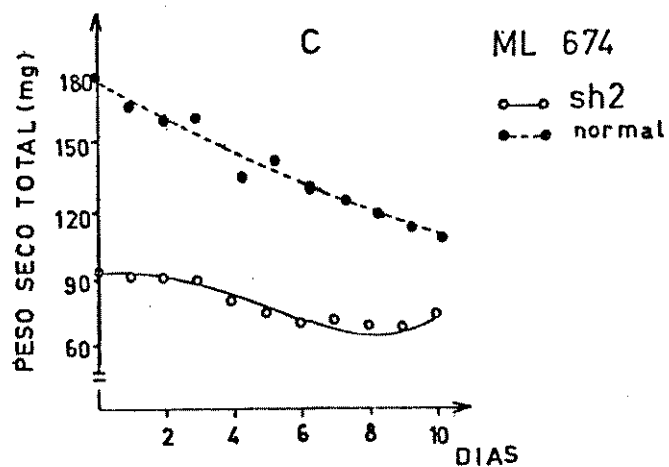
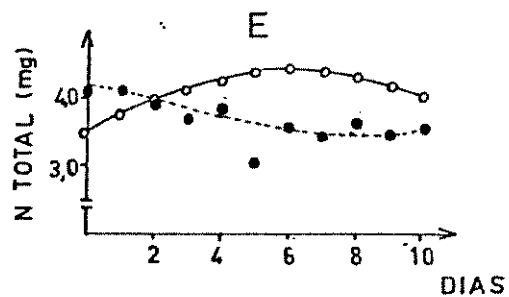
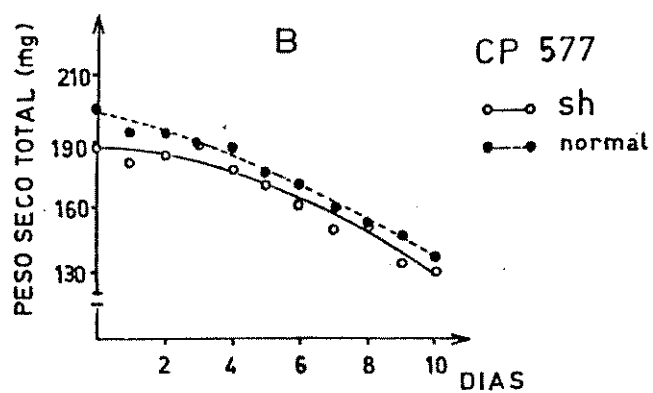
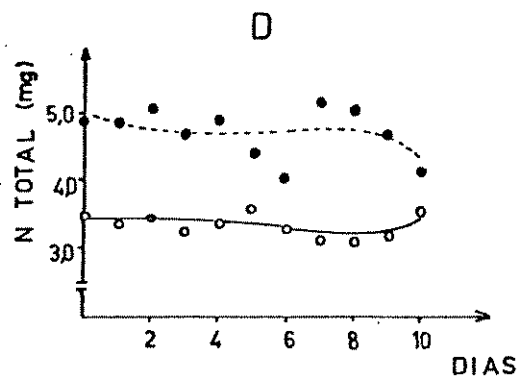
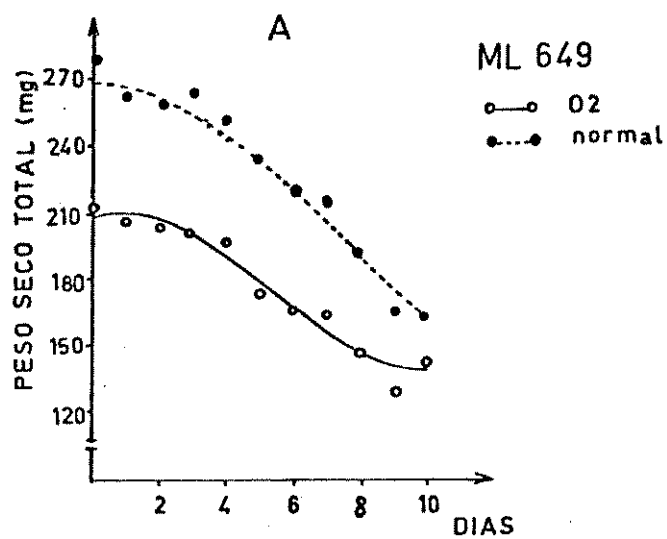
Linhagem	Endosperma	Nitrogênio	Matéria Seca
ML 649	<i>opaque-2</i>	6	6 - 7
	normal	5	7 - 8
ML 674	<i>shrunk-en-2</i>	4	5 - 6
	normal	5	6 - 7
CP 577	<i>shrunk-en</i>	8 - 9	8 - 9
	normal	5 - 6	7 - 8

e 4º dias de germinação. A ocorrência do pico da atividade proteolítica anterior ao da atividade amilolítica, explica perfeitamente a utilização mais rápida das reservas nitrogenadas pelo embrião em desenvolvimento observado no presente trabalho.

Com relação ao efeito do tipo de endosperma nessas duas características observa-se que, ao contrário dos normais, os tipos mutantes das linhagens estudadas apresentaram diferenças entre si, e também mostraram-se distintos dos normais correspondentes. Os genes *o2*, *sh* e *sh2*, portanto, interferem claramente na época de atuação destas enzimas durante a germinação.

A Figura 3 mostra os dados referentes ao peso seco total, isto é, endosperma + plântula (3A, B e C), e nitrogênio total (3D, E e F) durante a germinação. Os intervalos de confiança não foram aqui colocados em função dos pequenos desvios de regressão. Nota-se que a quantidade de nitrogênio total permanece praticamente constante em todos os tipos de endosperma. O peso seco total, entretanto sofre um decréscimo diário, em taxas iguais, tanto no normal, como no mutante. No 10º dia de germinação a linhagem ML 649 apresentou um decréscimo de 35% no peso seco total para o mutante *o2* e 31% para o tipo normal (Fig. 3A). Na linhagem CP 577 o mutante *sh* e seu normal (Fig. 3B) apresentaram um decréscimo de 28 e 33%

FIGURA 3 - Quantidades totais (plântula + endosperma), em mg, de peso seco (A, B, C) e nitrogênio (D, E, F) durante a germinação e início do desenvolvimento das linhagens estudadas.



respectivamente. Finalmente, na linhagem ML 674 o mutante *sh2* teve um decréscimo de 31% e seu normal 35% no peso seco to tal (Fig. 3C). Estes decréscimos relativamente uniformes, que oscilam ao redor de 30%, em endospermas distintos devem-se provavelmente às perdas de energia utilizadas, principalmente, na respiração, como sugeriram DURE (1960a), OAKS e BEEVERS (1964) e BEEVERS e GUERNSEY (1966).

O fato das taxas de perdas serem bastante semelhantes nos normais e mutantes, sugere indiretamente, que os genes estudados parecem não afetar a taxa de respiração, que provavelmente depende de outro sistema genético que controla a demanda de energia para o suprimento celular durante o crescimento da plântula.

4.3. - Alterações no conteúdo de nitrogênio no endosperma e na plântula durante a germinação.

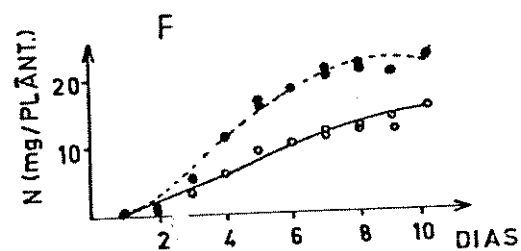
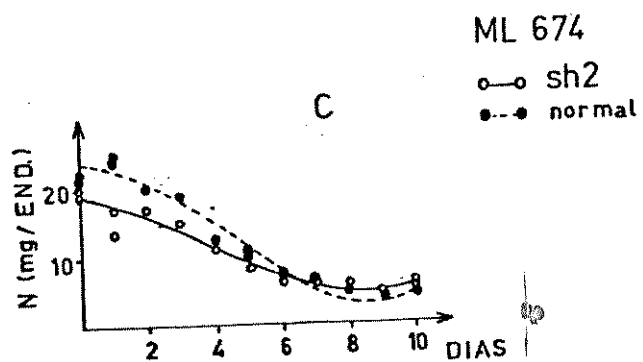
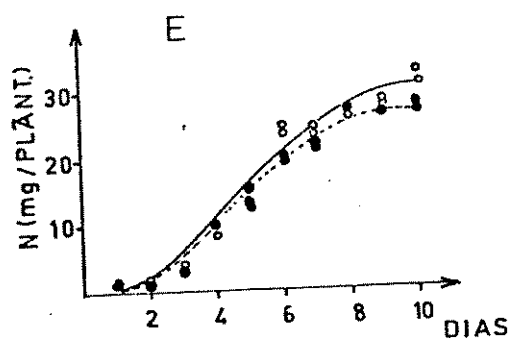
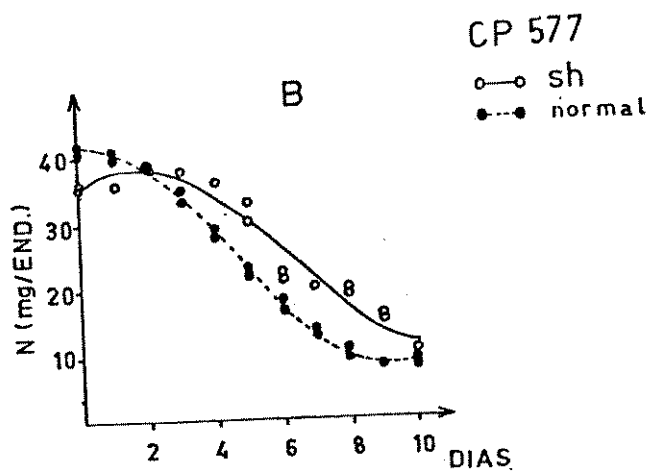
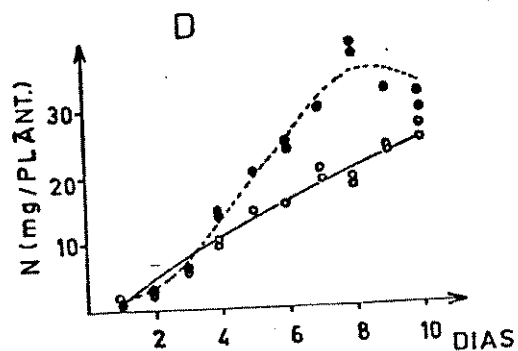
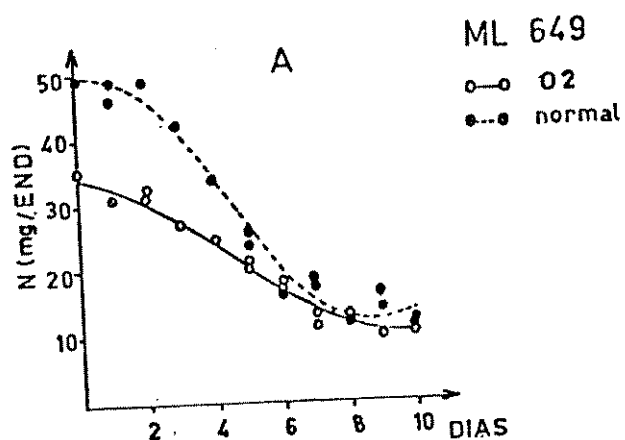
As alterações no conteúdo de matéria seca do endosperma e plântula devem-se não só à mudanças na quantidade de carboidratos, como também na de nitrogênio.

A maneira pela qual a plântula utiliza as reservas nitrogenadas está representada na Fig. 4. Em todas as li

nhagens estudadas observou-se um decréscimo diário na quantidade de nitrogênio do endosperma com um conseqüente aumento desse elemento na plântula. De um modo geral, entre as linhagens estudadas, as versões normais utilizaram as reservas de nitrogênio mais rapidamente que os mutantes. Nota-se também, que as diferenças entre as curvas dos normais e dos mutantes se restringem aos 6 primeiros dias de germinação. Assim, no 6º dia após a embebição, na linhagem ML 649 o mutante *opaque-2* e seu normal (Fig. 4A) utilizaram cerca de 44 e 63% do nitrogênio do endosperma, respectivamente. Para a linhagem ML 674, no mesmo período analisado, o mutante *shrunk-en-2* utilizou 63% do nitrogênio do endosperma, enquanto seu normal 72% (Fig. 4C). Por outro lado, na linhagem CP 577, não foram detectadas diferenças entre o mutante e o normal, no 6º dia, embora suas curvas tenham sido bastante distintas nos 6 primeiros dias de germinação, com o mutante *shrunk-en* utilizando o nitrogênio em uma taxa bem mais lenta do que o normal.

MONTEIRO (1980) mostrou que no mutante *opaque-2* as atividades amilolítica e proteolítica são menores que nos tipos normais. Se esse mesmo tipo de efeito ocorresse também nos mutantes *shrunk-en* e *shrunk-en-2*, poder-se-ia explicar as maiores taxas de utilização de nitrogênio nos endospermas normais, em relação aos mutantes, basendo-se na maior atividade enzimática encontrada no endosperma comum.

FIGURA 4 - Conteúdo de nitrogênio (mg) em endospermas
(A, B, C) e plântulas (D, E, F) durante a
germinação das linhagens estudadas.



Já demonstramos que a utilização de nitrogênio no endosperma, durante a germinação, precede a utilização de carboidratos. Isso implica que a relação nitrogênio/ carbono (N/C), ou mais indiretamente, entre nitrogênio/matéria seca (N/MS) deve mudar durante a germinação. Como mostra a tabela 3, a porcentagem de nitrogênio tanto nos normais como nos mutantes decresce, de um modo geral, até o 6º ou 7º dia e então sobe novamente. Observa-se de maneira geral, que após o 4º dia, os mutantes apresentam-se com maior porcentagem de nitrogênio no endosperma que os normais, possivelmente em função da utilização mais lenta do nitrogênio da semente, como foi visto anteriormente. Entretanto, parece não ocorrer diferenças genéticas entre os mutantes estudados.

O comportamento da porcentagem de nitrogênio, tanto nas sementes normais como nas mutantes, ao longo da germinação, difere bastante do que ocorre durante o desenvolvimento da semente, onde a relação N/C permanece praticamente inalterada durante o desenvolvimento do endosperma (ARRUDA e SILVA, 1982). Desse modo esses genes parecem não afetar a relação N/C do endosperma, tanto no desenvolvimento desse tecido como na germinação.

A porcentagem de nitrogênio nas plântulas (Tab.4) tem um comportamento bastante diferente da do endosperma, começando com níveis bastante elevados no início da germinação

Tabela 3 - Porcentagem de nitrogênio no endosperma das diferentes linhagens, durante a germinação.

DIAS GERMINAÇÃO	ML 649		ML 674		ML 577	
	<i>opaque-2</i>	normal	<i>shrunk-2</i>	normal	<i>shrunk</i>	normal
0	1,76 ± 0,01	1,84 ± 0,01	2,17 ± 0,10	1,37 ± 0,06	2,05 ± 0,10	2,11 ± 0,05
1	1,53 ± 0,01	1,82 ± 0,07	1,71 ± 0,30	1,51 ± 0,04	2,05 ± 0,11	2,11 ± 0,05
2	1,50 ± 0,05	1,95 ± 0,04	1,90 ± 0,04	1,37 ± 0,05	2,25 ± 0,11	2,01 ± 0,00
3	1,39 ± 0,01	1,66 ± 0,00	1,77 ± 0,05	1,27 ± 0,01	2,07 ± 0,00	1,87 ± 0,11
4	1,39 ± 0,01	1,51 ± 0,00	1,56 ± 0,00	0,98 ± 0,00	2,23 ± 0,00	1,70 ± 0,04
5	1,50 ± 0,04	1,32 ± 0,08	1,56 ± 0,01	0,98 ± 0,10	2,18 ± 0,16	1,56 ± 0,05
6	1,41 ± 0,09	1,01 ± 0,04	1,43 ± 0,09	0,77 ± 0,00	1,88 ± 0,88	1,35 ± 0,05
7	1,21 ± 0,15	1,15 ± 0,08	1,40 ± 0,04	0,80 ± 0,05	1,97 ± 0,05	1,15 ± 0,06
8	1,50 ± 0,05	1,27 ± 0,00	1,59 ± 0,04	0,80 ± 0,05	2,00 ± 0,08	1,15 ± 0,06
9	2,80 ± 0,07	1,70 ± 0,20	1,73 ± 0,09	0,94 ± 0,05	2,02 ± 0,11	0,99 ± 0,06
10	2,50 ± 0,14	1,34 ± 0,08	1,72 ± 0,22	0,95 ± 0,05	1,82 ± 0,00	1,26 ± 0,15

TABELA 4 - Porcentagem de nitrogênio na plântula das diferentes linhagens, durante a germinação.

DIAS DE GERMINAÇÃO	ML 649		ML 674		CP 577	
	<i>opaque-2</i>	<i>normal</i>	<i>shrunken-2</i>	<i>normal</i>	<i>shrunken</i>	<i>normal</i>
1	5,83 *	4,55 *	5,51 *	5,01 *	5,91 *	4,83 *
2	5,01 *	4,79 *	5,00 *	4,28 *	5,30 *	4,43 *
3	5,68 ± 0,40	4,76 ± 0,03	4,99 ± 0,23	5,27 ± 0,26	5,51 ± 0,13	4,38 *
4	4,51 ± 0,27	4,87 ± 0,35	5,27 ± 0,06	5,17 ± 0,18	4,86 ± 0,08	4,59 ± 0,30
5	4,04 ± 0,10	4,27 ± 0,08	4,01 ± 0,01	4,73 ± 0,19	5,00 ± 0,01	4,47 ± 0,50
6	3,41 ± 0,04	4,29 ± 0,12	4,07 ± 0,06	4,07 ± 0,01	4,95 ± 0,14	4,80 ± 0,19
7	2,83 ± 0,23	4,47 ± 0,04	4,20 ± 0,20	3,98 ± 0,06	4,82 ± 0,11	4,67 ± 0,28
8	2,88 ± 0,13	4,11 ± 0,13	3,82 ± 0,13	3,44 ± 0,04	4,61 ± 0,08	4,56 ± 0,05
9	2,91 ± 0,08	4,03 ± 0,01	4,13 ± 0,09	3,38 ± 0,10	4,47 ± 0,28	4,00 ± 0,00
10	3,72 ± 0,18	3,43 ± 0,24	4,09 ± 0,00	3,46 ± 0,01	4,11 ± 0,17	3,83 ± 0,14

* Apenas uma repetição.

e reduzindo a níveis praticamente iguais nos diferentes endospermas, com exceção do *opaque-2* que parece ter uma porcentagem maior. Essa tendência pode ser explicada em consequência da alta porcentagem de proteínas encontradas inicialmente no embrião, antes da germinação (SODEK, 1973; TOSELLO, 1978), e também devido ao fornecimento de nitrogênio à plântula pela ação precoce das proteases. Com isso ocorre uma maior entrada de nitrogênio, em relação a carboidratos, nos primeiros estágios da plântula. Com o desenvolvimento, além da hidrólise das proteínas armazenadas no embrião inicia-se o transporte de carboidratos à plântula pela ação das amilases. Portanto esses mecanismos explicam a alta porcentagem de nitrogênio no início da germinação com uma queda gradativa até o 10º dia.

4.4. - Variação nas quantidades de aminoácidos durante a germinação.

Na semente, os aminoácidos podem ser encontrados formando as proteínas estruturais e de reserva, ou ainda como aminoácidos livres. Em plantas anuais, o desenvolvimento das sementes é acompanhado pela senescência das folhas, sendo que as proteínas das folhas são hidrolisadas e os produtos trans

locados para a semente (BEEVERS, 1976). A composição de aminoácidos da semente difere bastante do "pool" de aminoácidos da folha. Assim, no endosperma, mecanismos de síntese e catabolismo de alguns aminoácidos devem ser ativados para que se atinja a quantidade adequada para o desenvolvimento da semente (BEEVERS, 1976).

No milho, os aminoácidos translocados em maiores quantidades para o endosperma, no período de enchimento do grão, são a glutamina, que representa 20 a 30% do "pool" de aminoácidos, e a asparagina com 9 a 12% do total (ARRUDA e SILVA, 1982). Em várias espécies de plantas essas amidas atuam como transportadoras de nitrogênio da planta para o endosperma (SODEK e WILSON, 1971; ATKINS *et alii*, 1975; PATE *et alii*, 1975; LORENS, 1976; MIFLIN e LEA, 1977; SODEK e SILVA, 1977; ARRUDA e SILVA, 1982). Os aminoácidos translocados para a semente podem ser mantidos intactos ou transformados em outros aminoácidos antes de sua incorporação nas proteínas, conforme a ação de vários genes. Estas proteínas são em seguida, hidrolisadas no processo de germinação, e os aminoácidos liberados para o desenvolvimento da plântula. Como a composição de aminoácidos muda bastante sob a ação dos genes que atuam no endosperma, tem-se grande interesse em saber como estes aminoácidos serão utilizados na germinação, nos diferentes mutantes de milho.

A análise comparativa entre aminoácidos de sementes ou plântulas normais e mutantes será sempre feita com base em dados representados sob a forma de micromol ($\mu\text{mol } \%$). Isto porque, tanto endospermas como plântulas normais e mutantes, apresentam quantidades diferentes de matéria seca, fator esse que poderia mascarar o efeito dos genes em estudo. Como durante a hidrólise ácida, a asparagina e a glutamina são convertidas em ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente (SODEK e WILSON, 1971), estes aminoácidos serão representados pelas abreviaturas *ASX* (ácido aspártico + asparagina) e *GLX* (ácido glutâmico + glutamina).

A análise dos vários endospermas, antes da embebição, revelou que a quantidade de alguns aminoácidos é bastante diferente, quando se compara sementes normais e mutantes de uma mesma linhagem, ou mesmo entre mutantes de linhagens diferentes (Tab. 5).

Assim, na linhagem CP 577 a principal diferença condicionada pelo gene *shrunk* é um aumento de 45% na quantidade de *LYS* em relação ao tipo normal. Na linhagem ML 674, o gene *shrunk-2* reduz 27% do conteúdo de *LEU* em relação ao endosperma normal, e aumenta as quantidades de *LYS* e *GLY* em 100 e 57%, respectivamente. Na linhagem ML 649, o mutante *opaque-2* aumenta o conteúdo de *GLY* em 100% e em 87% o de *LYS*, ao mesmo tempo reduz em 38 e 28% as quantidades de *LEU* e *GLX*.

TABELA 5 - Aminoácidos ($\mu\text{mol } \%$) no endosperma das linhagens, antes da germinação.

AA	ML 674		ML 649		ML 577	
	normal	sh2	normal	o2	normal	sh
ALA	15,09	14,02	11,96	10,27	12,02	11,22
GLY	6,06	9,54	4,53	10,04	5,26	5,99
VAL	5,22	6,47	5,63	6,48	5,83	5,09
TRE	3,73	4,77	4,16	4,67	4,09	4,09
SER	7,24	7,60	6,55	6,88	6,72	7,60
LEU	17,19	12,55	15,29	9,41	16,57	15,02
ILE	3,34	3,46	3,72	3,62	3,81	3,61
PRO	9,34	8,66	11,60	9,90	10,33	9,76
ASX	3,03	2,96	5,66	6,41	5,85	6,13
PHE	3,76	3,42	4,31	3,51	3,80	3,87
GLY	17,69	15,74	17,77	12,76	16,69	18,91
LYS	1,23	2,52	2,15	4,02	1,69	2,45
TYR	2,38	2,81	3,19	2,77	2,91	2,83

respectivamente, em relação ao endosperma normal.

Estudando, por outro lado, a composição de aminoácidos de endospermas normais antes da germinação (Tab. 5), verifica-se que nas tres linhagens estudadas, a composição de aminoácidos é bastante semelhante, indicando que a quantidade relativa dos vários aminoácidos tem um controle genético bem característico.

A composição de aminoácidos de plântulas provenientes dos diferentes endospermas revelou que, na linhagem ML 649 (Tab. 6), portadora do gene *opaque-2*, os tipos normais apresentam maiores quantidades de *ASX*, *PHE* e *TYR* que os mutantes, enquanto que esses apresentam quantidades de *LYS* e *GLX* superiores aos tipos normais. Desse modo, o gene *opaque-2* parece não somente modificar a composição de aminoácidos do endosperma, mas também da plântula, porém de maneiras distintas daquele que opera no endosperma.

Em plântulas provenientes do endosperma *shrunk-2* a quantidade de *ASX* e *LYS* foram superiores às observadas em plântulas normais (Tab. 7), onde o nível de *ALA* foi superior aos mutantes. Assim, à semelhança do *opaque-2*, o gene *shrunk-2* estaria alterando a composição de aminoácidos do endosperma e da plântula, porém de modos distintos.

Na linhagem CP 577, não foram detectadas diferenças significativas entre plântulas provenientes de endos

TABELA 6 - Aminoácidos (umol %) em plântulas de 3 a 9 dias, da linhagem ML 649.

AA	normal					opaque-2				
	3	5	7	9		3	5	7	9	
ALA	12,29	10,77	10,95	10,90		10,16	10,10	10,44	11,29	
GLY	10,03	9,26	10,44	9,30		9,07	8,03	8,66	9,74	
VAL	7,82	7,75	7,97	7,22		6,58	6,91	7,60	7,68	
TRE	5,44	5,47	5,69	5,88		4,59	4,50	6,05	5,91	
SER	7,42	6,66	8,27	8,46		6,42	7,16	8,25	8,73	
LEU	7,91	7,55	8,06	7,81		6,62	8,43	8,52	8,27	
ILE	3,94	4,18	4,35	4,19		3,66	3,19	4,51	4,78	
PRO	7,03	5,85	4,66	4,06		7,42	4,66	4,49	4,68	
ASX	12,41	19,16	14,89	18,56		14,57	16,01	16,89	13,59	
PHE	8,30	9,35	8,96	7,66		3,43	3,20	3,44	3,40	
GLX	6,25	5,27	5,08	4,59		13,46	11,15	8,58	7,68	
LYS	3,07	1,84	2,84	2,58		5,67	4,68	4,52	4,99	
TYR	4,30	3,36	4,51	5,72		2,19	2,21	2,22	2,80	

TABELA 7 - Aminoácidos ($\mu\text{mol } \%$) em plântulas de 3 a 9 dias, da linhagem ML 674.

AA	normal				shrunken-2			
	3	5	7	9	3	5	7	9
ALA	13,52	11,59	12,69	14,96	10,00	8,04	9,61	10,13
GLY	8,18	8,39	9,68	11,89	8,77	7,83	9,10	9,02
VAL	7,11	7,96	7,48	7,61	6,01	6,03	5,81	6,12
TRE	5,06	4,33	5,69	5,66	5,67	5,63	5,68	6,45
SER	6,48	6,72	7,51	8,69	7,13	6,66	7,05	8,21
LEU	9,51	10,11	9,76	9,99	7,56	8,04	7,63	7,34
ILE	3,58	4,46	3,64	4,34	2,56	2,55	2,57	2,94
PRO	3,74	4,24	3,17	3,22	4,09	4,04	3,32	3,10
ASX	9,81	20,17	18,29	13,50	16,85	24,10	24,92	22,50
PHE	2,88	3,07	3,11	3,20	3,62	3,86	3,41	3,41
GLX	18,15	10,24	8,34	8,33	15,87	11,86	9,27	8,86
LYS	3,74	4,04	3,82	3,45	6,37	6,48	5,67	5,27
TYR	2,40	2,26	2,89	2,58	3,69	3,68	3,13	3,45

permas normais e mutantes (Tab. 8), mostrando assim que o gene *shrunk*en, praticamente não altera a composição de aminoácidos, tanto de endosperma como de plântula.

Comparando-se a composição de aminoácidos de endospermas (Tab. 5) com a de plântulas (Tabs. 6, 7 e 8) das diferentes linhagens, fica claro que, independente do genótipo do endosperma, os aminoácidos mais importantes nas sementes são *GLX*, *ALA*, *LEU*, *PRO* e *SER*, enquanto que nas plântulas os mais relevantes são *ASX*, *ALA*, *GLY*, *SER* e *LEU*. Logo os que aparentemente necessitam de menor interconversão são *ALA*, *LEU* e *SER*. Os outros aminoácidos do endosperma, *GLX* e *PRO*, devem portanto, ser interconvertidos em outros de maior importância para a plântula, como o *ASX* e *GLY*.

Estes resultados mostram ainda que independente do genótipo do endosperma, o *GLX* é o aminoácido- diagnóstico para as sementes, enquanto que *ASX* é o aminoácido-diagnóstico para a plântula de milho. Isto significa que tanto sementes como plântulas deste cereal podem facilmente ser diferencia- das por estes dois aminoácidos.

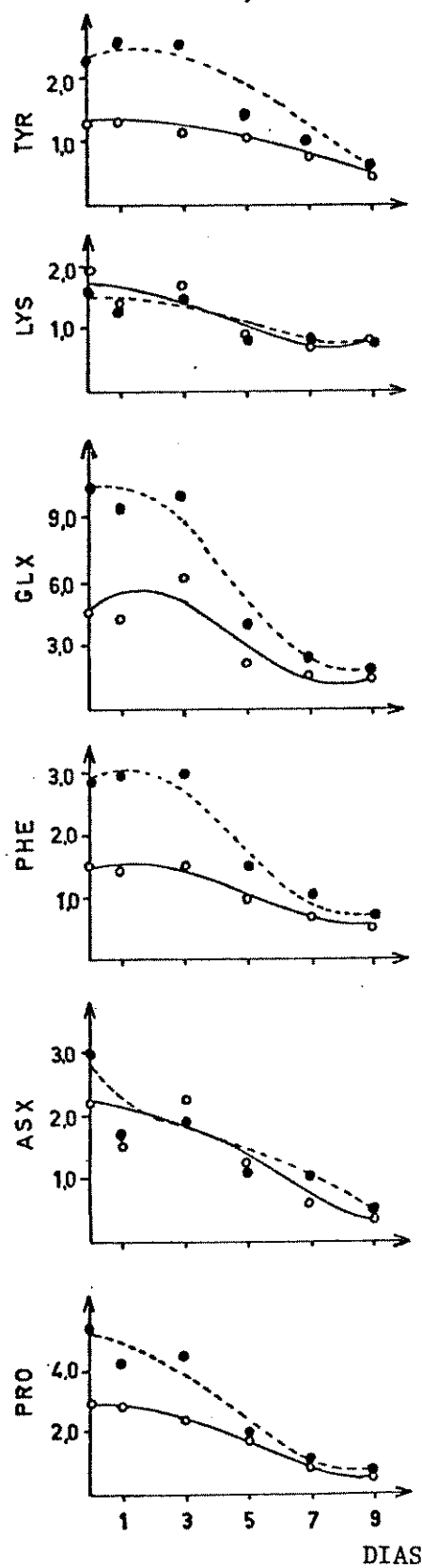
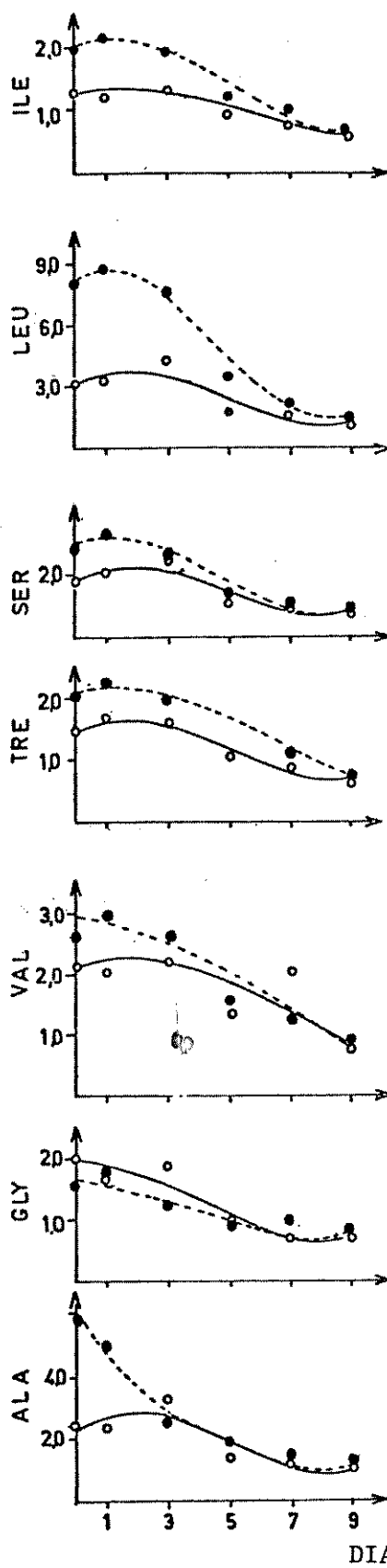
As figuras 5, 6 e 7 mostram as quantidades de aminoácidos nos endospermas durante a germinação. Nota-se que todos os aminoácidos são utilizados para o crescimento da plântula, porém em quantidades diferentes. Os aminoácidos presentes em maiores quantidades no endosperma, antes da germi-

TABELA 8 - Aminoácidos ($\mu\text{mol } \%$) em plântulas de 3 a 9 dias, da linhagem CP 577.

AA	normal				shrunken			
	3	5	7	9	3	5	7	9
ALA	11,43	9,15	8,71	8,69	9,27	9,21	8,66	8,88
GLY	9,15	8,04	8,64	8,31	8,87	7,21	8,09	7,67
VAL	6,81	6,03	5,63	5,59	5,70	5,83	5,17	5,12
TRE	4,93	4,64	4,55	4,37	5,55	4,76	3,87	4,02
SER	6,75	7,06	7,59	7,61	6,67	7,69	6,53	7,59
LEU	8,65	6,75	7,23	7,27	7,61	6,80	6,73	6,40
ILE	3,72	3,22	3,29	3,39	3,62	3,26	3,19	3,02
PRO	4,81	4,07	3,76	3,55	5,69	4,31	4,44	3,32
ASX	14,78	29,27	31,07	31,47	11,55	26,43	29,19	30,35
PHE	3,20	2,52	2,41	2,50	3,37	2,76	2,67	2,65
GLY	13,01	8,56	7,38	6,88	16,66	11,16	9,16	8,73
LYS	4,65	3,95	3,69	4,27	7,71	4,44	4,77	5,23
TYR	2,36	1,83	1,82	1,87	2,46	2,21	2,29	2,03

FIGURA 5 - Alterações no conteúdo de cada aminoácido (mg)
no endosperma da linhagem ML 649 normal (●--●) e
opaque-2 (○--○) durante a germinação.

AMINOÁCIDOS (mg/endosperma)



nação, são os mais utilizados em quantidades absolutas durante a germinação, porém o aproveitamento desses aminoácidos parece variar nas linhagens estudadas. Assim, comparando-se a quantidade final de cada aminoácido (9º dia de germinação) com a quantidade inicial, tem-se uma idéia de como estes aminoácidos estão sendo utilizados pela plântula.

Na linhagem ML 649 (Fig. 5) observa-se que os aminoácidos que ocorrem em maior abundância no endosperma antes da germinação são *LEU*, *ALA*, *PRO* e *PHE*.

Nota-se que no normal as quantidades iniciais destes aminoácidos são bem maiores que no *opaque-2*, e no final da germinação, são reduzidos à quantidades iguais. Isto indica que a interconversão de aminoácidos em sementes normais é maior que nos mutantes.

De modo semelhante, na linhagem ML 674 (Fig. 6), os aminoácidos mais abundantes no endosperma antes da germinação são *GLX*, *LEU*, *ALA* e *PRO* que no início (dia zero) também apresentam-se em maiores quantidades nos endospermas normais do que nos mutantes e são reduzidos a quantidades semelhantes no final da germinação indicando, também nessas linhagens, que a interconversão de aminoácidos em sementes normais é maior que no mutante.

Por outro lado, na linhagem CP 577 (Fig. 7), as

FIGURA 6 - Alterações no conteúdo de cada aminoácido (mg)
no endosperma da linhagem ML 674 normal (●--●)
e *shrunk-en-2* (○--○) durante a germinação.

AMINOÁCIDOS (mg/endosperma)

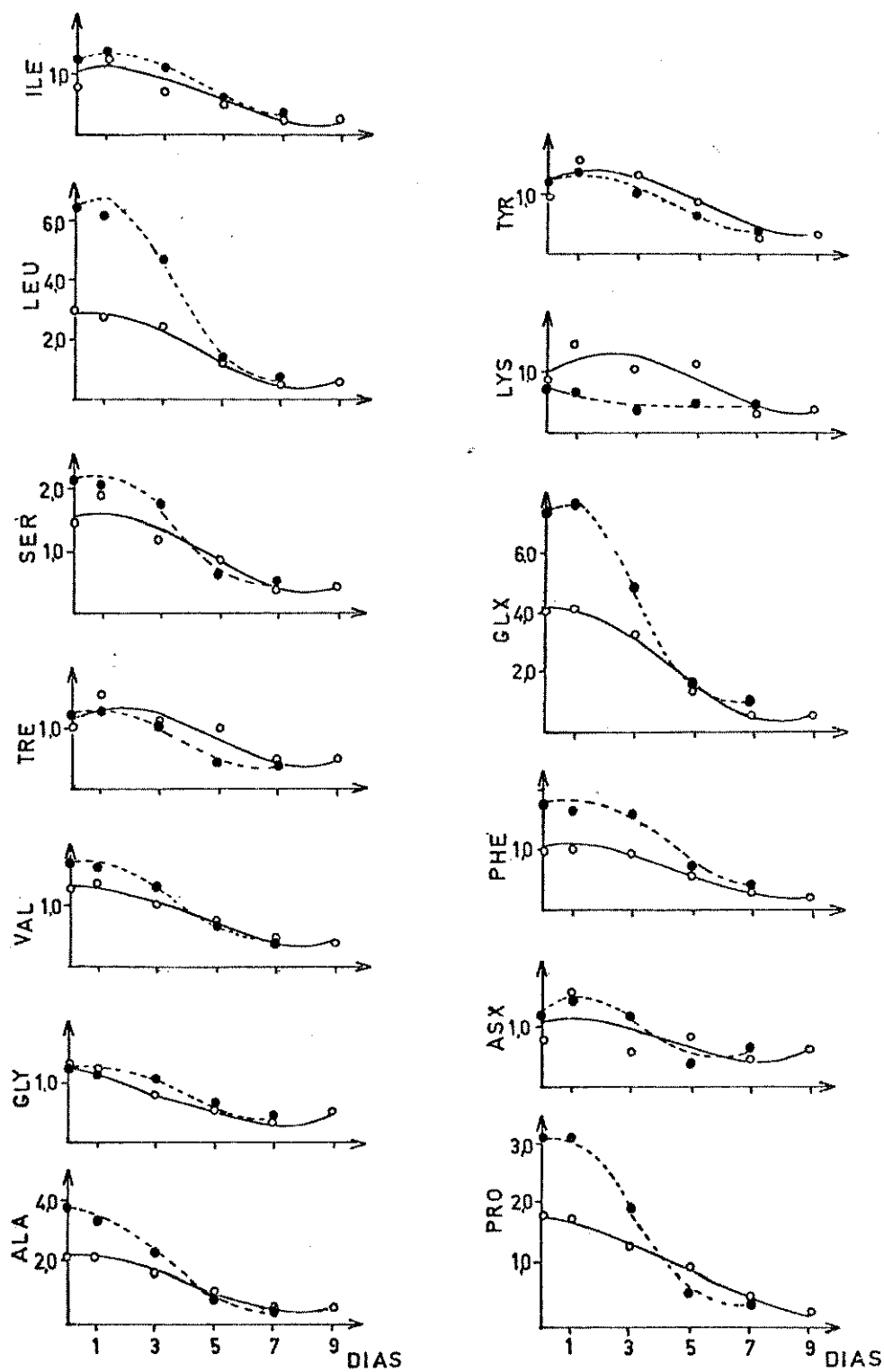
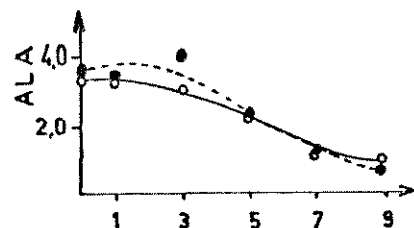
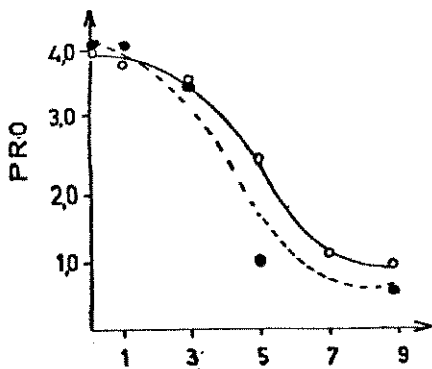
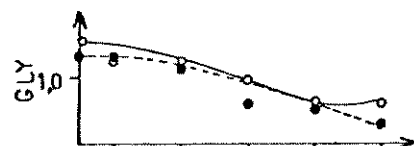
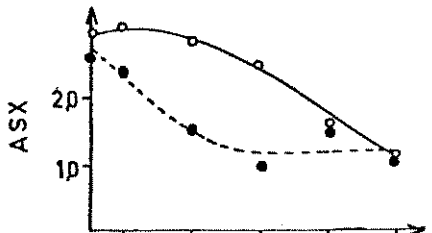
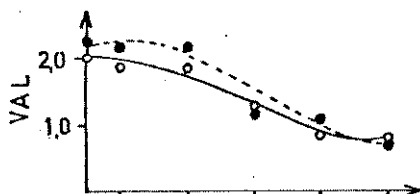
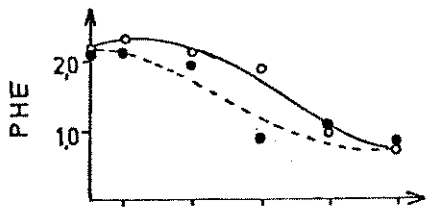
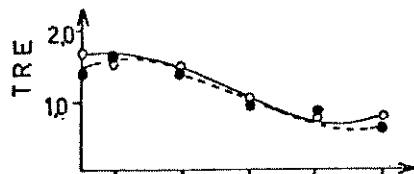
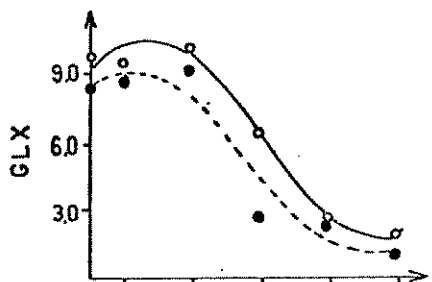
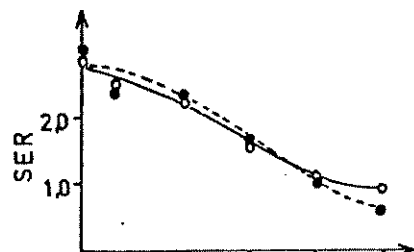
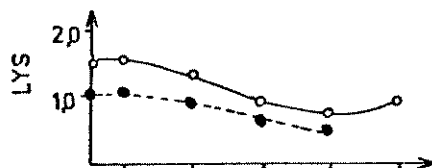
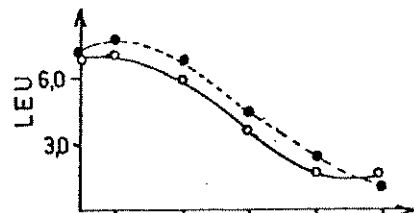
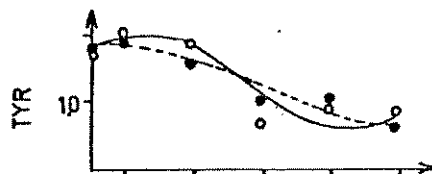
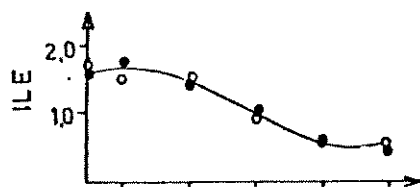


FIGURA 7 - Alterações no conteúdo de cada aminoácido (mg)
no endosperma da linhagem CP 577 normal (●--●)
e *shrunk* (○--○) durante a germinação.

AMINOÁCIDOS (mg/endosperma)



DIAS

DIAS

quantidades de aminoácidos no início da germinação são bastante semelhantes entre endospermas normais e *shrunk*. No final da germinação, estes aminoácidos são reduzidos a quantidades também semelhantes nos endosperma normal e mutante, indicando que nesta linhagem não existem diferenças quanto à taxa de metabolismo de aminoácidos nos dois genótipos.

Estes resultados mostram claramente que os aminoácidos que ocorrem em maior abundância no endosperma, de uma maneira geral, são os mesmos que ocorrem tanto em endospermas normais como nos mutantes, são também os mais utilizados pela plântula. As figuras 5, 6 e 7 mostram ainda que, independente do genótipo e da quantidade de aminoácidos do endosperma, todos os aminoácidos são utilizados pela plântula. Assim, o processo fisiológico que controla a utilização de aminoácidos do endosperma, pela plântula, não deve depender apenas do controle dos genes que atuam na formação da semente, mas sim a um controle mais amplo, possivelmente poligênico.

As figuras 8, 9 e 10 apresentam as quantidades totais de cada aminoácido (mg/endosperma + mg/plântula) durante os nove primeiros dias de germinação. Observa-se que a quantidade total de um aminoácido permanece constante ou sofre um decréscimo, o que indica a presença de catabolismo. Além disso, como caso único, o *ASX* apresenta um aumento bastante significativo, em todas as linhagens estudadas, indicando a sín

FIGURA 8 - Quantidade total (endosperma + plântula) de cada aminoácido (em mg) na linhagem ML 649 normal (●--●) e *opaque-2* (○--○), durante a germinação.

AMINOÁCIDOS (mg total)

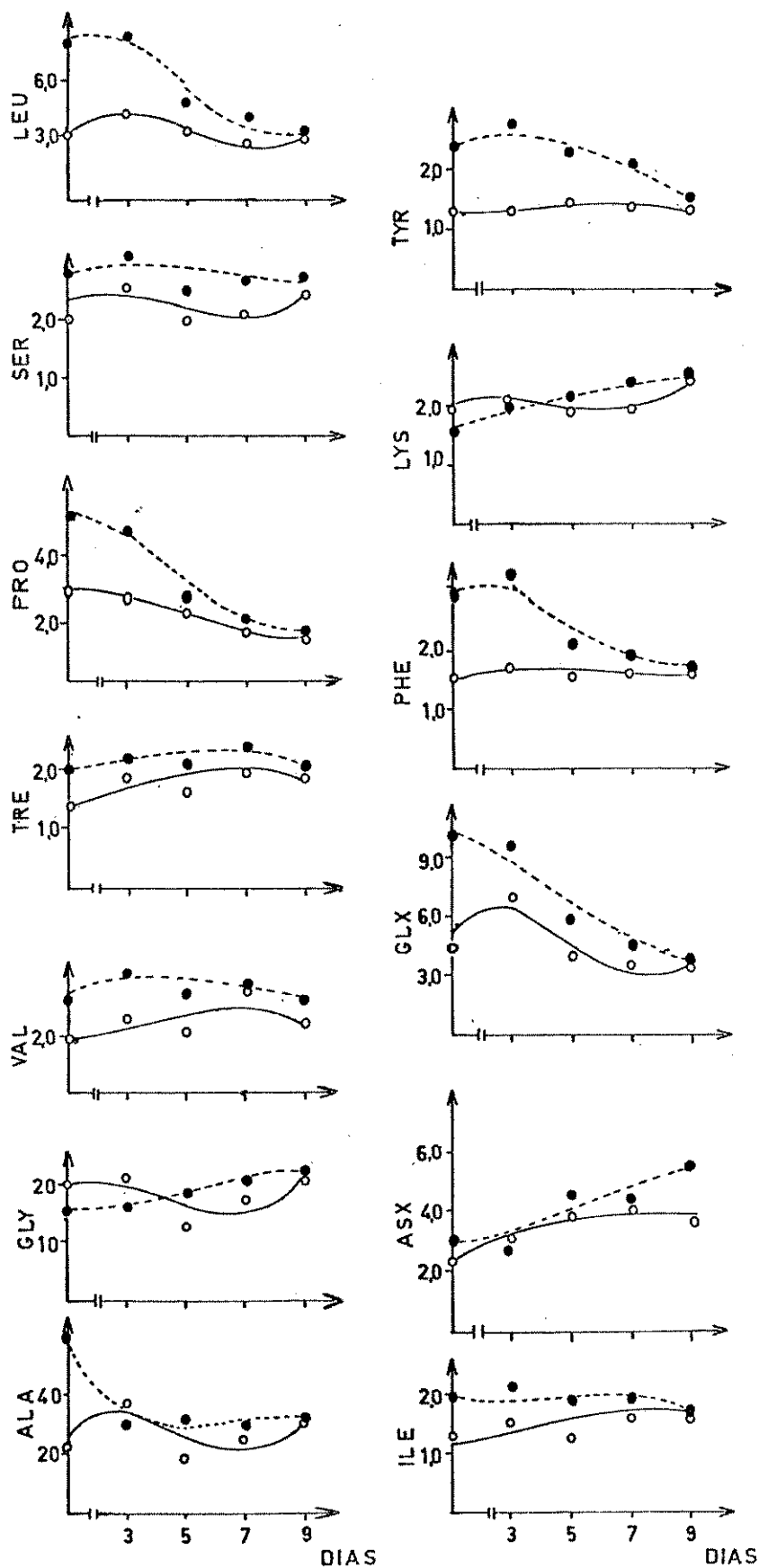


FIGURA 9 - Quantidade total (endosperma + plântula) de cada aminoácido (em mg) na linhagem ML 674 normal (●--●) e *shrunk-en-2* durante a germinação.

AMINOÁCIDOS (mg total)

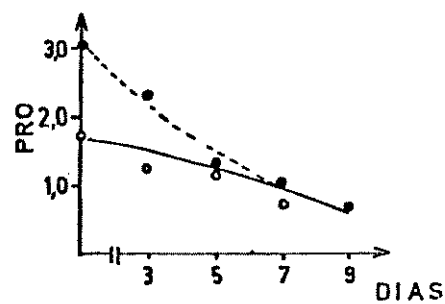
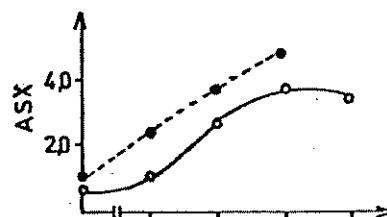
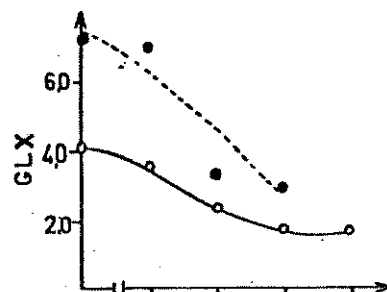
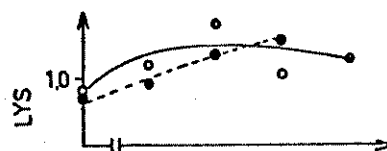
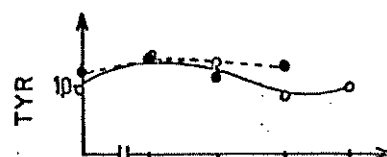
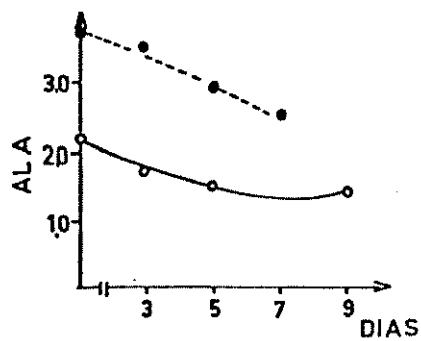
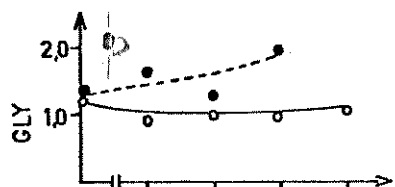
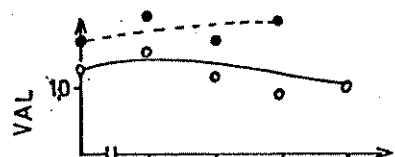
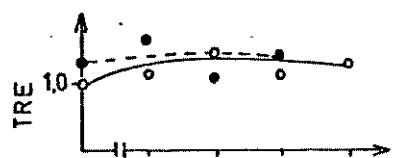
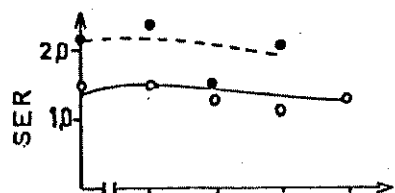
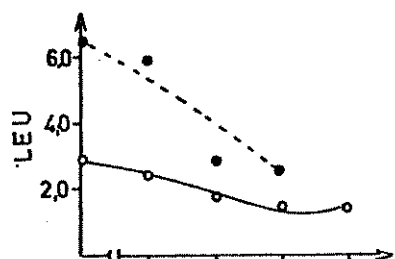
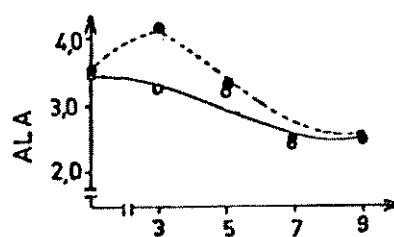
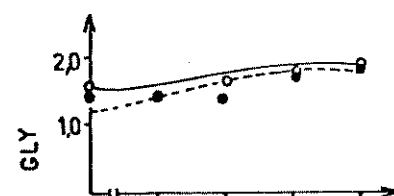
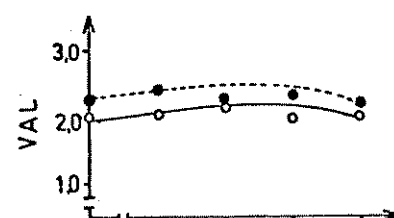
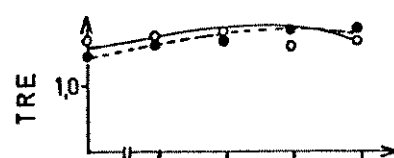
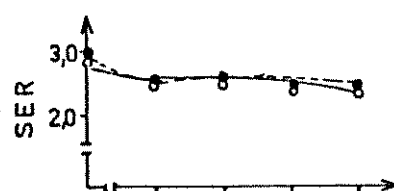
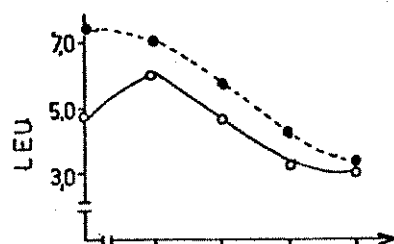
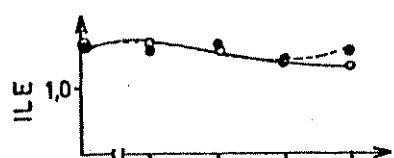
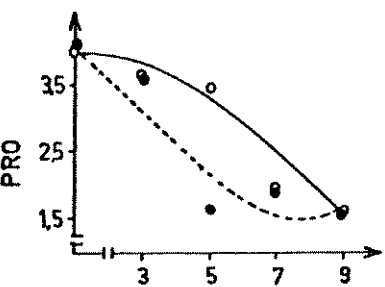
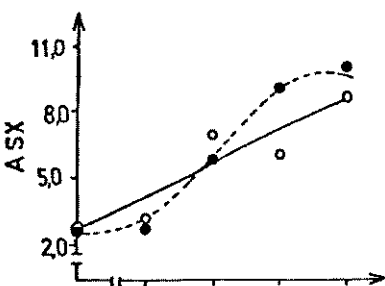
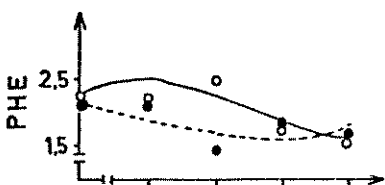
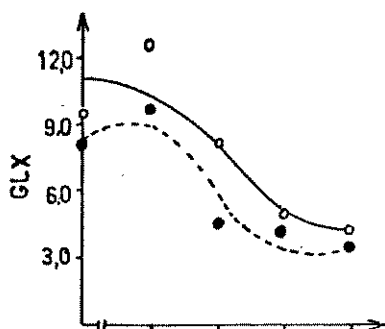
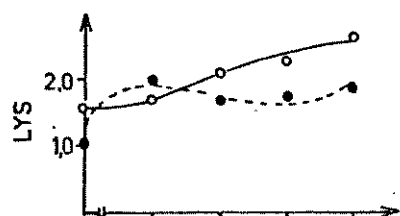


FIGURA 10 - Quantidade total (endosperma + plântula) de cada aminoácido (em mg) na linhagem CP 577 normal (●--●) e *shrunk* (○--○) durante a germinação.

AMINOÁCIDOS (mg total)



DIAS



DIAS

tese deste aminoácido no período de desenvolvimento da plântula. Numa análise individual, observa-se que o mutante *opaque-2* (Fig. 8) é responsável por uma redução de 57% na quantidade de *PRO*, e um aumento de 64% na quantidade de *ASX*, enquanto que todos os outros aminoácidos permanecem em níveis praticamente constantes. Nos tipos normais, já ocorrem maiores mudanças, havendo uma redução de 45% na quantidade de *ALA*, 57% de *LEU*, 71 de *PRO* e 62% de *GLX*, que, como já foi mostrado anteriormente, são os aminoácidos mais abundantes no endosperma. Por outro lado, o *ASX* é o único sintetizado em grande escala, apresentando um aumento de 83%.

O endosperma *opaque-2* apresenta níveis de *LEU*, *GLX*, *PRO* e *ALA* inferiores ao tipo normal. Isto porque o gene *opaque-2* condiciona uma severa redução na quantidade de zeína, que é bastante rica nestes aminoácidos (MERTZ *et alii*, 1964; JIMENES, 1966; MOSSÉ *et alii*, 1966, MURPHY e DALBY, 1971; DALBY e TSAI, 1975; LEE *et alii*, 1976), e um aumento nas frações de aminoácidos livres e glutelinas. Como já foi visto, as taxas de catabolismo desses aminoácidos durante a germinação do *opaque-2* também são menores do que as encontradas no endosperma normal correspondente. Essas informações indicam que no endosperma *opaque-2* ocorre um menor número de interconversões de aminoácidos do que no endosperma normal, o que também foi evidenciado indiretamente por MONTEIRO (1980) que encontrou u

ma reduzida atividade de transaminase neste mutante. Assim, o balanço de aminoácidos do endosperma *opaque-2* é bastante semelhante ao requerido pela plântula em desenvolvimento.

Na linhagem ML 674 (Fig. 9), o catabolismo de aminoácidos, quando analisado em termos percentuais, foi semelhante em endospermas normais e *shrunk-2*. Assim, os aminoácidos mais abundantemente catabolizados no endosperma normal foram ALA (36%), LEU (59%), PRO (68%) e GLX (58%), enquanto que no mutante as taxas de catabolismo foram de 33, 48, 67 e 55% respectivamente. Do mesmo modo que na linhagem ML 649, o único aminoácido sintetizado é o ASX, com um aumento de 300 % no normal e 400% no mutante. Esta linhagem também apresenta claras reduções nos níveis totais dos aminoácidos que ocorrem em maior quantidade no endosperma.

O mutante *shrunk-2*, por sua vez, não apresenta diferenças significativas em relação ao tipo normal (Fig.10), quanto ao catabolismo de aminoácidos. Apenas a leucina mostrou uma certa diferença nos dois tipos. Os aminoácidos mais abundantemente catabolizados no mutante são LEU (35%), PRO (60%), GLX (55%) e ALA (28%). No tipo normal, o catabolismo de aminoácidos foi bastante semelhante apresentando valores de 55, 60, 58 e 32%, respectivamente. A quantidade de ASX cresce bastante também nesta linhagem, revelando um aumento de 200% no mutante e de 300% no normal correspondente.

LARSON e BEEVERS (1964) e CHITTENDEN *et alii* (1978) mostraram que durante a germinação, a fração de aminoácidos livres aumenta. Por outro lado, SODEK e WILSON (1973) estudando metabolismo de aminoácidos durante a germinação do milho, verificaram um aumento bastante grande na quantidade de ácido aspártico em plântula de 6 dias. Assim, os aumentos verificados, neste trabalho, na quantidade de ASX, provavelmente devem-se à mudanças na fração de aminoácidos livres da plântula.

As Figuras 11, 12 e 13 mostram as quantidades de aminoácidos nas plântulas das diferentes linhagens durante a germinação. Comparando-se a quantidade de ASX na plântula, no último dia de germinação, com a presente no endosperma, antes da germinação, verifica-se que a quantidade de ASX na plântula é bem maior que a do endosperma. Isto indicaria que a síntese de ASX poderia ocorrer na plântula; no escutelo, no caminho do endosperma para a plântula ou na plântula, após a translocação do endosperma.

Trabalhos realizados por SODEK e WILSON (1970) e SILVA e ARRUDA (1979), indicaram que o excesso na quantidade de um aminoácido, que chega à semente durante seu desenvolvimento, pode ser catabolizado no endosperma. Esse é o caso da lisina, no endosperma *opaque-2*, e ASX e triptofano nos endospermas *opaque-2* enormal (ARRUDA e SILVA, 1982). Do mesmo mo

FIGURA 11 - Alterações na quantidade de cada aminoácido
(mg) durante o crescimento inicial de plân-
tulas da linhagem ML 649 normal (●--●) e
opaque-2 (○--○).

AMINOÁCIDOS (mg/plântula)

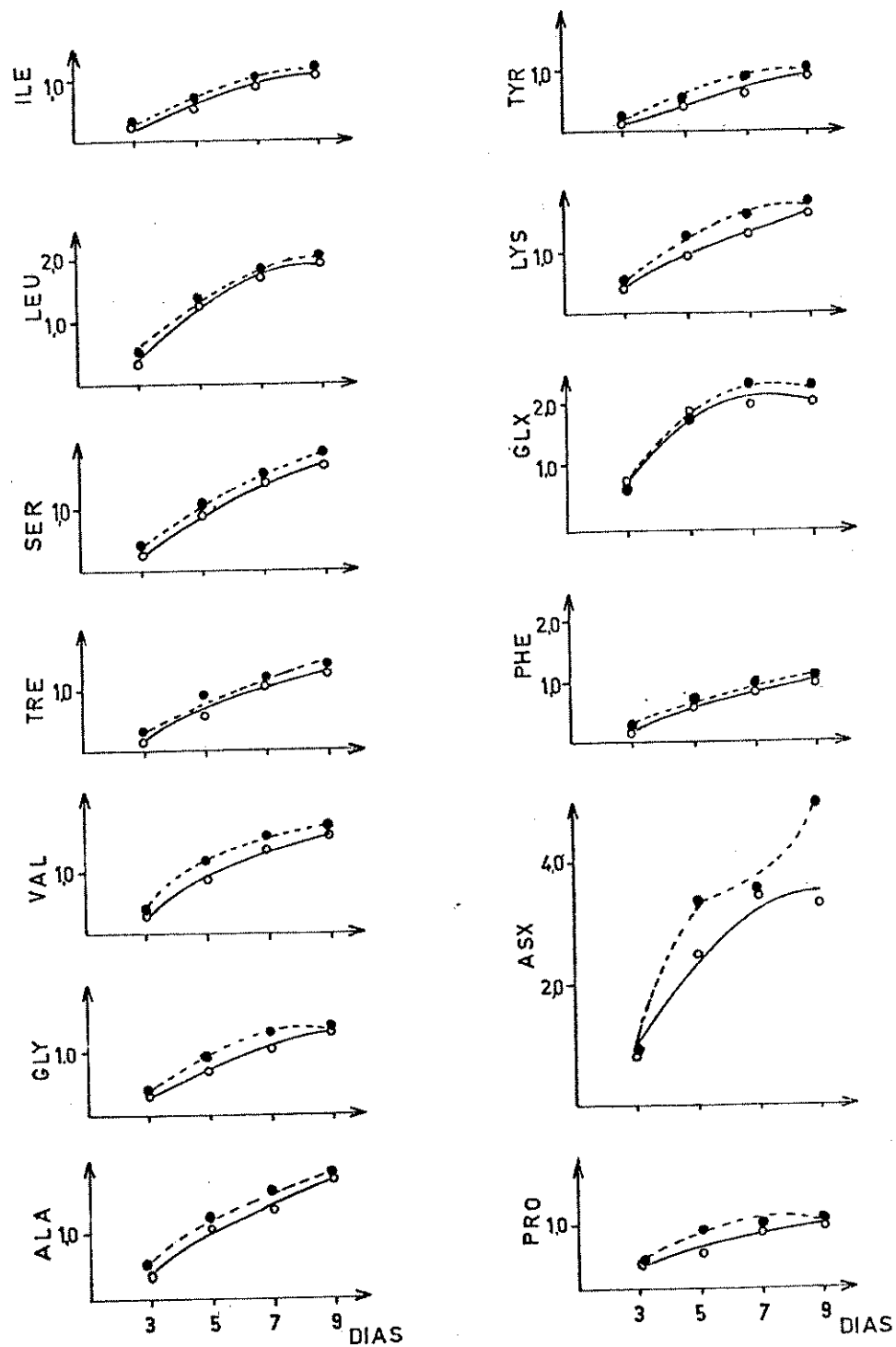


FIGURA 12 - Alterações na quantidade de cada aminoácido (mg) durante o crescimento inicial de plântulas da linhagem ML 674 normal (●--●) e *shrunk-en-2* (○--○).

AMINOÁCIDOS (mg/plântula)

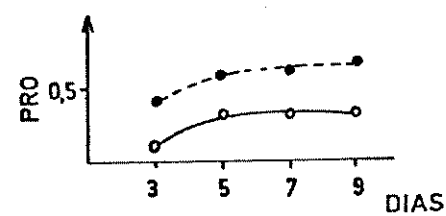
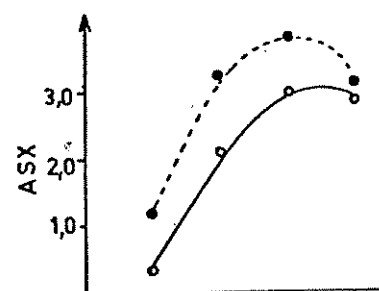
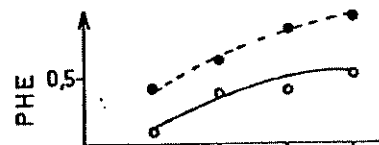
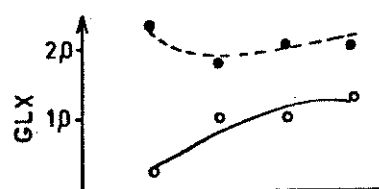
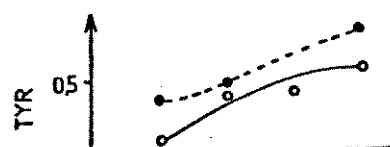
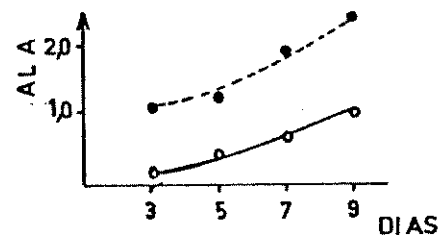
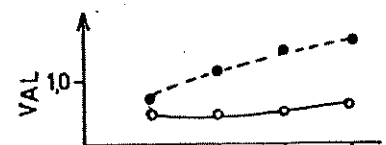
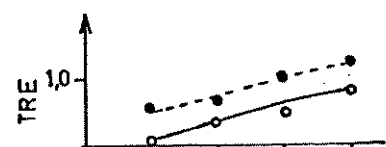
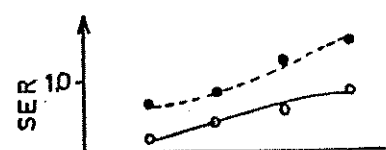
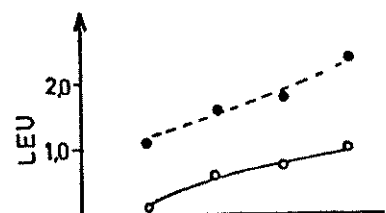
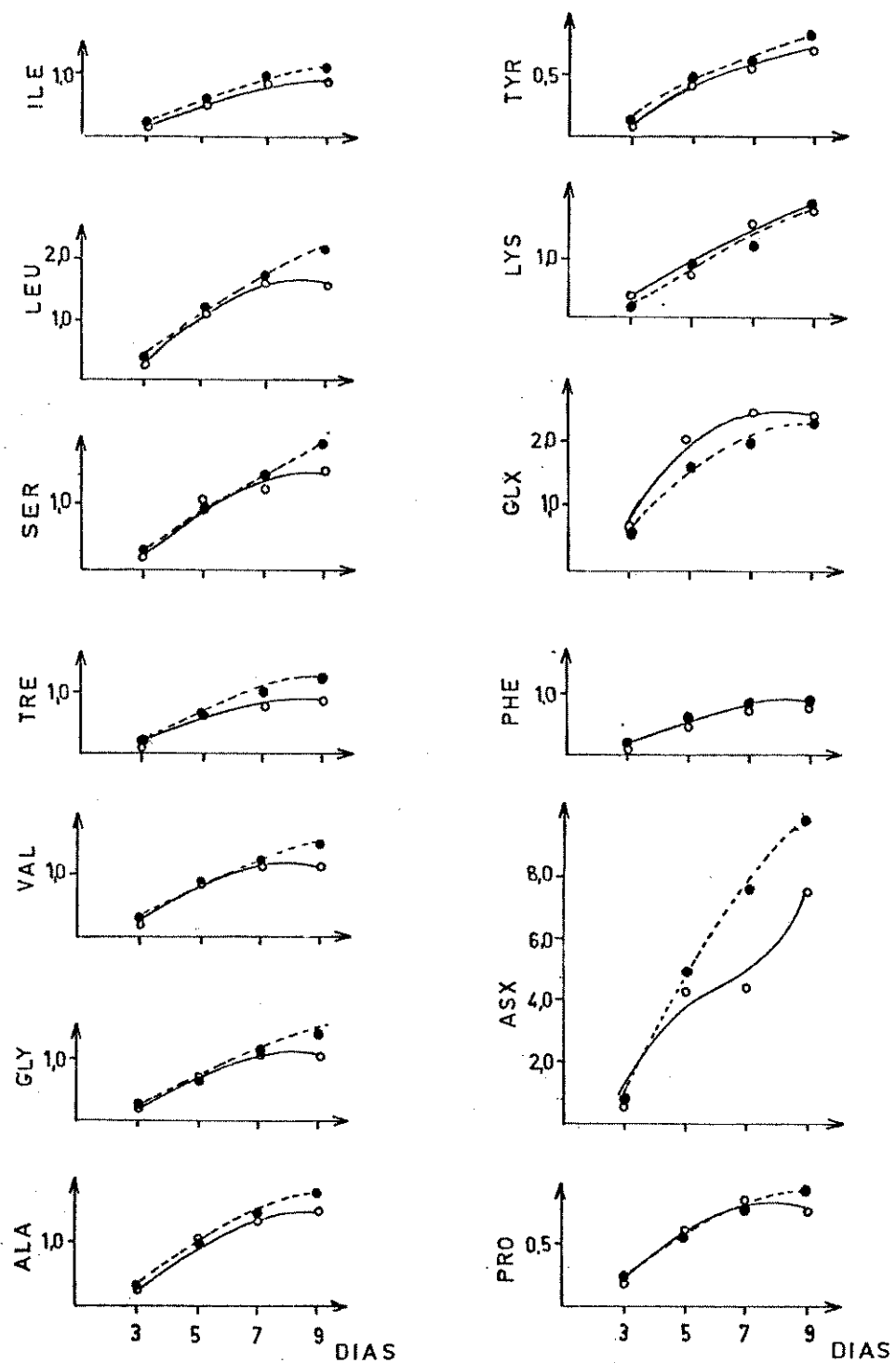


FIGURA 13 - Alterações na quantidade de cada aminoácido
(mg) durante o crescimento inicial de plân-
tulas da linhagem CP 577 normal (●--●) e
shrunk (○--○).

AMINOÁCIDOS (mg/plântula)



do, na germinação, somente os aminoácidos presentes em excesso irão sofrer interconversão, como sugeriram FOLKES e YEMM (1958) e SODEK e WILSON (1973). Desse modo, o nitrogênio dos aminoácidos que sofrem catabolismo, notadamente *GLX*, *LEU*, *PRO* e *ALA*, irá provavelmente ser utilizado na síntese de *ASX*, bastante abundante em plântulas. Além disso, quando se compara os tipos normais das três linhagens, nota-se que a taxa de catabolismo de aminoácidos é bastante semelhante para *LEU*, *PRO* e *GLX*. Isto parece indicar que o controle genético do catabolismo destes aminoácidos é provavelmente determinado por um sistema poligênico.

Por outro lado a síntese de *ASX* ocorre tanto em plântulas de endospermas normais como em mutantes, com taxas diferentes. Este fato sugere que o controle da síntese de *ASX* na plântula depende não só do genótipo do endosperma como também de outros genes que atuam na plântula, durante o seu desenvolvimento. Os resultados obtidos indicam também que o *ASX* tem um papel importante nos processos metabólicos que ocorrem na plântula durante o período inicial da germinação.

5. - CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitiram identificar características que são condicionadas pelos genes *opaque-2*, *shrunk* e *shrunk-2*, bem como outras independentes desses sistemas genéticos.

1. - Características afetadas pelos genes *opaque-2*, *shrunk* e *shrunk-2*.

. Os locos *opaque-2*, *shrunk* e *shrunk-2* afetam o processo de absorção de água durante a germinação de

sementes mutantes, devido às alterações físicas e químicas condicionadas por estes genes durante o desenvolvimento do endosperma.

. Durante a germinação, estes genes interferem nas épocas de atuação das enzimas amiláceas e proteolíticas, fazendo com que a matéria seca e as reservas nitrogenadas sejam utilizadas em épocas distintas. Os genes *opaque-2* e *shrunk-2* condicionam uma utilização mais lenta das reservas do endosperma durante a germinação, enquanto que o gene *shrunk* pouco afeta essa característica.

. Os genes *opaque-2* e *shrunk-2*, além de alterarem a composição de aminoácidos do endosperma, afetam também a composição de aminoácidos da plântula, porém de modos distintos. Todavia o teor de lisina no endosperma e plântula destes dois mutantes é bem superior aos tipos normais.

. A composição de aminoácidos do endosperma *opaque-2* é bem semelhante à requerida pela plântula, o que não é verdadeiro para os mutantes *shrunk* e *shrunk-2*.

. O metabolismo de aminoácidos nos endospermas *opaque-2* e *shrunk-2* é menor do que nos endospermas normais correspondentes. Isso entretanto não ocorreu para o mutante *shrunk*.

2. Características afetadas por outro sistema genético, independente dos genes *opaque-2*, *shrunk* e *shrunk-2*.

. Durante a germinação, as reservas nitrogenadas do endosperma são utilizadas mais rapidamente que as reservas amiláceas, tanto em endospermas normais como nos mutantes. Isso faz com que a relação entre nitrogênio e matéria seca, ou mais indiretamente nitrogênio/carbônio, difira bastante no endosperma, na germinação e durante a formação da semente. Conseqüentemente, no início do desenvolvimento, a porcentagem de nitrogênio é bastante elevada na plântula, fator esse incrementado pela alta porcentagem de proteína encontrada inicialmente no embrião.

. O peso seco total (semente + plântula) sofre significativos decréscimos durante a germinação, que podem ser atribuídos a perdas respiratórias.

. A alta concentração de *GLX* no endosperma e *ASX* na plântula, faz com que estes aminoácidos caracterizem perfeitamente cada uma destas partes.

. Os aminoácidos que ocorrem em maior abundância no endosperma, ou seja, em ordem decrescente, *GLX*, *LEU*, *ALA* e *PRO* são os mais utilizados pela plântula, durante a germinação.

. A síntese de *ASX*, durante a germinação é feita provavelmente às expensas de esqueletos de nitrogênio resultantes do catabolismo de *GLX*, *LEU*, *ALA* e *PRO*.

O controle genético destas características parece não depender dos genes *opaque-2*, *shrunk* e *shrunk-2*, já que elas são comuns a todos os endospermas estudados, tanto normais como mutantes. Assim, deve existir outro sistema genético de natureza poligênica, menos vulnerável, que provavelmente é característico da espécie.

6. - RESUMO

Três linhagens isogênicas de milho, cada uma com dois tipos de endospermas: o endosperma normal, do tipo selvagem, condicionado pelo gene dominante, e o endosperma mutante, homozigoto para o alelo recessivo, foram utilizadas para estudar o efeito dos genes *opaque-2*, *shrunk* e *shrunk-2* durante a germinação. Cada um dos mutantes e os respectivos endospermas normais foram obtidos em uma mesma espiga através da autofecundação de uma planta heterozigota para o loco em questão.

Os pesos fresco e seco e quantidade de nitrogênio foram analisados diariamente em endospermas e plântulas durante dez dias de germinação, a 27°C e no escuro. Nesse período estudou-se também o metabolismo de aminoácidos nos diferentes endospermas e plântulas.

Os resultados obtidos indicaram que a quantidade de água absorvida pelos vários endospermas durante a embebição, está relacionada com as características físicas e químicas deste tecido. Os endospermas com maiores quantidades de açúcares, e portanto, com os menores potenciais osmóticos, em ordem decrescente, *sh2*, *sh* e *o2* apresentaram também os maiores aumentos no peso fresco.

A utilização de matéria seca, ou indiretamente de carboidratos, foi semelhante nos mutantes e nos tipos normais. Desse modo, a transferência de matéria seca do endosperma para a plântula parece depender de um sistema genético diferente daquele governado pelos genes que atuam na formação do endosperma.

O peso seco total (endosperma + plântula) sofreu significativos decréscimos, durante a germinação, que podem ser atribuídos a perdas respiratórias. A taxa de perda nos vários genótipos foi semelhante, indicando que essa característica não depende de genes que atuam na formação do endos

perma. As plântulas provenientes de endospermas normais, utilizaram as reservas nitrogenadas mais rapidamente que as provenientes de endospermas mutantes, e as diferenças entre as curvas de tipos normais e mutantes ocorreu nos seis primei-ros dias de germinação.

A porcentagem de nitrogênio no endosperma, ao contrário de manter-se constante, como ocorre durante a formação da semente, decresce até o 6º ou 7º dia, tanto nos tipos normais, como nos mutantes. Nas plântulas, a concentração de nitrogênio no início da germinação é maior nos mutantes que nos tipos normais, e no décimo dia de germinação essa diferença é praticamente nula. Esses resultados sugerem que, um outro sistema genético, diferente do que atua na formação do endosperma, parece atuar durante a germinação, condicio-nando a relação nitrogênio/carbono na plântula em desenvolvimento.

Para o estudo do metabolismo de aminoácidos durante a germinação foram feitas análises de aminoácidos em endospermas e plântulas. Ficou evidente que a composição de aminoácidos do endosperma, antes da germinação, tem um sistema genético que permite pouca variação fenotípica.

Por outro lado, ficou demonstrado que os genes *o2* e *sh2* modificam a composição de aminoácidos das plântulas,

porém de maneira diferente da que ocorre no endosperma. Os resultados indicam também que o alto teor de *GLX* é característica do endosperma, enquanto o alto teor de *ASX* caracteriza a plântula, independentemente do genótipo do endosperma e da plântula.

A análise da quantidade total de cada aminoácido durante a germinação indicou que somente *ASX* é sintetizado, enquanto que *LEU*, *PRO* e *ALA* são os aminoácidos mais abundantemente catabolizados, provavelmente atuando como fornecedores de nitrogênio para a síntese de *ASX*.

7. SUMMARY

Three isogenic inbreads of maize were used to study the effect of the *opaque-2* (*o2*), *shrunk* (*sh*) and *shrunk-2* (*sh2*) genes during germination. One inbred had two types of endosperm; one homozygote for the *o2* gene and the other for the *o2* gene. A second line had also two different endosperms: one homozygote for the *sh* allele and the other for the *Sh* allele. Finally, a third inbred line with also two types of endosperms; one homozygote for the *sh2* gene and the other for the allele. Each mutant and his normal endosperm were produced in a same ear of an inbred by self

pollinating of a heterozigote plant for the pertinent locus.

Fresh and dry weight and nitrogen content were analysed daily in both endosperms and seedlings, along ten days, during germination at 27°C in the dark. The aminoacid metabolism were analysed in both endosperms and seedlings.

Data showed that the amount of water absorbed by the endosperm during imbibition depends on both physical and chemical characteristics of this tissue. The mutant endosperms with high sugar content and therefore with low osmotic potential, in decreasing order *sh2*, *sh* and *o2*, were also the ones that showed high increases in endosperms fresh weight.

Normal and mutant endosperms had similar pattern in terms of utilization of both dry matter and carbohydrates. Thus, dry matter transference from endosperm to seedling appears to be controlled by a different genetic system other than the one governed by the genes that act in endosperm formation.

Total dry weight (endosperm + seedling) decreased significantly during the germination period. This fact might be attributed to respiratory losses. As rate of loss was similar in the six genotypes, it may suggest that this trait

is not conditioned by either *o2*, *sh2* and *sh* genes.

The proteolytic effect of enzymes appeared earlier than amylolytic activity, during germination. The genes *o2*, *sh* and *sh2* apparently control the time of action of these enzymes.

Seedlings from normal endosperms use nitrogen reserves more rapidly than those from mutants endosperms, and differences between them seem to occur in the first six days of germination.

The nitrogen percentage of endosperms during germination was not constant as it was during seed formation, decreasing till the sixth or seventh day, in both normal and mutant types. The concentration of nitrogen in the seedlings at the beginning of germination is higher in the mutants than in the normal counterparts. This difference disappears at the 10th day of germination. This result indicates that a distinct genetic system, different from the one that acts on endosperm formation, seems to condition nitrogen/carbon ratio during seedling development.

It was also demonstrated that the *o2* and *sh2* genes affect amino acid composition of seedlings, however in different pattern they act in the endosperms. It was shown that high levels of GLX is an endosperm characteristic, while

high content of *ASX* is a seedling characteristic, and both traits are not dependent from either endosperm or seedling genotype.

Aminoacid analysis indicated that only *ASX* is synthesised, while *LEU*, *PRO* and *ALA* are catabolised. This indicates that *LEU*, *PRO* and *ALA* are the main nitrogen source of *ASX* synthesis.

8. - BIBLIOGRAFIA

ADAMS, C.A.; RINNE, R.W. e FJERSTAD, M.C. 1980. Starch deposition and carbohydrase activities in developing and germinating soya bean seeds. Ann.Bot. 45: 577-582.

Association of Official Agricultura Chemisis. 1965. Official methods of analysis. Ed. 10. Washington, D.C. pp. 744-745.

ARNOULD, J.M.; BAUMAN, L.F. e MAKONNEN, D. 1977b. Physical and chemical kernel characteristics of normal and opaque-2 endosperm maize hybrids. Crop. Science, 17: 362-366.

- ARRUDA, P. 1982. O potencial osmótico em mutantes de endosperma de milho e sua interação com características físicas e com a atividade da RNase da semente. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas. 87 p.
- ARRUDA, P. e SILVA, W.J. 1979a. Aminoacid composition of vascular sap of maize ear peduncle. Phytochemistry, 18 : 409-410.
- ARRUDA, P. e SILVA, W.J. 1979b. Relationship among maize endosperm characteristics of normal and sugary opaque-2 kernels during development. J.Agric.Food Chem. 27: 802-805.
- ARRUDA, P. e SILVA, W.J. 1982. Protein and aminoacid metabolism in normal and high-lysine sugary opaque-2 maize endosperm during kernel development. Rev.Bras.Genet. 5: 313-327.
- ARRUDA, P.; SILVA, W.J. e TEIXEIRA, J.P.F. 1978. Protein and free aminoacids in a high lysine maize double mutant. Phytochemistry, 17: 1217-1218.
- ASHTON, F. M. 1976. Mobilization of storage proteins of seeds. Ann.Rev.Plant Physiol. 27: 95-117.

- ATKINS, C.A.; PATE, J.S. e SHAKEY, P.J. 1975. Asparagine metabolism. Key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. Plant Physiol. 56: 807-812.
- BAEZINGER, P.S. e GLOVER, D.V. 1977. Protein body size and distribution and protein matrix morphology in various endosperm mutants of Zea mays L. Crop.Sci. 17: 415-421.
- BAUMAN, L.F. 1975. Germ and endosperm variability, mineral elements, oil content and modifier genes in opaque-2 maize. In: High Quality Protein maize. Purdue Univ. e CIMMYT, ed. Halted Press.
- BEEVERS, L. 1976. Nitrogen metabolism in plants. Edward Arnould Hill Street. London.
- BEEVERS, L. e GUERNSEY, F.S. 1966. Changes in some nitrogenous components during the germination of pea seeds. Plant Physiol. 41: 1455-1458.
- BOSE, B. e SRIVASTAVA, H.S. 1980. Proteolytic activity and nitrogen transfer in maize seeds during imbibition. Biologia Plant. (Praha) 22: 414-419.
- BOULTER, D. e BARBER, J.J. 1963. Aminoacid metabolism in germinating seeds of Vigna faba L. in relation to their biology. New Phytol. 62: 301-316.

- BRANDT, A.B. 1975. "In vivo"incorporation of ^{14}C lysine into the endosperm proteins of wild type and high-lysine barley. FEBS. Letters, 52: 288-291.
- BRYCE, W.H. e NELSON, O.E. 1979. Starch-synthesizing in the endosperm and pollen of maize. Plant Physiol., 63: 312-317.
- BURNHAM, C.R. 1944. Maize Genet.Coop. News Letter, 18: 15.
- CHIBBER, B.A.K.; VOICU, E. e MERTZ, E.T. 1977. Studies on corn proteins. XI. Distribution of lysine during germinating of normal and opaque-2 maize. Cereal Chem. 54: 558-564.
- CHITTENDEN, R.H. e OSBORNE, T.B. 1891. A study of the protein of the corn of maize kernel. Am.Chem.J. 13: 453-529.
- CHOUREY, P.S. e NELSON, O.E. 1976. The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken mutation in maize. Biochem. Genet. 14: 1041-1055.
- 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.
- CREECH, R.G. e McARDLE, F.J. 1966. Gene interaction for quantitative changes in carbohydrates in maize kernels. Crop Sci. 6: 192-194.

- DALBY, A. e TSAI, C.Y. 1975. Comparison of lysine and zein and nonzein protein contents in imature and mature maize endosperm mutants. Crop Science, 15: 513-515.
- DAUSSANT, J. e CORRAZIER, P. Biosynthesis and modifications of an amylases in germinating wheat seeds. FEBS Lett., 7: 191-194.
- DICKINSON, D.B. e PREISS, J. 1969. Presence of ADP- glucose pyrophosphorylase in shrunken-2 and brittle-2 mutants of maize endosperm. Plant Physiol. 44: 1058-1062.
- DUNWELL, J.M. 1981. Influence of genotype and environment of growth of barley embryos "in vitro". Ann. Bot., 48: 535-542.
- DUPUY, J.; BOUTIN, J. e DUPAIGNE, G. 1971. Recherche de l'effet possible de l'heterosis sur le metabolisme protèique du mais pendant la germination et sur, les premiers jours de la croissance. C.R.Acad.Sci., Ser. D (Paris) 272: 2548-2551.
- DURE, L. 1960a. Cross nutritional contributions of maize endosperm and scutellum to germination growth of maize axis. Plant Physiol., 35: 919-925.

- EARLE, F.R.; CURTIS, J.J. e HUBBARD, J.E. 1946. Composition of components parts of the cor kernel. Cereal Chem. 23: 504-11.
- ELMORE; C.D. 1970. Some effects of opaque-2 and fluory-2 kernel characteristics and the performance of counterpart maize(Zea mays L.) hibrids. Tese Ph.D. University of Illinois. USA.
- ELMORE, C.D. e KING, I.E. 1978. Aminoacid composition of germinating cotton seeds. Plant Physiol. 62: 531-535.
- EVANS, L.E. e BHATT, G.M. 1977. Influence of seed size protein content and cultivar of early seedling vigor in wheat. Can.J.Plant Sci. 57: 929-935.
- FELLER, U. 1979. Nitrogen mobilization and proteolytic activities in germinating and maturing bush beans (Phaseolus vulgaris L.). Z. Pflanzenphysiol. 95:413-422.
- FOLKES, B.F. 1970. The physiology of the synthesis of aminoacids and their movement into the seeds proteins of plants. Proc. Nutr. Soc. 29: 12-20.
- FOLKES, B.F. e YEMM, E.W. 1956. The aminoacid content of the proteins of barley grins. Biochem. J., 62: 4-11.

- FOLKES, B.F. e YEMM, E.W. 1958. The respiration of barley plants. X. Respiration and metabolism of aminoacids proteins in germinating grain. New Physiol. 57: 106-131.
- FOLKES, B.F.; WILLIS, A.J. e YEMM, E. 1952. The respiration of barley plants. VII. The metabolism of nitrogen and respiration in seedlings. New Phytol. 51: 317- 341.
- GIANAZZA, E.; RIGHETTI, P.G.; PIOLI, F.; GALANTE, E. e SOAVE, C. 1977. Aminoacid composition of zein molecular components. Phytochemistry, 16: 315-317.
- GOODSELL, J.F. 1968. Potassium in mature kernels of normal and opaque-2 maize. Crop Sci. 8: 281-282.
- HARDIE, D.G. 1975. Control of carbohydrate formation by gibberelic acid in barley endosperm. Phytochemistry 14: 1719-1722.
- HARVEY, B.M.R. e OAKS, A. 1974. The hydrolysis of endosperm protein in Zea mays. Plant Physiol. 53: 453-457.
- HOLDER, D.G.; GLOVER, D.V. e SHANNON, J.C. 1974. Interaction of shrunken-2 with five other carbohydrate genes in Zea mays. L. endosperms. Crop Sci. 14: 643-646.

HUTCHINSON, C.B. 1921. J. Hered. 12: 76-83.

INGLE, J.; BEEVERS, L. e HAGEMAN, R.H. 1964. Metabolic changes associated with the germination of corn. I. Changes in weight and metabolites and their redistribution in the embryo axis, scutellum and endosperm. Plant Physiol. 39: 735-740.

JACOBSEN, J.V.; SCANDALIOS, J.G. e VARNER, I.E. 1970. Multiple forms of amylase induced by gibberellic acid in isolated barley aleurone layers. Plant Physiol., 45: 367-371.

JENNINGS, P.H. e Mc COMBS, C.L. 1969. Effect of sugary and shrunken-2 loci on kernel carbohydrate contents, phosphorylase and branching enzyme activities during maize kernel ontogeny. Phytochemistry, 8: 1357-1363.

JIMENES, J.R. 1966. Protein fractionation studies of high lysine corn. In: Proc. High Lysine Corn Conference.

JONES, R.A. e TSAI, C.Y. 1977. Changes in lysine and tryptophan content during germination of normal and mutant maize seeds. Cereal Chem., 54: 565-571.

JOY, K.W. e FOLKES, B.F. 1965. The uptake of aminoacids and their incorporation into proteins of excised barley embryos. J. Exp. Bot., 16: 646-666.

- KAUFMANN, M.L. e GUITARD, A.A. 1967. The effect of seed size on early plant development in barley. Can.J.Plant.Sci., 47: 73-78.
- KIRKMAN, M.A. 1974. Comparative determination of protein aminoacids in plant materials by automated cation exchange and gas liquid cromatography of the acid N-heptafluorobutyryl, n Propyl esters. J. Cromatogr., 97: 175-191.
- LANDRY, J. e MOUREAUX, T. 1970. Hetérogeneité des glutelines du grain de maïs: extration sélective et composition in acides aminés de trois fractions isolées. Bull.Soc.Chem. Biol., 52: 1021-1037.
- LAUGHMAN, J.R. 1953. The effect of sh2 factor on carbohydrate reserves in the mature endosperm of maize. Genetics, 38: 485-499.
- LEE, K.H.; JONES, R.A.; DALBY, A. e TSAI, C.Y. 1976. Genetic regulation of storage protein content in maize endosperm. Biochem. Genetics, 14: 641-650.
- LEOPOLD, A.C. e KRIDEMAN, P.E. 1978. Plant growth and development. Mc Graw-Hill, Inc. New York.

- LODHA, M.L.; RAM, P.C.; GUPTA, H.D.; MEHTA, S.L. e SINGH, J.
1977. Changes in protein, lysine and tryptophan in normal
and opaque-2 Zea mays kernels during developement. Ind. J.
Exp. Biol. 15: 1080-1082.
- LORENZ, H. 1978. Nitrate-ammonium and aminoacids in the
seedling sap of tomato plants in relation to form and
concentration of nitrogen in the medium. Plant Soil, 45:
169-175.
- LOWE, L.B. e RIES, S.K. 1973. Endosperm protein of wheat
seed as a determinant of seedling growth. Plant Physiol.,
51: 57-60.
- LOWE, L.B.; AYERS, G.S. e RIES, S.K. 1972. Relationship of
seed protein and aminoacid composition to seedling vigour
and yeld of wheat. Agron.J., 64: 608-611.
- MERTZ, E.T. e BATES, L.S. 1964. Mutant gene that changes
protein composition and increases lysine contents of maize
endosperm. Science, 145: 279-280.
- MERTZ, E.T.; LLOYD, N.E. e BRESSANI, R. 1958. Studies on
corn proteins. II. Eletrophoretic analysis of germ and
endosperm extracts. Cereal Chem. 35: 146.

- METIVIER, J.R. e DALE, J.E. 1977. The utilization of endosperm reserves during early growth of barley cultivars and the effect of time of application of nitrogen. Ann. Bot. 41: 715-728.
- MIPLIN, B.J. e LEA, P.J. 1977. Aminoacid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 299-329.
- MISRA, S.; JAMBUNATHAN, R.; MERTZ, E.T.; GLOVER, D.V.; BARBOSA, H.M. e Mc WHITER, K.S. 1972. Endosperm protein synthesis in maize mutants with increased lysine contents. Science, 176: 1425-1427.
- MISRA, P.S.; MERTZ, E.T. e GLOVER, D.V. 1975a. Studies on corn proteins. VII. Developmental changes in endosperm proteins of high-lysine mutants. Cereal Chem. 52: 734-739.
- MONTEIRO, A.M. 1980. Estudos do crescimento inicial e utilização das reservas em Zea mays L. c.v. Maya. Influência do gene opaco-2 e hormônios vegetais. Tese de Mestrado UNICAMP.
- MOSSE, J. 1966. Alcohol soluble proteins of cereal grains. Fed.Proc., 25: 1663-1669.
- MOSSE, J.; BAUDET, J.; LANDRY, J. e MOUREAUX, T. 1966. Étude sur les protéins du maïs. II. Comparaison entre les compositions en acides aminés et les proportions mutuelles des fractions protéiques de grains normaux et mutants. An. Physiol. Vég., 8: 331-344.

- MOUREAUX, T. 1979. Protein breakdown and protease properties of germinating maize endosperm. Phytochemistry, 18: 1113-1117.
- MURPHY, J.J. e DALBY, A. 1971. Changes in the protein fractions of developing normal and opaque-2 maize endosperm. Cereal Chem., 48: 336-349.
- MURPHY, C.F. e LONG, R.C. 1979. Seedlings growth responses of oat genotypes. Crop Science, 19: 723- 726.
- NELSON, O.E. 1967. A mutant gene affecting protein synthesis in the maize endosperm. Maydica, 12: 81-96.
- OAKS, A. e BEEVERS, H. 1964. The glyoxylate cycle in maize scutellum. Plant Physiol., 39: 431-434.
- OKAMOTO, K. e AKAZAWA, T. 1979. Enzymic mechanisms of starch breakdown in germinating rice seeds. Plant Physiol., 63: 336-340.
- OKAMOTO, L. e AKAZAWA, T. 1980. Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. 9. De novo synthesis of α -amylase. Plant Physiol., 65: 81-84.
- OSBORNE, T.B. 1897. The amount and properties of the proteins of the maize kernel. J.Am.Chem. Soc., 19: 525.

- PATE, J.S.; SHARKEY, P.J. e LEWIS, O.A.M. 1975. Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes, studied by a phloem bleeding technique. Planta, 122: 11-26.
- PAULIS, J.W. e WALL, J.S. 1969. Comparison of glutelin proteins in normal and high-lysine corn endosperm. J. Agric. Food Chem., 17: 1301.
- RIGUETTI, P.G.; GIANAZZA, E.; VIOTTI, A. e SOAVE, C. 1977. Heterogeneity of storage proteins in maize. Planta (Berlin) 136: 115-123.
- ROSSI, C. 1980. Variações nos níveis de aminoácidos livres e proteicos em cotilédones de "seedlings" de girassol (Helianthus annuus) durante os sete primeiros dias. Phyton, 38: 113-118.
- ROSWELL, E.V. e GOAD, L.J. 1962. Latent α -amylase of wheat, its mode of attachment to glutelin and its release. Biochem. J., 84: 73-74.
- SHWEIZER, C.J. e RIES, S.K. 1969. Protein content of seeds, increase improves growth and yield. Science, 161: 73-75.
- SHANNON, J.C. e CREECH, R.G. 1973. Genetics of storage polyglucosides in Zea mays L. Ann. N.Y. Acad. Sci., 210: 279-289.

154.

SINGLETON e JONES. 1935. Citado por R.A. Emerson, G.W. Beadle, A.C. Fraser; Cornell Univ. Agr. Exp. Stambull nº 180.

SMITH, V.R. 1980. A phenol-hypochlorite manual determination of ammonium-nitrogen in KJEDHAHAL digests of plant tissues. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 11: 709-722.

SODEK, L. 1973. Corn proteins. Boletim 011 do Centro de Energia Nuclear da Agricultura - CENA - Piracicaba, Brasil.

SODEK, L. e SILVA, W.J. 1977. Glutamate synthase. A possible role in nitrogen metabolism of the developing maize endosperm. Plant Physiol., 50: 602-605.

SODEK, L. e WILSON, C.M. 1970. Incorporation of leucine ^{14}C and lysine ^{14}C into protein in the developing endosperm of normal and opaque-2 corn. Arch. Biochem. and Biophys., 140: 29-38.

SODEK, L.e WILSON, C.M. 1971. Aminoacid composition of proteins isolated from normal, opaque-2 and fluory-2 corn endosperms by a modified Osborne procedure. Agric. Food. Chem., 19: 1144-1150.

SODEK, L. e WILSON, C.M. 1973. Metabolism of lysine and leucine derived from storage protein during the germination of maize. Bioch. Biophys. Acta, 304: 353-362.

- SPLITTSTOESSER, N.E. 1967. The metabolism of glutamate and leucine by maize tissues. Phytochem., 6: 933-939.
- STYER, R.C.; CANTLIFFE, D.J. e HANNAH, L.C. 1980. Differential seed and seedling vigour in shrunken-2 compared to three other genotypes of corn at various stages of development. J.Amer. Soc. Hort. Sci., 105: 329-332.
- SUTCLIFFE, J.F. e BASET, O.A. 1973. Control of hydrolasis of reserves materials in the endosperm of germinating oat grains. Plant Sci. Lett., 1: 15-20.
- TOSELLO, G.A. 1978. Milhos especiais e seu valor nutritivo. In: Melhoramento e produção do milho no Brasil. Piracicaba/ESALQ., Marprint.
- TSAI, C.Y. e DALBY, A. 1974. Comparison of the effect of shrunken-4, opaque-2, opaque-7 and fluory-2 genes on the zein content of maize during endosperm development. Cereal Chem., 51: 825-829.
- TSAI, C.Y. e NELSON, O.E. 1966. Starch-deficient mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. Science, 151: 341-343.
- TSAI, C.Y.; DALBY, A. e JONES, R.A. 1975. Lysine and tryptophan increases during germination of maize seeds. Cereal Chem., 52: 356-360.

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

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

YOMO, H. e VARNER, J.E. 1973. Control of the formation of amylases and proteases in the cotyledons of germinating peas. Plant Physiol., 51: 708-713.