

Maria Bernadete Lovato

Características físicas e conteúdo de proteínas de endospermas normal e *sugary opaque-2*, em espigas segregantes.

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

Orientador: William José da Silva

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais,

com *Carinho*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. William José da Silva, Chefe do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP, pela orientação, estímulo e amizade decisivos para a minha formação científica.

Ao Engenheiro Agrônomo João Paulo Feijão Teixeira e aos demais integrantes da Seção de Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas, pela disponibilidade de seu laboratório para a realização de parte das análises químicas.

Ao Professor Paulo Arruda, pela valiosa colaboração na fase inicial do trabalho.

A Srta. Abigail Dorigatti, pela dedicação com que colaborou no trabalho prático.

Aos pós-graduandos do laboratório de Genética Vegetal da UNICAMP, pelo incentivo e amizade sempre demonstrados.

A Fundação CARGILL e à Coordenação do Aperfeiçoamento

mento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro através de uma bolsa de estudo, durante os anos de 1977 e 1978, respectivamente.

ÍNDICE

	Pag.
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MATERIAL E MÉTODO	12
2.1. Germoplasma	12
2.2. Técnica de polinização	14
2.3. Preparação das amostras de endospermas	16
2.4. Extração de proteínas	17
2.5. Determinação de Nitrogênio	19
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1. Espigas segregantes	21
3.2. Matéria seca e umidade no endosperma	25
3.3. Nitrogênio total nos endospermas	32
3.4. Proteínas no endosperma	35
4 - CONCLUSÃO	42
5 - RESUMO	44
6 - SUMMARY	46
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE TABELAS

TABELA	Pag.
1 - Esquema de extração das frações proteicas, segundo o método de LANDRY e MOUREAUX (1970)	18
2 - Porcentagens médias de endosperma normal nos sete grupos de espigas, e correspondentes porcentagens de polem normal nas misturas	22
3 - Porcentagem média de sementes com endosperma normal e os respectivos desvios padrões (D.P.), nos sete grupos de espigas utilizadas para os estudos de matéria seca, umidade e proteínas	26
4 - Médias de peso seco dos endospermas <i>sugary opaque-2 (suo2)</i> e normal, e médias do valor relativo do peso seco desses dois endospermas em uma mesma espiga	28
5 - Porcentagem de umidade nos endospermas <i>sugary opaque-2 (suo2)</i> e normal, e valor relativo entre a porcentagem de umidade nos dois endospermas de uma mesma espiga	31
6 - Porcentagem de nitrogênio total nos endospermas <i>sugary opaque-2 (suo2)</i> e normal, e valor relativo das quantidades de nitrogênio nos dois tipos de endosperma de uma mesma espiga	34
7 - Porcentagem de zeína nos endospermas <i>sugary opaque-2 (suo2)</i> e normal, e valor relativo entre a quantidade de zeína nos dois tipos de endosperma de uma mesma espiga	37

8 - Distribuição de nitrogênio nas frações proteicas de endospermas *sugary opaque-2*, nos grupos segregantes II e V 40

1. INTRODUÇÃO

O milho, devido à sua alta produtividade, é o ce real que produz a maior quantidade de calorias e proteínas por unidade de área (JOHNSON e LAY, 1974). O seu valor ali mentício pode ser analisado pela composição química das sementes que apresentam, em média, 83,0% de carboidra - tos, 4,9% de óleo e 10,6% de proteínas. O amido é a substân cia que existe em maior quantidade, correspondendo à cerca de 70% do peso seco da semente. Localiza-se principalmente no endosperma, constituindo em média 85% da matéria seca desse tecido. Os açúcares, por outro lado, representam so mente 2,5% do peso do endosperma.

A composição de carboidratos da semente varia consideravelmente durante o desenvolvimento, havendo uma re lação estreita entre umidade, açúcares redutores, sacarose, amido e peso seco do grão. A porcentagem de água diminui continuamente durante o desenvolvimento. A quantidade de a mido é pequena até a segunda semana após a polinização, mas após esse período a síntese de amido e o peso seco total au

mentam rapidamente. O conteúdo de açúcares redutores é alto nos estágios iniciais do desenvolvimento, constituindo cerca de 80% do total de carboidratos do endosperma no estágio de 8 a 12 dias após a polinização (DAP). Após esse período o conteúdo de açúcares redutores diminui lentamente. A sacarose aumenta a partir dos primeiros dias da polinização, atingindo uma concentração máxima ao redor dos 18 DAP, reduzindo em seguida até atingir limites muito baixos em sementes maduras (EARLEY, 1952; INGLE *et al.*, 1965; TSAI *et al.*, 1970).

São conhecidas várias mutações que alteram a composição de carboidratos do endosperma. Os genes *shrunken* (*sh*), *shrunken-2* (*sh2*), *shrunken-4* (*sh4*), *brittle* (*bt*), *brittle-2* (*bt2*) e *brittle-4* (*bt4*) quando presentes reduzem drasticamente a síntese de amido, e acumulam maiores quantidades de sacarose no endosperma do que o tipo normal. Em consequência da grande redução na síntese de amido, esses mu-tantes apresentam endospermas leves e com aspecto enrugado na maturação completa. O gene *sh2*, por exemplo, sintetiza uma quantidade de amido equivalente a 30% da encontrada em endosperma normal, causando uma redução de 30 a 50% no peso seco da semente (CREECH, 1965; CREECH e McARDLE, 1966; HOE-
DER *et al.*, 1974; JENNINGS e McCOMBS, 1969; LAUGHMAN, 1953). Esse gene, por outro lado, condiciona o acúmulo de grande quantidade de sacarose, que pode atingir até 16% do peso

seco da semente (LAUGHMAN, 1953).

O gene *sugary* (*su*), além de reduzir grandemente a síntese de amido e acumular maior quantidade de sacarose no endosperma, sintetiza, em grande quantidade, um polissacarídeo solúvel em água, o fitoglicogênio. Esse carboidrato que não ocorre no endosperma normal, pode representar 20 a 30% do peso seco da semente *sugary* (AYERS e CREECH, 1969; CREECH e McARDLE, 1966; DVONCH *et al*, 1951; JENNINGS e McCOMBS, 1969).

Alguns mutantes alteram a proporção de amilose e amilopectina na semente. O grânulo de amido do milho normal contém, em média, 75% de amilopectina e 25% de amilose. O mutante *waxy* (*wx*) produz amido com 100% de amilopectina (SPRAGUE *et al*, 1943). Entretanto, a quantidade total de amido no endosperma *waxy* não é alterada (HOLDER *et al*, 1974). O gene *amylose-extender* (*ae*) eleva o teor de amilose a 60% (KRAMER *et al*, 1958; VINEYARD e BEAR, 1952), e reduz de 10 a 20% a quantidade total de amido no endosperma mutante (CREECH e McARDLE, 1966; HOLDER *et al*, 1974; KRAMER *et al*, 1958). O gene *sugary-2* (*su2*) aumenta a proporção de amilose para níveis que oscilam entre 35 a 40% (DVONCH *et al*, 1951; KRAMER e WHISTLER, 1949), enquanto que o gene *dull* (*du*) condiciona teores de amilose no amido que variam de 30 a 35% (DVONCH *et al*, 1951).

Os estudos de CREECH *et al* (1963) e de CREECH (1965) sobre a composição de carboidratos em sementes dos tipos *wx*, *du*, *su2*, *su*, *sh2* e *ae*, durante o desenvolvimento, mostraram que no período de 16 a 28 DAP todos os mutantes apresentaram diferenças em relação ao tipo normal. Esses autores observaram que, nesse estágio, os conteúdos de açúcares totais, açúcares redutores e sacarose são negativamente correlacionados com amido e matéria seca.

Apesar do milho ser uma excelente fonte de carboidratos, as suas proteínas são de baixo valor nutritivo. O endosperma normal contém, em média, apenas 1,7% de lisina, que é cerca de 2,5 vezes inferior ao limite recomendado pela FAO para a dieta humana. Nesse caso, obviamente, haverá necessidade de complementação proteica (rica em lisina), de origem animal ou vegetal.

O valor nutritivo do endosperma normal pode ser analisado através do estudo da composição de proteínas desse tecido. A zeína, ou zeína-1, é uma prolamina que corresponde a aproximadamente 50% das proteínas do endosperma. Essa fração proteica é praticamente desprovida de lisina, porém contém altos teores de ácido glutâmico, prolina, leucina e alanina (LANDRY e MOUREAUX, 1970; GIANAZZA *et al*, 1977; SODEK e WILSON, 1971). As albuminas e globulinas, em bpra sejam ricas em lisina, correspondem apenas a 5%

das proteínas do endosperma maduro (MOUREAUX *et al.*, 1966 ; PAULIS e WALL, 1969; SODEK e WILSON, 1971). Entretanto nos estágios iniciais do desenvolvimento do endosperma, representam a maior parte das proteínas do tecido (ARRUDA *et al.*, 1978; MISRA *et al.*, 1975a; MURPHY e DALBY, 1971). A zeína -2 ou glutelina-1, em sementes maduras, representa 5 a 10% das proteínas do endosperma (MISRA *et al.*, 1975b, SODEK e WILSON 1971), e tem uma constituição de aminoácidos semelhante à zeína, embora apresente níveis superiores de aminoácidos sulfurados (LANDRY e MOUREAUX, 1970; SODEK e WILSON, 1971). A fração de glutelina-2 corresponde à cerca de 10% das proteínas do endosperma (MISRA *et al.*, 1975b). Apresenta uma composição de aminoácidos intermediária entre as albuminas-globulinas e a zeína, embora pouco mais próxima das primeiras. O conteúdo de lisina na glutelina-2 é pouco maior do que o encontrado na zeína (1,1%), conforme mostraram LANDRY e MOUREAUX (1970). A fração glutelina-3 constitui cerca de 15% das proteínas do endosperma (MISRA *et al.*, 1975b), apresentando uma composição de aminoácidos semelhante à das albuminas-globulinas, e um teor de lisina ao redor de 5% (LANDRY e MOUREAUX, 1970).

Cada fração proteica, entretanto, constitui - se de uma mistura heterogênea de proteínas, como tem sido demonstrado por estudos eletroforéticos (GIANAZZA *et al.*, 1976;

LEE *et al*, 1976; MISRA *et al*, 1976; PAULIS e WALL, 1969 , PAULIS *et al*, 1975; SOAVE *et al*, 1975). A zeína-1 apresenta em eletroforese, em gel de poliacrilamida com duodecilsulfato de sódio, duas bandas polipeptídicas, com pesos moleculares de 23.000 e 21.000 (GIANAZZA *et al*, 1976; SOAVE *et al* , 1975). A zeína-2 além dessas duas bandas, contém mais dois componentes de pesos moleculares de 13.500 e 9.600 (GIANAZZA *et al*, 1976). A mistura de zeína-1 e zeína-2 revela uma grande heterogeneidade de carga, contendo pelo menos 15 componentes polipeptídicos (GIANAZZA *et al*, 1976; RIGHETTI *et al*, 1977).

Embora o milho normal apresente baixa qualidade proteica, existem vários mutantes de endospermas que aumentam sensivelmente os níveis dos aminoácidos essenciais, lisina e triptofano. O mutante *opaque-2* (*o2*) contém um teor de lisina, quase duas vezes superior ao normal (MERTZ *et al* 1964). O *floury-2* (*fl2*) também apresenta uma quantidade alta de lisina, porém menor que a do *opaque-2* (NELSON *et al* , 1965). Os mutantes *opaque-7* (McWHIRTER; 1971), *floury-3* e *opaque-6* (MA e NELSON, 1975) são também conhecidos como mutantes de alta lisina. Os mutantes que apresentam redução drástica na síntese de amido também revelam níveis de lisina superiores ao normal. A combinação desses mutantes com o gene *opaque-2* resulta na produção de duplos mutantes com al

tos níveis de lisina, superiores mesmo ao *opaque-2* (BARBOSA e GLOVER, 1978; MISRA *et al.*, 1972; MISRA *et al.*, 1975b).

Estudos de fracionamento de proteínas do endosperma do milho mostram que o aumento na qualidade proteica dos mutantes é devido a uma diminuição na síntese de zeína, com conseqüente aumento proporcional das outras frações proteicas (MA e NELSON, 1975; McWHIRTER, 1971; MISRA *et al.*, 1972; MISRA *et al.*, 1975b ; MOSSÉ *et al.*, 1966; NELSON *et al.*, 1965; SODEK e WILSON, 1971 ; TSAI e DALBY, 1974). Analisando a composição das proteínas de *opaque-2*, *opaque-7* e *floury-2*, de seis mutantes que reduzem a síntese de amido e de duplos mutantes com o *opaque-2*, MISRA *et al.*, (1975b) verificaram que o aumento na qualidade proteica de todos os mutantes estudados foi associado com diminuição na síntese de zeína, e aumento nas concentrações das proteínas ricas em lisina, albuminas-globulinas e glutelina-3 .

A análise eletroforética das frações proteicas reforça a idéia de que, embora as mutações não produzam nenhuma proteína diferente, elas são responsáveis por mudanças nas proporções das proteínas do endosperma (GIANAZZA *et al.* 1976; LEE *et al.*, 1976; PAULIS *et al.*, 1975; SOAVE *et al.*, 1975). Com relação à síntese de zeína, verificou-se que o mutante *opaque-2* reduz a síntese dos quatro componentes de pesos moleculares distintos, atuando principalmente nas

cadeias de peso molecular de 23.000 (GIANAZZA *et al*, 1976 ; SOAVE *et al*, 1975). A zeína do *opaque-2* apresenta também a mesma heterogeneidade de carga revelada no tipo normal. A redução ocorre em todos os componentes, embora em maior proporção nas componentes mais alcalinos, que representam parte da população de cadeias de peso molecular de 23.000 (GIANAZZA et al, 1976).

Todos os mutantes de carboidratos e proteínas considerados tem herança monogênica recessiva e, desse modo podem ser transferidos, em prazo relativamente curto, para outros germoplasmas que apresentam características agronômicas desejáveis. Alguns mutantes devido a sua composição química, apresentam grande potencial para serem utilizados na dieta humana, quer *in natura* ou industrializados. Os mutantes opaque-2, sugary, waxy e amylose-extender, tem sido explorados economicamente em países desenvolvidos (SPRAGUE , 1977).

Os mutantes de endosperma, por outro lado, constituem-se em excelente material para estudos de metabolismo de carboidratos e proteínas, e também para a obtenção de conhecimentos na área de ação e regulação gênica em plantas superiores.

A ação desses genes mutantes manifesta-se principalmente no endosperma, não tendo sido constatadas grandes

diferenças morfológicas e fisiológicas entre as plantas mutantes e indivíduos do tipo normal. Esse fato, aliado à possibilidade de se produzir em uma mesma espiga sementes mutantes e normais, tanto em plantas mutantes, como em normais heterozigotas, sugere que indivíduos de genótipos diferentes produzem o mesmo tipo de substrato que é transportado para a espiga. O endosperma recebe o substrato comum e o processa de acordo com o seu genótipo.

O acúmulo de matéria seca na semente, além de depender dos vários fatores de clima, é função importante do nível de nutrientes no solo. Tem sido demonstrado que a adubação com nitrogênio aumenta o conteúdo de proteínas nas sementes, principalmente na fração de zeína, enquanto que a quantidade de outras proteínas permanece praticamente inalterada (KEENEY, 1970; SAUBERLICH *et al*, 1953; TSAI *et al*, 1978). Utilizando diferentes níveis de nitrogênio na forma NH_4^+ , TSAI *et al* (1978) verificaram que o conteúdo de zeína aumenta rapidamente com doses crescentes de fertilizante. O aumento de zeína foi correlacionado com o peso seco das sementes, tanto nos tipos normais, como nos mutantes *opaque-2* e *floury-2*. Esses últimos apresentaram, durante o desenvolvimento, menor acúmulo de matéria seca e de zeína que o tipo normal. Entretanto, a quantidade das proteínas não-zeína (albuminas, globulinas e glutelinas combinadas) foi praticamente igual nos três genótipos. Verificaram, ainda, que a adubação aumen

tou o transporte de sacarose para as sementes. Com base nessa evidência, TSAI *et al* (1978) sugeriram que a zeína funciona como uma fonte de consumo (*sink*) de nitrogênio para aumentar o acúmulo de amido e o peso seco da semente. Pode-se concluir desses trabalhos, que a quantidade de nutrientes que chega às sementes depende das condições ambientais de crescimento da planta e do genótipo do endosperma. As sementes com endospermas normal apresentam um maior consumo de nutrientes e, portanto, condicionam um maior fluxo de nutrientes para a espiga do que as sementes com endosperma mutante de menor peso.

Baseando-se nessas considerações, poder-se-ia supor que em uma espiga tendo sementes com genótipos diversos quanto ao consumo de nutrientes, o maior fluxo de nutrientes à espiga condicionado por certos genótipos, poderia acarretar maior acúmulo de matéria seca em endospermas com genótipos que apresentam menor demanda de nutrientes. Se essa hipótese for verdadeira, pode-se admitir que essas alterações devem depender da quantidade relativa dos vários tipos de endospermas que possam ocorrer em uma espiga. Uma mesma espiga, com endospermas do tipo normal e mutantes que apresentam grande redução no teor de amido, receberá maior quantidade de nutrientes quanto maior for a porcentagem de grãos normais em relação aos mutantes.

Se a intensidade de fluxo alterar a composição dos endospermas, o mutante apresentará maior quantidade de matéria seca e provavelmente de zeína, quanto maior for a proporção de endospermas normais na espiga. A análise do efeito dos genes que condicionam diferentes endospermas, em espigas segregantes de plantas mutantes, ficaria desse modo seriamente prejudicada.

Por outro lado, a utilização de espigas segregantes apresenta algumas vantagens em relação às espigas puras, em trabalhos de genética fisiológica e de melhoramento de plantas. A análise comparativa entre dois ou mais genótipos de endosperma numa mesma espiga, é sempre mais precisa que o contraste de tipos em plantas diferentes, uma vez que os endospermas de uma mesma espiga, estão em condições mais comparáveis do que os de espigas em plantas diferentes.

A importância de uma análise mais precisa do efeito dos genes de endosperma e a vantagem da utilização de espigas segregantes em estudos de genética, estimularam o desenvolvimento do presente trabalho, cujo objetivo é estudar a possível influência das sementes normais em sementes de endosperma *sugary opaque-2*, e vice versa, em espigas segregantes de plantas *sugary opaque-2*

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 - Germoplasma

As espigas segregantes utilizadas foram produzidas em plantas *sugary opaque-2* do cultivar Nutrimaiz. Esse sintético foi obtido por SILVA *et al* (1978), através de um programa de retrocruzamentos, usando como pai recorrente o cultivar Maya opaco e como fonte de gene *sugary*, a variedade de milho doce Pajimaca, proveniente de Cuba. A população Maya opaco, homozigota para o fator *opaque-2*, foi sintetizada a partir do cultivar Maya, no Instituto Agronômico de Campinas (POMMER, 1976). A variedade Pajimaca foi escolhida como pai não recorrente, por ser uma população de endosperma *sugary*, bem adaptada às condições tropicais.

Os grãos de poleo do tipo normal (*Su 02*), utilizados para a obtenção das espigas segregantes, foram provenientes de plantas da variedade sintética Maya normal (MIRANDA, 1972), de

sementes amarelas e dentadas. Essa variedade, produzida no Instituto Agronômico de Campinas, foi obtida da combinação de 14 linhagens de Asteca com as linhagens Ip 701-1, Tx 303, PD(MS) 6 e duas linhagens de endosperma branco, Llera III e Vera Cruz 226 y 227. A população Asteca é um sintético de coleções de Tuxpeños amarelos de San Luis Potosí. A linhagem Ip 701-1 foi obtida a partir da variedade Tuxpan, que é produto do cruzamento de Tuxpeño branco com Creole Yellow Flint. As linhagens Tx 303 e PD (MS) 6 são derivadas respectivamente das variedades Yellow Surecropper e Pozo Dulce-Mass Selection. Finalmente, as linhagens brancas Llera III e Vera Cruz 226 y 227 são originárias de Tuxpeños brancos tardios, de espigas grandes e cilíndricas.

O material estudado foi produzido em um lote especial constituído de 37 linhas de 10 m de comprimento do cultivar Nutrimaiz, adjacentes a outro lote de 12 linhas de 10 m do cultivar Maya normal, todas com espaçamento de 1 m entre linhas e 0,4 m entre covas na linha. Foram plantadas três sementes por cova, deixando-se duas plantas por ocasião do desbaste, para se obter uma população com densidade média de 50.000 plantas por hectare.

Os dois lotes receberam nos sulcos de plantio, 30 kg de N/ha, 80 kg de P_2O_5 /ha e 35 kg de K_2O /ha, nas formas de sulfato de amônia, superfosfato simples e cloreto de potássio,

respectivamente. Trinta e cinco dias após a germinação foi feita uma adubação em cobertura com 50 Kg de N/ha, na forma de sulfato de amônia.

2.2 - Técnica de polinização

Para a obtenção dos vários tipos de espigas segregantes, polinizaram-se artificialmente plantas *sugary opaque-2* com misturas de pólen *sugary opaque-2* e normal em sete diferentes proporções. Para tanto, coletou-se inicialmente uma mistura de grãos de pólen provenientes de 20 plantas normais, com panículas no mesmo estágio de desenvolvimento, para se obter uma amostra bem representativa da germoplasma de micrôsporos do tipo normal. Os polens mutantes, analogamente, foram obtidos de 20 plantas do cultivar Nutrimaiz. As panículas utilizadas, tanto das plantas normais, como da variedade Nutrimaiz, estando aparentemente no mesmo estágio de maturação, permitiram que cada planta contribuisse com aproximadamente a mesma quantidade de grãos de pólen na amostra. Após a obtenção das duas amostras compostas, foram preparadas sete diferentes proporções de misturas de pólen, envolvendo os tipos normal e duplo mutante. Essas misturas foram feitas com base no volume de pólen, medido em uma concha plástica, com aproximadamente 0,5 ml.

As seguintes misturas de pólen foram produzidas:

Grupo I - somente pólen normal

Grupo II - 7,5 volumes de pólen normal e 2,5 volumes de *sugary opaque-2*

Grupo III - 5,0 volumes de pólen normal e 5,0 volumes de *sugary opaque-2*

Grupo IV - 2,5 volumes de pólen normal e 7,5 volumes de *sugary opaque-2*

Grupo V - 1,0 volume de pólen normal e 9,0 volumes de *sugary opaque-2*

Grupo VI - 0,5 volume de pólen normal e 9,5 volumes de *sugary opaque-2*

Grupo VII - somente pólen *sugary opaque-2*

Cada mistura de pólen foi usada para a polinização de 10 a 15 plantas *sugary opaque-2*, cujos estilo-estigmas foram protegidos previamente para evitar contaminação. Os sete conjuntos de pólen foram distribuídos ao acaso nas plantas polinizadas em um único dia, a fim de propiciar condições semelhantes para o desenvolvimento dos dois endospermas nos diferentes indivíduos estudados.

2.3 - Preparação das amostras de endospermas.

Todas as espigas foram coletadas aos 51 DAP, no estágio de maturação fisiológica. As sementes normais e mutantes de cada espiga foram contadas, e mantidas separadamente, para o estudo de incorporação de matéria seca e de proteínas em espigas individuais. Essas observações foram feitas em seis espigas, correspondendo a seis repetições, dentro de um mesmo grupo segregante de mistura de polem.

Para a determinação de peso seco e porcentagem de umidade dos endospermas foram escolhidas 10 sementes *sugary opaque-2* e 10 sementes normais de uma mesma espiga, com tamanho e forma de modo a representar o tipo de semente da espiga. Os escutelos foram retirados e os endospermas pesados para avaliação do peso fresco. Esses foram então conservados a -20° C para posterior liofilização. O peso seco foi determinado em endosperma liofilizado.

Para a obtenção de uma quantidade adequada de material para as análises químicas, além dos 10 endospermas de cada genótipo, mencionados acima, foram retirados de cada espiga mais 10 endospermas de cada tipo. Cada amostra utilizada para as análises químicas ficou constituída, portanto, de 20 endospermas provenientes de uma mesma espiga.

O material liofilizado foi pulverizado em moinho de bola. Os lipídeos da farinha foram extraídos com acetona, por três vezes, usando-se uma proporção de 1 g de farinha para 10 ml de solvente, através de agitação e posterior centrifugação.

2.4 - Extração de proteínas

As proteínas do endosperma foram fracionadas pelo método de LANDRY e MOUREAUX (1970). Utilizaram-se 200 mg de amostra desengordurada, num volume de 2 ml de solvente, com duas repetições por amostra. A sequência de extração das proteínas é mostrada na tabela I. O procedimento baseia-se em extrações sucessivas nos solventes, através de agitação e posterior centrifugação. Para a obtenção da fração I, por exemplo, agita-se a farinha com NaCl 0,5 M, durante 60 minutos. Após esse tempo, centrifuga-se a mistura. O resíduo é então tratado com NaCl 0,5 M durante 30 minutos, e em seguida é centrifugado. A seguir faz-se mais uma extração de 30 minutos com solução salina, e duas extrações com água, com duração de 15 minutos cada uma. Os cinco sobrenadantes combinados constituem a fração I. O resíduo remanescente após a extração da fração I é tratado por três vezes consecutivas, com isopropanol 70% para a extração de zeína. A sequência é continuada de acordo com a tabela I, até a extração da glutelina-3.

Tabela I

TABELA I: Esquema de extração das frações proteicas, segundo o método de LANDRY e MOUREAUX(1970).

Fração	Solvente	Tempo de agitação (minutos)	Fração proteica
I	NaCl 0,5 M (4°)	60	Aminoácidos livres albuminas e globulinas
		30	
	Água destilada (4°)	30	
		15	
		15	
II	Isopropanol 70% (20°)	30	Zeína
		30	
III	Isopropanol 70% com 2-ME 0,6% (20°)	30	Glutelina-1
		30	
IV	Tampão borato pH 10 com 2-ME 0,6% e NaCl 2,92% (20°)	60	Glutelina-2
		30	
V	Tampão borato pH 10 com 2-ME 0,6% e LSS 0,5% (20°)	60	Glutelina-3
		30	
		15	Resíduo

2-ME: 2-mercaptoetanol.

LSS: laurilsulfato de sódio.

Tampão borato pH 10: 250 ml de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0,05 M e 100 ml de NaOH, 0,2M em 1000 ml.

Finalmente, todas as frações proteicas foram diluídas num volume de 10 ml de solvente. Os aminoácidos livres foram separados das albuminas e globulinas por precipitação dessas proteínas com ácido tricloroacético 10%, através de mistura de volumes iguais de ácido e de extrato proteico.

2.5 - Determinação de nitrogênio

Para a determinação do nitrogênio total dos endospermas utilizou-se farinha desengordurada, dividida em duas amostras (repetições) de 100 mg. A farinha foi primeiramente digerida segundo o método de KJELDAHL (AOAC, 1965), usando-se 3 ml de ácido sulfúrico concentrado até o extrato ficar claro. A digestão foi completada com 6 gotas de peróxido de hidrogênio 30%, as quais foram evaporadas no digestor. As amostras digeridas foram diluídas em água, e a quantidade de nitrogênio foi determinada em um autoanalisador Technicon. Para cada 50 amostras lidas no autoanalisador, foram destiladas 10 no micro-kjeldahl, para se estabelecer um fator de equivalência entre a leitura no autoanalisador e a quantidade de nitrogênio determinada no micro-kjeldahl.

Para a dosagem de cada fração proteica utilizaram-se 2 ml do extrato. Os solventes desses extratos foram evaporados em digestor, efetuando-se em seguida a digestão do mesmo

modo que o descrito anteriormente, para a digestão da farinha .
O nitrogênio de cada fração proteica foi determinado em autoana-
lizador Technicon.

Na maioria dos endospermas foi determinada apenas a
quantidade de zeína. A extração dessa proteína foi realizada pe-
lo método de LANDRY e MOUREAUX até o estágio II, e a sua quanti-
dade foi dosada por digestão, seguida por destilação pelo méto-
do de KJELDAHL:

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Espigas segregantes

A tabela II apresenta as médias das porcentagens de endospermas normais encontradas nos sete grupos de espigas, produzidas a partir das sete misturas de pólem. Para avaliar a precisão da técnica de polinização foram realizados testes de χ^2 envolvendo as espigas segregantes dos grupos II a VI. Para cada grupo segregante, o χ^2 total foi decomposto em χ^2 do conjunto de espigas e χ^2 devido a heterogeneidade entre espigas. O χ^2 total representou a soma dos χ^2 das várias espigas dentro do grupo segregante. O χ^2 do conjunto de espigas foi calculado considerando-se a soma dos endospermas de todas as espigas do grupo analisado, como se as mesmas fizessem parte de uma única amostra. O χ^2 devido à heterogeneidade foi calculado pela diferença entre o χ^2 total e o χ^2 do conjunto de espigas do grupo.

TABELA II: Porcentagens médias de endospermas normal nos sete grupos de espigas, e correspondentes porcentagens de pólen normal nas misturas.

Grupo de espigas	Pólen normal	Endosperma normal	Espigas analisadas	χ^2	
				Conjunto	Heterogeneidade
	%	%	n°		
I	100	98,9	10	—	—
II	75	72,1	8	12,898**	4,697 NS
III	50	53,2	10	16,422**	6,826 NS
IV	25	23,9	6	0,736NS	6,196 NS
V	10	6,8	10	48,111**	11,532 NS
VI	5	3,3	7	17,810**	2,118 NS
VII	0	0	7	—	—

NS, não significativo;

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

Analisando-se os valores dos χ^2 na tabela II, pode-se observar que em todos os grupos não houve heterogeneidade significativa, o que demonstra que as proporções genotípicas nas várias espigas foram semelhantes. As espigas do grupo IV foram as únicas que não mostraram diferenças entre as proporções de endospermas, com base nas proporções de polens utilizadas. Os grupos II, III, V e VI mostraram χ^2 significativos ao nível de 1% de probabilidade.

Pensou-se, inicialmente, que as discrepâncias entre as frequências observadas e as esperadas pudessem ser explicadas por possíveis diferenças no volume dos grãos de pólen normal e *sugary opaque-2*. Como as misturas de grãos de pólen foram preparadas com base no volume, a existência de diferenças no tamanho dos grãos de pólen, acarretaria desvios nas frequências esperadas dos dois tipos de endospermas. Para verificar essa hipótese foram coletados, no ano seguinte, polens dos dois genótipos contrastantes, de panículas em mesmo estágio de desenvolvimento, e avaliados os diâmetros dos micrósporos em microscópio. Foram analisados 100 grãos de pólen de cada genótipo, provenientes de 10 panículas. Os diâmetros médios dos polens normais e *sugary opaque-2* foram respectivamente, 106 e 104 μ . Não houve grande variabilidade para tamanho de micrósporos das várias panículas, com grãos de polens do tipo normal apresentando um coeficiente de variação de 4,0% e os do mutan-

te, um coeficiente de 4,1% . Através de uma análise de variância foi demonstrado que as médias de diâmetro dos dois grãos de polem não são diferentes. Esses resultados indicam que o número de grãos de polem foram bem estimados nas misturas e que desse modo, o volume dos micrósporos não explicaria as discrepâncias encontradas.

Uma análise mais minuciosa da tabela II revela que apenas o grupo III apresentou maior porcentagem de endospermas normais do que a esperada. Nos outros três grupos o desvio ocorreu em sentido contrário, com maior frequência de endospermas *sugary opaque-2* do que a esperada. Observa-se ainda que as espigas do grupo I, que deveriam apresentar somente endospermas normais, mostraram em média 1,1% de endospermas *sugary opaque-2* , devido, provavelmente, à contaminação por polem *suo2* durante a polinização. Isso ocorreu, aparentemente, pela maior probabilidade de contaminação com polem *sugary opaque-2*, do que com polem normal, durante a polinização, uma vez que todas as plantas polinizadas formavam um bloco compacto de aproximadamente 1500 plantas do mesmo genótipo. Como a magnitude das discrepâncias observadas é da ordem da encontrada na espiga do grupo I, onde ocorreu sem dúvida a contaminação, deduziu-se que a técnica descrita de mistura de polem, pode-se constituir num importante recurso para se produzir espigas segregantes com proporções desejadas de genótipos.

3.2 - Matéria seca e umidade no endosperma

Para o estudo de peso seco, umidade e proteínas nos endospermas *sugary opaque-2* e normal, foram escolhidas seis espigas de cada grupo segregante, cujas proporções genotípicas eram as mais próximas possíveis. Isso foi feito com o objetivo de tornar mais precisas as comparações entre os diferentes grupos segregantes. As médias e os desvios padrões das porcentagens de endospermas normais das espigas utilizadas são apresentados na tabela III. Comparando-se essas porcentagens com as da tabela II, pode-se verificar que algumas foram levemente alteradas, em consequência da escolha de espigas com proporções mais adequadas para o estudo. A porcentagem de endosperma mutante nas espigas, aumenta gradativamente do grupo I ao VII, de um valor de 1,3% no grupo I, até o valor de 100% no grupo VII.

Tabela III

Na tabela IV observa-se que as médias de peso seco dos endospermas *sugary opaque-2* nos seis grupos de espigas mantiveram-se dentro de limites estreitos, oscilando entre 158,5 e 173,9 mg/endosperma. Para verificar a possível existência de diferenças entre as médias de peso seco desses endospermas nos seis grupos de espigas, efetuou-se uma análise de variância seguida de um teste de Tukey. Esse teste revelou que para os ti-

TABELA III: Porcentagem média¹ de sementes com endosperma normal e os respectivos desvios padrões (D.P.), nos sete grupos de espigas utilizadas para os estudos de matéria seca, umidade e proteínas.

Grupo de espiga	Endospermas normais	
	Média %	D.P.
I	98,7	0,61
II	71,7	2,06
III	51,8	2,81
IV	23,9	2,26
V	7,9	1,10
VI	4,3	0,62
VII	0	0

¹Os valores representam a média de seis espigas

pos *sugary opaque-2* não há diferenças entre médias, indicando que o acúmulo de matéria seca nos endospermas mutantes não foi influenciado pela presença de frequências variadas de endospermas normais na espiga.

Por outro lado, as médias de peso seco dos endospermas normais mostraram maior variabilidade entre grupos que as do tipo *sugary opaque-2*, apresentando valores de 184,0 a 250,9 mg/endosperma (tabela IV). O teste de Tukey mostrou que os endospermas normais das espigas do grupo I apresentaram peso seco menor que os das espigas dos grupos II, III e V. O peso seco dos endospermas normais do grupo I, entretanto, não foi significativamente diferente dos normais das espigas dos grupos IV e VI. Isso mostra que o acúmulo de matéria seca nos endospermas normais de espigas quase puras (grupo I) foi praticamente igual ao das espigas que contêm poucos endospermas normais (grupo VI, com 4,3%) e ao das espigas do grupo IV com 23,9% de normais. Os endospermas normais das espigas do grupo I, por outro lado, tiveram peso seco diferente dos endospermas das espigas do grupo V, que apresenta porcentagens de endospermas normais intermediárias entre os grupos IV e VI. A falta de associação entre proporções genotípicas e peso seco de endospermas revelou que as diferenças de peso seco, registradas entre endospermas normais nos seis grupos de espigas, não podem ser atribuídas ao efeito

TABELA IV: Médias de peso seco dos endospermas *sugary opa - que-2 (suo2)* e normal, e médias do valor relativo do peso seco desses dois endospermas em uma mesma espiga¹.

Grupo de espiga	Peso seco (mg/endosperma)		
	<i>suo2</i>	normal	<i>suo2</i> /normal
I	—	184,0 b ²	—
II	163,4 a	242,3 a	0,673 a
III	173,9 a	250,9 a	0,694 a
IV	158,5 a	233,9 ab	0,680 a
V	162,7 a	245,5 a	0,664 a
VI	169,3 a	234,2 ab	0,725 a
VII	170,2 a	—	—
Média ³	166,3	231,8	0,687
C.V. (%) ³	14,1	16,1	9,5

¹Os valores representam a média de seis espigas.

²Os valores com a mesma letra dentro de uma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

³Os valores são relativos a todas as espigas estudadas.

das várias proporções de endospermas *sugary opaque-2* estudadas.

Uma análise mais precisa desses efeitos pode ser realizada, comparando-se valores relativos do peso seco de endospermas *sugary opaque-2* e normais de uma mesma espiga, nos diferentes grupos segregantes. Com isso elimina-se variações decorrentes do efeito entre plantas. Esse índice relativo, aparentemente atendeu as expectativas, uma vez que o coeficiente de variação foi reduzido de 14,1 e 16,1% para 9,5% (tabela IV). As médias nos cinco grupos segregantes variaram de 0,664 a 0,725. A análise de variância revelou que essas médias não são diferentes entre si. Ficou assim demonstrado que a quantidade de matéria seca de qualquer um dos dois tipos de endosperma não é influenciada pela presença, na mesma espiga, de uma quantidade maior ou menor de endospermas com outro genótipo, em proporções que induzem a formação de diferentes fontes de consumo. Assim, ambos os endospermas, normal e mutante, devem apresentar um mesmo padrão de acúmulo de matéria seca, independente das diversas intensidades de fluxo de nutrientes que devem ter ocorrido nos vasos do pendúculo das espigas estudadas.

A redução média de 31,3% de peso seco apresentada pelos endospermas *sugary opaque-2* em relação aos normais, deve ser atribuída, principalmente, à presença do gene *sugary*, embora o gene *opaque-2* também cause um menor acúmulo de matéria se

ca no endosperma (DALBY e TSAI, 1975; MURPHY e DALBY, 1971 ; TSAI *et al.*, 1978). O gene *sugary* condiciona maior redução de peso seco, uma vez que ele diminui em mais de 50% a síntese de amido (CREECH 1965; CREECH e McARDLE, 1966; HOLDER *et al.*, 1978).

De maneira semelhante à quantidade de matéria seca acumulada aos 51 DAP, os endospermas normal e mutante mostraram-se bastante distintos, nesse estágio, quanto à porcentagem de umidade (Tabela V). Os endospermas mutantes tiveram uma porcentagem média de 30,0% e os normais de 23,1%. A comparação entre os dois tipos de endosperma numa mesma espiga mostrou que os endospermas normais apresentam em média uma porcentagem de água 20,4% menor que os mutantes. Trabalhos anteriores com o mesmo mutante mostraram que esses endospermas apresentam uma porcentagem maior de umidade desde o estágio de milho leitose até a maturação fisiológica (SILVA *et al.*, 1978). A maior quantidade de água durante esse período parece estar associada ao maior conteúdo de açúcares solúveis e de certos minerais desses endospermas (ARRUDA e SILVA, 1979).

Tabela V

As médias das porcentagens de umidade dos endospermas mutantes, nas espigas dos tipos II e VII, variaram de 29,0 a 31,3%. O teste de Tukey indicou que essas médias não diferem

TABELA V: Porcentagem de umidade nos endospermas *sugary opaque-2 (suo2)* e normal, e valor relativo entre a porcentagem de umidade nos dois endospermas de uma mesma espiga¹.

Grupo de espigas	Porcentagem de umidade		
	<i>suo2</i>	normal	normal/ <i>suo2</i>
I	—	20,5 a ²	—
II	29,3 a	23,0 a	0,795 a
III	29,8 a	24,9 a	0,838 a
IV	30,2 a	22,5 a	0,746 a
V	30,7 a	24,2 a	0,799 a
VI	29,0 a	23,3 a	0,803 a
VII	31,3 a	—	—
Média ³	30,0	23,1	0,796
C.V. (%) ³	15,2	14,5	9,7

¹Os valores representam a média de seis espigas.

²Os valores com a mesma letra dentro de uma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

³Os valores são relativos a todas as espigas estudadas.

entre si, mostrando que a unidade desses endospermas não foi influenciada pela presença ou quantidade de endospermas normais na mesma espiga. A quantidade de água dos endospermas normais também não sofreu interferências de frequências variadas de endospermas *sugary opaque-2*, já que as médias das porcentagens de água nos endospermas normais das espigas dos tipos I a VI não foram estatisticamente diferentes. A análise comparativa dos endospermas mutante e normal na mesma espiga, através do valor relativo das porcentagens de umidade, mostra também, que esse índice não é alterado nos diferentes grupos segregantes. Aqui também, o valor relativo parece ser mais adequado para a comparação dos grupos segregantes, uma vez que houve uma redução nos coeficientes de variação de 14,5 e 15,2% para 9,7%.

3.3 - Nitrogênio total nos endospermas

As porcentagens de nitrogênio total nos endospermas dos seis grupos de espigas são apresentadas na tabela VI. Em milho, a quantidade aproximada de proteína pode ser obtida multiplicando-se a quantidade de nitrogênio pelo fator 6,25.

A porcentagem média de nitrogênio total dos endospermas *sugary opaque-2*, nos cinco grupos de espigas, mostrou valores de 1,4 e 1,6%. Os endospermas normais apresentaram teores de nitrogênio que variaram de 1,3 a 1,7%. Essas médias não diferem

entre si, pelo teste de Tukey, indicando que tanto os endospermas normais, como os mutantes, apresentaram a mesma porcentagem de nitrogênio quando se acham em espigas puras ou em diferentes tipos de espigas segregantes.

Ao contrário das duas características estudadas até agora, peso seco e porcentagem de umidade, os endospermas normais e *sugary opaque-2* não diferiram quanto às porcentagens de nitrogênio, com ambos revelando um teor médio de 1,5%. Ocorreu entretanto, maior variação nos endospermas do tipo normal, revelada pelo coeficiente de variação de 19,3% contra 13,3% nos duplos mutantes. Trabalhos realizados por outros pesquisadores, com o fator *opaque-2* em linhagens quase-isogênicas, mostram que esse gene condiciona uma redução na porcentagem de proteína do endosperma (BARBOSA e GLOVER, 1978; NELSON 1967). Entretanto, os duplos mutantes resultantes da combinação do gene *opaque-2* com os genes que reduzem a síntese de amido, apresentam geralmente porcentagem de proteína maior que o *opaque-2*, e aproximadamente igual à dos tipos normais (BARBOSA e GLOVER, 1978; MISRA *et al.*, 1975b). Os resultados aqui obtidos, em endospermas *sugary opaque-2* e normal confirmam portanto, as observações desses autores com outros duplos mutantes.

TABELA VI: Porcentagem de nitrogênio total nos endospermas *sugary opaque-2* (*suo2*) e normal, e valor relativo das quantidades de nitrogênio nos dois tipos de endosperma de uma mesma espiga¹

Grupo de espigas	Nitrogênio		
	Porcentagem		mg/endosperma
	<i>suo2</i>	normal	<i>suo2</i> /normal
I	—	1,3 a ²	—
II	1,6 a	1,6 a	0,679 a
III	1,4 a	1,5 a	0,664 a
IV	1,6 a	1,7 a	0,637 a
V	1,4 a	1,4 a	0,677 a
VII	1,4 a	—	—
Média ³	1,5	1,5	0,664
C.V. (%) ³	13,3	19,3	11,7

¹ Os valores representam média de seis espigas

² Os valores com a mesma letra dentro de uma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

³ Os valores são relativos a todas as espigas estudadas.

Quando se considera a quantidade de nitrogênio em mg/endosperma e analisa-se a relação entre as quantidades presentes nos endospermas mutante e normal de uma mesma espiga, observa-se que ela é praticamente constante nos quatros grupos de espigas segregantes, variando de 0,637 (grupo IV) a 0,679 (grupo II). A média desses valores nas 24 espigas segregantes foi de 0,664 e o coeficiente de variação de 11,7%. Essa redução média de 33,6% na quantidade de nitrogênio dos endospermas mutantes é semelhante à redução de peso seco (31,3%), apresentada nesses endospermas. A quantidade de nitrogênio acha-se, portanto, intimamente associada com acúmulo de matéria seca no endosperma, fato esse já demonstrado por TSAI *et al.*, (1978) e ARRUDA e SILVA (1979). O coeficiente de correlação entre peso seco e quantidade de nitrogênio (mg/endosperma) foi de 0,80 para os endospermas normais, e de 0,83 para os endospermas *sugary opaque-2* nas 30 espigas analisadas. Esses valores, obtidos com a aplicação de 80 kg de N/ha, são semelhantes ao coeficiente de 0,87 encontrado por TSAI *et al.*, (1978) em linhagens e híbridos de milho normal, adubados com 223 kg de N/ha.

3.4 - Proteínas no endosperma

A quantidade de zeína nos endospermas normais e *sugary opaque-2*, nos vários grupos de espigas, é apresentada na ta-

bela VII. Observa-se que os endospermas normais tiveram uma porcentagem média de zeína de 41,4%, e um coeficiente de variação de 16,7% equivalente aos das outras características analisadas anteriormente. Aparentemente não houve também diferenças significativas entre as porcentagens de zeína nos endospermas normais nos cinco grupos de espigas, o que indica que proporções menores ou maiores de endospermas *sugary opaque-2* não afetam o acúmulo de zeína nos endospermas normais.

Tabela VII

A zeína nos endospermas *sugary opaque-2* apresentou uma porcentagem média de 7,7% e um coeficiente de variação de 47,4% indicando que a variabilidade para zeína no endosperma *sugary opaque-2* é bem maior que a observada para o tipo normal. As médias das porcentagens de zeína, nos endospermas mutantes nos cinco grupos de espigas, também não foram estatisticamente diferentes. Isso demonstra que a presença de endospermas normais, de alta síntese de zeína, em proporções distintas na mesma espiga, parece não afetar a síntese de zeína no endosperma mutante.

As relações entre as quantidades de zeína (mg/endosperma) dos endospermas mutante e normal, de uma mesma espiga, não diferiram entre si nos quatro grupos de espigas segregantes, embora tenham variado de 0,085 a 0,179. A semelhança desses valo -

TABELA VII - Porcentagem de zeína nos endospermas *sugary opaque-2* (*suoz*) e normal, e valor relativo entre a quantidade de zeína nos dois tipos de endosperma de uma mesma espiga¹.

Grupo de espigas	Zeína		
	Porcentagem do N total		mg/endosperma
	<i>suoz</i>	normal	<i>suoz</i> /normal
I	—	37,0 a ²	—
II	8,9 a	44,9 a	0,179 a
III	7,9 a	41,2 a	0,125 a
IV	6,2 a	44,4 a	0,085 a
V	5,8 a	39,4 a	0,110 a
VII	9,9 a	—	—
Média ³	7,7	41,4	0,112
C.V. (%) ³	47,4	16,7	56,8

¹ Os valores representam média de seis espigas

² Os valores com a mesma letra dentro de uma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

³ Os valores são relativos a todas as espigas estudadas.

res relativos reforça a conclusão de que em espigas segregantes, os endospermas normais e mutantes, em proporções variadas, não interferem entre si, quanto a síntese de zeína no endosperma. A comparação do valor relativo para a quantidade de zeína no endosperma mostra a grande redução da síntese de zeína no endosperma *sugary opaque-2*, embora tenha se constatado um coeficiente de variação de 56,8%. Os endospermas mutantes apresentaram em média 11,2% da quantidade presente nos endospermas normais.

Como as diferenças na composição proteica dos endospermas normais e *sugary opaque-2* na maturação completa residem principalmente na quantidade de zeína (ARRUDA *et al.*, 1978; MISRA *et al.*, 1975b), poder-se-ia esperar que, havendo alterações nas proteínas dos endospermas em espigas segregantes, a zeína seria a fração mais afetada. Além disso, como tem sido demonstrado, qualquer alteração no nitrogênio das sementes, quer através de seleção ou aplicação de fertilizantes, reflete-se principalmente em mudança na quantidade de zeína (FREY *et al.*, 1949; KEENEY, 1970; SAUBERLICH *et al.*, 1953; TSAI *et al.*, 1978). Nos endospermas analisados observou-se também uma forte associação entre as quantidades de nitrogênio e de zeína (mg/endosperma), que revelou um coeficiente de correlação de 0,97 para os endospermas normais e 0,79 para os endospermas *sugary opaque-2*.

Apesar de não ter sido constatada interferência de um genótipo em outro para a síntese de zeína, verificou-se também se

a síntese das outras proteínas no endosperma mutante poderia ser afetada pelas diferentes proporções de endospermas normais, em espigas segregantes. Para tanto, foram fracionadas as proteínas dos endospermas *sugary opaque-2* em dois grupos de espigas segregantes. Foram escolhidos os grupos II e V, por apresentarem nas espigas proporções extremas de endospermas normais, isto é, 71,7 e 7,9%, respectivamente.

A semelhança do que ocorreu com a zeína, as porcentagens das outras proteínas do endosperma *sugary opaque-2* não foram estatisticamente diferentes nos grupos II e V (tabela VIII). Zeína e glutelina-1 foram as frações proteicas existentes em menor quantidade, com porcentagens médias de 8,9 e 5,8% e 8,1 e 6,6%, respectivamente, nos grupos II e V. A glutelina-3 correspondeu à maior fração, apresentando valores médios de 36,1 e 32,5, nos grupos II e V respectivamente. A glutelina-2 apresentou uma quantidade intermediária entre as glutelinas 1 e 3. Os teores dessas frações estão dentro da faixa obtida por MISRA *et al.*, (1975_b), com duplos mutantes de *opaque-2* e de genes que reduzem a síntese de amido. A quantidade de nitrogênio do resíduo foi relativamente alta, com valores de 9,5 e 10,6%. O método de LANDRY-MOUREAUX (1970) apresenta uma extração da ordem de 95% em endosperma normais. Entretanto, como pode-se observar no trabalho de MISRA *et al.*, (1975_b) os mutantes que reduzem a síntese de amido e os duplos mutantes, resultantes

TABELA VIII: Distribuição de nitrogênio nas frações proteicas de endospermas *sugary opaque-2*, nos grupos segregantes II e V.¹

Fração ²	Grupo de espigas	
	II	V
Aminoácidos livres	12,3 a ³	18,1 b
Albuminas e globulinas	10,8 a	13,3 a
Zeína	8,9 a	5,8 a
Glutelina-1	8,1 a	6,6 a
Glutelina-2	14,1 a	12,9 a
Glutelina-3	36,1 a	32,5 a
Resíduo	9,5 a	10,6 a

¹Os valores representam média de seis espigas.

²Porcentagem do nitrogênio total.

³Os valores com a mesma letra dentro de uma mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

da combinação desses genes com o *opaque-2*, apresentam uma porcentagem menor de extração do que o normal, ao redor de 90%.

O endosperma *sugary opaque-2* difere, ainda, do normal por apresentar maiores quantidades de aminoácidos livres (ARRUDA *et al.*., 1978; MISRA *et al.*., 1975c). As quantidades de aminoácidos livres foram relativamente elevadas nos endospermas *sugary opaque-2*, nos dois grupos de espigas, com o grupo II apresentando em média 12,3% e o grupo V, 18,1%. Essas porcentagens sendo estatisticamente diferentes, indicam que a maior quantidade de endospermas normais presentes no grupo II afetou a quantidade de aminoácidos livres acumulados no endosperma mutante. O endosperma mutante, em espigas desse grupo, apresentou uma quantidade de aminoácidos livres mais próxima daquela que é encontrada comumente nos endospermas normais. Entretanto essa diferença representa apenas 5,8% do total de nitrogênio do endosperma. Além disso esse pequeno efeito é aparentemente diluído nas várias frações proteicas dos endospermas *sugary opaque-2*, uma vez que não ocorreram diferenças para proteínas nos grupos II e V. Portanto, a alteração ocorrida apenas para os aminoácidos livres, como consequência da maior quantidade de endospermas normais na espiga, tem efeito desprezível, insuficiente para influir na composição proteica de endospermas mutantes em espigas segregantes.

4. CONCLUSÃO

A produção de diferentes proporções de endospermas normal e *sugary opaque-2* em espigas segregantes, com formação de um gradiente de fonte de consumo, parece não afetar o peso seco, a porcentagem de umidade, a porcentagem de nitrogênio total e a porcentagem de zeína nos dois tipos de endospermas. Essas características permaneceram inalteradas no endosperma normal e no endosperma *sugary opaque-2*, de sementes provenientes de espigas segregantes com cinco proporções genotípicas bem distintas. Esses resultados indicam que os diferentes fluxos de nutrientes gerados nas espigas segregantes, não interferem no acúmulo de matéria seca, de zeína e de nitrogênio total não só no endosperma duplo mutante, como também no endosperma normal.

As outras frações proteicas do endosperma *sugary*

opaque-2, à semelhança da zeína, também não são afetadas por diferentes proporções de endospermas normais na espiga. A quantidade de aminoácidos livres do endospermas duplo mutante, embora pareça ter sido influenciada pela quantidade de endospermas normais na espiga, revelou diferenças equivalentes a apenas 5,8% do total do nitrogênio no endosperma.

Os resultados obtidos indicam a alta viabilidade de estudos comparativos do efeito de genes *sugary* e *opaque-2* em espigas segregantes de plantas mutantes.

5. RESUMO

Sete tipos de espigas segregantes, com proporções distintas de endospermas do duplo mutante *sugary opaque-2* e do tipo normal, foram produzidas artificialmente para investigar se as diferentes fontes de consumo geradas poderiam alterar características físicas e conteúdo de proteínas dos dois tipos de endospermas estudados. As espigas segregantes foram obtidas através da polinização de plantas *sugary opaque-2*, com sete diferentes misturas de pólen, preparadas com base no volume dos micrôsporos. Os endospermas foram analisados na maturação fisiológica, em seis espigas individuais de cada grupo segregante.

A quantidade de matéria seca (mg/endosperma), a porcentagem de umidade, a porcentagem de nitrogênio total e a porcentagem de zeína não foram alteradas nos diferentes grupos segregantes, tanto nos endospermas normais, como nos endospermas *sugary opaque-2*. Esses resulta -

dos demonstram que o acúmulo de matéria seca, de nitrogênio total e de zeína nos endospermas *sugary opaque-2* e normal não foram influenciados pelos diferentes fluxos de nutrientes gerados nos grupos segregantes.

As outras frações proteicas de Landry-Moureaux nos endospermas *sugary opaque-2*, à semelhança da zeína, não se mostraram diferentes em dois grupos segregantes distintos com 71,7 e 7,9% de endospermas normais. A quantidade de aminoácidos livres, apesar de ter sido estatisticamente menor no grupo com proporção de 71,7% de endospermas normais, revelou uma pequena diferença equivalente a 5,8% do total do nitrogênio no endosperma.

Os resultados obtidos indicam a alta viabilidade de estudos comparativos do efeito de gene *sugary* e *opaque-2* em espigas segregantes de plantas mutantes.

6. SUMMARY

Seven groups of segregating ears with different normal to *sugary opaque-2* endosperm ratios were produced artificially to see whether the different sink effects of the two maize types could influence each other in terms of physical or protein characteristics when developing side-by-side on the same ear. The segregating ears were produced after pollination of *sugary opaque-2* plants using different pollen mixtures of normal and *sugary opaque-2* pollen grains based on volume of microspores. Endosperms were analysed at maturity from six individual ears in each of the seven segregating groups.

Dry Matter accumulation (mg/endosperm), moisture percentage, total nitrogen percentage, and zein percentage were studied. These traits were not altered in both normal and *sugary opaque-2* endosperms of the several segregating groups.

The results demonstrate that dry matter, total nitrogen and zein accumulation in normal and *sugary opaque-2* endosperms are not affected by different levels of nutrients taken into the segregating ears.

The Landry-Moureaux fractions in the *sugary opaque-2* endosperms also showed no difference between the two segregating groups containing 71.7 and 7.9% of normal endosperms. The amount of free amino acid, though statistically lower in the group with 71.7% of normal endosperms, showed small difference corresponding to 5.8% of total endosperm nitrogen.

These results indicate that the use of segregating ears is highly appropriated for comparative studies of *sugary* and *opaque-2* genes effects.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, P. e SILVA, W.J. 1979. Relationship among endosperm characteristics of normal e *sugary opaque - 2* kernels during maturity. *J. Agric. Food Chem.* (in press).
- ARRUDA, P. ; SILVA, W.J. e TEIXEIRA, J.P.F. 1978 Protein and free amino acids in a high lysine maize double mutant *Phytochemistry*, 17: 1217-1218.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. 1965. Official methods of analysis. Ed. 10. Washington, D. C. pp - 744 - 745.
- AYERS, J. E. e CREECH, R. G. 1969. Genetic control of phyto_glycogen accumulation in maize (*Zea mays L.*) *Crop. Sci.* 9: 739-741.
- BARBOSA, H. M. e GLOVER, D. V. 1978. Genes and gene interactions affecting protein and lysine content in the endosperm of maize. *Rev. Bras. Genet.*, 1: 29 - 39.
- CREECH, R. G. 1965. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. *Genetics*, 52: 1175-1186.

- CREECH, R.G. e Mc ARDLE, L.J. 1966. Gene interaction of quantitative changes in carbohydrates in maize kernels. *Crop Sci.*, 6: 192 . 194.
- CREECH, R.G.; Mc ARDLE, L.J. e KRAMER, H.H. 1963. Genetic / control of carbohydrate type and quality in maize kernels. *Maize Genet. Coop. Newsl.*, 37: 111-120 .
- DALBY, A. e TSAI, C.Y. 1975. Comparisons of lysine and zein and nanzein protein contents in immature and mature maize endosperm mutants. *Crop. Sci.*, 15: 513 - 515.
- DVONCH, W.; KRAMER, H.H. e WHISTLER, R.L. 1951. Polysaccharides of high-amylose corn. *Cereal Chem.*, 28: 270-280.
- EARLEY, E.B. 1952. Percentage of carbohydrates in kernels of station reid yellow dent corn at several stages of development. *Plant Physiol.*, 27: 184-190.
- FREY, K.J.; BRIMHALL, B. e SPRAGUE, G.F. 1949. The effects of selection upon protein quality in the corn kernel. *Agron. J.* 41: 339-403 .
- GIANAZZA, E.; RIGHETTI, P.G.; PIOLI, F.; GALANTE, E. e SOAVE, C. 1976. Size and charge heterogeneity of zein in normal and *opaque-2* maize endosperms. *Maydica*, 21: 1-17.
- GIANAZZA, E.; VIGLIENGHI, V.; RIGHETTI, P.G.; SALAMINI, F. e SOAVE, C. 1977. Amino acid composition of zein molecular components. *Phytochemistry*. 16: 315-317.

- HOLDER, D.G.; GLOVER, D.V. e SHANNON, J.C. 1974. Interaction of *shrunken-2* with five other carbohydrate genes in corn endosperm. *Crop Sci.*, 14: 643-646.
- INGLE, J.; BEITZ, D. e HAYEMAN, R.H. 1965. Changes in composition during development and maturation of maize seeds. *Plant Physiol.*, 40: 835-839.
- JENNINGS, P.H. e Mc COMBS, C.L. 1969. Effect of *sugary-1* and *shrunken-2* loci on kernel carbohydrate contents, phosphorylase and branching enzyme activities during maize kernel ontogeny. *Phytochemistry*, 8: 1357-1363.
- JOHNSON, V.A. e LAY, C.L. 1974. Genetic improvement of plant protein. *J. Agric. Food Chem.*, 22: 558-566.
- KEENEY, D.R. 1970. Protein and amino acid composition of maize grain as influenced by variety and fertility. *J. Sci. Food Agric.*, 21: 182-184.
- KRAMER, H.H. e WHISTLER, R.L. 1949. Quantitative effects of certain genes on the amylose content of the corn endosperm starch. *Agron. J.*, 41: 409-411.
- KRAMER, H.H.; BEAR, R.P. e ZUBER, M.S. 1958. Designation of high amylose gene loci in maize. *Agron. J.* 50:299.

- LANDRY, J. e MOUREAUX, T. 1970. Hétérogénéité des glutélines du grain de Maïs: extraction sélective et composition en acides aminés des trois fractions isolées. *Bull. Soc. Chim. 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. Genet.*, 14: 641-650.
- MA, Y. e NELSON, O.E. 1975. Amino acid composition and storage proteins in two new high-lysine mutants in maize. *Cereal Chem.*, 52: 412-419.
- Mc WHIRTER, K.S. 1971. A floury endosperm, high lysine locus on chromosome 10. *Maize Genet. Coop. Newsl.* 45: 184.
- MERTZ, E.T.; BATES, L.S. e NELSON, O.E. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. *Science*, 145: 279 - 300.
- MIRANDA, L.T. de. 1972. A característica "latência" do milho (*Zea mays* L.) e suas possibilidades no melhoramento. Esc. Sup. Agric. "Luis de Queiroz". Piracicaba.

- 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.
- MISRA, P.S.; MERTZ, E.T. e GLOVER, D.V. 1975b. Characteristics of protein in single and double endosperm mutants of maize. High Quality Protein Maize, p. 291-305. Dowden, Hutchinson and Ross, Inc., Stroudsburg. Penn.
- MISRA, P.S.; MERTZ, E.T. e GLOVER, D.V. 1975c. Studies on corn proteins. VIII. Free amino acid content of *opaque-2* double mutants. *Cereal Chem.*, 52: 844-848.
- MISRA, P.S.; MERTZ, E.T. e GLOVER, D.V. 1976. Studies on corn proteins. X. Polypeptide molecular - weight distribution in Landry-Moureaux fractions of normal and mutants endosperms. *Cereal Chem.* 53: 705-711.
- MISRA, P.S.; JAMBUNATHAN, R.; MERTZ, E.T.; GLOVER, D.V. ; BARBOSA, H.M. e Mc WHIRTER, K.S. 1972. Endosperm protein synthesis in maize mutants with increased lysine content. *Science*, 176: 1425-1426.
- MOSSÉ, 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.
Ann. Physiol. Vég. 8: 331-334.
- MOUREAUX, T.; BAUDET, J. e MOSSÉ, J. 1966. Fractionnement des albumines du Mais par chromatographie sur Sephadex. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 262: 1710-1713.
- 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.
- NELSON, O.E. 1967. A mutant gene affecting protein synthesis in the maize endosperm. *Genetics Agraria*, 21: 209-230.
- NELSON, O. E.; MERTZ, E.T. e BATES, L.S. 1965. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. *Science*, 150: 1469-1470.
- PAULIS, J.W. e WALL, J.S. 1969. Albumins and globulins in extracts of corn grain parts. *Cereal Chem.*, 46: 262-273.
- PAULIS, J.W.; BIETZ, J.A e WALL, J.S. 1975. Corn protein subunits: Molecular weights determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Agr. Food Chem.*, 23: 197-201.

- POMMER, C.V. 1976. Seleção entre e dentro de famílias de meios irmãos para produção e qualidade proteica em duas populações de milho (*Zea mays L.*) *opaque-2*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.
- RIGHETTI, P.G.; GIANAZZA, E.; VIOTTI, A. e SOAVE, C. - 1977. Heterogeneity of storage proteins in maize. *Planta*, 176: 115-123.
- SAUBERLICH, H.E.; CHANG, W.Y. e SALMON, W.D. 1953. - The amino acid and protein content of corn as related to variety and nitrogen fertilization. *J. Nutr.*, 51: 241-250.
- SILVA, W.J.; TEIXEIRA, J.P.F.; ARRUDA, P. e LOVATO, M. B. 1978. Nutrimaiz e tropical sweet maize cultivar of high nutritional value. *Maydica*, 23: 129-136.
- SOAVE, C.; PIOLI, F.; VIOTTI, A.; SALAMINI, F. e RIGHETTI, P.G. 1975. Synthesis and heterogeneity of endosperm proteins in normal and *opaque-2* maize. *Maydica*, 20: 83-94.
- SODEK, L. e WILSON, C.M. 1971. Amino acid composition of proteins isolated from normal, *opaque-2* and *floury-2* corn endosperm by a modified Osborne procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 19: 1144-1150.

- SPRAGUE, G. F. 1977. Corn and corn improvement. 2^a edição .
American Society of Agronomy, Inc., Publisher Madison ,
Wisconsin, USA 770 p. .
- SPRAGUE, G. F. ; BRIMHALL, B. e HIXON, R. M. 1943. Some
effects of the waxy gene in corn on properties of the
endosperm starch. *Agron. J.*, 35: 817-822.
- TSAI, G.Y. e DALBY, A. 1974. - Comparison of the effect of
shrunk-4, opaque-2, opaque-7 and floury-2 genes on the
zein content of maize during endosperm development. *Ce-
real Chem.*, 51: 835-829.
- TSAI, C. Y. ; HUBER, D. M. e WARREN, H. L. 1978. Relation -
ship of the kernel sink for N to maize productivity, *Crop.
Sci.*, 18: 399-404.
- TSAI, C.Y. ; SALAMINI, F. e NELSON , O. E. 1970. Enzymes of carbo
hydrate metabolism in the developing endosperm of maize.
Plant Physiol., 46: 299-306 .
- VINEYARD, M. L. e BEAR, R. P. 1952. Amylose content. *Maize
Genet. Coop. Newsl.*, 26: 5.