

ANA MARIA MONTEIRO

ESTUDOS DO CRESCIMENTO INICIAL E UTILIZAÇÃO
DAS RESERVAS EM *Zea mays* L. cv. MAYA:
INFLUÊNCIA DO GENE OPACO-2
E HORMÔNIOS VEGETAIS

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Departamento de
Fisiologia Vegetal do
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas.

CAMPINAS
Estado de São Paulo
1980

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Jacques Robert Metivier, ^{at} cuja orientação, auxílio e estímulo constantes permitiram a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários e estagiários do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP que de um modo ou outro colaboraram na realização deste trabalho.

Ao Dr. William José da Silva, do Departamento de Genética da UNICAMP pelo fornecimento dos grãos de milho utilizados.

Ao Dr. Ladslav Sodek, pela orientação nos estudos da atividade das transaminases realizados neste trabalho.

Ao Dr. Gil Martins Felipe, pela colaboração na organização final deste trabalho.

Í N D I C E

	Pág.
<u>INTRODUÇÃO</u> -----	1
I - RESERVAS -----	3
1. Proteínas -----	4
2. Carboidratos -----	10
II- ENZIMAS HIDROLÍTICAS -----	12
1. Amilases -----	12
2. Proteases -----	14
III- MOBILIZAÇÃO DAS RESERVAS -----	15
IV- CONTROLE HORMONAL -----	21
 MATERIAL E MÉTODOS	
I - MATERIAL -----	30
II- MÉTODOS GERAIS -----	30
III- MÉTODOS ANALÍTICOS	
1. Comprimento, largura e área da lâmina foliar -----	32
2. Peso fresco -----	32
3. Peso seco -----	32
4. Preparação de farinhas -----	32
5. Extração e dosagem de proteínas -----	33
6. Fracionamento sequencial das proteínas do endosperma -----	34
7. Dosagem de açúcar -----	37
8. Ensaio enzimáticos -----	37
a) Atividade amilolítica -----	37
b) Atividade proteolítica -----	38
c) Atividade de transaminases -----	38
9. Análise estatística -----	41

	Pág.
<u>RESULTADOS</u>	
I - CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL -----	42
II - CRESCIMENTO INICIAL E UTILIZAÇÃO DAS RESERVAS -----	73
III- ATIVIDADE AMIOLÍTICA E PROTEOLÍTICA DURANTE O CRESCIMENTO INICIAL E O E- FEITO DE REGULADORES DO CRESCIMENTO -----	123
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES -----	197
RESUMO -----	219
SUMMARY -----	222
BIBLIOGRAFIA -----	225

* * * *

INTRODUÇÃO

O grão dos cereais durante a maturação acumula reservas que serão utilizadas na fase inicial do crescimento da plântula. Nesta fase, a plântula depende totalmente destas reservas para sua nutrição pois a germinação de cereais é hipógea e a planta só se tornará autotrófica após o desenvolvimento da lâmina da primeira folha. Assim as reservas, principalmente do endosperma, são as únicas fontes de energia e nutrição durante a fase do estabelecimento da plântula. Nas gramíneas, o único cotilédone, representado pelo escutelo, é um órgão especializado na absorção e metabolismo dos vários produtos da degradação enzimática da reserva do endosperma e na transferência destes para o eixo embrionário.

Após a reativação das atividades metabólicas da semente, que ocorre com a hidratação dos tecidos durante a embebição, várias enzimas hidrolíticas são ativadas, liberadas ou sintetizadas e estas serão responsáveis pela degradação das reservas. O controle deste processo foi bem estudado em cereais, principalmente em cevada, por causa de sua importância econômica na produção de malte para fabricação de cerveja. Nesta espécie foi estabelecido que as giberelinas, hormônios provenientes do embrião durante a germinação, agem como reguladoras da degradação, através da síntese, ativação e liberação de hidrolases da aleurona, camada de células vivas que circunda o endosperma. Mais re-

centemente, outras pesquisas neste campo, feitas com diferentes cereais, mostraram que este modelo não pode ser generalizado. Assim, em alguns deles, como aveia, o embrião não é absolutamente necessário para a degradação das reservas, enquanto que em outros, como o trigo, parece que outros hormônios, como as citocininas, estão também envolvidos. No caso de milho a regulação da hidrólise das reservas foi investigada por diversos pesquisadores, mas resultados conflitantes aparecem na literatura.

O alto conteúdo de reservas do grão de milho confere-lhe uma grande importância nutricional e econômica, sendo considerado mundialmente o terceiro cereal após o trigo e o arroz (Glover, 1976; Bressani, Urrutia e Elias, 1976). Estas reservas, embora constituindo importantes fontes de energia pelo seu alto conteúdo de carboidratos, apresentam um baixo conteúdo proteico em relação às leguminosas e uma deficiência em certos aminoácidos essenciais. Assim, a introdução do gene recessivo mutante opaco-2, que aumenta o nível de aminoácidos essenciais podendo também às vezes aumentar o conteúdo proteico total, foi um passo importante no melhoramento desta espécie. Entretanto, o efeito desta mudança radical na composição das reservas da semente sobre o crescimento inicial da própria plântula não foi bem estudado. Desta forma, dentro dos cereais, os mutantes de milho modificados, opaco-2 (op-2) comparados com plantas normais são materiais de especial interesse para o estudo tanto da utilização das reservas durante o crescimento inicial como do controle hormonal da degradação destas.

I - RESERVAS

As reservas de cereais incluem carboidratos, proteínas, lipídios, fosfato orgânico e vários outros componentes inorgânicos necessários para o crescimento do eixo embrionário. Em geral, os carboidratos constituem a maior porcentagem destas reservas sendo que as proteínas e lipídios representam cerca de 10 e 2% respectivamente (Bewlay e Black, 1978). Desta forma, os cereais são alimentos menos completos que as leguminosas como a lentilha, a ervilha e o feijão, cujo conteúdo proteico pode representar 40% do peso da semente. Em arroz por exemplo, a proteína pode constituir somente 5% das reservas (Juliano, Ignacia, Panganiban e Perez, 1968) e mesmo em milho, o conteúdo proteico que normalmente representa cerca de 10% da reserva pode diminuir consideravelmente dependendo das condições regionais de cultura (Urrutia, Garcia, Bressani e Mata, 1976).

A distribuição das reservas dentro do grão é vãriável (Sodek e Wilson, 1973). Em milho, embora o embrião (eixo e escutelo) represente somente 11% do peso seco da semente, seu conteúdo proteico e lipídico é alto quando comparado com o do endosperma que é principalmente constituído por carboidratos, apresentando também pequenas quantidades de lipídios e proteínas na parede de aleurona (Sodek, 1973).

1) Proteínas

As reservas proteicas dos grãos de cereais foram originalmente caracterizadas por Osborne (1895), utilizando suas propriedades diferenciais de solubilidade. Ele descreveu quatro categorias de proteínas que podem ser extraídas sequencialmente em água (albuminas), soluções salinas (globulinas), álcool (prolaminas) e soluções ácidas ou alcalinas (glutelinas). As albuminas e globulinas constituem principalmente as enzimas do grão e são mais abundantes no embrião (eixo e escutelo), enquanto que as prolaminas e glutelinas são geralmente as proteínas de reserva e estruturais do endosperma (Mertz, Lloyd e Bressani, 1958; Paulis e Wall, 1969). Quatro tipos de globulinas, alfa, beta, gama e delta, foram identificadas em cevada. A gama-globulina só ocorre no embrião enquanto que as formas alfa e beta-globulinas só no endosperma (Munck, 1972). As prolaminas receberam esta denominação devido ao alto conteúdo do aminoácido prolina e das amidas: glutamina e asparagina. Devido a alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos e o baixo conteúdo de aminoácidos iônicos as moléculas das prolaminas são apolares e solúveis em álcool, solvente normalmente utilizado para precipitar proteínas. Estas proteínas são restritas, no reino vegetal ao grão de cereais e assim foram denominadas, dependendo da espécie, hordeínas em cevada, kafirinas em sorgo, gliadinas em trigo e zeínas em milho.

O baixo valor nutritivo das proteínas dos grãos de cereais é atribuído à composição das prolaminas, que

possuem um baixo teor de aminoácidos essenciais, particularmente lisina. Entre cereais há variações na composição desta fração. Assim, os grãos de milho e de sorgo são menos completos em termos nutricionais que os de cevada e trigo. A zeína de milho, por exemplo, tem um conteúdo de aminoácidos especialmente baixo em lisina e triptofano comparado com a hordeína de cevada. Por esta razão, a descoberta, dos genes *opaco-2* (*op-2*) e *floury-2* (*fl-2*), que diminuem a síntese de zeína durante o desenvolvimento do grão de milho, foi de grande importância no melhoramento genético desta espécie (Mertz, Bates e Nelson, 1964; Nelson, Mertz e Bates, 1965; Misra, Jambunathan, Mertz, Glover, Barbosa e McWhirter, 1972). Em variedades com os genes *op-2* ou *fl-2* os níveis de lisina, arginina e histidina são aumentados em relação às variedades normais, enquanto que os níveis de serina, glutamina, prolina, alanina, isoleucina, leucina, tirosina e fenilalanina são diminuídos (Munck, 1972). Assim em milho, a variedade *op-2* tem 3,6% do total de aminoácidos sob a forma de lisina, enquanto que a normal tem apenas 1,7%. Em experimentos de nutrição, foi notado que os mutantes de milho *op-2* promovem um aumento no peso dos organismos alimentados com eles, devido ao balanço melhorado dos aminoácidos em relação ao milho normal (Bressani, Alvarado e Viten, 1970). As diferenças entre os mutantes *op-2* e *fl-2* são pequenas, mas o *fl-2* possui níveis mais altos de metionina e ácido aspártico, enquanto que o *op-2* é mais rico em lisina, histidina e arginina.

Os grãos da variedade *op-2* comparados com os

normais são menores e mais leves, com um conteúdo de água maior, o endosperma é farinhento, opaco e quebradiço (Alexander, Lambert e Dudley, 1969).

O gene op-2 não exerce seus efeitos diretamente através de alterações na composição dos aminoácidos da zeína, mas sim mudando a proporção de cada fração proteica, diminuindo a zeína, mas simultaneamente aumentando ligeiramente as outras frações que são mais balanceadas em termos nutricionais. Em estudos mais recentes e detalhados destas frações, mais etapas foram introduzidas ao método de fracionamento original de Osborne, desde que foi observado contaminação entre elas. Assim, Dimler (1966) verificou que as glutelinas extraídas segundo Osborne eram contaminadas com um componente das zeínas, sendo esta contaminação menor na variedade op-2 onde a zeína é radicalmente reduzida. Desde então, vários sistemas de fracionamento foram testados com o intuito de eliminar a contaminação e obter frações mais homogêneas (Nagy, Weidl e Hixon, 1941; Mossé, Baudet, Landry e Moureaux, 1966; Paulis, James e Wall, 1969). Atualmente, o melhor esquema para o fracionamento sequencial de proteínas de milho é o baseado no método de Moureaux e Landry (1968) que reconhece três tipos de glutelinas G1, G2 e G3 (vide Material e Métodos - Tabela 1). Estes autores verificaram que na presença de 2-mercaptoetanol uma nova fração proteica, semelhante a prolamina, com baixos níveis de lisina, era extraída em álcool. Esta fração, denominada pelos autores de glutelina-1 é provavelmente a parte da zeína responsável pela contaminação da glutelina de Os-

borne. Assim, Sodek e Wilson (1971) distinguiram zeína-1 e zeína-2, a segunda sendo uma prolamina muito semelhante à primeira mas com a composição alterada, apresentando níveis mais altos de metionina e glicina e mais baixos de leucina e ácido aspártico. Parece que a maior parte da redução da zeína provocada pelo gene *op-2* é atribuída à diminuição da zeína-1 que, em milho híbrido normal, constitui cerca de 40% da reserva proteica e passa a aproximadamente 20% no *op-2*. Em certas linhagens esta diminuição é muito maior (Sodek e Wilson, 1971).

Foi mostrado, nos estudos de Sodek e Wilson (1971) que os aminoácidos livres presentes na reserva são importante fonte de nitrogênio no milho *op-2*, onde representam 10 a 20% do nitrogênio total, ao contrário do milho normal cuja porcentagem é de apenas 3 a 5%. Estes autores também verificaram que aminoácidos que têm uma via biossintética longa, como a histidina, valina, leucina, fenilalanina e tirosina, estavam presentes em menores quantidades que os relacionados ao metabolismo de carboidratos (glutamina e asparagina) que representam 55% do total. O alto nível de aminoácidos livres encontrado no milho *op-2* poderia ser atribuído à redução da demanda durante a maturação do grão proporcionada pela diminuição da síntese da zeína; este fato também poderia explicar o estímulo da síntese das albuminas e globulinas.

Estas diferenças significantes na composição das reservas proteicas do endosperma do grão seco estimularam pesquisas durante a maturação da espiga. Assim, Sodek e Wilson (1970) mostraram que o milho normal pode converter li

sina em ácido glutâmico e prolina, enquanto que o op-2 só pode fazer isto nas últimas etapas do desenvolvimento.

Foi verificado que há uma atividade muito maior de ribonucleases em milho op-2 que no normal (Dalby e Davies, 1967; Wilson e Alexander, 1967). Assim, Dalby e Cagampang (1970) consideraram o gene op-2 como regulador, controlando a produção de mRNAs específicos para a síntese de zeína, através do aumento na atividade das ribonucleases. Outros autores, sugerem que o gene op-2 afeta o metabolismo básico da planta mas a expressão deste gene é mais manifestada no endosperma. Assim, foi verificado que em folhas jovens de plantas op-2 o nível de ácidos carboxílicos (malato, citrato, succinato e aspartato) é menor que nas de plantas normais, como também o nível de aminoácidos relacionados com o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (treonina, alanina e glutamato) (Munck, 1972).

Durante a maturação dos cereais, as prolaminas são armazenadas em estruturas granulares, os corpos de proteínas. Em trigo estes aparecem ao microscópio eletrônico, embebidos numa matriz proteica constituída de glutelina (Duvick, 1961; Paulis e Wall, 1971). Durante a maturação, prolaminas podem vaziar dos corpos proteicos e se misturam na matriz, dificultando assim a separação destas frações. Em milho e arroz, os corpos proteicos podem ser visualizados ao microscópio óptico apesar de serem menores que os de trigo, que estão completamente imersos na matriz proteica. Entretanto, no milho op-2 os corpos de proteína são menores (0,1 µm de diâmetro) e em menor quantidade que no normal e só podem ser visualizados ao microscópio eletrônico (Wolf,

Khoo e Seckinger, 1967; 1969). Em trigo, grânulos de proteína isolados por uma membrana aparecem, uma semana após a fertilização e permanecem associados aos dictiossomas (Buttrose, 1963). Estes corpos proteicos foram originalmente denominados corpos de aleurona, por serem especialmente abundantes nesta camada de células. Nelson (1970) sugeriu que o conteúdo proteico do milho, poderia ser aumentado, selecionando-se sementes menores, onde a superfície externa, e assim a camada de aleurona, constituiria uma porcentagem relativamente maior do grão. Dechary e Altschul (1966) sugeriram que os corpos proteicos da camada de aleurona poderiam ser chamados de aleurinas para distinguir daqueles do endosperma. Estes, além de conter proteínas, contem também fitina e sua enzima de degradação, fitase, importante no metabolismo do fosfato durante os primeiros passos da germinação. As células da camada de aleurona também contêm lipídios, distribuídos ao redor dos corpos proteicos (Jones, 1969a).

Utilizando microscopia eletrônica, em trigo, Jennings, Morton e Palk (1963) observaram que os corpos proteicos são circundados por uma membrana lipoproteica e seu diâmetro varia de 0,5 a 15 μm enquanto que em cevada e milho este está em torno de 2 μm . Graham, Morton e Raison (1963), obtendo corpos proteicos inteiros, de grãos de trigo durante seu desenvolvimento demonstraram através de eletroforese que as proteínas das bandas obtidas, de deslocamento lento, são equivalentes à gliadina, prolamina do trigo. Em contraste, as proteínas da fração sobrenadante, migram rapidamente e são semelhantes às albuminas e globuli

nas. Christiansson, Nielsen, Khoo, Wolf e Wall (1969) estudando proteínas da reserva de milho notaram que 86 por cento destas estão no interior de vesículas e que a maior parte delas é a prolamina, zeína. O diâmetro destes corpos proteicos varia de 1 a 2 μ m. Khoo e Wolf (1970) acompanhando o desenvolvimento dos corpos proteicos durante a maturação do grão de milho, verificaram que estas vesículas são formadas no retículo endoplasmático e nos dictiossomas. Verificaram também, o acúmulo de polirribossomas próximos aos corpos proteicos, sugerindo assim que as proteínas seriam sintetizadas fora das vesículas e posteriormente transportadas para o interior delas. Corpos de proteína imaturos, comparados com os maduros, apresentam diferenças em relação à sua afinidade cromática, indicando que durante a maturação, as proteínas da reserva mudam suas propriedades químicas (Wolf e Khoo, 1970).

2) Carboidratos

O principal carboidrato da reserva de cereais é o amido, um polissacarídeo, constituído por dois polímeros de glicose, um linear (amilose) e outro ramificado (amilopectina). A proporção destes dois polissacarídeos varia conforme a espécie e variedade da semente. Dure (1960a) observou que no milho normal, 25 por cento do amido está sob a forma de amilose, o restante sendo amilopectina. Estes polissacarídeos estão localizados em corpúsculos subcelulares, os grãos de amido, que podem apresentar formas diferentes dependendo da proporção de amilose e amilopectina. Buttrose (1963) estudando o desenvolvimento do endosperma de trigo,

notou que os grãos de amido foram encontrados somente dentro de plastídeos bem desenvolvidos com pequenos grãos misturados aos maiores, dentro de uma membrana que posteriormente se contrai e quebra liberando os grãos pequenos no citoplasma. Também foram observadas proteínas fibrilares ligadas à superfície dos grãos de amido maiores. Buttrose sugeriu que estas fibrilas seriam resíduos do estroma da antiga membrana dos plastídeos. Geralmente a região central do endosperma de vários cereais, possui grãos de amido firmemente agregados e relativamente poucos corpos proteicos, enquanto que as células mais superficiais (subaleurona) possuem grãos de amido menores e mais corpos de proteínas (Evers, 1970).

Foi observado, que a síntese de amido nos amiloplastos, durante a maturação do grão de milho, termina antes da síntese proteica. Assim, quando o grão atinge 60 por cento de água, a síntese de prolamina se intensifica enquanto que a de amido termina (Munck, 1972).

Recentemente, genes mutantes como sugary-1 (su-1) shrunken-1 (sh-1) e brittle (bt-1) que modificam as propriedades dos carboidratos do grão de milho, foram introduzidos neste cereal juntamente com o gene op-2 (Misra et al., 1972). Os duplos mutantes su-1-op-2 mostram várias características vantajosas, porque além do alto conteúdo de lisina possuem alto nível de açúcares livres que fazem com que o grão fique mais consistente, aumentando a resistência aos insetos e fungos durante o armazenamento e também melhorando as características para moagem. Além disso, o mutante su-1 contém mais lipídeos que o milho normal, devido ao au-

mento no tamanho do escutelo e este gene parece ter um efeito sinérgico com o gene *op-2* diminuindo ainda mais a síntese de zeína (Glover, 1976). O endosperma do milho brasileiro Nutrimaiz, por exemplo, contendo os genes *su-1* e *op-2*, possui seis vezes mais açúcar livre que o endosperma normal e seu conteúdo amiláceo diminui de 50 por cento sendo que 38 por cento desta diminuição é na amilose (Sgarbieri, da Silva, Antunes e Amaya, 1977; da Silva, Teixeira, Arruda e Lovato, 1978). Esta variedade também apresenta sinérgismo entre os genes *su-1* e *op-2*, uma vez que há um aumento do conteúdo de lisina em relação ao mutante *op-2*.

II - ENZIMAS HIDROLÍTICAS

1 - Amilases

A atividade amilolítica em vegetais é conhecida desde o início do século dezenove, quando vários pesquisadores observaram que extratos ativos de cereais, denominados "diastase", tinham a capacidade de degradar amido (Bernfeld, 1951). Mais tarde, foi verificado que as substâncias responsáveis por este fenômeno eram enzimas hidrolíticas, as amilases. Estas enzimas, de acordo com seu modo de ação foram classificadas em endo e exoamilases. O primeiro tipo, incluindo as alfa-amilases, atacam, ao acaso, somente as ligações alfa-1,4 do amido, deixando as ligações alfa-1,6 da amilopectina inalteradas (Fischer e Stein, 1960). Como consequência deste modo de ação, o amido, inicialmente com alto peso molecular, é degradado a pequenos polissacarídeos de

menor peso molecular, degradação esta acompanhada por uma rápida diminuição da viscosidade. No fim da hidrólise completa da amilose, os produtos finais são 13 por cento de glicose e 87 por cento de maltose; no caso da amilopectina tem-se 19 por cento de glicose, 73 por cento de maltose e 8 por cento de isomaltose. O peso molecular da alfa-amilase é aproximadamente 45.000 e em cereais existem várias isoenzimas que podem ser identificadas por eletroforese (Fry - denberg e Nielsen, 1966; Jacobsen et al., 1970). Estas enzimas não são encontradas em sementes secas.

As exoamilases ocorrem exclusivamente em vegetais e incluem as beta-amilases, assim denominadas pois seus produtos sofrem uma inversão da configuração apresentando-se na forma beta (French, 1960). Esta enzima quebra somente a segunda ligação alfa-1,4 do final não redutor da cadeia do polissacarídeo, produzindo moléculas do dissacarídeo, beta-maltose. A beta-amilase é encontrada em sementes secas, como cevada, milho, centeio, aveia, trigo, arroz e também em batata doce e soja (Engel, 1947; Dure, 1960b). Do mesmo modo que as alfa-amilases as beta possuem o peso molecular de aproximadamente 45.000 e existem várias isoenzimas, como também formas diméricas (P.M. 86.000), tetraméricas (P. M. 180.000) e octaméricas (P.M. 400.000) formadas a partir do monômero básico (Stoddart, 1971; Bilderback, 1974). Embora teoricamente a reação destas hidrolases é reversível, o e - quilíbrio da reação é fortemente deslocado para o lado dos produtos da quebra do amido, sendo a reação praticamente irreversível sob condições fisiológicas.

As duas enzimas encontradas em cereais responsã

veis pela desramificação da amilopectina são a R-enzima da cevada, que age diretamente sobre a amilopectina, e a dex - trinase-limite, que é sintetizada de novo na aleurona e age somente sobre as partes que já foram liberadas pelas alfa-amilases (Mac William e Harris, 1959; Manners, Marshall e Yellowlees, 1970). Além destas enzimas hidrolíticas desc^{ri}tas, existem as fosforilases que degradam o amido através da incorporação de fosfato entre as ligações alfa-1,4, mas, com exceção do arroz, elas parecem não ter um papel de grande importância na degradação das reservas de cereais.

2 - Proteases

As proteases são classificadas em exopeptidases que atacam grupos terminais da cadeia polipeptídica e endopeptidases que atacam as ligações peptídicas internas da cadeia. O primeiro grupo pode ser subdividido em carboxi - peptidases e aminopeptidases, dependendo do grupo terminal que atacam (Ashton, 1976). Também existem as dipeptidases, que atacam dipeptídeos e moléculas pequenas e foram conside^{ra}das como aminopeptidases por Mikola e Kolehmainen (1972). As proteases foram encontradas tanto em sementes em germina^ção como nas não germinadas. Sementes secas de cevada, por exemplo, contém várias endopeptidases com atividade ótima em pH entre 3,9 e 9,0; algumas destas enzimas estão presen^{te}s nos corpos proteicos (Ory e Henningsen, 1969). Sundblom e Mikola (1972) observaram quatro tipos diferentes de endopeptidases secretadas pela aleurona de cevada pelo estímulo do ácido giberélico (GA₃) e também com atividade ótima no pH entre 3,9 e 7,0. Em milho, Harvey e Oaks (1974b) obser-

varam que durante a germinação há uma grande produção de polipeptídeos, sugerindo a atividade de endopeptidases; estas enzimas tem um ótimo de atividade no pH 3,8 e tem a mesma afinidade pelos substratos zeína e glutelina.

Vários tipos de exopeptidases também foram extraídos de sementes durante a germinação. Assim, Mikola e Kolehmainen (1972) observaram em cevada, três carboxipeptidases, três aminopeptidases e duas dipeptidases. A parede de aleurona apresenta altos níveis dos três grupos e embora não ocorram mudanças na atividade das cinco aminopeptidases durante a germinação, as carboxipeptidases mostram um aumento em atividade. Os mesmos autores observaram ainda que o endosperma apresenta altos níveis de carboxipeptidases enquanto as aminopeptidases estão completamente ausentes; alta atividade foi encontrada para todas as peptidases no escutelo.

III - MOBILIZAÇÃO DAS RESERVAS

O crescimento inicial de cereais, é caracterizado por uma diminuição do material armazenado no endosperma acompanhada pelo crescimento do eixo, sugerindo que a reserva está sendo degradada e utilizada pela plântula. Assim, o conteúdo inicial da reserva da semente, particularmente de proteína que normalmente é baixo em cereais, é importante no desenvolvimento da planta, podendo afetar a fotossíntese e a produção final desta (Lowe, Ayers e Ries, 1972; Lowe e Ries, 1973; Metivier e Dale, 1977a, b; Metivier 1979).

Logo após a germinação, as reservas do próprio eixo embrionário e aquelas do escutelo são utilizadas para seu desenvolvimento. Em cevada, os lipídeos do escutelo são utilizados inicialmente e somente depois os carboidratos do eixo embrionário (MacLeod e Palmer, 1966). Ainda em cevada, os principais carboidratos estocados no eixo e metabolizados nas primeiras 24 horas, são sacarose e rafinose, utilizadas como energia ou para a produção de carboidratos insolúveis importantes na formação de novas paredes celulares.

Em milho, os lipídeos do escutelo são reservas importantes e Dure (1960a) mostrou que o quociente respiratório do eixo nas primeiras horas de crescimento foi menor que 1, indicando o catabolismo de lipídeos, posteriormente confirmado por Ingle, Beevers e Hageman (1964). A presença do ciclo do glioxilato no escutelo de milho também sugeriu que os lipídeos da reserva poderiam ser convertidos em açúcar cujo conteúdo aumenta no eixo embrionário durante este período (Oaks e Beevers, 1964).

As maiores modificações durante o crescimento inicial ocorrem no endosperma onde estão estocadas as principais reservas da semente. Uma das primeiras modificações, que ocorre durante a germinação, é a dissolução das paredes das células do endosperma, particularmente as próximas ao escutelo, facilitando a absorção dos produtos de degradação. As paredes celulares do endosperma têm uma composição mais simples que as das células normais, consistindo de proteínas, betaglucanos e arabinoxilanos, com menos pectina e celulose, facilitando a hidrólise. Briggs (1972) notou que em

cevada a hidrólise do endosperma ocorre paralela ao escutelo de uma maneira simétrica, atrasando-se apenas em algumas regiões que são mais resistentes ao ataque hidrolítico. Em muitos cereais, as hidrolases mais importantes são sintetizadas de novo no início da germinação (vide controle hormonal) enquanto, em outros, parece que elas são pré-existent no grão seco. Assim, em sorgo alfa e beta-amilase, alfa glicosidase, proteases, fosfatases e ribonucleases foram encontradas em vesículas do endosperma (Adams e Novellie , 1975). Há evidências que isto também ocorre em milho e estas enzimas são ativadas com a hidratação do tecido durante a embebição (Adams, Watson e Novellie, 1975).

A degradação das reservas amiláceas é feita principalmente pelas alfa e beta-amilases. O segundo grupo, geralmente, não ataca o grão de amido intacto, mas só pode digerir grãos previamente hidrolisados pela alfa-amilase.

Ingle, Beevers e Hageman (1964) notaram que, em milho, há pouca atividade amilolítica antes do terceiro dia de crescimento e que nem glicose nem sacarose são encontradas no endosperma como acontece em sorgo, trigo e cevada ; estes compostos são sintetizados posteriormente no escutelo, através da maltose proveniente da degradação do amido no endosperma (Edelman, Shibko e Keys, 1959). Assim, em milho, a enzima alfa-glicosidase, é situada nas células da superfície do escutelo e libera glicose que será utilizada para a síntese de sacarose que é a forma de açúcar recebida e utilizada pelo eixo embrionário. As enzimas responsáveis por esta síntese, a sacarose-6-fosfato-sintetase, sacarose fosfatase e sacarose sintetase estão presentes no escutelo e

umentam sua atividade nos primeiros três dias de embebição; uma vez formada, a sacarose não é degradada, desde que as enzimas responsáveis pela sua hidrólise não estão presentes no escutelo e assim ela é transportada para o eixo (Hawker, 1971; Humphreys, 1975). A síntese de sacarose para o eixo embrionário também ocorre nas células do aleurona (Chrispeels, Tenner e Johnson, 1973).

Existem dois locais para o armazenamento de proteínas: os grãos de aleurina situados nas células da aleurona e os corpos proteicos no endosperma. Através da ação de diferentes proteases estas proteínas são liberadas. As da aleurona são utilizadas para o fornecimento de aminoácidos para a síntese de enzimas hidrolíticas e as do endosperma sendo mais importantes na nutrição do eixo em desenvolvimento. Durante o crescimento inicial, em milho, o desaparecimento da proteína solúvel do endosperma é acompanhado por um aumento desta no eixo. Durante a germinação a proteína solúvel aumenta no eixo continuamente mas nos primeiros três dias de crescimento este aumento é maior no endosperma sugerindo que a taxa de hidrólise inicialmente é maior que a de transporte (Ingle, Beevers e Hageman, 1964; Ingle e Hageman, 1965a, b); entretanto não há acúmulo de aminoácidos no endosperma de milho e de cevada neste período, indicando que sua mobilização é mais eficiente que a do amido, cujos produtos da degradação se acumulam no endosperma, fato que possivelmente está relacionado com as exigências do eixo embrionário (Folkes e Yemm, 1958). No caso de milho, foi observado que o período mais ativo de hidrólise proteica ocorre entre os dias 6 e 8 após a embebição, através de

uma endopeptidase sintetizada de novo no endosperma e que ataca tanto zeína como glutelina (Harvey e Oaks, 1974b, c). A hidrólise da glutelina é mais rápida que a da zeína entre 40 a 80 horas de embebição e após este tempo é igual. Harvey e Oaks (1974 b, c) concluíram que estas diferenças podiam ocorrer devido à proporção relativa destas duas frações; assim, em sementes com alto teor de glutelina sua degradação é mais rápida que em outras com baixo teor desta proteína. Isto não ocorre em cevada, onde a prolamina hordenina é utilizada mais rapidamente e antes que a glutelina, hordenina (Folkes e Yemm, 1958). Foi notado, em endospermas de milho com embriões, que o máximo de atividade de proteases foi atingido quando 75 por cento das reservas proteicas foram degradadas, mas que nos endospermas isolados a atividade foi acelerada e iniciou-se mais cedo; isto levou à sugestão de que o embrião exerceria um controle, através de um inibidor, na atividade destas enzimas (Goldstein e Jennings, 1975).

Como a composição de proteínas das reservas é diferente das proteínas citoplasmáticas do eixo embrionário devem ocorrer interconversões dos aminoácidos liberados durante a proteólise (Folkes e Yemm, 1956; Boulter e Barber, 1963; Splittstoesser, 1967), embora Oaks (1965b, 1966) trabalhando com milho, notou que a interconversão de aminoácidos não era de grande importância. Folkes e Yemm (1958), trabalhando com cevada, calcularam através da composição das proteínas protoplasmáticas e da reserva, que 75 por cento dos aminoácidos exigidos pelo eixo já estavam presentes no endosperma. Um dos aminoácidos mais abundantes no endosper

ma de milho parcialmente digerido, é a glutamina e foi mostrado, através de marcação radioativa que ela é absorvida pelo escutelo e transportada para o eixo dentro de algumas horas (Stewart, 1971). Parece que não há competição no transporte entre glutamina e outros aminoácidos ou açúcares, sugerindo a existência de um carregador especial para a glutamina. Entretanto, Splittstoesser (1967) mostrou que glutamato marcado aplicado em milho, é facilmente convertido em $^{14}\text{C O}_2$ e que somente menos de 5 por cento da marcação aparece em outros aminoácidos, bases e clorofila, fato que em cevada ocorre numa porcentagem bem maior (Folkes e Yemm, 1958). Ainda em milho, o aminoácido leucina não sofre interconversão, a grande maioria permanecendo não metabolizada e a restante sendo degradada a CO_2 , ou incorporada à proteína no escutelo, indicando considerável síntese proteica neste tecido (Splittstoesser, 1967). Do mesmo modo, Joy e Folkes (1965) notaram, em cevada, que aminoácidos que possuíam a via biossintética mais próxima a dos carboidratos podiam ser degradados a açúcares ou perdidos como CO_2 respiratório, enquanto que os como a leucina e lisina, com a via biossintética mais longa, tenderam a ser utilizados pelo eixo embrionário, sem mudanças. Sodek e Wilson (1973) notaram o mesmo em milho, utilizando técnicas mais refinadas nas quais a proteína da reserva havia sido marcada radioativamente durante o desenvolvimento da semente na planta mãe. O tecido metabolicamente mais ativo foi o eixo, que converteu mais aminoácidos em CO_2 e a marcação foi encontrada em um número maior de compostos que no escutelo ou endosperma, sendo no último caso a atividade metabólica localizada na

aleurona. Isto concorda com observações de outros pesquisadores, de que em milho, a maior parte do metabolismo dos produtos da reserva ocorre no próprio eixo ou no escutelo e que tentativas para isolar mitocôndrias do endosperma não tiveram sucesso (Ingle, Beevers e Hageman, 1964; Ingle e Hageman, 1965a, b).

IV - CONTROLE HORMONAL

A maioria das pesquisas sobre o controle hormonal da degradação das reservas de sementes durante o crescimento inicial, foi feita em cereais, particularmente em cevada (Paleg, 1960a, b; MacLeod e Palmer, 1966), mas recentemente têm surgido estudos deste tipo em dicotiledôneas (Penner e Ashton, 1967; Juliano e Varner, 1969; Locker e Ilan, 1975; Van Onckelen, Caubergs e De-Greef, 1977; Paulilo, 1980).

Há muito tempo é conhecido que a remoção do embrião de cevada atrasa ou inibe a degradação das reservas do endosperma, no entanto, somente mais tarde foi descoberto que havia uma substância responsável por este feito, que se difundia do embrião para o endosperma. Paleg, Coombe e Buttrose (1962) mostraram que grãos de cevada sem embrião produzem mais alfa-amilase quando incubados com embriões isolados e a substância difusível foi identificada como uma gibberelina. Mais tarde, foi demonstrado que aplicações de gibberelinas exógenas podiam estimular a degradação das reservas de grãos sem embrião e que também podiam melhorar o pro

cesso de maltagem na fabricação de cerveja (MacLeod, 1967).

No período inicial de embebição as giberelinas também estão presentes, embora existam dúvidas se este hormônio é pré-existente ou sintetizado. De qualquer maneira, em sementes maduras de arroz, trigo, milho e cevada, foram encontrados níveis de 5 a 15 $\mu\text{g eq. kg}^{-1}$ de ácido giberélico (Brian, 1966). É conhecido que em sementes em desenvolvimento na planta mãe o nível de giberelinas é bem alto e que durante a secagem da semente elas podem se tornarem ligadas a açúcares ou proteínas, permanecendo inativas e sendo liberadas durante a embebição, talvez por ação de enzimas hidrolíticas (McComb, 1961; Morinla e Michael, 1973 ; Suge e Gallardio, 1977). Também existem controvérsias sobre o local de síntese das giberelinas; alguns acreditam que elas são sintetizadas no eixo embrionário no início da germinação (MacLeod e Palmer, 1966; 1967) outros, que elas são formadas a partir de precursores armazenados no escutelo (Radley, 1967; 1969).

As giberelinas não estimulam somente a secreção de alfa-amilase, mas também a de proteases, pentosanases , dextrinases e alfa-glicosidases como também aumentam a liberação, pelas células da aleurona, de ribonucleases, fosfatases e da beta-1-3-glucanase (Bewley e Black, 1978).

O controle da síntese da alfa-amilase foi o mais estudado em relação ao das outras enzimas, e a maioria dos estudos foi feita com paredes de aleurona de cevada isoladas em meio líquido para onde as enzimas eram liberadas (Bewley e Black, 1978). A aleurona de cevada possui três camad_{as} celulares que, quando isoladas, na presença de ácido

giberélico, secretam alfa-amilase após 8 horas de embebição; quase toda a enzima sintetizada é liberada, não havendo acúmulo na aleurona. Jacobsen e Knox (1973) propuseram ser a camada central da aleurona responsável pelo início da secreção da alfa-amilase. Se o ácido giberélico é removido após sete horas de embebição, a produção de alfa-amilase cai, mas se ele é fornecido novamente a produção volta ao normal, sugerindo que este hormônio é necessário continuamente durante a fase da síntese da enzima (Chrispeels e Varner, 1967a, b; Jones, 1971). Tanto o ácido abscísico (ABA) como a ciclohexamida e a actinomicina D inibem a síntese de alfa-amilase indicando que esta síntese ocorre de novo nas camadas da aleurona (Varner e Ram-Chandra, 1964). Estes autores, também demonstraram que na presença de ^{14}C -aminoácidos e após a digestão da alfa-amilase com tripsina, todas as partes da enzima apareceram marcadas mostrando que todas as subunidades da alfa-amilase foram sintetizadas de novo. Mais tarde, Filner e Varner (1967) comprovaram esta síntese de novo utilizando técnicas de marcação por densidade e verificando que na presença de H_2^{18}O as moléculas de alfa-amilase produzidas foram mais pesadas que as normais. Isto também sugeriu que os aminoácidos componentes da alfa-amilase se originariam a partir das proteínas da reserva presentes nos corpos proteicos da camada de aleurona. Atualmente, sabe-se que existem em cevada sete isoenzimas para alfa-amilase e parece que todas são sintetizadas de novo (Jacobsen, Scandalios e Varner, 1970). Em todos os estudos feitos em aleurona de cevada isolada, notou-se haver uma fase de latência antes da síntese de alfa-amilase (Bewley e Black,

1978). Durante este período (cerca de 6 horas) os corpos de proteína mudam de volume e forma sugerindo que estão sendo degradados para a produção de aminoácidos necessários para a síntese da enzima (Jones, 1969b). Notou-se um aumento de polirribossomos, na aleurona de cevada, de três a quatro horas após a adição de ácido giberélico ao meio de cultura e próximo ao período de síntese da alfa-amilase a atividade do retículo endoplasmático rugoso aumentou e esta organela se tornou mais ramificada, associada ao núcleo, sugerindo um aumento na síntese proteica (Jones, 1969c; Jones e Chen, 1976; Evins, 1977).

Parece que a secreção de alfa-amilase requer energia, contudo, este processo é ainda controverso (Varnier e Mense, 1972). Inicialmente Reed (1904) e O'Brien (1942) mostraram que em cevada partículas migravam do escutelo para o epitélio do endosperma. Em contraste Jones, utilizando técnicas de microscopia eletrônica, autoradiografia e ultracentrifugação favoreceu a hipótese de que a liberação de alfa-amilases se daria de forma solúvel e não encapsulada (Jones, 1972; Chen e Jones, 1974a, b). Outros autores, preferem a hipótese de que a região das células da aleurona mais associada ao endosperma acumula vesículas que contem a enzima que está sendo sintetizada e estas vesículas são liberadas posteriormente para o endosperma (Gibson e Paleg, 1972; Jacobsen e Knox, 1973; Vigil e Ruddat, 1973). Dados mais recentes favorecem esta segunda hipótese, assim Firn (1975) mostrou em cevada que a alfa-amilase estava dentro de vesículas e que podia ser liberada através do tratamento destas com detergentes.

Com o intuito de definir o mecanismo de ação do ácido giberélico, vários pesquisadores, analisando espécies de RNA mensageiro (mRNA) que podem ser reconhecidos pelos segmentos poli-A, notaram que aplicações de ácido giberélico aumentam este tipo de mRNA, que in vitro pode sintetizar alfa-amilase (Jacobsen e Zwar, 1974; Ho e Varner, 1974; Higgins, Zwar e Jacobsen, 1976).

Foi observado por Groat e Briggs (In: Bewley e Black, 1978) que em grãos intactos de cevada, o nível endógeno de giberelinas aumenta durante a embebição produzindo um pico após dois dias, quando a síntese de alfa-amilase se inicia. A síntese desta enzima, continua mesmo após a queda do nível de giberelinas, talvez devido ao mRNA produzido que permanece nas células da aleurona. Do mesmo modo, a remoção do embrião após trinta horas de embebição não inibe a síntese da alfa-amilase, já que a giberelina liberada no endosperma continua a se difundir para a aleurona. Após três ou quatro dias de embebição do endosperma isolado a síntese de alfa-amilase começa a diminuir, talvez pela destruição dos mRNAs e falta de giberelinas necessárias para a produção de novos ou, como foi sugerido por Jones e Armstrong (1971), que os produtos da reação (glicose e maltose) aumentando a pressão osmótica nas células da aleurona provocariam o declínio da síntese da enzima. Assim, a produção de alfa-amilase foi inibida, em aleuronas isoladas, pela presença no meio de cultura de glicose e maltose a 0,1 e 0,4M. Também parece que a taxa inicial de hidrólise do amido é maior que a do transporte dos produtos para o eixo e assim, o acúmulo destes no endosperma poderiam inibir a

síntese de alfa-amilase por um mecanismo de "feed-back" (Chrispeels e Varner, 1967b).

Apesar da maior parte das pesquisas sobre o controle hormonal da degradação das reservas ter sido realizado com a alfa-amilase, o ácido giberélico, também possui importante papel na síntese e liberação de outras enzimas. Assim, em cevada este hormônio estimula a síntese de ATPase, fitase, alfa e beta-glicosidase, fosfomonoesterase e alfa-galactosidase (Pollard, 1969; Hardie, 1975). Muitas destas enzimas são liberadas no endosperma antes da alfa-amilase após tratamentos dos grãos com ácido giberélico e respondem a concentrações menores do que as exigidas para a síntese de alfa-amilase (Pollard e Nelson, 1971). Algumas proteases também são sintetizadas de novo durante a embebição de grãos de cereais, mas o nível destas enzimas é trinta vezes menor que o das amilases talvez devido ao baixo conteúdo proteico das reservas destes grãos. A hidrólise inicial de proteínas poderia também fornecer aminoácidos para a síntese de outras proteases (Jacobsen e Varner, 1967).

Várias proteases são conhecidas em cereais; algumas já estão presentes no endosperma, outras na aleurona, e a liberação destas é iniciada pelas giberelinas e ainda algumas são sintetizadas de novo. Além das proteases degradarem as aleurinas e as proteínas do endosperma, elas podem liberar enzimas ligadas à parede celular da aleurona. Roswell e Goad (1962) mostraram que em trigo, a beta-amilase era pré-existente no endosperma, numa forma inativa ligada às glutelinas; a secreção de proteases pela aleurona libera aquelas enzimas que se tornam ativas. Da mesma forma, em

cevada, agregados de beta-amilase foram degradados pelas proteases em monômeros ativos (Bilderback, 1974).

Outra enzima que é sintetizada de novo durante a embebição do grão é a beta-1,3-glucanase. Neste caso, o ácido giberélico não é necessário para a síntese, mas sim para a liberação (Taiz e Jones, 1970; Bennett e Chrispeels, 1972). Talvez esta enzima desempenhe algum papel importante na degradação das paredes das células da aleurona facilitando a liberação de enzimas e também na degradação das paredes celulares do endosperma tornando o amido e proteínas da reserva mais acessíveis às amilases e proteases. A primeira hipótese é duvidosa, desde que as paredes celulares da aleurona contem poucos glucanos, e por outro lado contem arabinoxilanos (85%) e celulose (8%) que são degradados pelas pentosomases cuja síntese também é estimulada por ácido giberélico (McNeil, Albersheim, Taiz e Jones, 1975; Taiz e Honigman, 1976). Também foi observado que as membranas das paredes celulares da aleurona são ricas em plasmodesmatas, facilitando a difusão de seus conteúdos (Taiz e Jones, 1973).

Comparando-se com cevada, há poucas pesquisas em outros cereais, no campo do controle da degradação das reservas. Embora muitos parecem seguir o mesmo modelo, já foi observado que alguns cereais não possuem uma necessidade absoluta da presença do ácido giberélico para iniciar a degradação e outros hormônios estão envolvidos neste processo. Entretanto, o ácido giberélico aumenta a síntese e liberação de muitas hidrolases em arroz, aveia e trigo (Ogawa, 1966; Palmiano e Juliano, 1972; Sutcliffe e Baset, 1973).

Naylor (1969) demonstrou que Avena fatua requer

essencialmente o ácido giberélico para a produção de alfa-amilase, enquanto que Avena sativa não exige hormônio exógeno e nem o embrião para a produção da enzima. Também em milho, o aparecimento das enzimas ribonuclease e 3'nucleotidase é independente da presença do ácido giberélico (Ingle e Hageman, 1965b). Para a síntese e liberação de algumas enzimas de trigo parece que a presença do embrião é necessária, enquanto que para outras este processo é independente da presença deste órgão. Por exemplo, o isocitrato liase e malatosintetase, enzimas do glioxissoma (Doig, Colborne, Morris e Laidman, 1975a) e também lipase (Tavener e Laidman 1972), fitase (Eastwood e Laidman, 1971) e alfa-amilase (Pa leg et al., 1962), parecem ter sua síntese dependente da presença do embrião. Enzimas cuja síntese é independente da presença do embrião são geralmente as que são ativadas no início da embebição, como as da glicólise, via pentose-fosfato e síntese de aminoácidos (Doig, Colborne, Morris e Laidman, 1975b).

Outros hormônios além do ácido giberélico, também parecem estar envolvidos no controle da degradação das reservas. Assim, Eastwood e Tavener (1969) mostraram que pré-tratamentos com citocininas em endospermas de trigo promoveram a síntese de alfa-amilase induzida por giberelina. Concluíram então, que as citocininas agiriam, de maneira não conhecida, sensibilizando o tecido para posterior ação da giberelina.

Em cevada, o ácido indolacético (AIA) é sintetizado no ápice do coleoptile durante o início da embebição e seu papel seria na formação de um sistema vascular impor -

tante no transporte de metabolitos do escutelo para o embrião (MacLeod e Palmer, 1969).

No caso de milho, resultados contraditórios aparecem na literatura. Assim, há autores que acreditam que o controle da degradação das reservas é semelhante ao de cevada onde o embrião ou o ácido giberélico são necessários (Dure, 1960a; Ingle e Hageman, 1965b). Por outro lado, vários autores acreditam que nem o embrião nem o ácido giberélico são necessários para a hidrólise das reservas (Toole, 1924; Harvey e Oaks, 1974a, b; Goldstein e Jennings, 1975). Neste último caso, o controle da hidrólise seria atribuído à inibição proporcionada pelos seus próprios produtos. Assim, Oaks (1965a) mostrou que a degradação das proteínas da reserva pode ser controlada pelo nível de aminoácidos livres no endosperma ou pelo fornecimento exógeno de aminoácidos.

Como existem resultados conflitantes em relação ao controle da degradação e utilização das reservas do grão de milho, durante o início da germinação e como a atividade das proteases e amilases está relacionada a este fato, é interessante analisar a cinética destas enzimas durante o desenvolvimento inicial de plântulas de milho, verificando o possível papel de reguladores de crescimento como o ácido giberélico e a 6-benziladenina e do próprio embrião, no controle deste processo.

Além disso, sabendo-se que a presença ou ausência do gene *opaco-2*, em milho, provoca grandes variações entre

os grupos proteicos da reserva do endosperma, particularmente nas prolaminas (principais reservas do grão), e que existe uma correlação entre a quantidade de proteína do grão de cereais e o crescimento da planta, é de grande interesse o estudo da utilização destes grupos proteicos individuais durante o desenvolvimento da plântula, relacionando a utilização deles com a atividade das proteases. Este estudo foi possível graças à disponibilidade de um cultivar de milho (Maya) sob a forma opaco-2 e normal (selvagem para aquele locus).

MATERIAL E MÉTODOS

I. MATERIAL

Grãos de Zea mays L., cv. Maya, gentilmente cedidos pelo Dr. William José da Silva do Departamento de Genética do Instituto de Biologia da UNICAMP, foram utilizados neste trabalho. Este material foi de dois tipos (com base genética quase que idêntica) sendo um tipo denominado Maya-opaco-2, mutante recessivo para o gene opaco - 2 (o_2o_2), enquanto que o outro, denominado Maya normal, foi o tipo selvagem para este locus (O_2O_2).

II. MÉTODOS GERAIS

Condições de cultura:

Grãos com pesos conhecidos foram plantados em potes plásticos com volume de 120 ml ou em bandejas, com vermiculite. Durante o crescimento as plântulas foram mantidas sob condições naturais dentro de uma estufa ou em câmaras de crescimento (Lab-line Instruments Mark III) com temperatura de $29 \pm 2^\circ\text{C}$ e luz contínua com intensidade de $0,089 \text{ cal/cm}^2/\text{min}$ fornecida por lâmpadas incandescentes e fluorescentes. As plântulas foram regadas com água destilada quando necessário (nutrientes não foram fornecidos). Em experimentos onde foi realizado algum tratamento hormonal, os grãos foram previamente colocados para embeber na solu -

ção do regulador em questão, em placas de Petri com papel de filtro, por 48 horas a 25°C em luz contínua em câmaras de crescimento (FORMA - Scientific - Model 24). Após este período de embebição os grãos foram transferidos para as mesmas condições descritas acima e durante o crescimento não foi mais fornecido regulador de crescimento.

Em alguns experimentos, montados para ensaios enzimáticos, endospermas foram separados do embrião ou plântula. Estes endospermas isolados, tanto como os grãos intactos utilizados no mesmo experimento, foram esterilizados em solução de hipoclorito de cálcio a 5% por 15 minutos. Os endospermas isolados foram mantidos em câmara asséptica em placas de Petri com papel de filtro e soluções hormonais preparadas com água previamente autoclavada.

Em experimentos onde foi analisada a embebição dos grãos, estes foram deixados embeber em água destilada durante sete horas, em câmaras de crescimento (FORMA) a 25°C.

Obs: No presente trabalho adotaram-se os termos:

- embrião = eixo antes da germinação
- plântula = eixo + endosperma após a germinação e até as reservas do endosperma serem esgotadas
- eixo = parte aérea + raiz + escutelo

III. MÉTODOS ANALÍTICOS

1) Comprimento, largura e área da lâmina foliar:

A área da lâmina foliar foi determinada através do desenho do contorno da lâmina em papel e posterior comparação do peso do papel com a área anteriormente padronizada. Estes desenhos também foram utilizados para medidas de comprimento e largura.

2) Peso fresco:

Logo após serem colhidas as diferentes partes das plântulas (endosperma remanescente, raiz, escutelo, bainha e lâminas foliáres) foram pesadas em balança de torção (Alem Mar - Com. e Ind.; sensibilidade de 10 mg).

O peso fresco dos grãos utilizados para qualquer experimento foi determinado em balança analítica (Sartorius; sensibilidade de 0,1 mg).

O embrião foi separado do endosperma de grãos escolhidos dentro de diferentes faixas de peso. Estes órgãos foram pesados, em balança analítica até o nível de miligramas, para se estabelecer uma relação entre estas partes no grão, antes da embebição.

3) Peso seco:

O peso seco de grãos ou de suas diferentes partes foi medido em balança analítica (Sartorius; sensibilidade 0,1 mg), após 24 horas de secagem destas partes em estufa a 80°C.

4) Preparação de farinhas:

Farinhas finas de grãos secos, endospermas ou

embriões com pesos conhecidos foram preparadas em tritura - dor (Spex-Mixer-Mill). Estas farinhas foram posteriormente tratadas com acetona a 100% para remoção dos lipídeos, como recomendado por Baudet et al. (1966) e Subramanian et al. (1970) para facilitar a dosagem de proteína. Amostras desta farinha isenta de lipídeos, foram pesadas em balança a - nalítica.

5) Extração e dosagem de proteínas:

A extração de proteínas solúveis de farinhas ou de órgãos da plântula (endosperma remanescente, raiz, escu - telo, bainha e lâmina foliar) macerados em almofariz, foi feita em volume conhecido de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1M. Após a extração, foi retirada uma aliquota de volume conhecido do extrato já centrifugado (a 3.000 g por 15 min) e as proteínas desta aliquota foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% a frio. Este precipitado, após centrifugação a 3.000 g por 15 min foi resuspendido em volu - me conhecido de hidróxido de sódio a 0,1M e uma aliquota de 1 ml foi utilizada para a dosagem de proteína pelo método de Lowry et al. (1951). A esta aliquota foram adicionados 5 ml de solução alcalina de cobre e tartarato de potássio e sódio (3 g de carbonato de potássio e sódio 10% em hidróxi - do de sódio 0,1M; 1 ml de solução de sulfato de cobre 10%). Após 15 minutos foram adicionados 0,5 ml de reagente de Fo - lin 50% (reativo de Folin Ciocalteau, Queel Indústrias Quí - micas S.A.) e a mistura agitada imediatamente. Simultanea - mente preparou-se, da mesma maneira que as amostras, um pa - drão de proteína de Albumina de soro bovino (Sigma Chemical

Company, 96-99% de albumina) em concentrações de 0 a 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Após 30 minutos, quando a cor azul se desenvolveu, a densidade óptica das soluções foi lida no espectrofotômetro (Varian - série 634) a 620 nm e o conteúdo proteico das amostras foi determinado por comparações com a curva padrão de albumina de soro bovino.

6) Fracionamento sequencial das proteínas do endosperma:

Variações nas frações proteicas dos endospermas de grãos secos e nos endospermas de plântulas em diferentes etapas do desenvolvimento foram analisadas, baseando-se no esquema original de Osborne (1895) para o fracionamento de proteínas de milho e modificado por Landry e Moureaux (1970). O método de Landry e Moureaux é apresentado na Tabela 1 e o adotado no presente trabalho, na Tabela 2.

Para endospermas de grãos secos foram utilizados 200 mg de farinha em 10 ml do solvente adequado em várias etapas dependendo do experimento, seguindo o esquema indicado na Tabela 2, e para endospermas de plântulas em diferentes fases do desenvolvimento alterou-se apenas o volume do solvente dependendo do peso fresco dos endospermas utilizados. O sobrenadante de cada etapa foi separado e guardado e juntou-se ao resíduo o solvente seguinte. A proteína solúvel de cada etapa foi dosada separadamente pelo método de Lowry et al. (1951).

TABELA 1

Processo de fracionamento de proteínas (Landry e Moureaux, 1970)

Passos	Solventes	Temp. °C	Tempo de extração(*)	Fração
I	1 g de pó sem lipí- deos + 10 ml NaCl 0,5M	4	60'	Albuminas e Globulinas
	+ 10 ml de água destilada		30' 30'	
II	Resíduo + 10 ml isopropanol 55%	20	30'	Zeinas
			30' 30'	
III	Resíduo + 10 ml isopropanol 55% e 2-mercaptoetanol 0,6%	20	30'	G. 1
			30'	
IV	Resíduo + 10 ml sol. tampão pH 10 com força iônica 0,5** e mercaptoetanol 0,6%	20	60'	G. 2
			30' 15'	
V	Resíduo + 10 ml de sol. tampão pH 10 e 2 mercaptoetanol 0,6% e dodecil sul- fato de sódio (SDS) 0,5%	20	60'	G. 3
			30' 15'	

Sol. tampão pH 10: diluir em 1.000 ml, 250 ml de
 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,05M 100 ml NaOH 0,2M

(**) NaCl 2,92% na sol. tampão

(*) agitação contínua seguida de centrifugação

TABELA 2

Método de fracionamento das proteínas do endosperma adotado
neste trabalho

ETAPA	SOLVENTES	TEMPERATURA	TEMPO DE EXTRAÇÃO	FRAÇÕES
I	amostra + NaCl 0,5M *	4°C	15' centrifugado a 3.500 g	Albuminas e Globulinas
II	resíduo + isopropanol 55%	ambiente	15' centrifugado a 3.500 g	Zeinas
III	resíduo + NaOH 0,1M	ambiente	15' centrifugado a 3.500 g	Glutelinas

* Precipitado lavado com água destilada.

7) Dosagem de açúcar:

O conteúdo de açúcar solúvel de extratos de endospermas em tampão fosfato pH 5,5 (0,02M) foi determinado utilizando-se o método da antrona (Yemm e Willis, 1954). A 1 ml deste extrato foram adicionados 2 ml de antrona (Sigma Chem. Co) a 0,2% em ácido sulfúrico 98%. Esta solução foi imediatamente agitada e a densidade óptica foi lida no espectrofotômetro (Varian série 634) a 620 nm.

8) Ensaaios enzimáticos:

As atividades das proteases e amilases de endospermas de plântulas em diferentes etapas do desenvolvimento, bem como as de endospermas separados do embrião no início da embebição, foram medidas. Também foi medida a atividade de algumas transaminases nas diferentes partes da plântula (endosperma e eixo) em etapas sequenciais do desenvolvimento.

a) Atividade amilolítica: Foi determinada medindo-se o aparecimento de maltose com o tempo (Bernfeld, 1955). As amilases do endosperma foram extraídas em 12 ml de tampão fosfato de potássio em pH 5,5 (0,02M). Após centrifugação (3.000 g por 15') usou-se 0,2 ml deste extrato para cada reação. O substrato utilizado em cada mistura de reação foi 2 ml de uma solução de fécula de mandioca com amido de milho (Arrozina - Idisa - S.P.) a 9% em tampão fosfato de potássio pH 5,5 (0,02M). Os ensaios foram realizados em banho-maria a 40°C. A reação foi terminada em diferentes intervalos de tempo (0 a 10 min) e para isto usou-se 2 ml do ácido 3,5-dinitrossalicílico (1 g de ácido 3,5-dini

trossalicílico em 20 ml de NaOH 2M e 30 g de tartarato de potássio e sódio em 50 ml de água destilada, completando-se o volume para 100 ml com água destilada). Após o término da reação os tubos de ensaio foram aquecidos a 100°C em banho-maria por 10 minutos. Para a leitura da densidade óptica de cada mistura de reação, 0,4 ml desta solução foram diluídos em 9,5 ml de água destilada. A absorbância da solução foi lida a 535 nm e os valores de densidade óptica obtidos foram, em alguns experimentos, comparados com uma curva padrão de maltose (0-2 mg/ml).

b) Atividade proteolítica: Foi determinada medindo-se a produção de tirosina com o tempo (Prisco *et al.*, 1975). As proteases foram extraídas em 6 ml de tampão fosfato de potássio em pH 5,5 (0,02M). Após centrifugação (3.000 g por 15 min) usou-se 0,5 ml deste extrato para cada reação. O substrato utilizado para cada mistura de reação foi 1 ml de hemoglobina bovina liofilizada, a 1,5% em tampão fosfato de potássio em pH 3,6 (0,02M). Os ensaios foram realizados em estufa a 40°C. A reação foi terminada em diferentes intervalos de tempo (0 a 5 h) e para isto usou-se 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Após a centrifugação juntou-se, 1 ml do sobrenadante, 1 ml de NaOH e 0,1 ml do reagente Folin (reativo de Folin Ciocalteau-Queel Ind. Químicas S.A.) e a absorbância da solução foi lida a 620 nm.

c) Atividade de transaminases:

Medidas por cromatografia:

Num experimento preliminar foram examinadas as

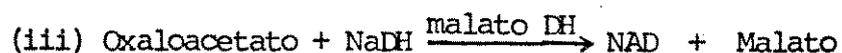
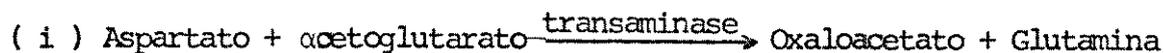
eficiências de dois aceptores de grupo amino, o alfa-ceto - glutarato e o piruvato, medidas pela produção de seus aminoácidos, glutamina e alanina, respectivamente durante a transaminação:



Estas duas reações foram realizadas com 0,1 ml de aminoácido, o aspartato (ASP), 0,1 ml de cetoácido, o α cetoglutarato (α KG) ou o piruvato (PIR) e 0,1 ml de extrato de plântulas de milho. As misturas de reação foram incubadas por 60 minutos em banho-maria a 30°C, sendo as reações interrompidas com 0,5 ml de etanol. Aliquotas de 20 μ l destes ensaios foram aplicadas em placas de sílica (Merck Typ 60) e celulose (30 g : 12 g em 100 ml de água destilada) para cromatografia de camada delgada (espessura 0,3 mm). Utilizaram-se os solventes fenol: água (80 : 20 por volume) para o desenvolvimento ascendente do cromatograma. Terminada a cromatografia, a placa foi deixada secar ao ar e revelada com ninhidrina a 0,2% em etanol, sendo logo após aquecida a 100°C por 10 minutos (Turner e Redgwell, 1966).

Medidas por espectrofotometria:

A atividade das transaminases foi medida por uma reação acoplada (iii) a de transaminação (i), reação esta envolvendo a oxidação do NADH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo- na forma reduzida) determinada pela diminuição da densidade óptica lida no espectrofotômetro a 340 nm.



Nestas reações um grupo amino está sendo transferido do aspartato (doador) para o acetoglutarato (receptor), formando o oxaloacetato que na presença do NADH e da malatodesidrogenase, enzima normalmente abundante em tecidos vegetais, produz malato acompanhado pela oxidação do NADH que pode ser analisada espectrofotometricamente. O ponto de equilíbrio da reação de transaminação(i) é fortemente deslocado para a direita, garantindo que é formado oxaloacetato suficiente para a segunda reação (iii).

As transaminases foram extraídas em tampão tris-hidroximetilaminometano (Tris) 50 mM em pH 7,5, contendo 2-mercaptoetanol 15 mM (1 ml/l) usando-se 3 ml de tampão por grama de tecido fresco. Após centrifugação (3.000 g por 15 min) o sobrenadante foi filtrado em gase e 1 ml deste extrato bruto foi passado numa coluna de Sephadex G-25, previamente equilibrada com o mesmo tampão do extrato, para remover os compostos de baixo peso molecular. Todos estes passos foram realizados a 4°C. Recolheram-se 4 ml do extrato que passaram pela coluna (previamente calibrada) e utilizou-se para cada ensaio enzimático 0,1 ml. Em cada ensaio foram utilizados, como doador de grupos amino 0,3 ml de aspartato 20 mM em tampão Tris pH 7,5 e 0,3 ml de acetoglutarato 50 mM em tampão Tris pH 7,5 como acceptor de grupos amino. Também, 0,1 ml de NADH (1 mg/ml) foi adicionado a cada ensaio como substrato para a reação acoplada à de transaminação. O volume de cada mistura de reação foi completado para 1 ml com tampão Tris 50 mM pH 7,5. Simultaneamente, como controle, foi feito uma mistura onde se utilizaram todos os componentes descritos acima, com exceção do asparta-

to, substituído por tampão, medindo-se desta forma, qual -
quer oxidação de NADH que não dependa da transaminação. Imediatamente após juntar-se o extrato enzimático à mistura de reação, esta foi colocada no espectrofotômetro e a diminuição da densidade óptica a 340 nm em um determinado intervalo de tempo foi registrada graficamente. A atividade enzimática foi expressa em termos de μ moles de aspartato transaminado (ou NADH oxidado) por minuto por grama de tecido fresco.

9) Análise estatística:

O tratamento estatístico (análise de variância, correlação e regressão linear), foi realizado de acordo com Snedecor (1962).

RESULTADOS

I. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

Para analisar a utilização das reservas do grão durante o crescimento inicial da plântula foi necessário caracterizar o material em termos de peso, conteúdo proteico e de água dos grãos e suas partes, estabelecendo valores normais para estes parâmetros dentro das populações estudadas.

Na figura 1 (a, b) pode-se ver um histograma que representa a distribuição do peso de 400 grãos, escolhidos ao acaso, dos milhos normal e opaco-2. Notou-se que para o normal a distribuição foi ampla, variando de 110 mg a 470 mg, faixa que abrangeu a distribuição do opaco, que variou de 150 mg a 390 mg. Baseando-se nestas observações, escolheu-se grãos numa faixa de peso de 60 mg considerada normal em cada população, para serem utilizados nos experimentos subsequentes. A faixa de peso adotada para o milho normal incluía 40% dos grãos e foi de 270 a 330 mg (fig. 1a) e para o opaco foi de 250 a 310 mg incluindo 55% dos grãos (fig. 1b), devido a maior uniformidade destes. Assim, os grãos de Maya normal na faixa de peso escolhida, foram ligeiramente mais pesados que os de Maya opaco-2.

Baseando-se numa amostra de 35 grãos escolhidos ao acaso numa faixa de peso de 200 a 400 mg, faixa esta que incluiu a maior parte dos grãos das duas variedades (fig. 1), determinou-se o peso do embrião, representado pelo escutelo e eixo, com a finalidade de se estabelecer a proporção ocupada por este órgão em grãos de pesos diferentes (fig. 2 a e b).

Figura 1. Distribuição de pesos de quatrocentos grãos tomados ao acaso nas populações de Maya-normal (1a) e Maya-opaco-2 (1b).

(.....) faixa de peso escolhida

- faixa de peso escolhida para Maya-normal (270-330 mg)
- faixa de peso escolhida para Maya-opaco-2 (250-310 mg)

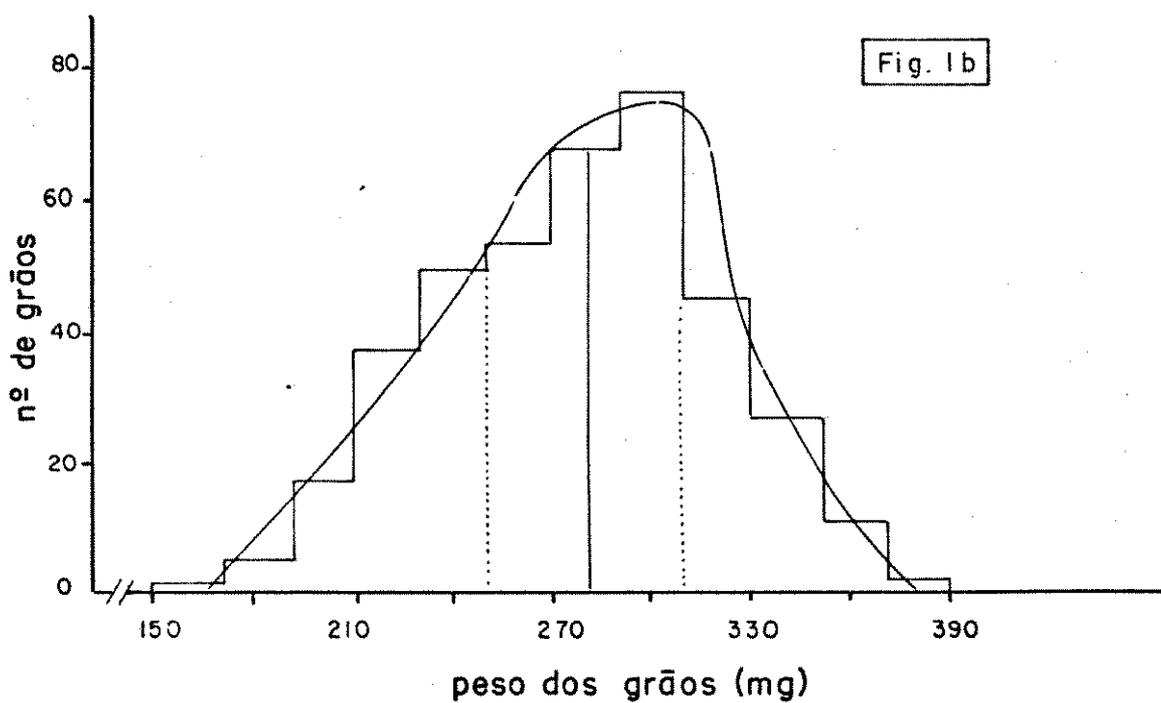
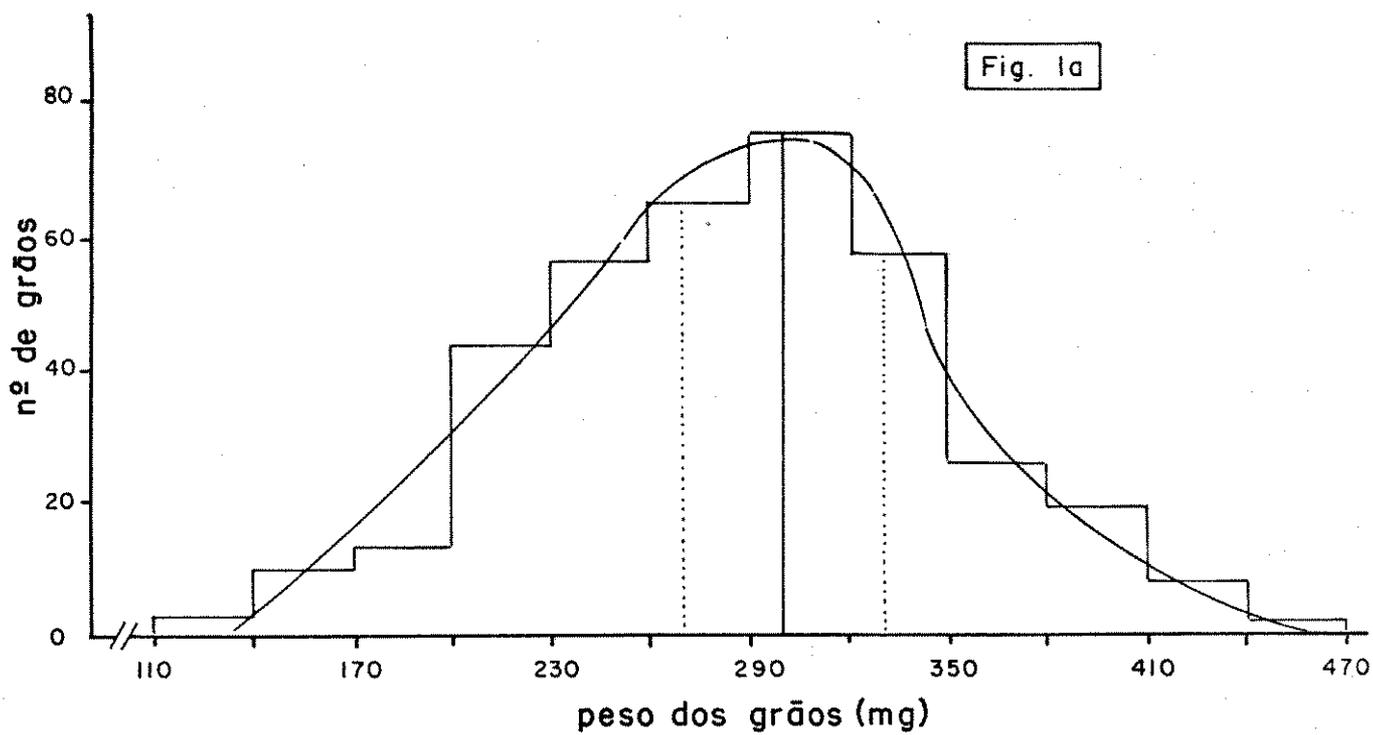
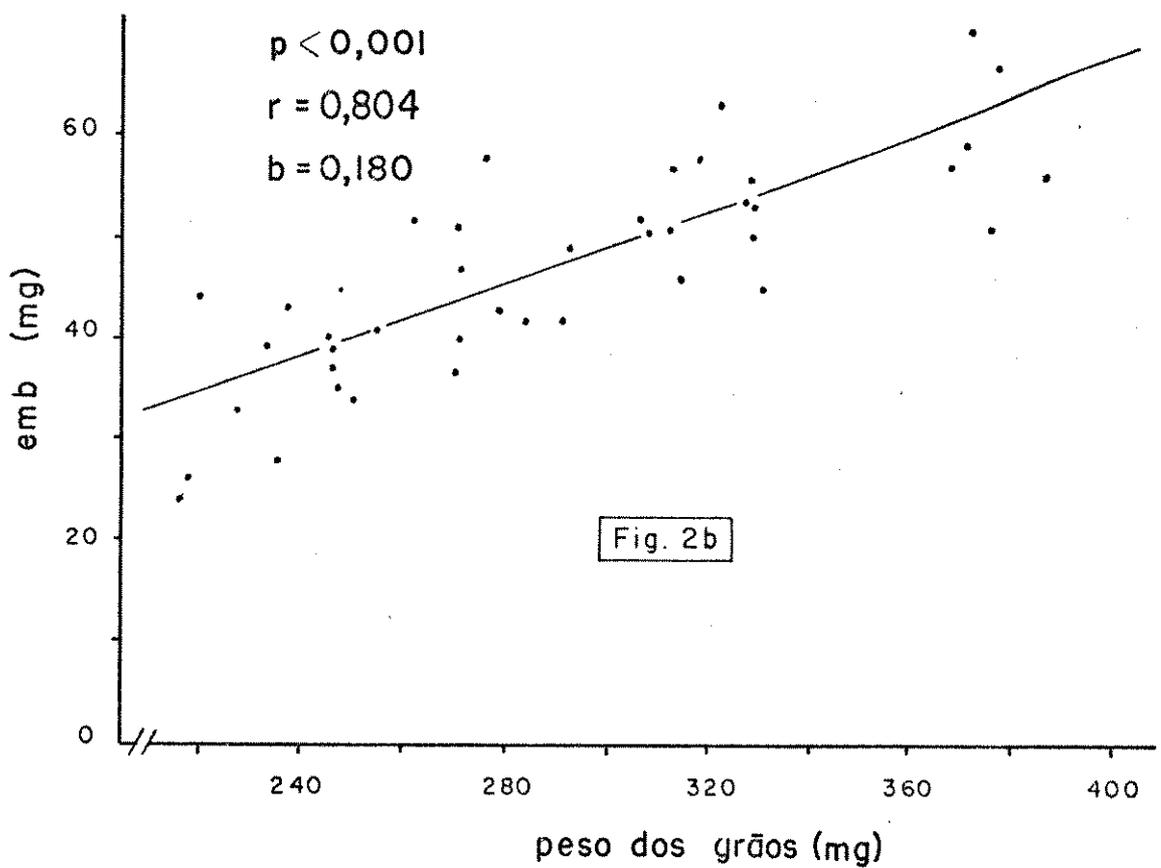
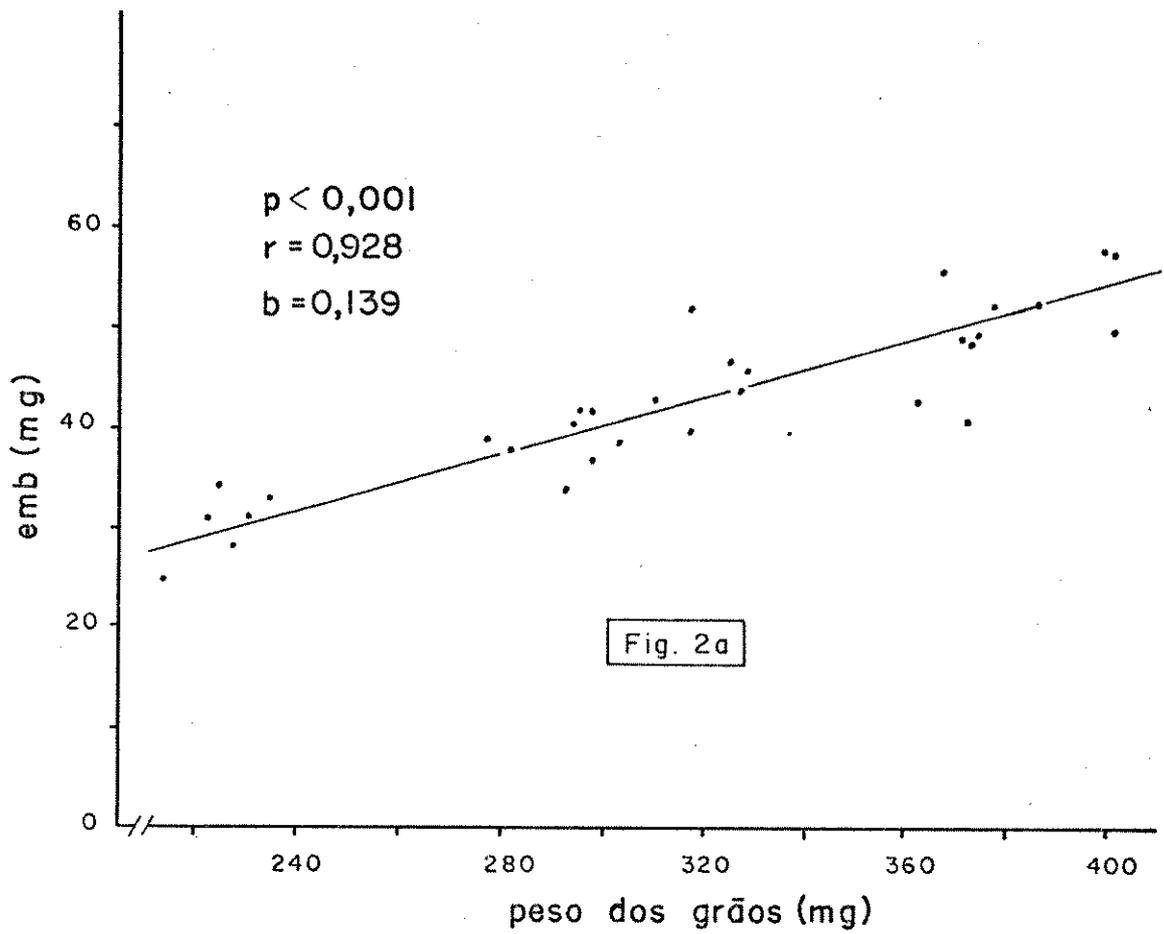


Figura 2. Relação entre o peso de grãos e o peso de seus respectivos embriões (eixo e escutelo) para Maya-normal (2a) e Maya-opaco-2 (2b).

emb = embrião



Notou-se que em termos absolutos, o peso do embrião aumentou com o aumento do peso do grão. Através da análise de regressão foi possível estabelecer pesos de embriões para determinados pesos de grãos como também a porcentagem do peso total ocupada pelo embrião. Estes dados são apresentados na Tabela 3. Os embriões de Maya-normal sempre foram menores que os de Maya-opaco-2 em qualquer peso do grão analisado e na faixa de peso adotada como a mais comum, o embrião ocupou aproximadamente 13% do peso total em Maya-normal e 16% no opaco. Além do embrião do opaco ter sido invariavelmente maior que o do normal esta tendência foi acentuada em grãos mais pesados, como pode ser verificado pelas inclinações (b) das retas dadas na fig. 2 (a, b).

Para que as duas formas de Maya analisadas fossem comparadas em termos de conteúdo proteico e utilização deste durante o crescimento, foi necessário estabelecer a eficiência do método de extração proteica. A figura 3 mostra que a relação entre o volume do solvente (NaOH a 0,1M) e a quantidade de farinha utilizada tem que ser estabelecida para a extração total das proteínas. Assim, na extração da proteína de farinhas preparadas a partir de grãos em diferentes faixas de pesos, notou-se que um volume de 10 ml foi muito mais eficiente na extração de 10 mg de farinha, que na de 100 mg. Assim a curva inferior da fig. 3 sempre apresentou uma subestimativa da proteína total e este erro foi relativamente maior em grãos mais pesados, como pode ser verificado pela comparação das inclinações das duas curvas. Deste modo a proteína extraída de 10 mg de farinha (curva inferior) para grãos de 340 mg foi somente cerca de 20% da extraída de 100mg de farinha (curva superior).

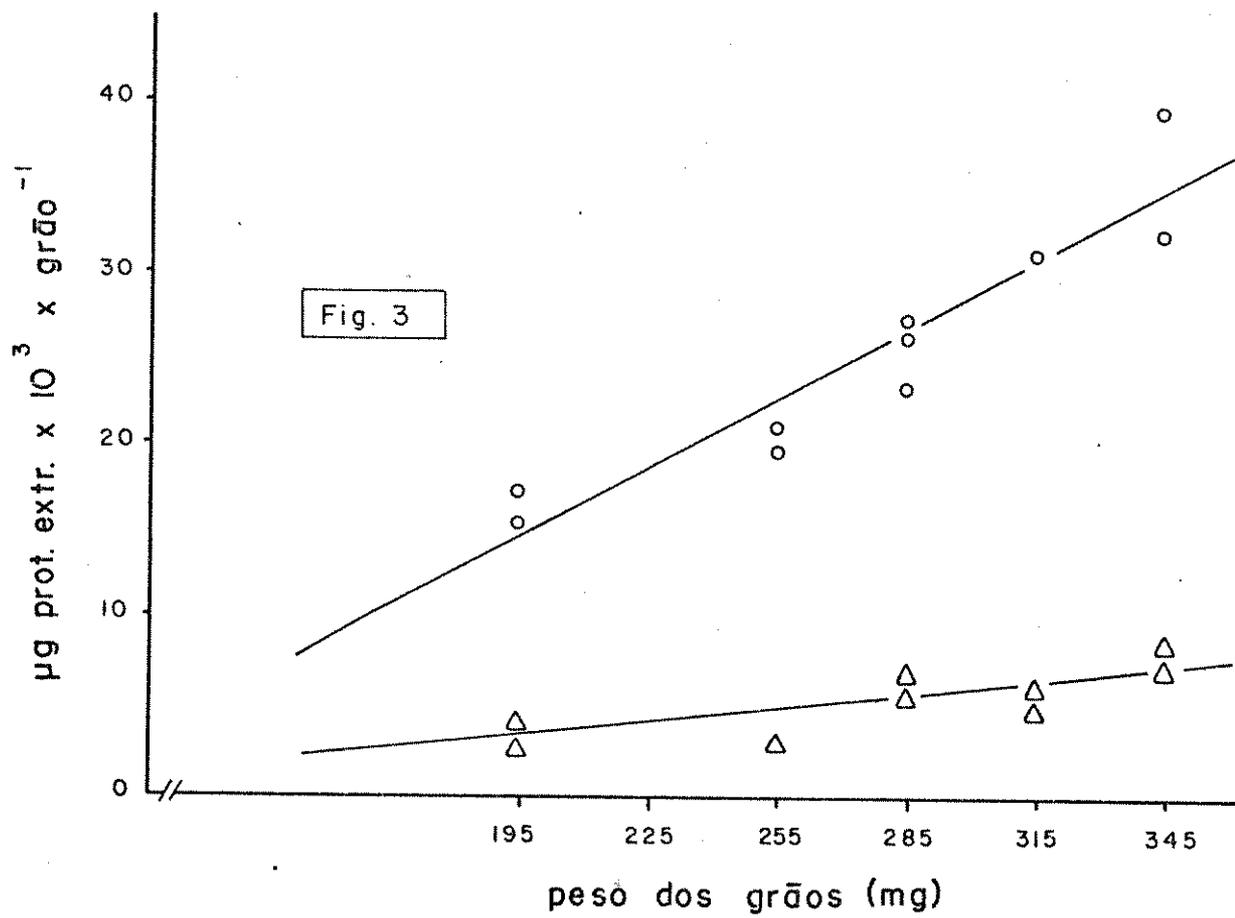
TABELA 3

Relação entre o peso do embrião e grãos de milho de vários pesos. O peso do embrião foi calculado através dos dados apresentados na fig. 2 para vários pesos de grãos, arbitrariamente escolhidos, entre 240 e 400 mg

peso do grão (mg)	peso do embrião (mg)		% do peso do embrião em relação ao total	
	normal	opaco	normal	opaco
240	31,6	37,7	13,2	15,7
280	37,2	45,4	13,3	16,2
320	42,8	52,5	13,4	16,4
360	48,5	59,6	13,5	16,6
400	54,1	-	13,5	-

Figura 3. Proteína total extraída de farinhas preparadas de grãos de milho de diferentes faixas de peso

- (o) - proteína extraída de 10 mg de farinha em 10 ml NaOH 0,1M (1 mg/ml)
- (Δ) - proteína extraída de 100 mg de farinha em 10 ml NaOH 0,1M (10 mg/ml)



Foi interessante notar que apesar do volume do meio de extração ser igual nas duas extrações, aquela onde se utilizou 100 mg de farinha apresentou um conteúdo proteico extraído menor. Mesmo aceitando-se que este volume de solvente não permitiria a extração total da proteína talvez se esperaria que a proteína extraída de 100 mg de farinha fosse maior que a de 10 mg. O resultado obtido indicou que o volume de solvente (10 ml) utilizado se tornou rapidamente saturado com outros compostos solúveis, além das proteínas, presentes na farinha, como açúcares livres, oligossacarídeos e amido presentes em maiores quantidades no grão.

Assim, por causa do coeficiente de partição existente entre os vários compostos que entram na fase solúvel ou permanecem insolúveis no resíduo, uma extração sequencial em várias etapas é invariavelmente mais eficiente do que uma única etapa de extração. Pode-se notar este fato na tabela 4, onde são apresentados resultados, de 3 experimentos, da extração de 250 mg de farinha em várias etapas sequenciais de 15 ml do meio de extração. Na primeira extração, cerca de 65% da proteína total foi extraída, na segunda ao redor de 20% e na terceira menos de 10%, tornando possível estabelecer-se que nestas primeiras 3 etapas de extração cerca de 95% da proteína total foi extraída e que a quarta, quinta e sexta etapas só retiram os últimos 5% de proteína. Estes dados mostraram que 4 extrações sequenciais numa razão aproximada de 1 ml/15 mg foram adequadas para extração de grande parte da proteína total. Assim ficou estabelecida a importância tanto da relação entre a quantidade de farinha a ser extraída e o solvente, como do número

TABELA 4

Porcentagem de proteína extraída em relação ao total em três experimentos independentes. A proteína de 250 mg de farinha de grãos de milho escolhidos dentro da faixa de peso normal foi extraída em seis etapas sequenciais de 15 ml de NaOH 0,1M

ETAPAS	% de proteína extraída		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
1	61,0	69,0	72,0
2	23,6	20,0	24,0
3	9,5	6,4	2,3
4	2,7	2,7	1,6
5	2,2	1,1	0,1
6	1,0	0,8	0,05
Total	100,0	100,0	100,0

ro mínimo de etapas sequenciais necessárias para se certificar que toda a proteína foi extraída.

De posse destes resultados, foi determinado o conteúdo proteico de grãos do milho normal e opaco de diferentes pesos. Estes resultados são mostrados na fig. 4 (a, b). Para as duas formas houve uma forte correlação ($r = 0,94$) entre o conteúdo proteico e o peso dos grãos, indicando que grãos de maior peso tem maior quantidade de proteína em termos absolutos. Em cada faixa de peso analisada verificou-se que grãos normais (fig. 4a) tem menos proteína que os opaco (fig. 4b) e que esta diferença é ainda maior em grãos mais pesados como é indicado pelo valor (b) da inclinação das retas. Assim, no intervalo de pesos analisado cada acréscimo de 1 mg no peso do grão do milho opaco foi acompanhado por um aumento de 134 μg de proteína enquanto que para o normal este acréscimo foi de apenas 87 μg . Verificou-se também, através destes dados, que na faixa de peso adotada como mais comum para o milho normal o conteúdo proteico variou em 6.000 μg (19.000 - 25.000 μg) e para o opaco esta variação foi de 7.000 μg (22.000 - 29.000 μg); esta maior variação é representada pela maior inclinação da reta que correlaciona os pesos dos grãos com seus conteúdos proteicos já mencionada acima (fig. 4b). Na tabela 5 é mostrada a porcentagem de proteína em relação ao peso seco total do grão. Notou-se que no milho normal a concentração de proteína no grão foi menor que a no opaco e que em ambos, esta porcentagem teve uma tendência de aumentar em grãos mais pesados, estabelecendo que estes tem um conteúdo proteico relativo maior que os mais leves.

Figura 4. Correlação entre o conteúdo proteico e o peso de grãos de Maya-normal (4a) e Maya-opaco-2 (4b) . Cada ponto representa valores obtidos das extrações de farinhas preparadas de grãos de vários pesos.

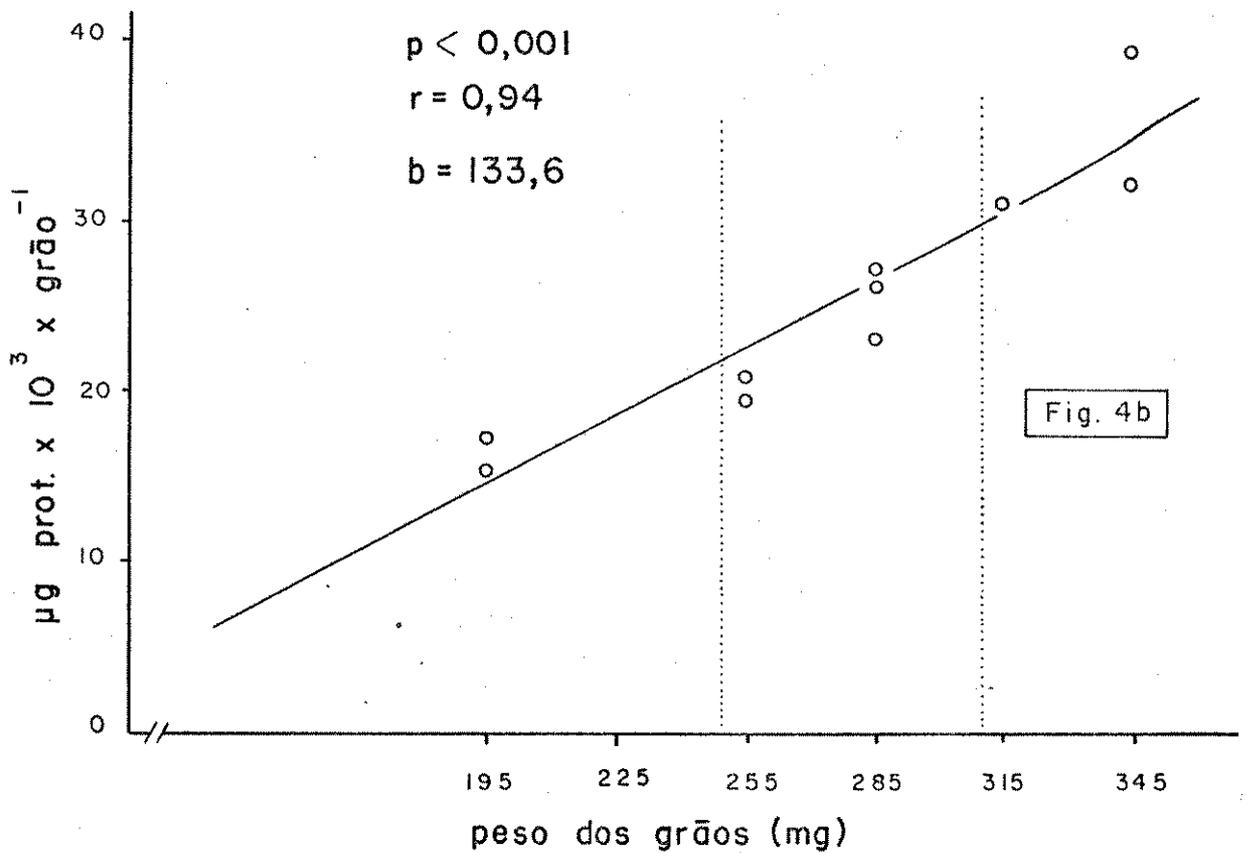
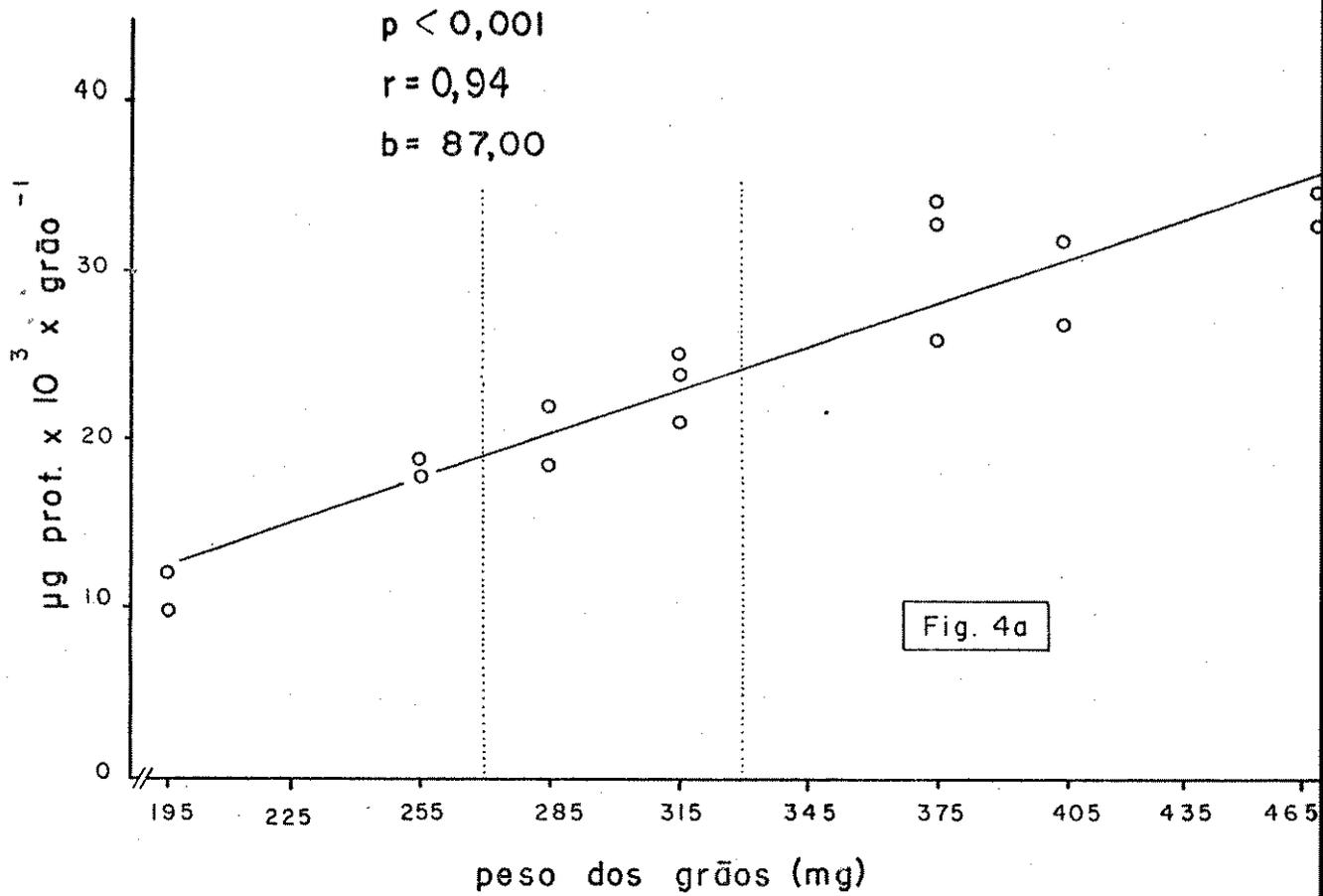


TABELA 5

Relação entre o conteúdo proteico e peso do grão em Maya-normal e Maya-opaco-2. Estes dados representam as médias dos valores obtidos nas extrações de farinhas preparadas de grãos de várias faixas de peso

Variedade	peso grão (mg)	µg prot./ grão	% prot. mat. seca
	195	11.100	5,7
	255	17.800	7,0
Maya	285	22.300	7,8
normal	315	24.200	7,7
	375	30.900	8,2
	465	34.000	7,3
	195	16.300	8,3
Maya	225	20.900	8,4
opaco-2	285	25.600	9,0
	315	30.900	9,8
	345	34.700	10,0

Prosseguindo-se a caracterização dos grãos em termos de proteínas, analisou-se a distribuição destas nas diferentes partes do grão, o endosperma e embrião. Na tabela 6 são apresentados os resultados deste estudo para ambas as formas de Maya, em 5 faixas de pesos diferentes, entre 210 e 420 mg. Como o conteúdo proteico total do grão (coluna 4) já havia sido determinado, pôde-se estimar a quantidade de proteína do endosperma (coluna 2) após a determinação experimental da proteína do embrião (coluna 3) pela diferença entre os dois valores. Na faixa de peso de 240 a 270 mg a proteína do endosperma também foi dosada experimentalmente e o total obtido pela soma desta com a do embrião foi semelhante ao total determinado anteriormente para o grão inteiro, mostrando a validade destes valores calculados para o endosperma. Como pode ser visto na coluna 3, o embrião do milho normal (Mn) possuiu um conteúdo proteico menor que o do opaco (Mop) e para ambas as formas houve um aumento da proteína do embrião acompanhando o aumento do peso do grão. Este aumento foi relativamente maior no normal; assim, na faixa de peso menor (210-240 mg), o valor proteico encontrado para o embrião desta variedade representou menos de 50% do encontrado para o opaco. Em grãos mais pesados esta diferença diminuiu sendo que o valor obtido para o embrião do milho normal foi agora somente 70 por cento do encontrado para o opaco. Novamente, no endosperma, em termos absolutos a forma normal mostrou um conteúdo proteico menor que o do opaco (coluna 2) e também, para ambas as variedades o conteúdo de proteína deste órgão aumentou em grãos mais pesados. Entretanto, as diferenças no conteúdo proteico do endosper-

TABELA 6

Conteúdo proteico do embrião e endosperma de Maya normal (Mn) e Maya opaco-2 (Mop). Estes dados representam as médias dos valores obtidos nas extrações de farinhas preparadas com embriões e endospermas de grãos em várias faixas de peso

1 aixa peso (mg)	2 µg proteína no endosperma		3 µg de proteína no embrião		4 µg proteína no grão		5 % proteína do em- brião em relação ao total		6 concentração de proteína no em- brião (µg/mg)		7 concentração de proteína no en- dosperma (µg/mg)	
	Mn	Mop	Mn	Mop	Mn	Mop	Mn	Mop	Mn	Mop	Mn	Mop
210 - 240	12.668	13.150	2.832	5.850	15.500	19.000	14,9	30,8	96	165	65	69
240 - 270	15.525	16.235	5.023	6.265	20.546	22.500	24,4	27,8	146	153	70	76
300 - 330	15.880	24.261	4.670	6.739	20.550	31.000	22,7	21,7	111	130	58	92
360 - 390	19.984	31.800	5.616	8.200	25.600	40.000	21,9	20,5	111	131	62	126
390 - 420	23.726	-	6.424	-	30.150	-	21,3	-	117	-	67	-

ma das duas variedades, ao contrário do que foi demonstrado para os embriões, foram maiores em grãos mais pesados. Assim, na faixa de 210 a 240mg houveram pequenas diferenças na quantidade de proteína do endosperma e portanto as desigualdades observadas no conteúdo proteico do grão inteiro (coluna 4) foram principalmente atribuídas às diferenças presentes nos embriões; em grãos mais pesados (360 a 390 mg) o conteúdo de proteína do endosperma do opaco foi consideravelmente maior e neste caso as diferenças notadas entre os grãos inteiros das duas variedades foram mais atribuídas ao endosperma. Assim, desigualdades no conteúdo proteico entre grãos de milho normal e opaco são mais notadas no embrião em grãos menores, enquanto que para grãos maiores estas são devidas ao conteúdo proteico do endosperma. As colunas 5, 6 e 7 desta mesma tabela apresentam a porcentagem de proteína no embrião em relação ao conteúdo proteico total do grão, a concentração proteica no embrião ($\mu\text{g}/\text{mg}$) e no endosperma, respectivamente. Em termos absolutos, o endosperma possuiu muito mais proteína que o embrião que contém aproximadamente 15 a 31 por cento da proteína total (coluna 5). Entretanto, por causa do tamanho menor do primeiro, a concentração de proteína nele (coluna 6) foi aproximadamente o dobro que a no endosperma (coluna 7). Novamente, também em termos relativos, em todas as faixas de peso analisadas a variedade opaco foi mais rica em proteína, tanto no endosperma como no embrião (colunas 6 e 7).

Tendo estabelecido que a variedade opaco tem um conteúdo proteico maior que a normal prosseguiu-se a análise das classes de proteínas do endosperma fracionando-as se

quencialmente. Em experimentos preliminares foi utilizado um método de fracionamento sequencial modificado, baseado no de Landry-Moureaux (1970), que reconhece três classes de glutelinas (veja Tabela 1). As modificações introduzidas foram na extração das albuminas e globulinas, que foi feita separadamente, as primeiras em água a frio e as últimas em solução salina para melhor comparar possíveis diferenças entre as duas formas. Em adição, na extração das glutelinas o último solvente do método original foi substituído por hidróxido de sódio 0,1M que retirou qualquer proteína restante. Simultaneamente ao fracionamento sequencial, numa segunda amostra da mesma farinha, foi feita uma extração da proteína total em dez etapas, com hidróxido de sódio a 0,1M para se estabelecer o conteúdo proteico total e se há alguma perda durante o fracionamento sequencial. Além disso, a proteína total das frações foi dosada pelo método de Lowry et al. (1951) tanto diretamente após a extração de cada etapa como após a precipitação da proteína deste extrato com ácido tricloroacético a 10%, de acordo com o esquema da pág. 61. Os resultados desta análise são apresentados na fig. 5 e Tabela 7. Este experimento forneceu vários resultados importantes, alguns favoráveis ao método utilizado e outros desfavoráveis.

Analisando-se inicialmente os pontos favoráveis, de acordo com a literatura, ficou claro que as formas normal e opaco são diferentes em suas classes proteicas e que o gene opaco-2, diminuindo a zeína aumenta as outras classes (albuminas, globulinas e glutelinas 3). Assim, pela tabela 7A pôde ser visto que as albuminas e globulinas juntas que re-

Esquema utilizado para dosagem das classes proteicas e
proteína total do endosperma

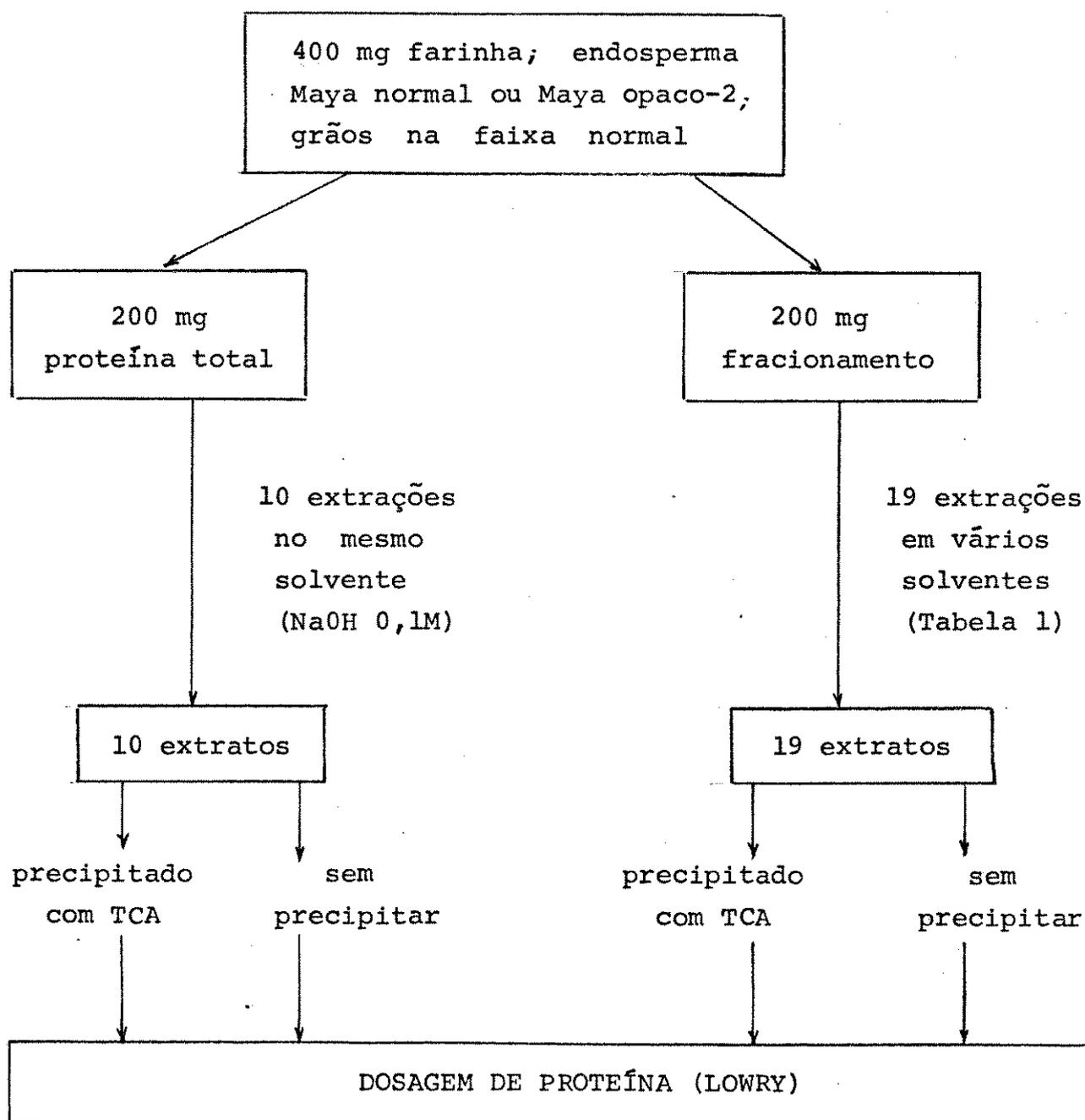


Figura 5. Proteína extraída de 200 mg de farinha de endosperma de grãos de Maya normal (o) e Maya opaco - 2 (●) escolhidos na faixa de peso normal, por fracionamento sequencial em dezenove etapas utilizando seis solventes:

- água - Albuminas (Alb.)
- NaCl 0,5M - Globulinas (Glob.)
- isopropanol 55% - Zeinas
- isopropanol 55% e 2-mercaptoetanol 0,6% -
Glutelina 1 (G1)
- tampão $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,05M pH 10 e 2-mercapto-
etanol 0,6% - Glutelina 2 (G2)
- NaOH 0,1M - Glutelina 3 (G3)

Fig. 5

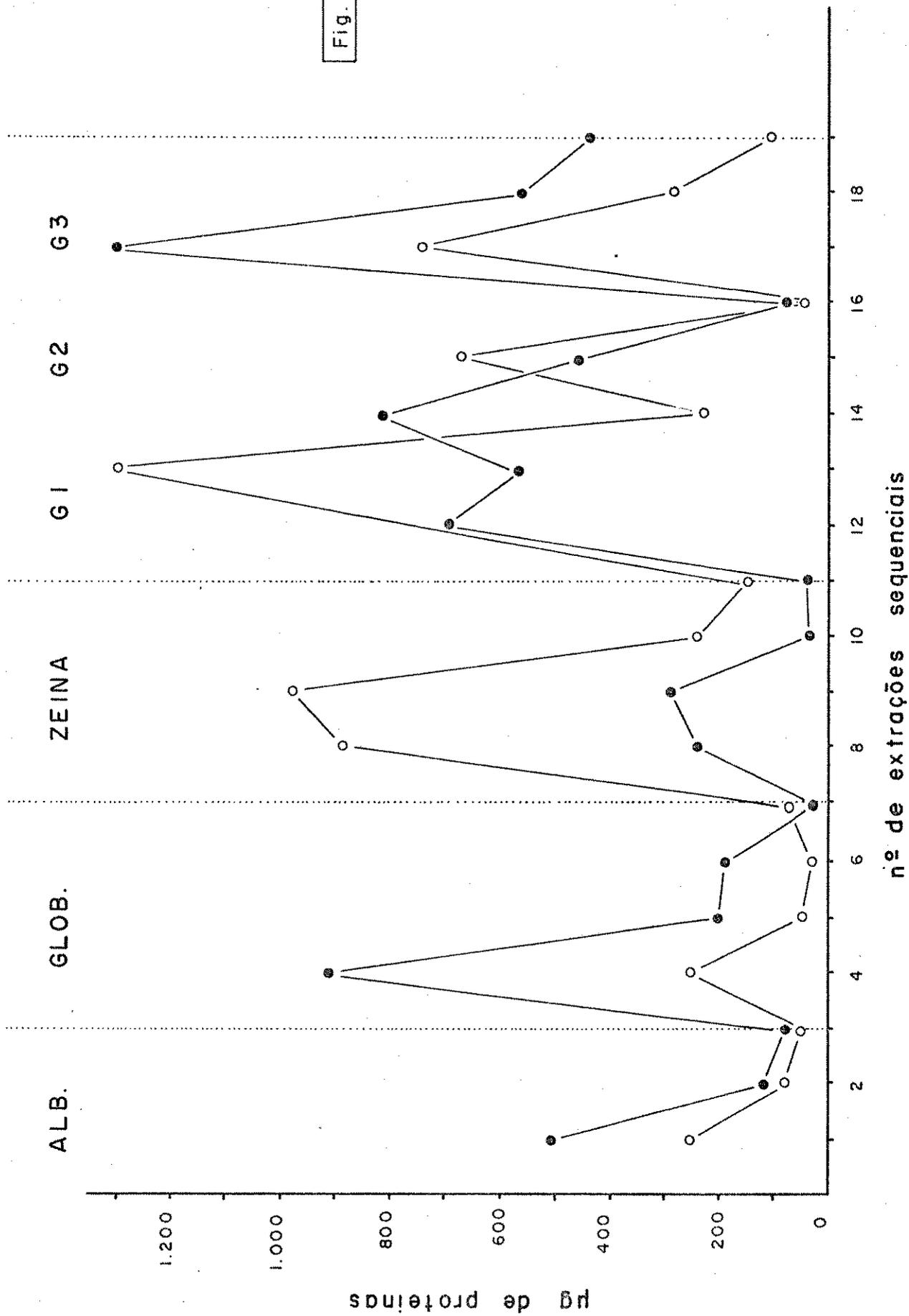


TABELA 7

Porcentagem de proteína obtida nas frações em relação ao total, após precipitação com ácido tricloroacético (7A). Totais de proteína (µg) obtidos no fracionamento das classes proteicas (i) e na extração da proteína total em 10 etapas (ii) (7B). As dosagens foram realizadas de acordo com o esquema da página 61

A	Frações	Maya normal		Maya opaco-2	
	Albumina	6,1		10,4	
			11,9		30,0
	Globulina	5,8		19,6	
	Zeína	32,4		8,3	
	Glutelina-1	29,5		25,8	
	Glutelina-2	9,9		6,8	
	Glutelina-3	16,2		32,3	

B		Maya normal		Maya opaco-2	
(i)	Total frações	+TCA	-TCA	+TCA	-TCA
	(19 etapas)	7662	-	7947	-
(ii)	Total NaOH	+TCA	-TCA	+TCA	-TCA
	(19 etapas)	9148	12950	8263	11850

presentavam 12% do total proteico na variedade normal passaram a constituir 30% da proteína total na variedade opaco. Esta diferença foi principalmente devida ao aumento das globulinas que de 5,8% do total no normal passaram a 19,6% no opaco, enquanto que as albuminas que constituíam 6,1% do total no normal passaram a ocupar 10,4% da proteína total no opaco. Deste modo, notou-se que as albuminas e globulinas são muito mais equilibradas no normal do que no opaco. Também, no milho opaco, houve uma grande diminuição na zeína que representou somente 25% da encontrada no normal. Em relação às glutelinas, observou-se também um aumento total destas na forma opaco. Esta diferença foi totalmente devida ao aumento na glutelina 3 que dobrou na forma opaco desde que as frações glutelina 1 e glutelina 2 foram maiores no milho normal. Um segundo ponto que pôde ser notado foi que a extração sequencial foi bem eficiente parecendo não ter havido contaminação entre as classes proteicas, assim, cada etapa da extração com um mesmo solvente retirou menos proteína que a etapa anterior e quando o solvente foi mudado, no final da extração de cada classe, a proteína extraída aumentou nitidamente. Assim na primeira extração da zeína (etapa 8) da variedade normal houve um grande aumento na proteína extraída, seguindo a última etapa das globulinas (etapa 7) quando esta fração já foi totalmente extraída.

Considerando os pontos desfavoráveis a este método, alguns fatos puderam ser estabelecidos. Primeiramente, a presença de 2-mercaptoetanol no solvente para a extração da glutelina 1 e 2 interferiu no método de dosagem de proteína utilizado (Lowry et al., 1951). Assim, somente foi

possível apresentar os resultados obtidos no fracionamento onde a dosagem de proteína foi feita após a precipitação com ácido tricloroacético (Tabela 7A). Em segundo lugar, a precipitação da proteína com ácido tricloroacético, que seria necessária para evitar a interferência do 2-mercaptoetanol, diminuiu consideravelmente a proteína total recuperada. Assim, na tabela 7B (ii) quando a proteína total foi dosada após a precipitação com ácido tricloroacético a recuperação foi sempre menor do que quando dosada diretamente sendo a perda cerca de 30%. Esta perda considerável foi devida ao acúmulo de várias pequenas perdas durante a precipitação nas dez etapas da extração. Além destas dificuldades apresentadas foi difícil a precipitação da zeína com ácido tricloroacético, fato que aumentou as perdas nesta classe proteica. Isto talvez explique a baixa quantidade de zeína recuperada para a variedade normal comparada com as glutelinas (Tab. 7A, Fig. 5). O total de proteína calculado a partir da soma das frações proteicas (Tabela 7B (i)) foi ainda menor que o obtido nas dez etapas da extração da proteína total (Tabela 7B (ii)), como era esperado, desde que no primeiro caso houve o acúmulo de perdas de 19 etapas. Entretanto, a diferença entre estes dois totais obtidos foi entre 10 e 15%, valores que quando comparados com cerca de 30% de proteína perdida com a precipitação com ácido tricloroacético, tornaram possível estabelecer que embora durante o fracionamento tenham ocorrido pequenas perdas, estas não foram significativas como as ocasionadas pela precipitação com ácido tricloroacético. Resumindo, embora este método tenha mostrado as diferenças qualitativas entre o milho nor

mal e o opaco-2, quantitativamente o método não foi eficiente devido a interferência do mercaptoetanol na dosagem pelo método de Lowry. Isto não pôde ser evitado pela precipitação com ácido tricloroacético pois esta provocou grandes perdas e não foi adequada para a zeína uma das frações mais importantes para a comparação das duas formas.

Sabendo-se pela literatura que não existem grandes diferenças entre as formas opaco e normal nas frações de glutelina 1 e 2, fato que também foi demonstrado nesta análise (Tabela 7A) e que estas frações são aquelas que necessitam a presença do 2-mercaptoetanol, foi decidido modificar este método de extração eliminando-se as etapas onde o 2-mercaptoetanol estava envolvido. Assim, nos experimentos subsequentes o fracionamento sequencial foi simplificado, envolvendo somente três etapas (Tabela 2). As albuminas e globulinas foram extraídas juntas ou separadas, seguidas pelas zeínas numa segunda etapa e todas as glutelinas foram extraídas num único solvente (NaOH 0,1M). Este novo método, manteve todas as vantagens do anterior, pois mostrou as diferenças entre o milho normal e o opaco e qualquer modificação observada nas glutelinas pôde ser atribuída na sua maior parte às mudanças na glutelina 3. Novamente foi determinado o número de etapas necessárias para a extração eficiente neste novo método. A figura 6 mostra a proteína extraída de 200 mg de farinha de endosperma das variedades opaco e normal utilizando 10 ml do solvente em cinco etapas para cada fração. A proteína de cada etapa foi determinada diretamente, pelo método de Lowry et al. (1951) sem precipitação com ácido tricloroacético. Do mesmo modo

Figura 6. Proteína extraída de 200 mg de farinha do endosperma de grãos de Maya normal (.....) e Maya opaco-2 (——) escolhidos na faixa de peso normal, por fracionamento sequencial em quatorze etapas utilizando três solventes:

- NaCl 0,5M - Albuminas e Globulinas (Alb. e Glob.)
- isopropanol 55% - Zeinas
- NaOH 0,1M - Glutelinas (Glut.)

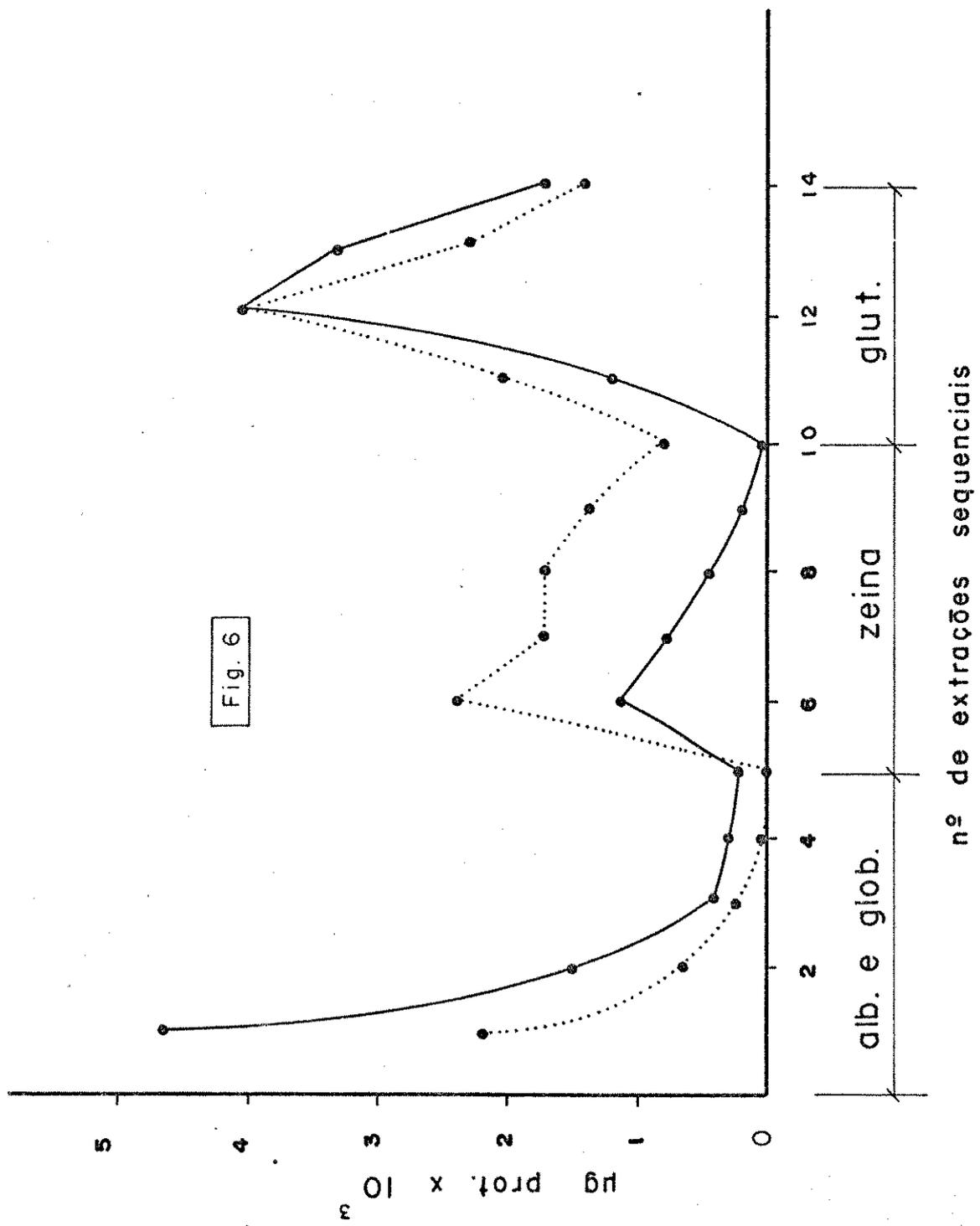


Fig. 6

que nas extrações anteriores as primeiras etapas de cada fração retiraram a maior parte da proteína da farinha e as últimas etapas retiraram pouco em relação ao total, mostrando que os solventes utilizados foram eficientes na extração das diferentes classes proteicas. No caso das glutelinas a segunda etapa da extração retirou mais proteína que a primeira provavelmente, porque na primeira houve contaminação do solvente (NaOH 0,1M) com álcool da última etapa da extração de zeína. Este fato não foi de grande importância neste experimento, já que na segunda etapa, a pequena contaminação do álcool foi completamente eliminada. Pôde-se observar novamente que houve um aumento nas albuminas e globulinas no milho opaco, acompanhado por uma diminuição da zeína.

Utilizando-se este método, tanto o conteúdo proteico de cada classe como também a proporção ocupada por ele em relação ao total foram determinados; simultaneamente, foi feita uma extração da proteína total utilizando um lote igual da mesma farinha que foi extraído em seis etapas. Estes resultados são apresentados na Tabela 8A. O primeiro ponto importante a ser notado foi que o total derivado da soma das classes proteicas (Total 1) foi semelhante (sendo a diferença menor que 10%) ao derivado da soma das seis extrações da proteína total (Total 2) num único solvente (NaOH 0,1M). Notou-se também que o conteúdo proteico total do endosperma da forma opaco foi ligeiramente maior (ao redor de 22.000 µg prot.) que o da forma normal (cerca de 19.000 µg prot.) como já havia sido observado anteriormente (Fig. 4 e Tabela 5). Analisando-se as fra-

TABELA 8

Classes de proteínas do milho normal e opaco-2 e proporção ocupada por elas em relação ao total de proteínas no grão, obtidas por fracionamento sequencial de 200 mg de farinha do endosperma (8A). Total 1 = soma das diferentes frações proteicas. Total 2 = soma das seis extrações da proteína total num único solvente (NaOH 0,1M)

A	Maya normal		Maya opaco-2	
	total da fração (µg)	% do total geral	total da fração (µg)	% do total geral
Albumina e Globulina	3.120	15	7.060	35
Zeina	8.080	38	2.570	13
Glutelina	9.940	47	10.350	52
Total 1	21.140	100	19.980	100
Total 2	19.180	-	21.850	-

Porcentagem de albuminas e globulinas em relação ao total de proteína do grão obtidas pelo fracionamento sequencial de 200 mg de farinha de endosperma de Maya normal (Mn) e Maya opaco-2 (Mop) (8B)

B	Frações	% de proteína em relação ao total	
		Mop	Mn
	Albuminas	9,6	7,1
	Globulinas	20,0	7,8
	Total	29,6	14,9

ções proteicas obtidas (Tabela 8A) observou-se que, tanto em termos absolutos como relativos, a fração de albuminas e globulinas que também contem os aminoácidos livres foi no milho opaco, mais do que o dobro que no normal. As diferenças entre as duas variedades foram ainda mais marcantes para a zeína, sendo que o gene opaco-2 diminuiu esta fração em um terço em relação ao milho normal. Assim, a zeína, que ocupa normalmente cerca de 40% da proteína total da reserva passa a ocupar somente 13% na presença do gene opaco-2, porcentagem esta que é menor que a ocupada pela fração de albuminas e globulinas (15%), proteínas menos abundantes no endosperma do milho normal. Como era esperado, a fração das glutelinas foi a menos modificada, sendo que houve um pequeno aumento, tanto em termos absolutos como relativos no milho opaco.

A fração das albuminas e globulinas foi analisada separadamente em água a frio e solução salina respectivamente, visto que o gene opaco-2 aumenta relativamente mais as globulinas (Tabela 7A). A Tabela 8B mostra os totais obtidos para as duas frações que concordaram com os obtidos no experimento anterior (Tabela 8A). Também, os totais proteicos das frações em particular estão de acordo com os apresentados na Tabela 7A confirmando que o aumento da fração albuminas e globulinas, provocado pelo gene opaco 2, foi realmente devido às globulinas que constituíram o dobro das albuminas e que no milho normal as duas frações foram equilibradas.

Finalizando a caracterização do material, analisou-se o conteúdo de água em quarenta grãos, para cada for-

ma, com diferentes pesos e escolhidos ao acaso. O peso dos grãos escolhidos para o milho opaco variou de 190 a 350 mg e para o normal, de 200 a 470 mg confirmando novamente que a amplitude de variação de peso para o milho opaco foi menor que a para o normal. Verificou-se que o conteúdo de água no grão das duas variedades foi semelhante. Adotando-se o limite de confiança de 95%, obteve-se para o milho normal um teor de água no grão de $9,2 \pm 0,25\%$ e para o opaco $9,5 \pm 0,46\%$. A relação do peso fresco do grão contra o peso seco (Fig. 7 a,b) mostrou que para ambas as formas, grãos mais pesados apresentaram um maior conteúdo de água. Este aumento foi idêntico para as duas formas e é indicado pela inclinação da reta ($b = 1,09$).

II. CRESCIMENTO INICIAL E UTILIZAÇÃO DAS RESERVAS

Analisando-se a embebição de grãos das duas variedades, com pesos e conteúdo de água inicialmente iguais, notou-se que o milho opaco absorveu durante as primeiras sete horas de embebição maior quantidade de água e mais rapidamente que o normal (Fig. 8a). Esta situação permaneceu até o segundo dia de embebição (fig. 8b) e pôde ser notado que houve duas fases na absorção de água, uma inicial mais rápida, até por volta de sete horas e outra mais lenta após este período.

Em um experimento preliminar foi estudado o crescimento inicial das duas formas com grãos com pesos dentro da faixa normal a fim de verificar o tempo em que o crescimento da plântula é dependente das reservas do endosperma e

Figura 7. Correlação entre o peso seco (P.S.) e fresco (P.F.) de quarenta grãos de Maya normal (7a) e Maya opaco-2 (7b) escolhidos ao acaso.

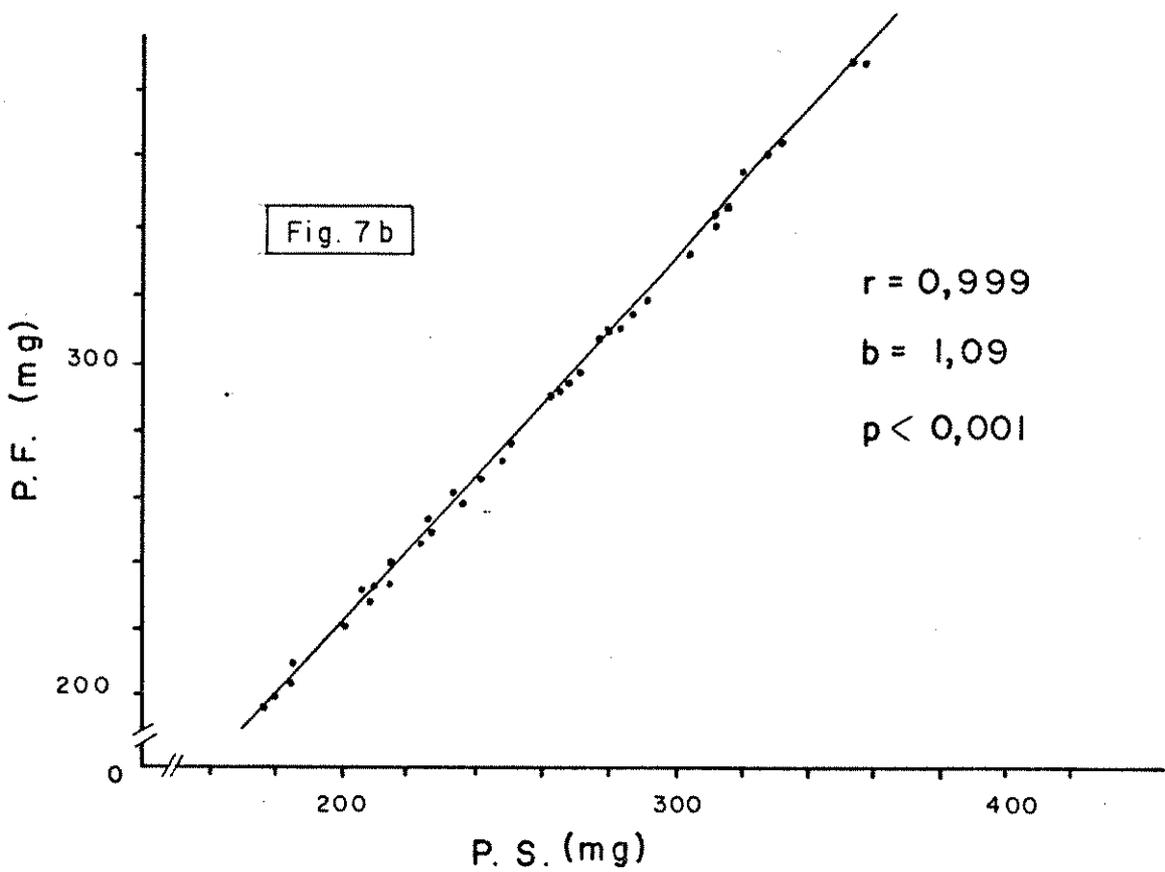
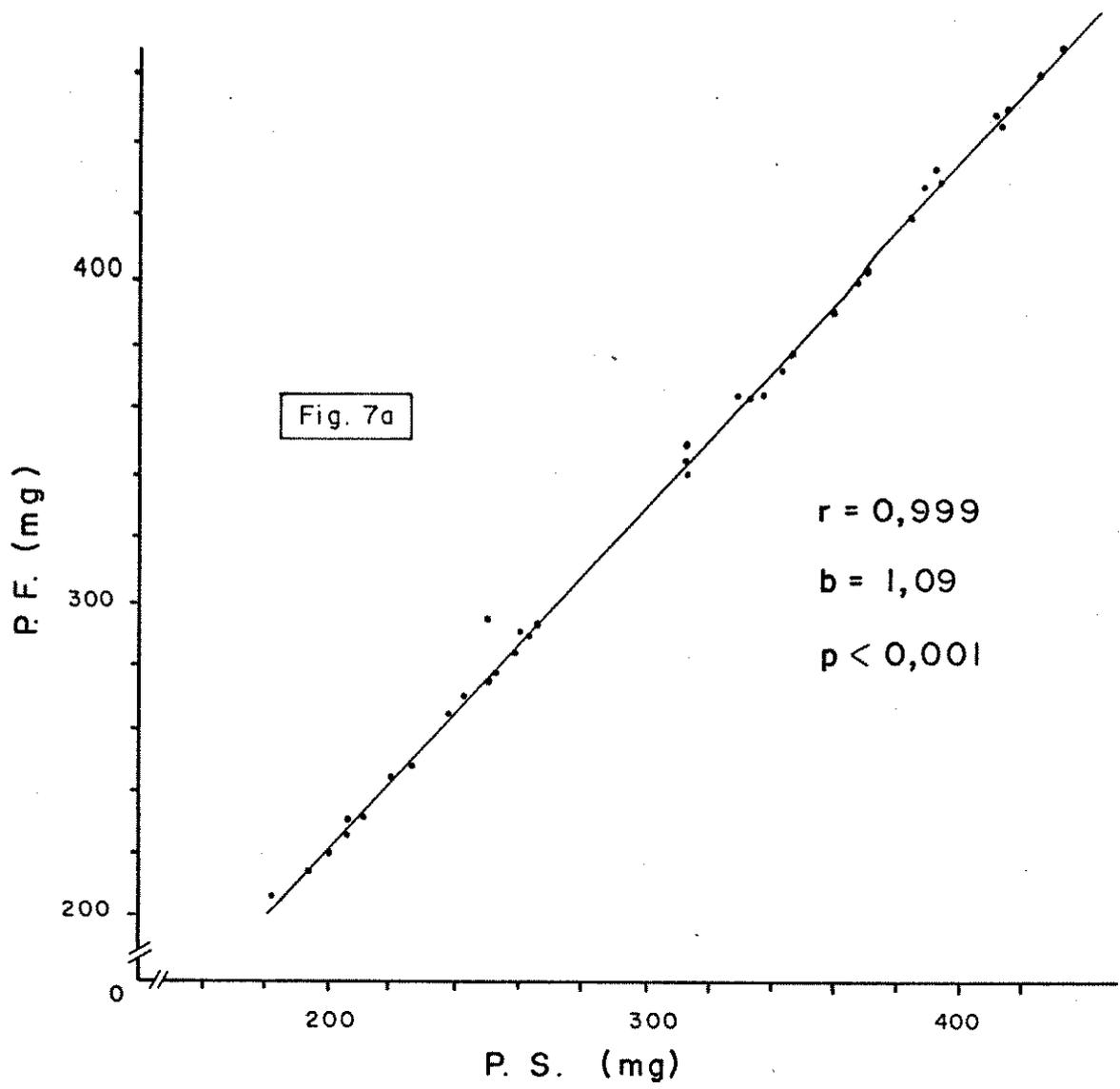
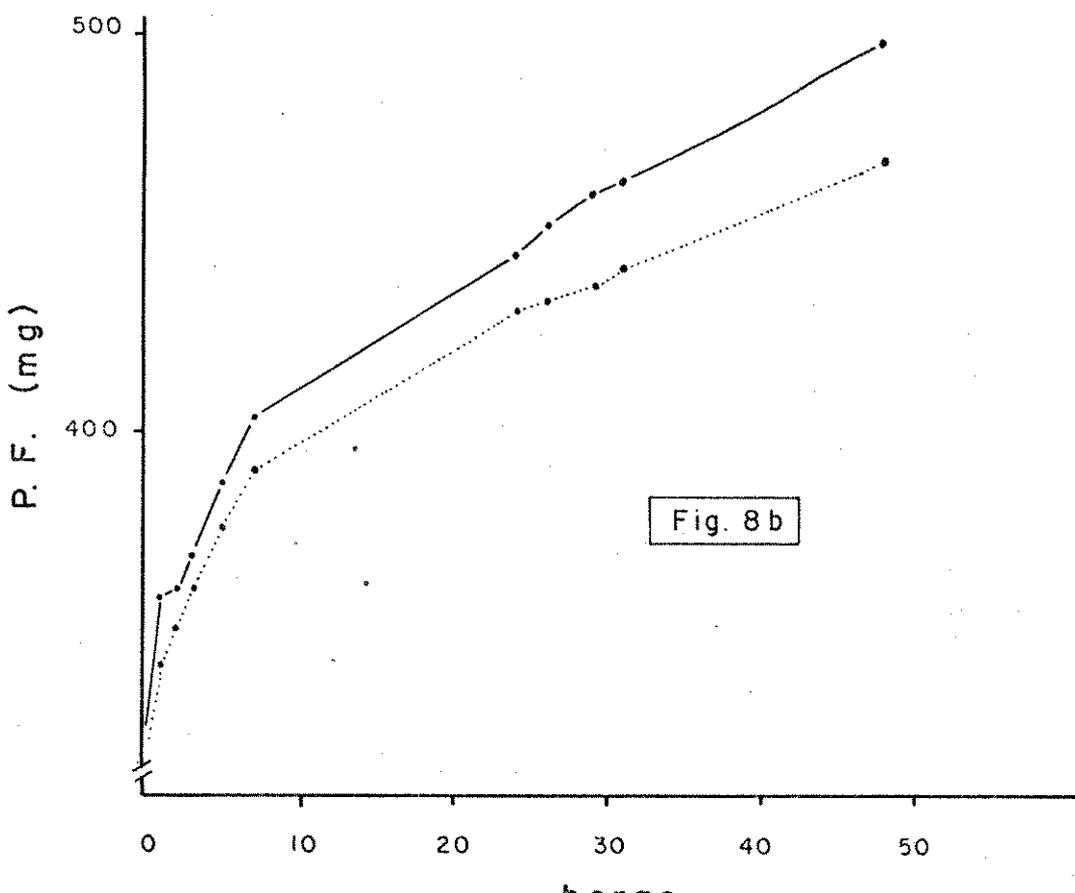
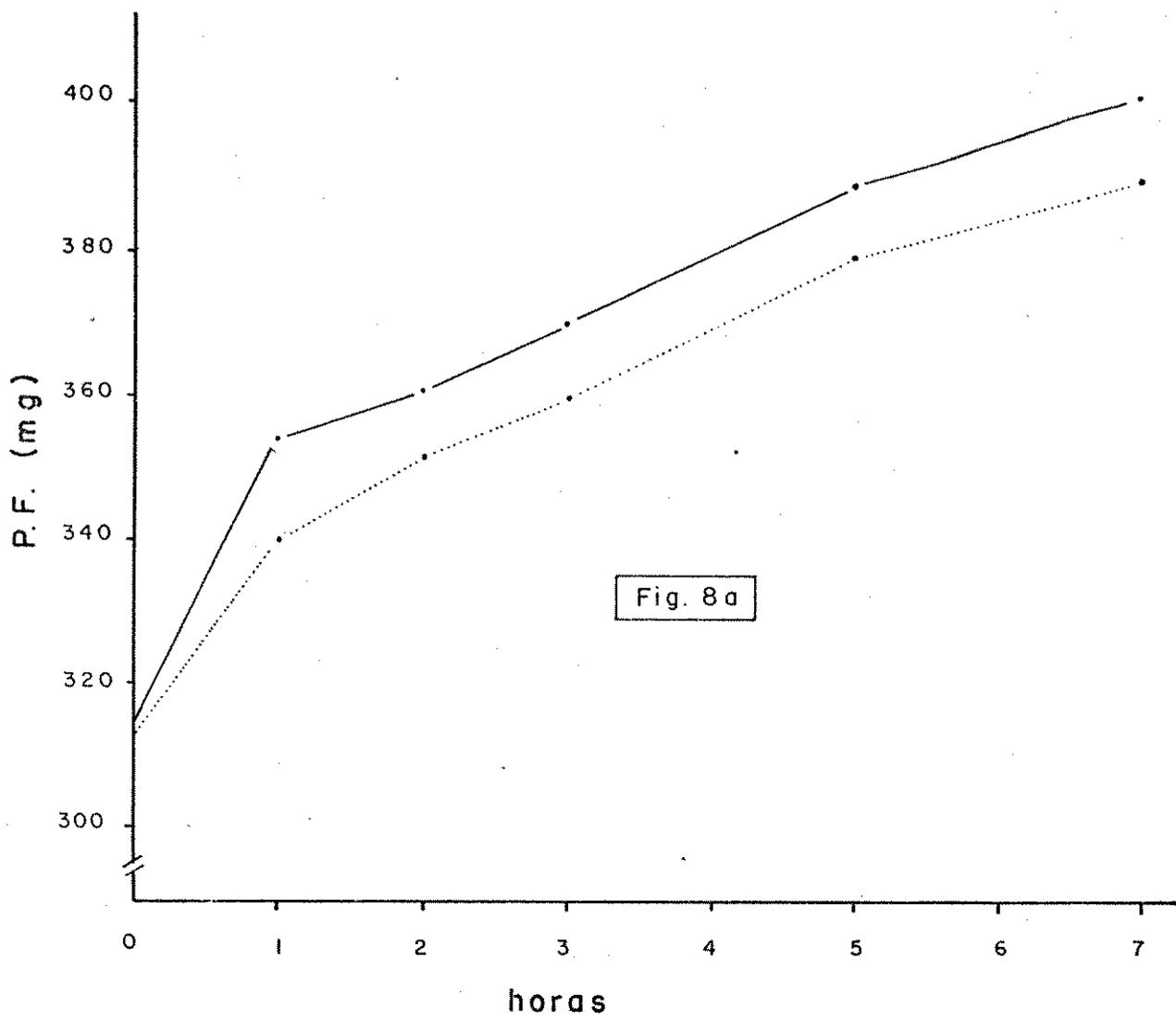


Figura 8. Aumento do peso fresco (P.F.) de grãos de Maya normal (.....) e Maya opaco-2 (—) durante sete horas (8a) e quarenta e oito horas (8b) de embebição. Cada ponto representa a média de 15 valores.

P.S. = peso seco



se há diferenças na partição deste material durante o crescimento das duas formas. Assim, as plântulas foram analisadas nos dias 2, 5, 9 e 12 após o início da embebição. Nota-se, na figura 9 (a, b) que o padrão de desenvolvimento da plântula e utilização das reservas foi semelhante para as duas formas, apesar das diferenças iniciais nos pesos dos grãos. Tanto para o milho normal como para o opaco o peso seco do endosperma diminuiu até o nono dia de crescimento, quando as reservas pareceram terminar. Este fato foi acompanhado por um aumento no peso seco da raiz e parte aérea, indicando que parte do material foi translocado para o eixo em crescimento. A parte aérea foi invariavelmente mais pesada que a raiz, em cada idade, para ambas as formas, embora esta diferença tenha ficado menor nos últimos dias de análise, provavelmente devido à falta de nutrição exógena. Grande parte do material seco do endosperma não foi translocado para o eixo em crescimento mas provavelmente perdido pela respiração como foi indicado pelas curvas de peso seco total que decresceram até o quinto dia. Do quinto ao nono dia o peso seco total não variou muito, após este tempo o peso seco total aumentou concomitante a um aumento exponencial da área da folha 1 (Fig. 10a). Comparações do crescimento dos órgãos das duas formas, no geral, não indicaram diferenças significativas entre elas, tanto em termos de área foliar, como em peso seco de raízes e parte aérea (Fig. 10 a,b,c). Provavelmente, as pequenas diferenças observadas no décimo segundo dia de crescimento foram devidas ao peso maior do grão do milho normal, ao invés de diferenças intravarietais.

Figura 9. Mudanças no peso seco (P.S.) de plântulas e seus órgãos durante o crescimento inicial de Maya normal (9a) e Maya opaco-2 (9b).

(◇) - peso total; (o) - endosperma; (▣) - eixo
(□) - parte aérea; (■) - raiz

Cada ponto representa a média de 5 valores.

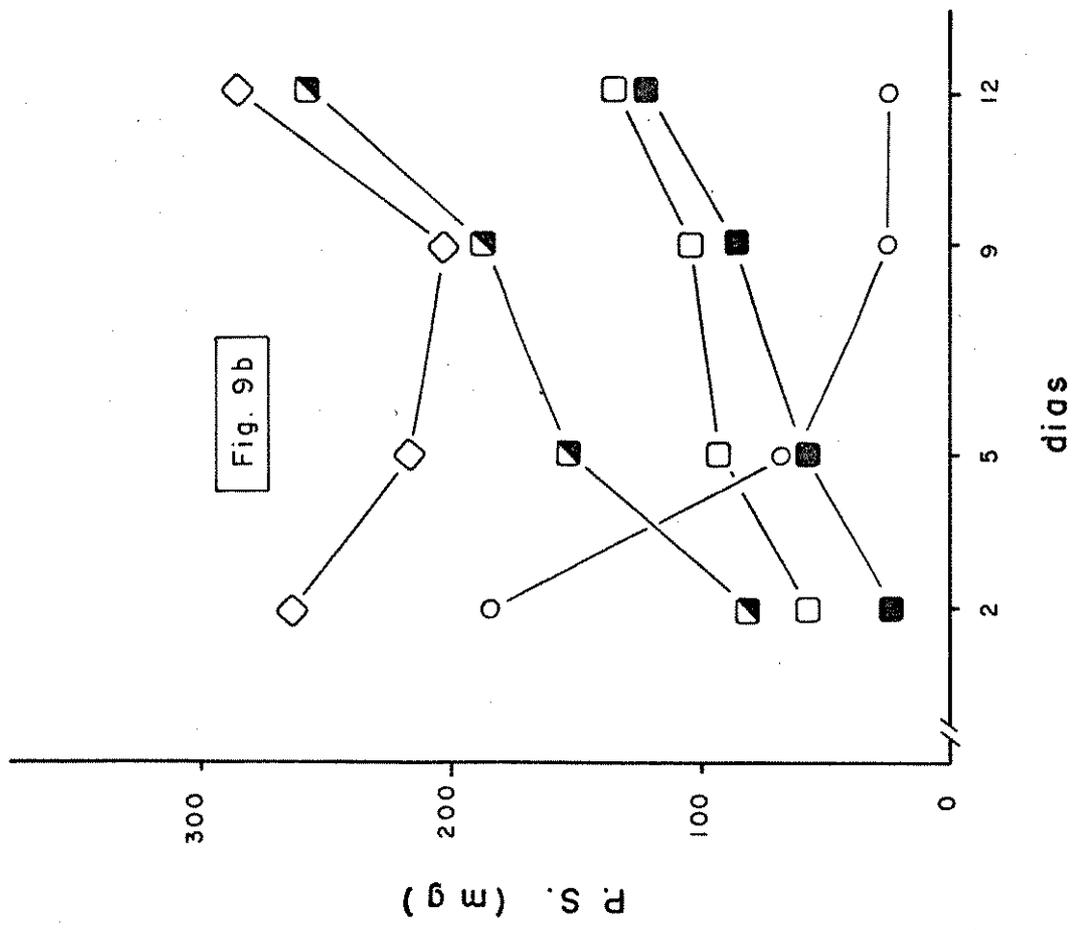
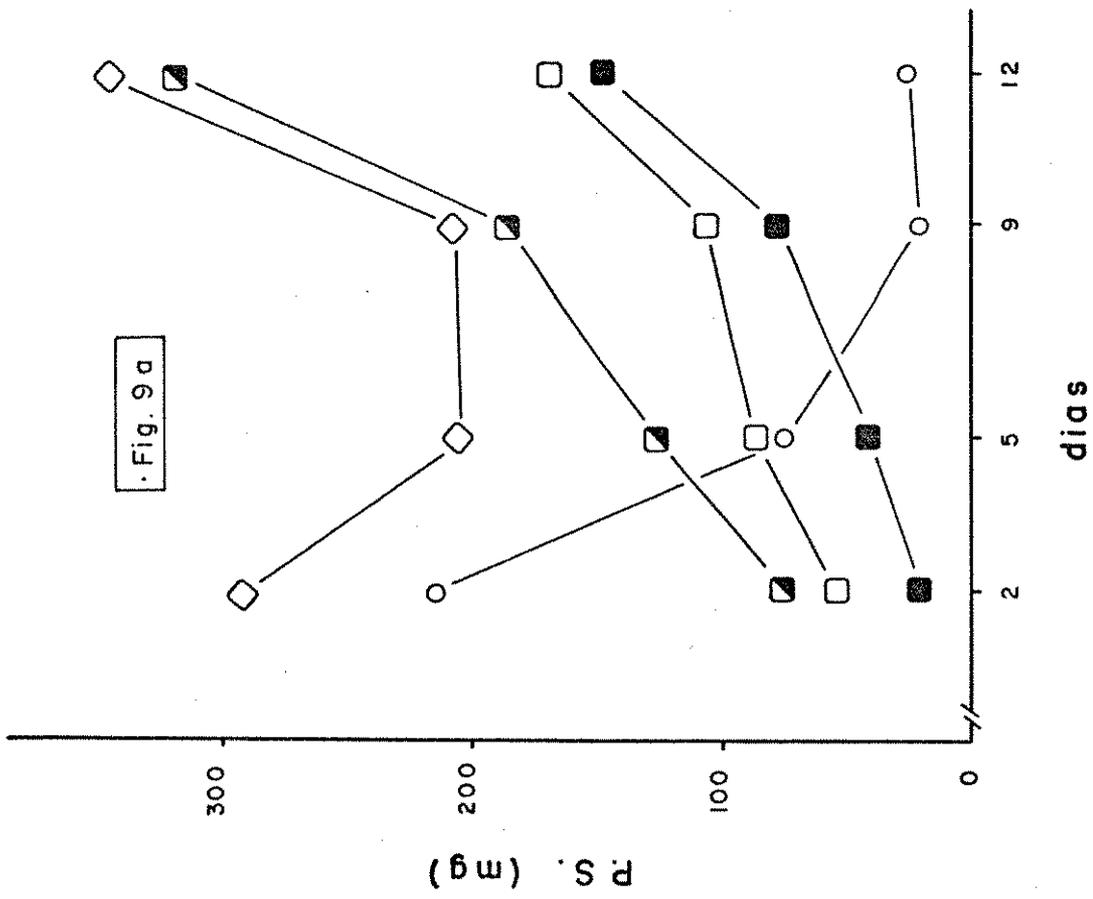
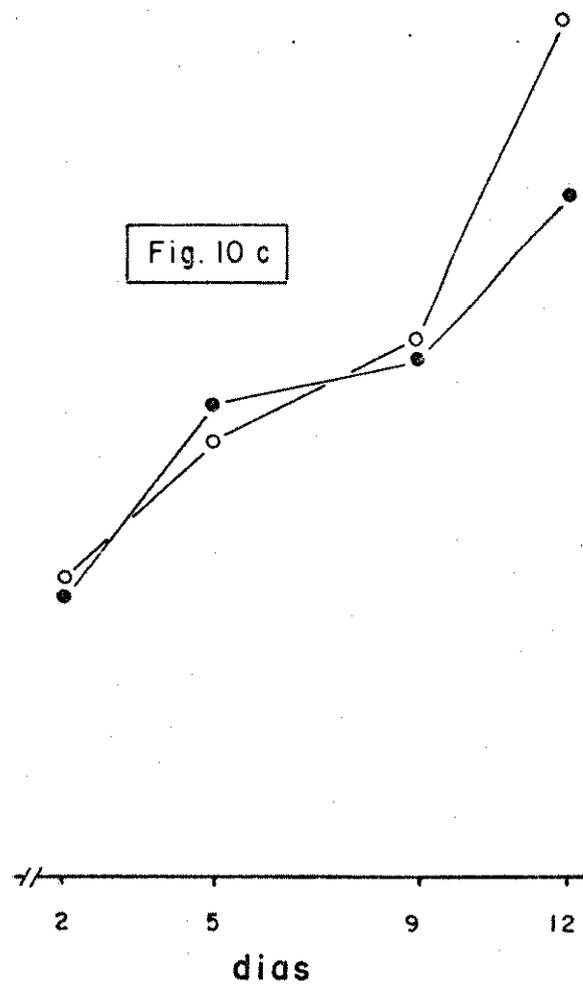
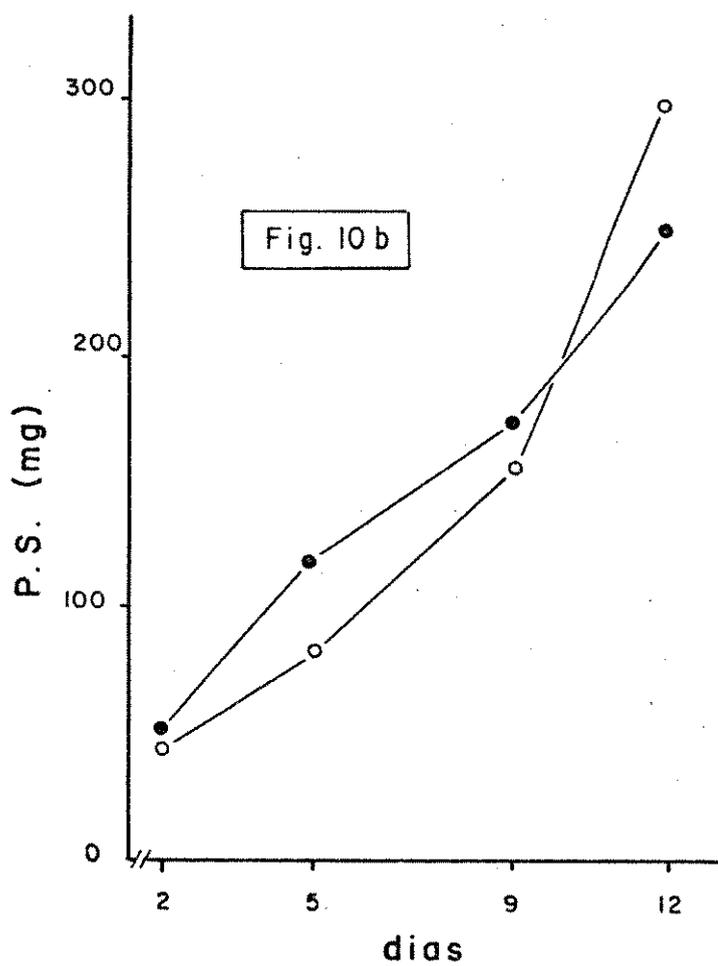
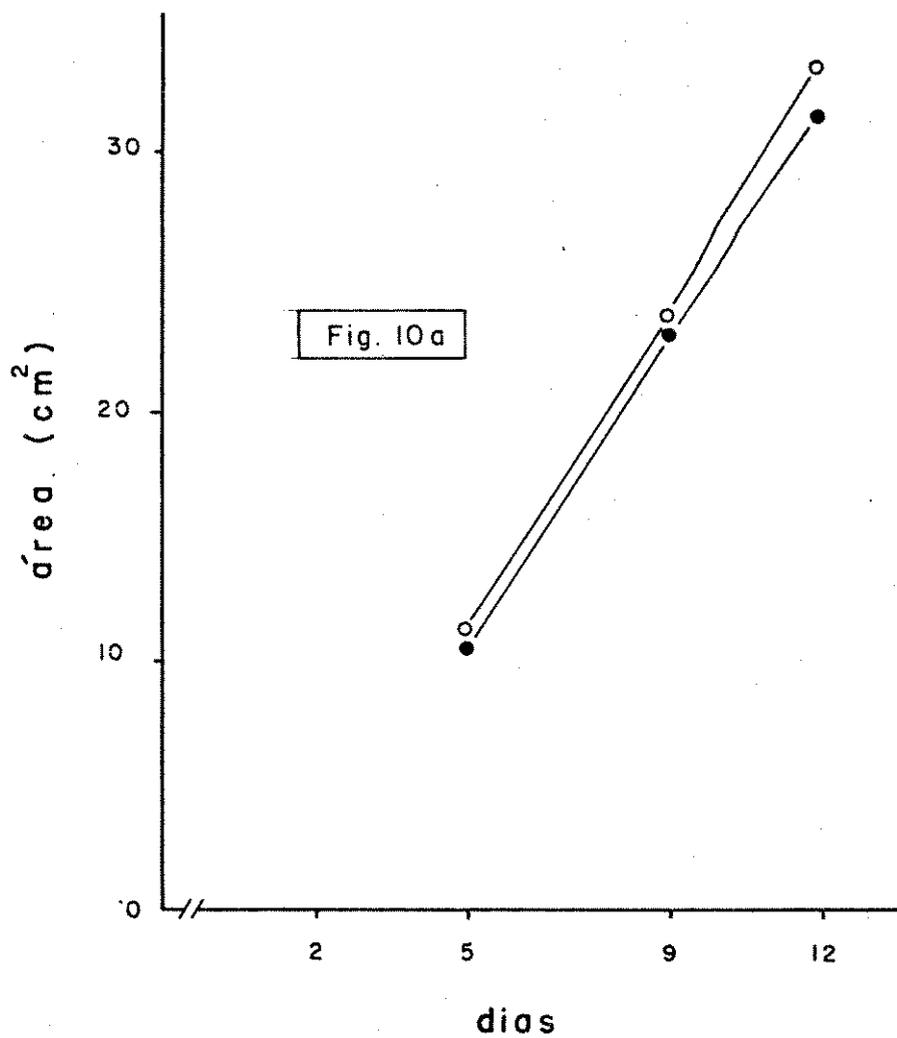


Figura 10. Mudanças observadas durante os doze primeiros dias de crescimento de plantas de Maya normal (o) e Maya opaco-2 (●) em:

- área da lâmina da primeira folha (10a)
- peso seco de raízes (10b)
- peso seco da parte aérea (10c)

Cada ponto representa a média de 5 valores.

P.S. = peso seco



Para eliminar dificuldades na comparação do crescimento dos dois tipos de milho surgidas pelos diferentes pesos iniciais dos grãos dentro da faixa normal de cada forma e para melhor estudar a translocação das reservas, tanto de material seco (equivalente aos carboidratos) como de proteínas, nos experimentos subsequentes, grãos de mesmo peso foram escolhidos dentro da faixa mais comum para as duas formas. Resultados de dois experimentos independentes são mostrados na Fig. 11 (a,b) onde pode ser visto que em termos de peso fresco não houve diferenças no crescimento do eixo do milho normal e opaco nas etapas iniciais analisadas e, por volta do quinto dia o eixo dos dois pesava cerca de 1 g. As mudanças no peso seco durante o crescimento são mostradas na Fig. 12 (a,b). No primeiro experimento onde estas mudanças foram analisadas até o sexto dia (Fig. 12a) novamente observou-se que o peso seco do endosperma diminuiu, processo acompanhado por um aumento no peso do eixo, sendo estas mudanças iguais para as duas variedades. O maior decréscimo no peso seco do endosperma só ocorreu depois do segundo dia de crescimento, fato que foi refletido no peso do eixo que não aumentou neste intervalo inicial de tempo. Entre o segundo e sexto dias, em ambas as formas, o peso seco do endosperma caiu de 200 mg para menos de 80 mg, o que representa uma taxa de degradação de 30 mg de matéria seca por dia, ou seja 13% do peso seco inicial do endosperma. O peso seco total para os dois tipos de milho diminuiu continuamente durante o período analisado, sendo que no sexto dia a perda total de material seco representou 25% do peso inicial. O peso seco do escutelo do milho opaco foi sempre

Figura 11. Mudanças no peso fresco (P.F.) e do endosperma (end.) durante o crescimento inicial de plântulas de Maya normal (.....) e Maya opaco-2(——) em dois experimentos (11a, 11b).

Cada ponto representa a média de 5 valores.

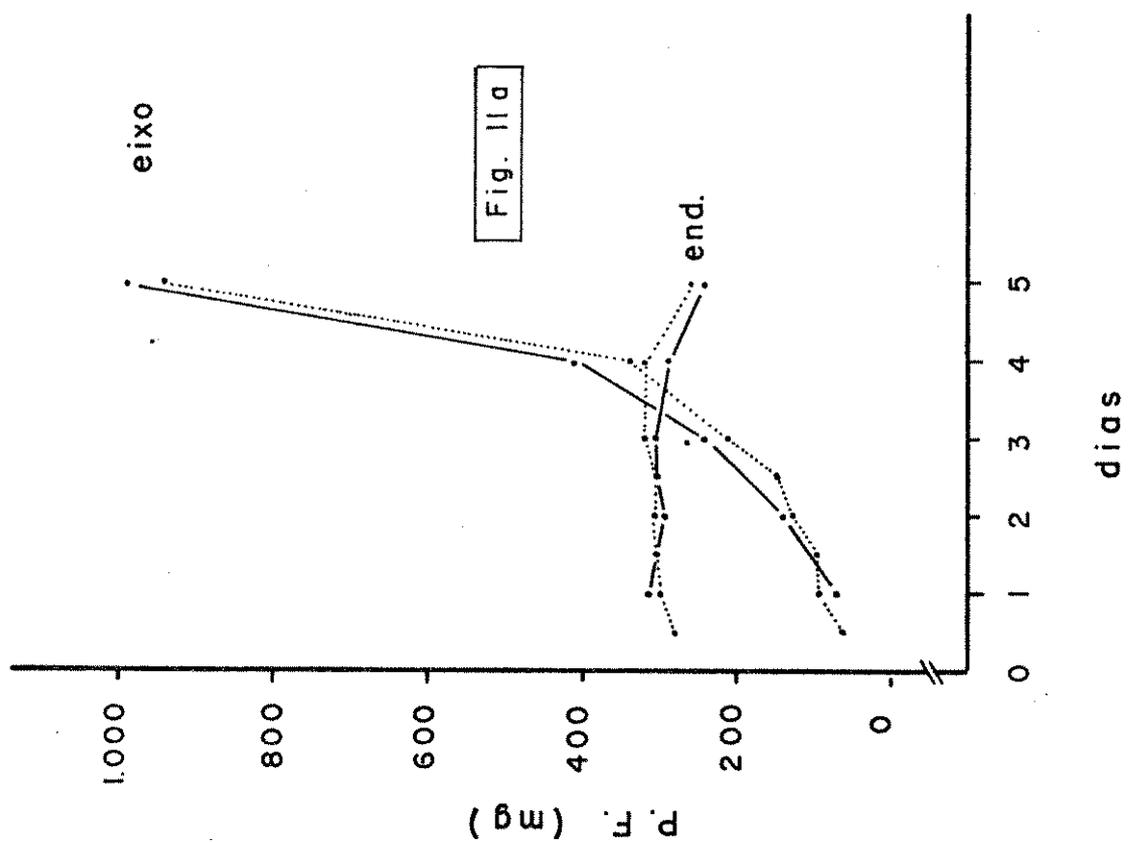
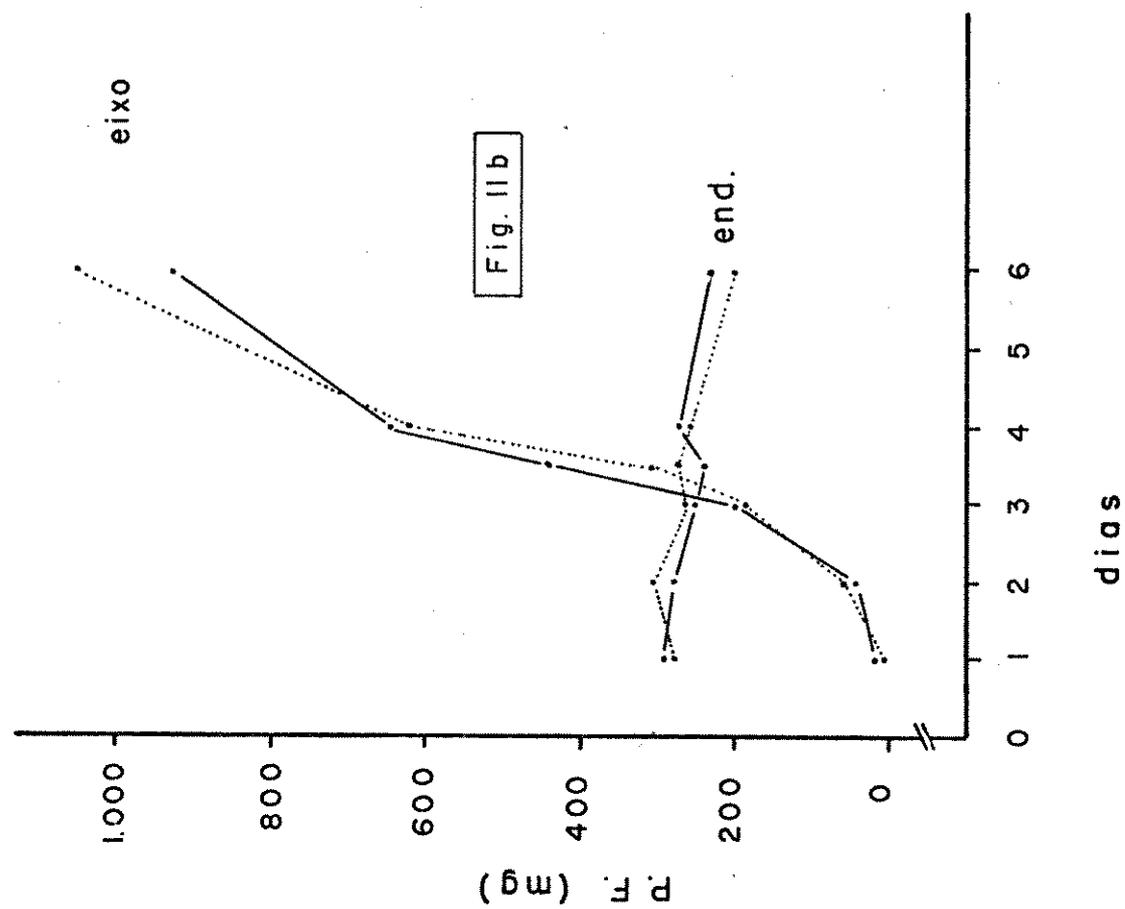
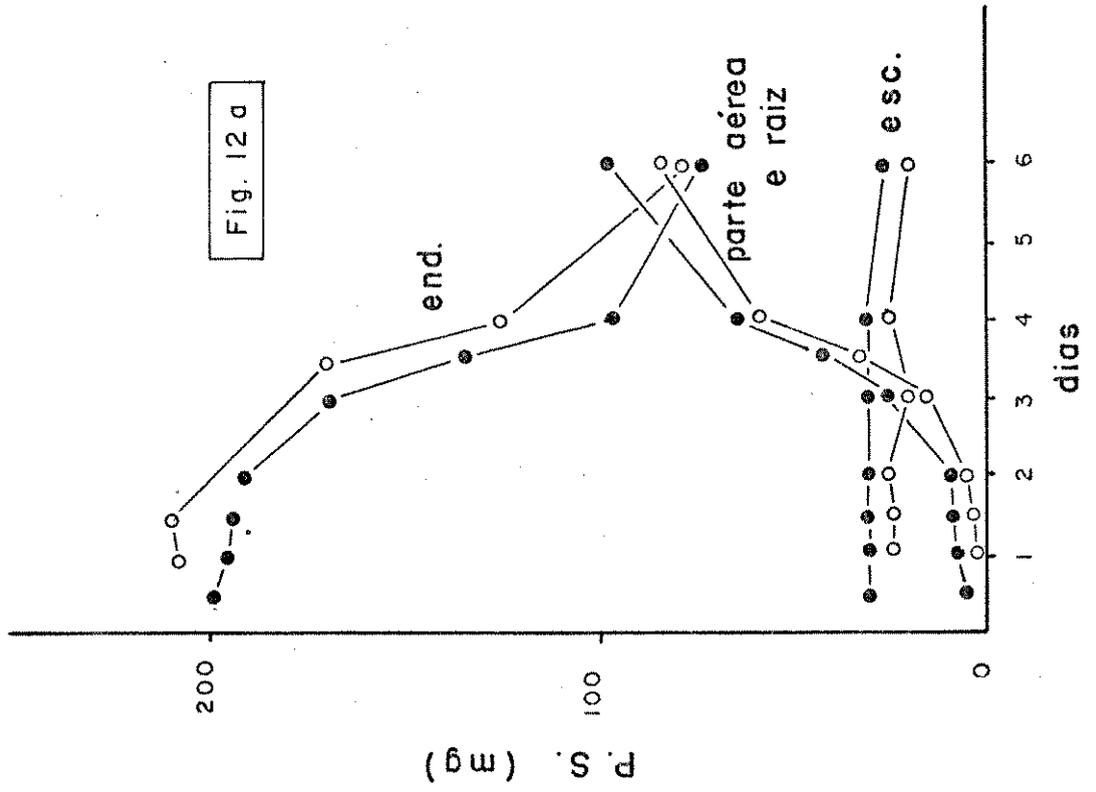
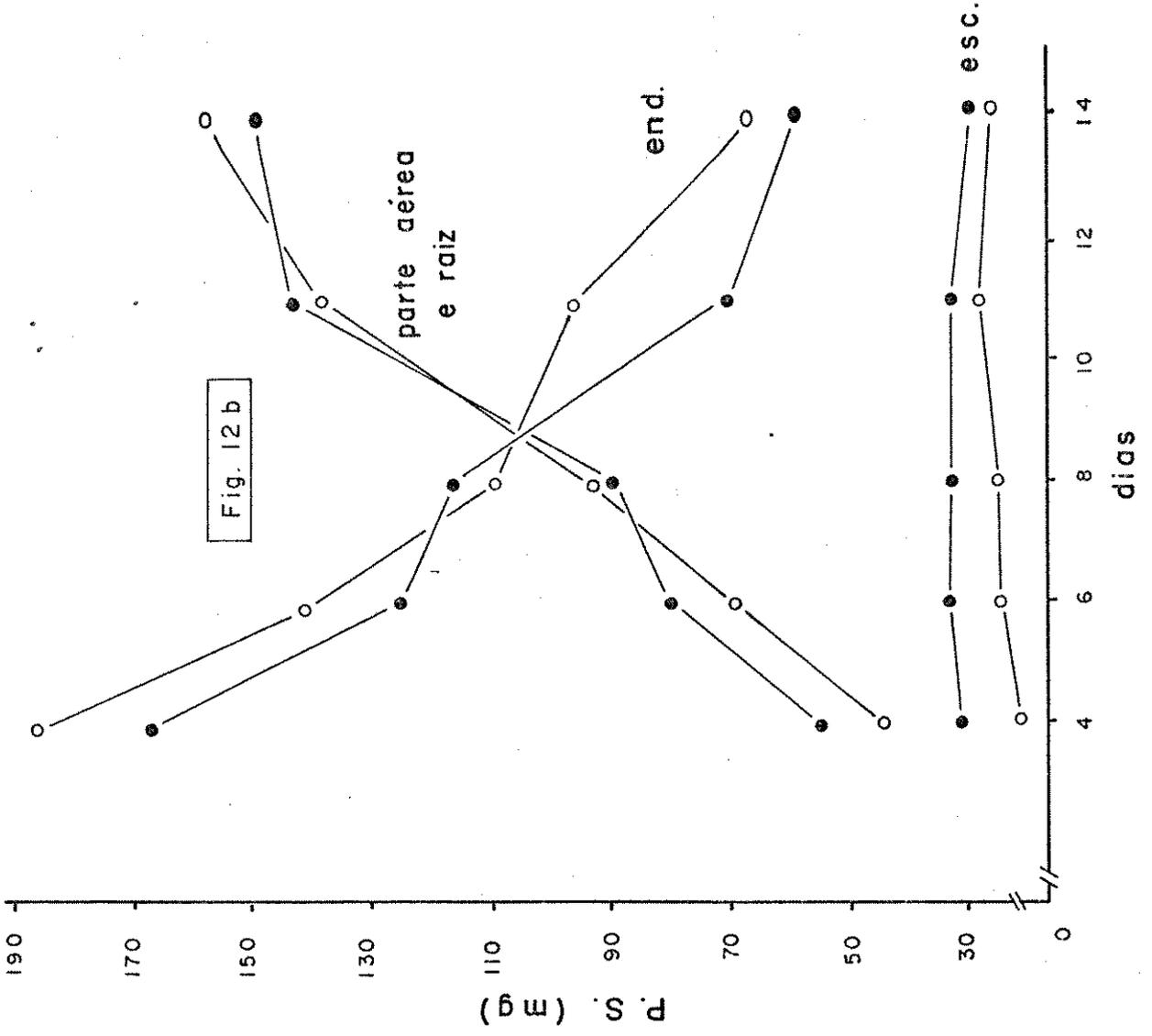


Figura 12. Mudanças no peso seco (P.S.) do endosperma(end.) escutelo (esc.) e parte aérea e raiz de Maya normal (o) e Maya opaco-2 (●) durante o crescimento inicial em dois experimentos (12a, 12b). Cada ponto representa a média de 5 valores.



25% maior, ou seja possuiu 6 mg a mais, que o milho normal. Assim, esta forma parecia ter comparativamente menos endosperma e mais escutelo que grãos da forma normal com o mesmo peso. Entretanto o peso do escutelo permaneceu constante contrastando com o peso do eixo na mesma fase do experimento. Resultados para um segundo experimento onde analisou-se as mudanças no peso seco do endosperma e embrião até o décimo quarto dia são apresentados na Fig. 12b. Este experimento em vez de ter sido realizado em câmaras de crescimento, o foi em estufa, sob condições naturais, onde era esperado que devido as temperaturas mais baixas durante a noite o processo da utilização das reservas e crescimento fosse retardado, ampliando assim, possíveis diferenças na taxa de degradação das reservas das duas formas de milho. Nestas condições, o crescimento foi mais lento, como era esperado. Este fato foi indicado pelo ponto onde as curvas que representam a perda de peso pelo endosperma e o ganho de peso pelo eixo, se cruzam (quando 50% das reservas foram utilizadas) que ocorreu no nono dia de crescimento (Fig. 12b), ao invés de entre os quinto e sexto dias do experimento anterior (Fig. 12a). Entretanto, não foi possível detectar qualquer diferença no crescimento inicial entre as duas formas sendo a taxa de translocação do material seco cerca de 12 mg por dia para ambas. Também, foi possível observar novamente que o peso do escutelo do milho opaco foi maior que o do milho normal sendo confirmada ser esta diferença em torno de 6 mg equivalendo a 25% e que mesmo durante um período maior de análise (14 dias) o peso seco deste órgão permaneceu constante, estabelecendo que ele não foi

utilizado. A análise do peso seco da raiz e parte aérea (Fig. 13 a,b) feita neste mesmo experimento, confirmou não existir diferenças significativas no crescimento do eixo entre o milho normal e opaco. Após o sexto dia de crescimento a parte aérea foi invariavelmente maior que a raiz.

Após ter sido estudada a degradação e utilização do material seco do grão, equivalente principalmente à reserva amilolítica deste, deu-se sequência a este estudo analisando-se o mesmo processo em relação às reservas proteicas dos dois tipos de milho. As mudanças no conteúdo proteico entre os primeiro e quinto dias de crescimento, no endosperma, parte aérea e raiz, são mostrados na Fig. 14 (a, b,c). Pôde ser visto que durante a análise o conteúdo proteico do endosperma diminuiu rapidamente. Para ambas as formas, entre o segundo e quinto dias de crescimento, a taxa de degradação proteica foi semelhante, equivalendo a 4,5 mg por dia. Como para a matéria seca, a diminuição do conteúdo proteico do endosperma foi acompanhada por um aumento na proteína do eixo (Fig. 14a). Entretanto, as mudanças no conteúdo proteico destes órgãos não foram equivalentes, assim, entre os segundo e quinto dias de crescimento cerca de 13,0 mg de proteína foram degradadas no endosperma, mas somente 50% aproximadamente 6,0 mg, apareceu no eixo. Observando-se a Fig. 14a pareceu que o eixo do milho opaco teve um conteúdo proteico maior que o do milho normal mas isto foi devido ao maior conteúdo proteico do escutelo (Fig. 14 b,c) do primeiro (cerca de 3,5 mg) comparado com o do segundo (cerca de 2,0 mg). Este conteúdo proteico maior do escutelo do milho opaco não pôde ser atribuído somente ao seu

Figura 13. Mudanças no peso seco (P.S.) da raiz (13a) e parte aérea (13b) de Maya normal (o) e Maya opaco-2 (●) durante os primeiros quatorze dias de crescimento.

Cada ponto representa a média de 5 valores.

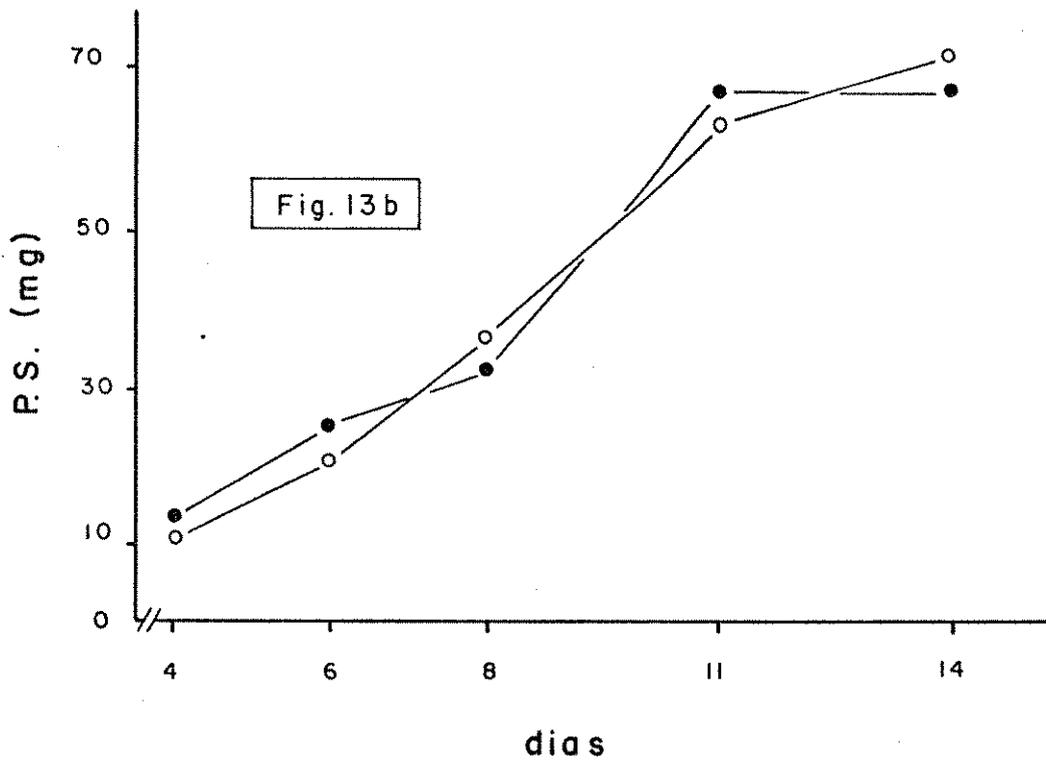
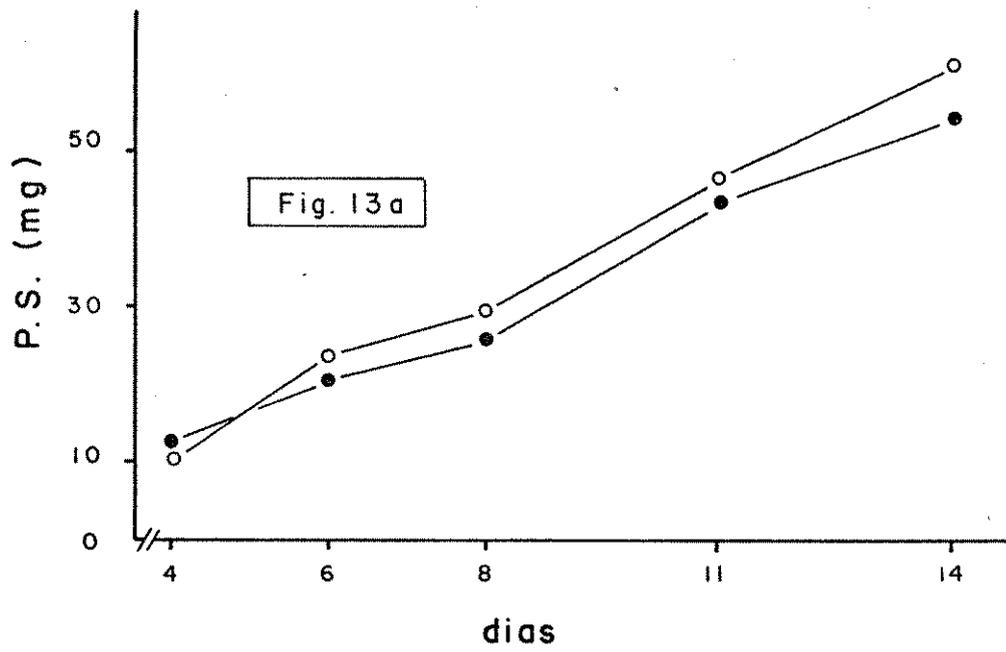
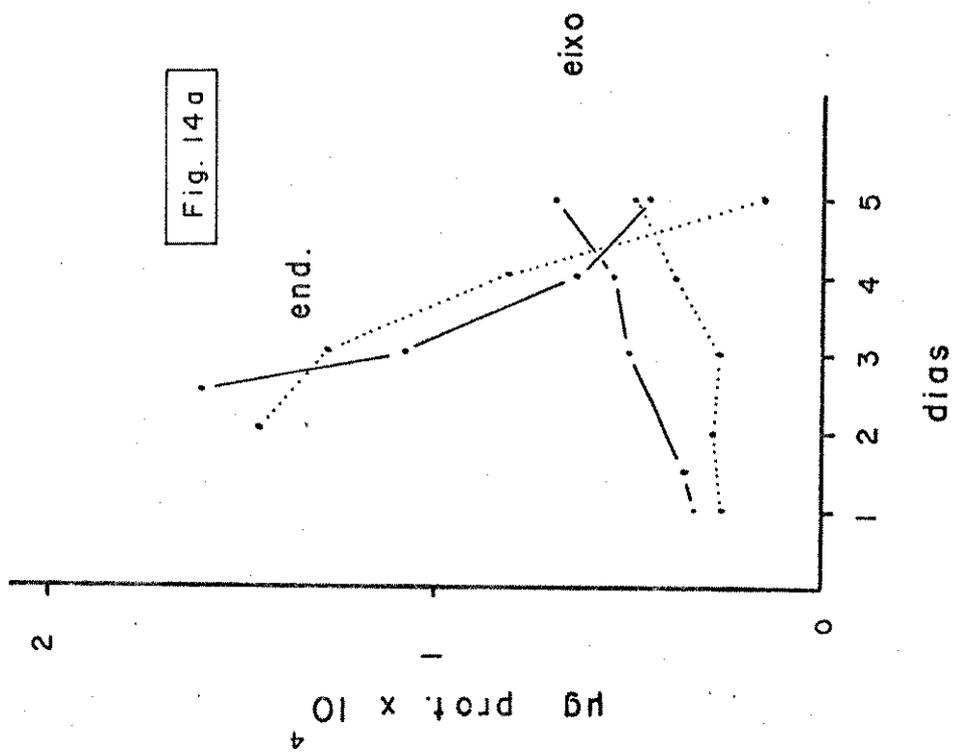
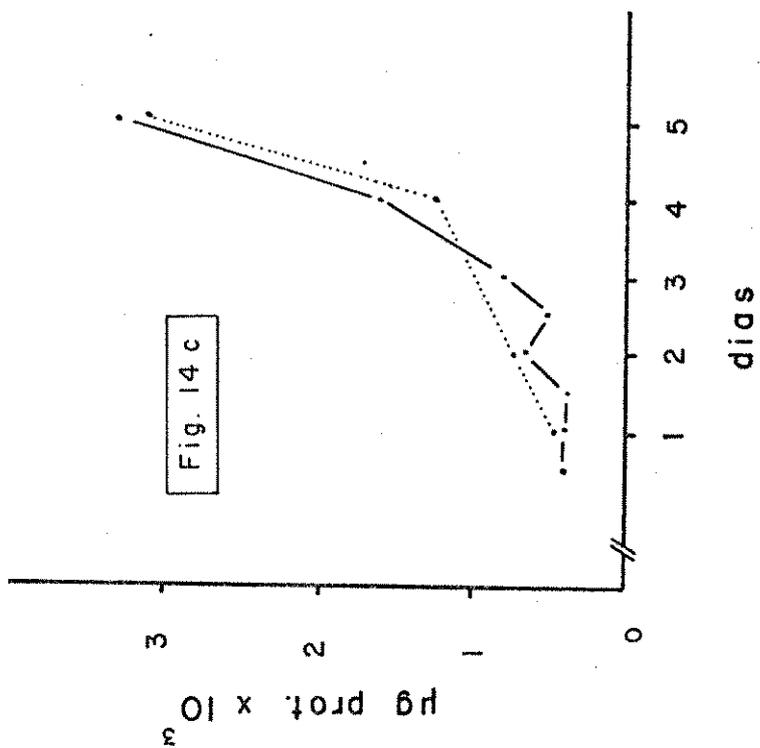
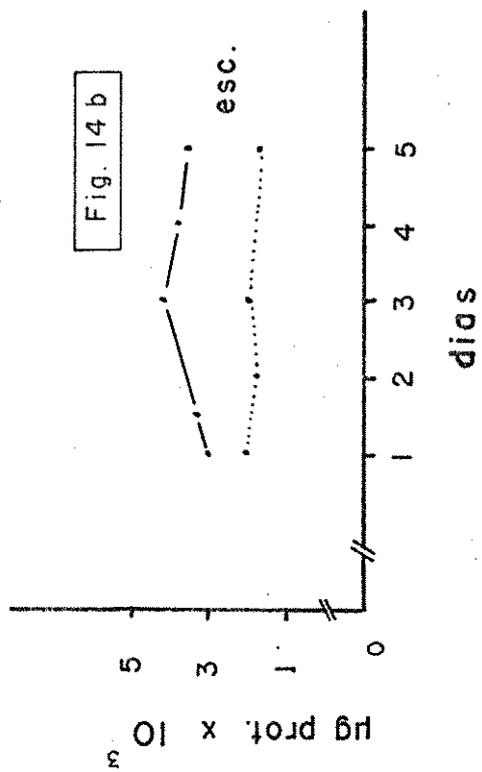


Figura 14. Mudanças no conteúdo proteico do endosperma(end.) e eixo (14a), escutelo (esc.) (14b) e parte aérea e raiz (14c) de Maya normal (.....) e Maya opaco-2 (—) nos primeiros cinco dias de crescimento.

Cada ponto representa a média de 5 valores.

prot. = proteína



maior peso (Fig. 12a), desde que a concentração de proteína neste órgão foi o dobro, sendo 113 μ g de proteína por miligrama de peso no milho opaco, comparado com somente 6,5 μ g/mg do milho normal. Também foi observado que o conteúdo proteico do escutelo permaneceu constante durante os primeiros dias de crescimento (Fig. 14b).

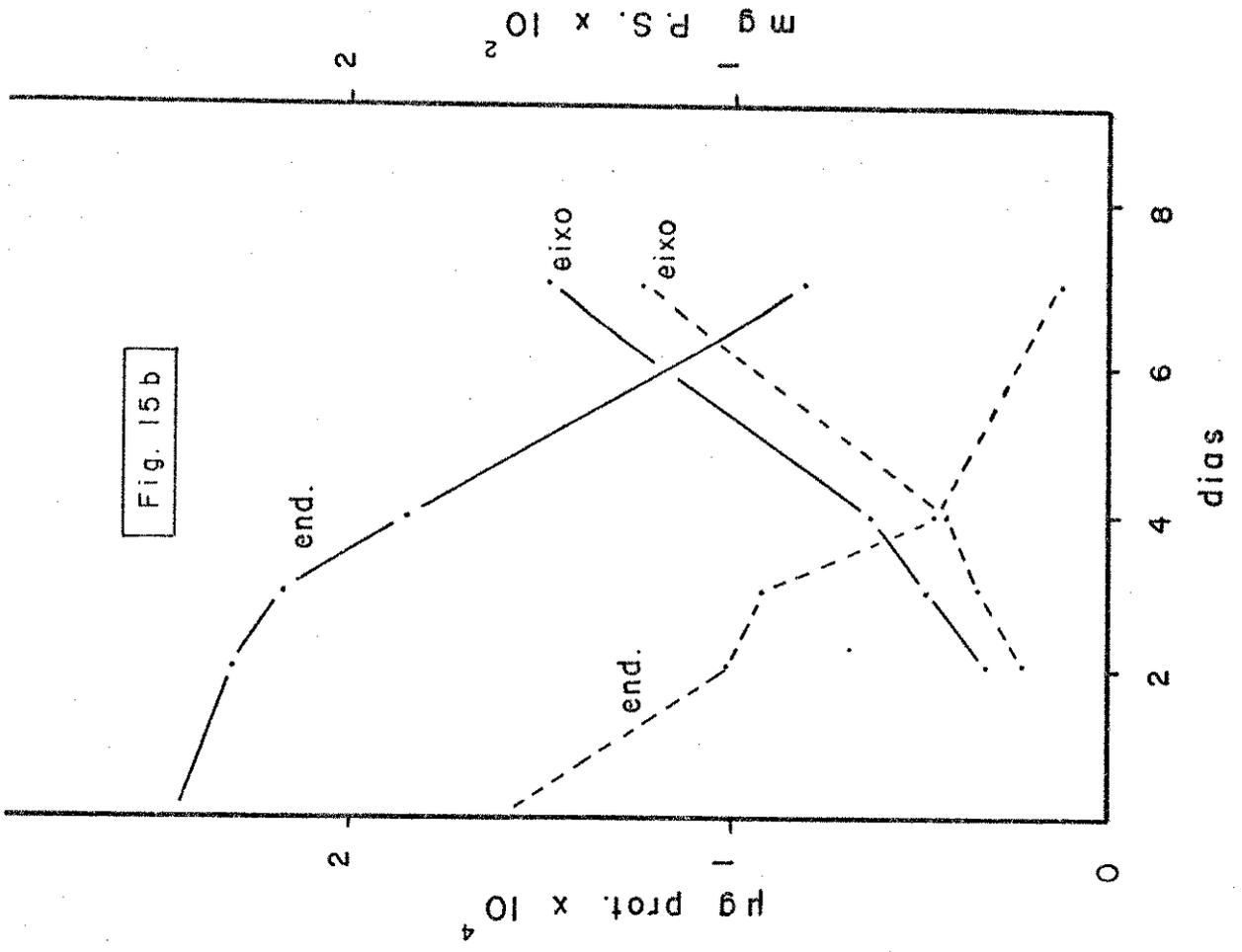
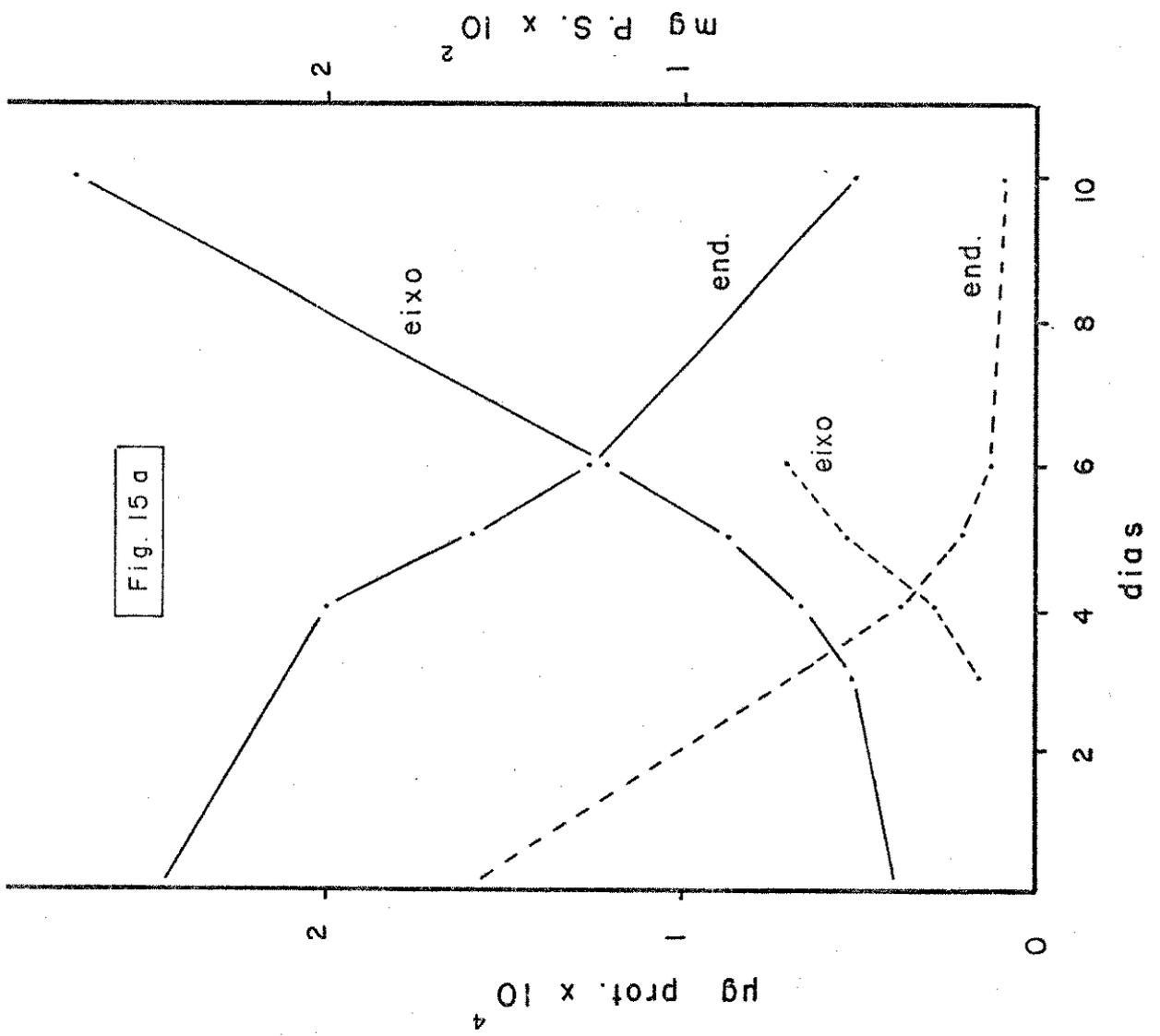
Como este estudo de degradação e incorporação de proteína (Fig. 14) foi feito nas mesmas condições de crescimento que o de matéria seca (Fig. 12a) e que o ponto onde 50% das reservas proteicas translocáveis foram incorporadas no eixo pareceu ocorrer antes (ao redor do quarto dia) do que o ponto equivalente para a matéria seca (ao redor do sexto dia), pôde-se sugerir que as reservas proteicas estão sendo utilizadas relativamente mais rapidamente que os carboidratos. Estes fatos foram, então, analisados com mais detalhe em experimentos subsequentes. Nestes, foi utilizado apenas o milho normal, desde que a comparação anterior não mostrou diferenças entre as duas formas. Na Fig. 15 (a,b) são mostrados os resultados obtidos para as mudanças no material seco e proteína do endosperma e eixo em dois experimentos independentes. Em ambos, durante o período de análise, notou-se uma diminuição no conteúdo de material seco e proteína do endosperma acompanhada por um aumento destes no eixo, havendo um ponto onde as curvas que representam estes fenômenos se cruzam, indicando que 50% do material seco e proteína translocáveis do endosperma foram utilizados pelo eixo. Comparando-se a utilização relativa do material seco e proteína, durante o período de crescimento analisado, notou-se que a do primeiro foi mais lenta que a do último e

Figura 15. Mudanças na matéria seca (—) e no conteúdo proteico (---) do endosperma (end.) e eixo durante o crescimento inicial de Maya normal em dois experimentos independentes (15a; 15b).

Cada ponto representa a média de 5 valores.

prot. = proteína

P.S. = peso seco



assim, o ponto de cruzamento das curvas que representam estes fenômenos, para proteínas foi ao redor do quarto dia em ambos os experimentos e para material seco ocorreu dois dias mais tarde, confirmando as observações anteriores (Fig. 12a, 14a) de que as proteínas da reserva foram translocadas relativamente mais rápido que as reservas amiláceas (representadas pelo material seco). Por isto, ao redor do sexto e sétimo dias de crescimento as reservas proteicas foram completamente esgotadas sendo que o mesmo não ocorreu para o material seco, restando ainda, nesta época, 40 a 50% do peso inicial do endosperma. Notou-se também, que apesar da degradação do material seco ter tido duas fases, uma inicial lenta até o terceiro dia, seguida por outra mais rápida, a degradação da proteína pareceu ser contínua e rápida desde o início da embebição. Análises mais detalhadas destes resultados, baseadas no cálculo das taxas de degradação de material seco e proteína no endosperma e incorporação destes pelo eixo são mostradas na Tabela 9, confirmando novamente os dois pontos principais assinalados acima. Embora as análises nos dois experimentos tenham sido feitas em dias de crescimento diferentes, notou-se uma boa concordância entre as taxas calculadas, tanto para proteína (dada em μg degradada e incorporada por dia) como para material seco (dada em mg degradada e incorporada por dia).

A taxa de degradação da proteína no endosperma (Tabela 9A) diminuiu durante o período em que foi realizado o experimento, até o sétimo dia quando a proteína quase que esgotou-se. Nos primeiros quatro dias, a taxa de degradação da proteína foi ao redor de 2.900 $\mu\text{g}/\text{dia}$, representando

TABELA 9

Taxas de degradação (9A,B) e incorporação (9C,D) de proteína e matéria seca durante o crescimento inicial de Maya normal em 2 experimentos independentes (exp. I e exp. II).

Cada valor representa a média de 5 medidas

A - Proteína ($\mu\text{g}.\text{dia}^{-1}$)			B - Matéria seca ($\text{mg}.\text{dia}^{-1}$)		
dias	exp. I	exp. II	dias	exp. I	exp. II
0 - 2		2.990	0 - 2		5
2 - 4	2.810	2.850	2 - 3	11	14
			3 - 4		33
4 - 5	1.770		4 - 5	29	
5 - 6	520	1.080	5 - 6	36	34
6 - 7	470		6 - 7	-	

C - Proteína ($\mu\text{g}.\text{dia}^{-1}$)			D - Matéria seca ($\text{mg}.\text{dia}^{-1}$)		
dias	exp. I	exp. II	dias	exp. I	exp. II
2 - 3	-	1.020	2 - 3	-	14
3 - 4	1.140	-	3 - 4	17	16
4 - 5	2.520		4 - 5	19	
5 - 6	-	2.730	5 - 6	37	27
6 - 7	-		6 - 7	-	

18% da proteína total do endosperma. Após este período esta taxa diminuiu consideravelmente em cada dia, sendo que entre os quarto e sétimo dias foi em média de 1.000 μ g/dia o que representa 6% da reserva, ou seja, um terço do que estava sendo degradado inicialmente. Comparando-se a degradação do material seco (Tabela 9B) com a da reserva proteica, dois pontos que já haviam sido sugeridos podem ser agora confirmados. Primeiramente, ao contrário da degradação proteica, a da matéria seca começou lenta e aumentou continuamente com o tempo e em segundo lugar, o material seco degradado foi relativamente menor, considerando o total inicial, indicando novamente a utilização mais rápida das proteínas. Assim, nos primeiros quatro dias de crescimento das plântulas, a degradação da matéria seca foi em média, nos dois experimentos, 15 mg por dia, representando somente cerca de 6% da matéria seca presente no endosperma da semente seca. Após este período a taxa de degradação dobrou para 33 mg por dia ou seja, 13% do material seco original, valor este ainda menor que a taxa de degradação proteica entre os dias 0 e 4 de crescimento. Deste modo, mesmo no período de máxima degradação da matéria seca, a taxa foi menor que a no pico de degradação proteica que ocorreu mais cedo, entre os dias 0 e 4 de crescimento.

Analisando-se a incorporação de proteína (Tabela 9C) e material seco (Tabela 9D) no eixo notou-se um aumento tanto na taxa de incorporação proteica como na de matéria seca durante o período de crescimento analisado. Foi observado que o material degradado no endosperma não equivaleu ao incorporado pelo eixo, tanto em termos de proteí-

na como de matéria seca, sugerindo a existência de uma defasagem entre a degradação no endosperma e incorporação pelo eixo. Assim, a taxa de incorporação de proteína pelo eixo entre os segundo e quarto dias de crescimento, foi menor do que a de degradação no endosperma observada durante esta época quando cerca de 2.900 μg de proteína estavam sendo degradadas por dia no endosperma e somente um terço desta (1.000 μg por dia) aparecia no eixo. Mesmo entre os quarto e sexto dias a incorporação de proteína no eixo ainda não atingiu estas taxas de degradação. Em contraste, pareceu que durante o crescimento, não houve uma defasagem tão evidente entre a degradação e incorporação do material seco.

A observação de que a degradação proteica iniciou imediatamente após a embebição e pareceu ser mais rápida nesta fase que a da matéria seca, foi examinada num terceiro experimento cujos resultados são mostrados na Fig. 16. A análise da degradação da proteína e material seco do endosperma feita nos primeiros quatro dias de embebição comprovou que a degradação da matéria seca (Fig. 16a) foi muito mais lenta que a de proteína (Fig. 16b) fato indicado pelas inclinações (b) das retas. Assim, a proteína que restou no endosperma após 100 horas de embebição foi 50% da que estava presente nele após 12 horas, enquanto que no mesmo período a perda do material seco foi menos do que 10%. Estes três experimentos também forneceram dados sobre a relação entre proteínas e matéria seca do eixo, tanto como sobre a distribuição destes componentes nos diferentes órgãos do eixo (Fig. 17). Na Fig. 17a pode ser visto que houve uma forte correlação ($r = 0,997$) entre o conteúdo proteico do eixo e o peso seco deste. Embora estes resultados te-

Figura 16. Degradação de matéria seca (16a) e proteína (16b) no endosperma de Maya normal nos primeiros quatro dias de crescimento.

Cada ponto representa a média de 5 valores.

P.S. = peso seco

prot.= proteína

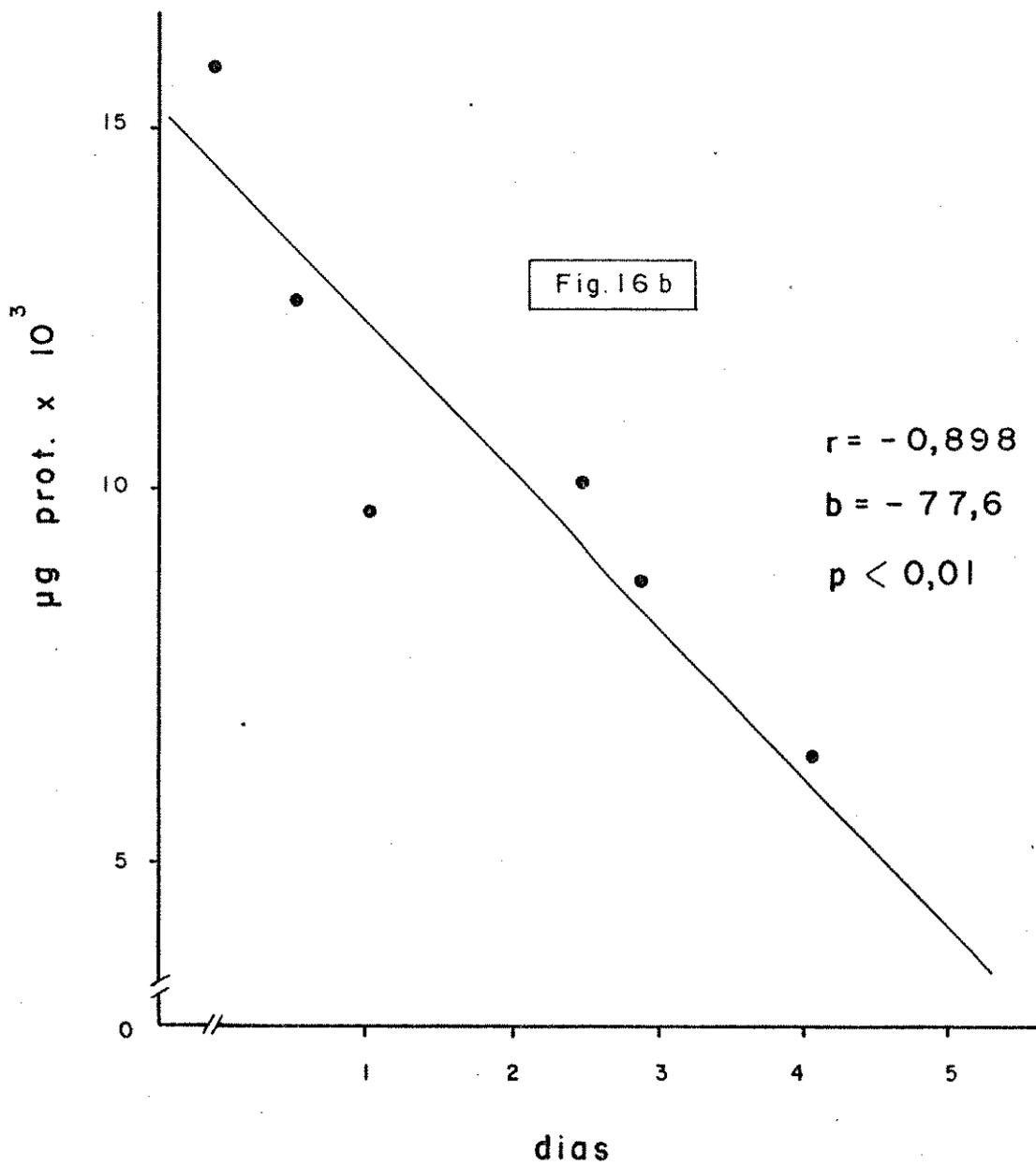
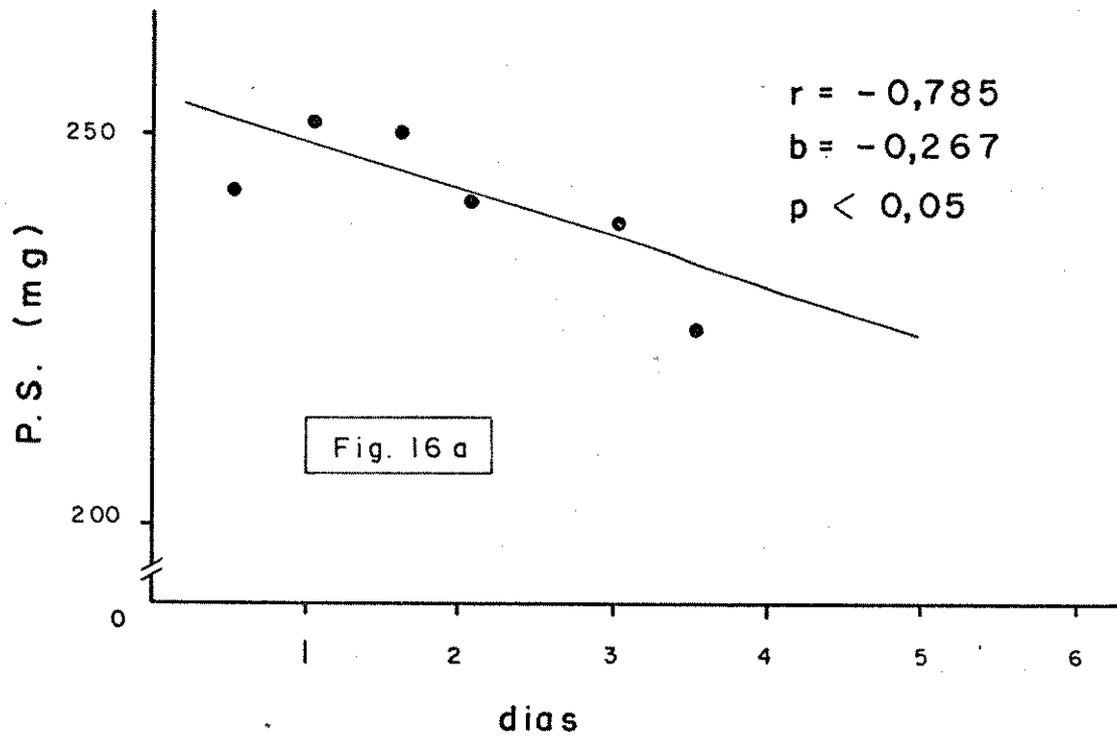
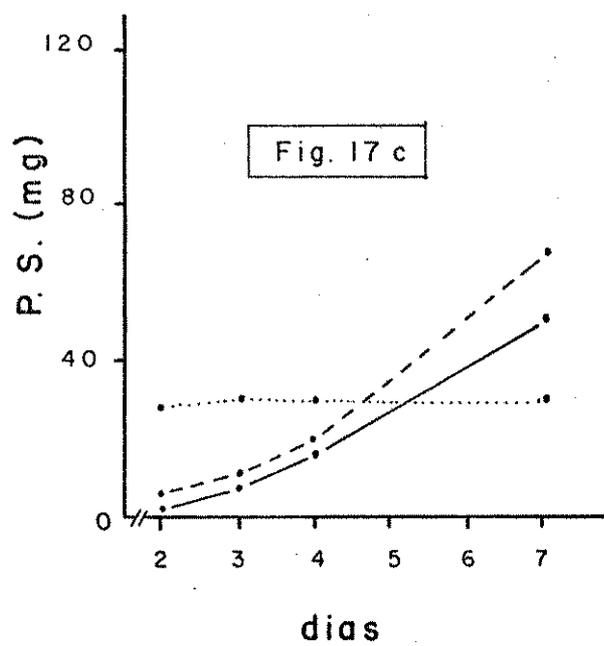
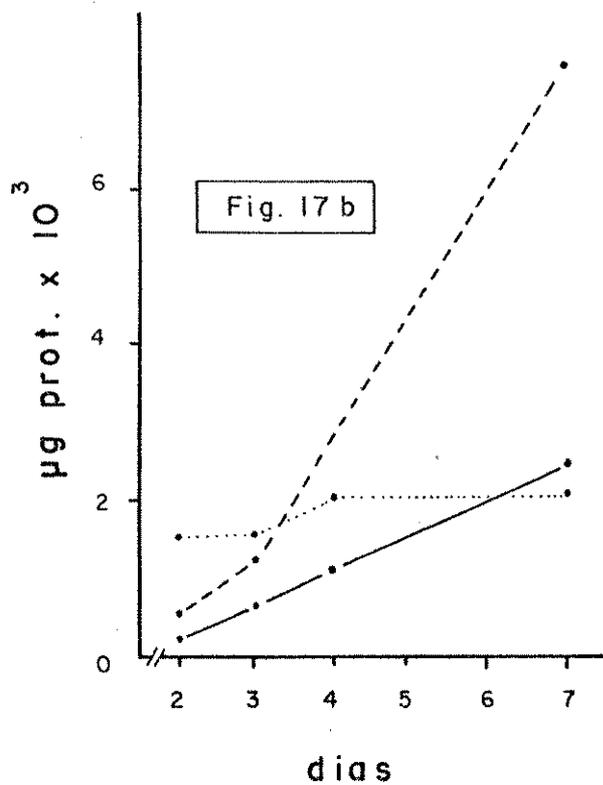
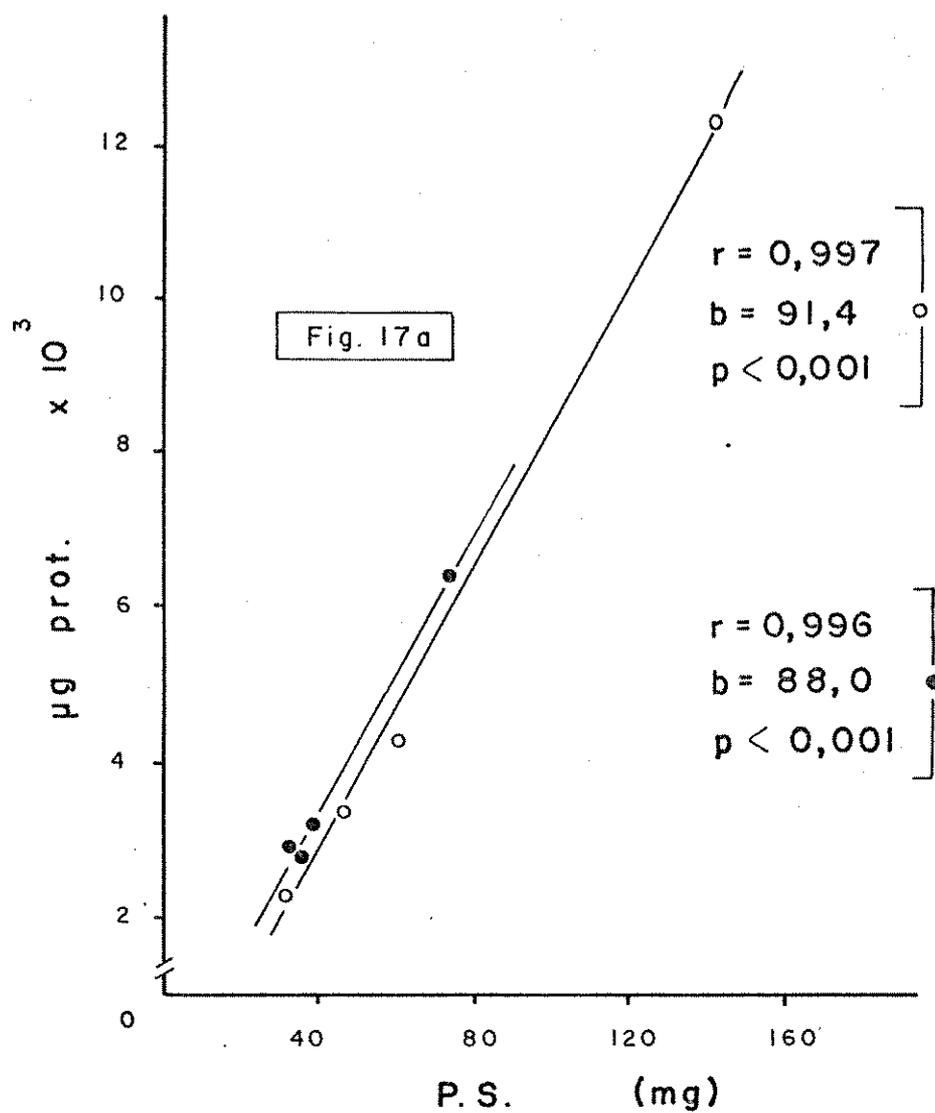


Figura 17. Correlação, em Maya normal, entre o conteúdo proteico do eixo e seu peso seco (P.S.) em dois experimentos independentes (exp. 1 (●); exp. 2 (○) (17a)).

Mudanças no conteúdo proteico (17b) e matéria seca (17c) durante os primeiros dias de crescimento na parte aérea (---), escutelo (...) e raiz (—).

Cada ponto representa a média de 5 valores.

prot. = proteína



nham sido obtidos em experimentos diferentes, a relação entre peso seco e proteína foi sempre mantida constante durante o desenvolvimento, como pode ser visto pela inclinação(b) das retas que correlacionam estes parâmetros (Fig. 17a). Assim, eixos com 50 mg de peso seco possuíram cerca de 4.000 μ g de proteína, ou seja, 8 por cento. Em relação a distribuição das reservas nas diferentes partes do eixo foi observado que o peso seco da parte aérea foi invariavelmente maior que o da raiz, o mesmo sendo observado para a proteína (Fig. 17 b,c), embora a diferença entre estes órgãos para proteína tenha sido consideravelmente maior. Assim, o peso seco da raiz no sétimo dia de crescimento foi somente 75% daquele da parte aérea, embora, em termos de proteína esta diferença tenha sido maior, o conteúdo proteico da raiz representando menos de 30% daquele da parte aérea. Deste modo, em termos relativos, a parte aérea possuindo 121 μ g de proteína por mg de peso foi um órgão muito mais rico que a raiz que possuiu 68 μ g de proteína por mg de peso. O escutelo mostrou um conteúdo proteico e de material seco constante durante o período analisado (Fig. 17 b,c). Em relação ao conteúdo proteico, mesmo no sétimo dia de crescimento este órgão apresentou em termos relativos 44% de proteína a mais que a raiz, sendo que a concentração na última foi de 47 μ g por mg de peso seco e no escutelo foi de 68 μ g por mg. A incorporação de proteína e material seco na parte aérea e raiz foi calculada para melhor análise da partição destas reservas durante o crescimento entre estas duas partes da plântula (Tabela 10). Através destes cálculos, pode-se notar que inicialmente, entre o segundo e terceiro dias de cresci

TABELA 10

Partição de proteína e matéria seca entre a parte aérea e raiz durante os primeiros dias de crescimento de Maya normal. Cada valor representa a média de 5 medidas.

dias	Matéria seca (mg.dia ⁻¹)		Proteína (µg.dia ⁻¹)	
	raiz	parte aérea	raiz	parte aérea
2 - 3	5,8	3,2	504	665
3 - 4	9,4	9,4	452	1270
4 - 7	11,2	16,1	425	1845

mento, a incorporação de matéria seca na parte aérea foi menor que na raiz. Já entre os terceiro e quarto dias a incorporação na parte aérea aumentou, tornando-se igual a na raiz e após o quarto dia foi marcadamente maior, superando a incorporação na raiz em 50%. No entanto, em ambos os órgãos a incorporação de matéria seca aumentou, indicando que até o sétimo dia de crescimento esta reserva não se tornou limitante. Este não foi o caso para a proteína, onde a taxa de translocação para a raiz caiu continuamente até o sétimo dia e aumentou no mesmo período na parte aérea. A taxa de incorporação proteica na parte aérea sempre foi maior que a na raiz para cada idade analisada, diferença esta que é acentuada com o tempo. Assim, a taxa de incorporação na raiz entre os segundo e terceiro dias de crescimento foi 75% daquela na parte aérea, mas somente 23% entre os quarto e sétimo dias. Este fato mostrou novamente que a partição de proteína e matéria seca entre a parte aérea e raiz foi desigual, sendo esta desigualdade maior no caso da proteína, onde a parte aérea representou grande fonte de consumo. A observação de que a incorporação de proteína na raiz diminuiu continuamente e que a diferença na incorporação pela parte aérea após o quarto dia de crescimento foi menor que a no início da embebição sugeriu que a proteína estava se tornando limitante após o quarto dia, fato que indica novamente que a translocação proteica ocorreu antes e mais rapidamente que a do material seco.

Tendo estabelecido haver diferenças na hidrólise e utilização da reserva proteica e amilácea do grão era interessante determinar possíveis diferenças na degradação

das classes proteicas durante o crescimento inicial. Como as duas formas analisadas apresentaram grandes diferenças entre estas classes, elas constituíram material interessante para esta análise. Assim, a degradação das albuminas e globulinas, zeinas e glutelinas do endosperma das duas formas foram analisadas no terceiro, quinto, sétimo, décimo e décimo segundo dias de crescimento. Os resultados obtidos nesta análise são mostrados na Fig. 18, onde valores para o conteúdo proteico de cada classe no grão seco (Tabela 8A) são também incluídos. Notou-se, para ambas as formas que no intervalo de tempo analisado houve uma diminuição no conteúdo proteico das três classes estudadas, indicando a degradação de todas elas durante este período; entretanto, esta degradação foi diferente para cada classe e entre as duas formas de milho. Novamente as diferenças entre o conteúdo absoluto das classes proteicas foram evidentes, o milho opaco mostrando um baixo conteúdo de zeína, acompanhado por maiores níveis de albuminas, globulinas e glutelinas, confirmando os dados anteriores (Tab. 8A). Considerando-se primeiramente as albuminas e globulinas, notou-se que não houve diminuição até o terceiro dia de crescimento, parecendo até no milho normal ter havido um aumento desta fração neste período. Na Fig. 19 são comparadas as taxas de degradação para cada fração proteica entre o terceiro dia de crescimento e o final do experimento ou o ponto onde estas classes foram esgotadas. Pode ser visto, na Fig. 19c que do terceiro dia até o décimo segundo, houve uma diminuição das albuminas e globulinas em ambas as formas, sendo esta diminuição mais acentuada no milho opaco. A degradação de albuminas e glo-

Figura 18. Degradação das albuminas e globulinas (círculos), zeínas (quadrados) e glutelinas (triângulos) do endosperma de Maya normal (símbolos abertos) e Maya opaco-2 (símbolos cheios) nos primeiros doze dias de crescimento.

prot. = proteína

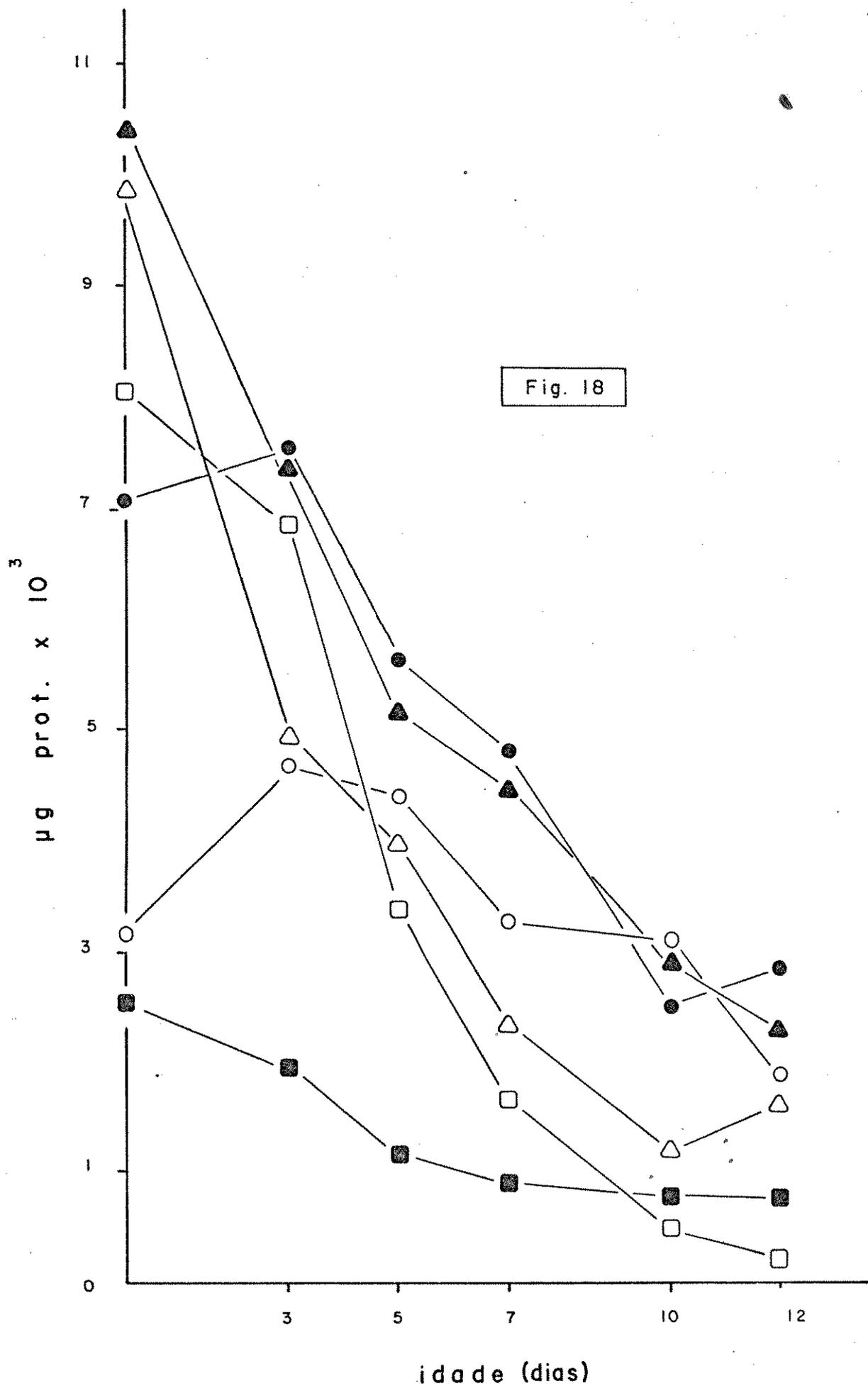
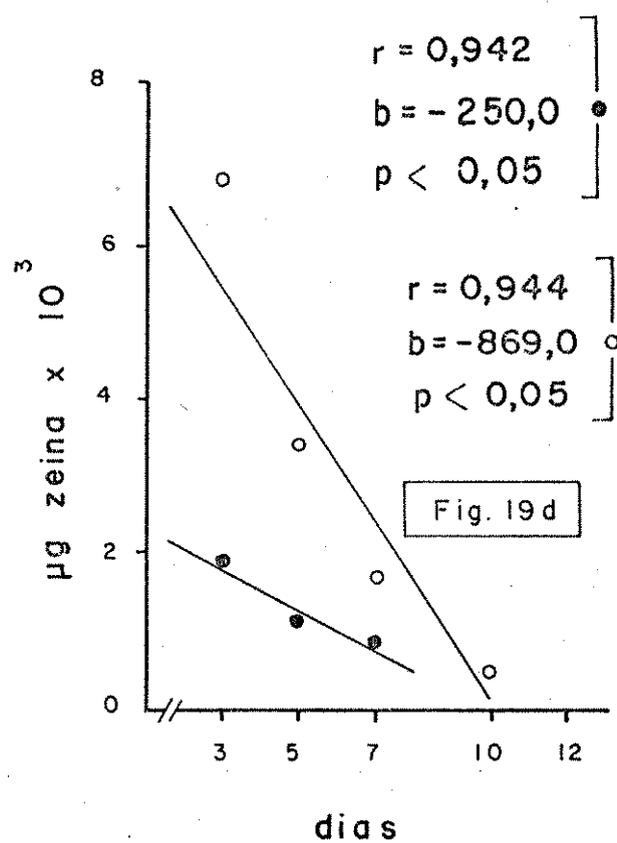
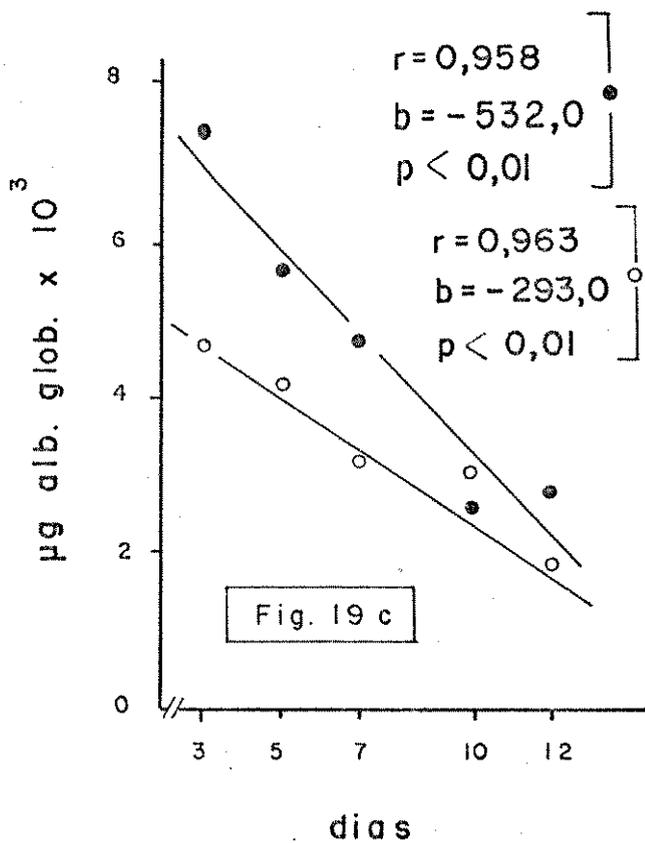
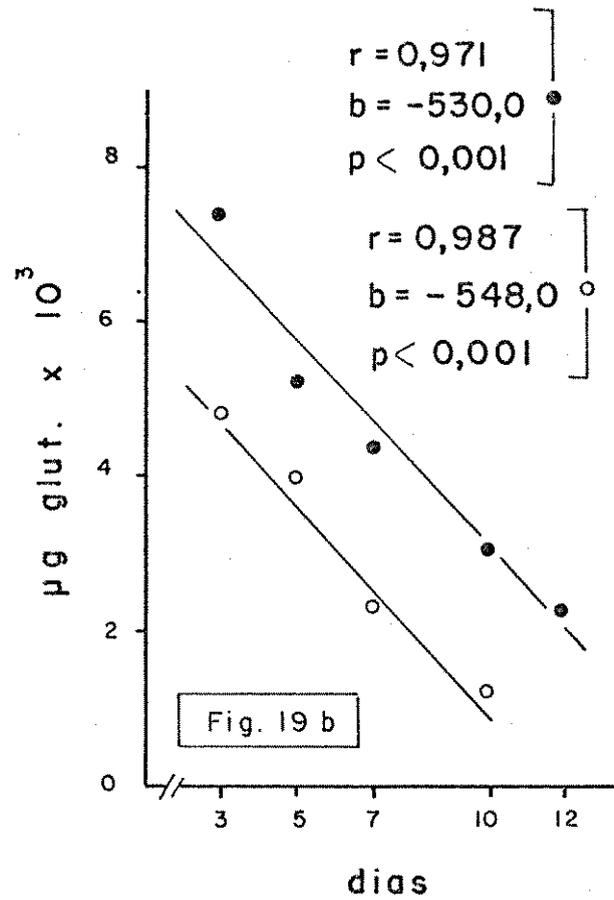
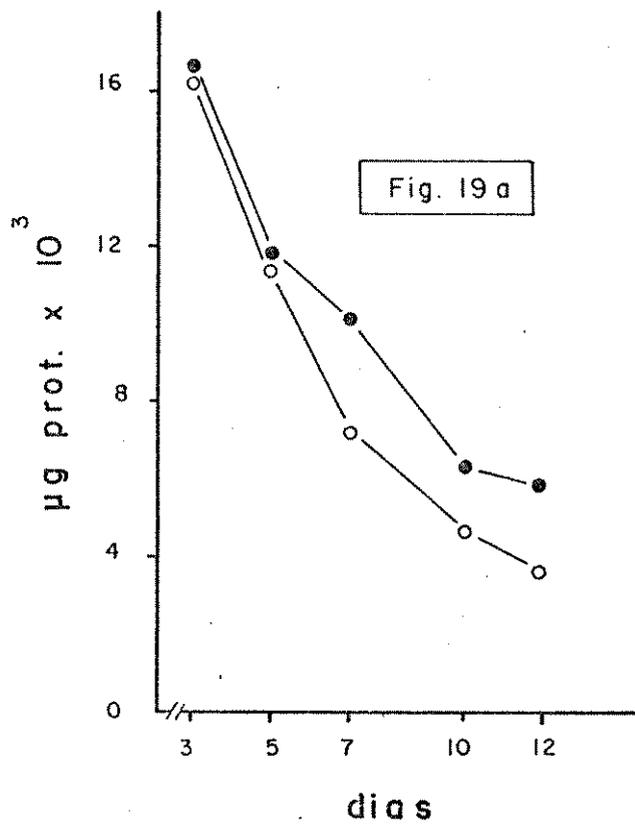


Figura 19. Degradação da proteína total (prot.) (19a), representada pela soma das frações individuais, do endosperma de Maya normal (o) e Maya opaco - 2 (●) nos primeiros doze dias de crescimento. Relação da degradação das glutelinas (glut.) (19b), das albuminas e globulinas (alb. e glob.) (19c) e das zeinas (19d) com a idade da plântula.



bulinas neste período foi linear ($r=0,958$; $p < 0,001$). Tanto para as zeinas como para as glutelinas, a degradação começou imediatamente após a embebição, embora para as zeinas até o terceiro dia a hidrólise foi mais lenta para ambas as variedades (Fig. 18). Em termos absolutos, a taxa de degradação da zeina neste período foi o dobro na variedade normal, sendo $421 \mu\text{g}/\text{dia}$ comparada com $209 \mu\text{g}/\text{dia}$ no opaco. Os valores para as taxas de degradação das glutelinas neste período foram mais altos sendo $1670 \mu\text{g}/\text{dia}$ no milho normal e $1970 \mu\text{g}/\text{dia}$ no opaco.

A maior taxa de hidrólise das zeinas foi observada entre o terceiro e sétimo dias tanto no milho normal como no opaco sendo mais alta no normal. Este ponto pode ser visto na Fig. 19d onde o valor para a inclinação (b) da reta que representa a taxa de degradação desta classe proteica foi bem menor para a forma opaco. Assim, no terceiro dia de crescimento o milho normal continha cerca de três vezes mais zeina que o opaco, mas no sétimo dia esta diferença foi bem reduzida sendo que neste ponto a zeina degradável do opaco se esgotou enquanto que a do normal continuou sendo degradada até o final do experimento. Em relação às glutelinas, notou-se que a taxa de degradação foi semelhante para as duas formas. Isto pode ser visto na Fig. 19b onde os valores da inclinação das retas foram semelhantes, embora em termos absolutos houve maior quantidade de glutelinas no milho opaco durante todos os estágios do crescimento, refletindo os dados anteriores.

Resumindo, as maiores diferenças entre as 2 formas foram na degradação das zeinas e albuminas e globulinas

que são as frações mais modificadas pela presença do gene opaco-2. Também foi observado que a degradação da proteína total, representada pela soma das frações individuais, ocorreu mais rapidamente na forma normal do que na opaco (Fig. 19a), estabelecendo que houve uma diferença na degradação proteica total entre as duas formas. Isto não foi visto anteriormente onde somente os primeiros 5 dias de germinação foram analisados (Fig. 14a), período onde a degradação desta reserva é máxima. Entretanto os dados da Fig. 19 corroboram esta observação desde que as diferenças na proteína total só começam a ser aparentes após o quinto dia. A taxa de degradação das diferentes classes proteicas foi analisada mais detalhadamente em termos absolutos (μ g de proteína degradada por dia) e relativos (% de proteína degradada em relação ao total inicial). Estes valores são mostrados na Tabela 11. Embora o milho opaco tenha mostrado taxas absolutas de degradação de albuminas e globulinas maiores que o normal, em termos relativos, a proporção degradada foi menor. O mesmo fato não foi observado para as zeínas e glutelinas, onde altas taxas de degradação em termos absolutos geralmente corresponderam a maior degradação em termos relativos. Assim para zeína maiores taxas de degradação absoluta foram vistas em Maya normal, enquanto que para glutelinas estas foram observadas em Maya opaco-2. Pode-se afirmar então que entre as proteínas principais da reserva, as zeínas e glutelinas, a classe mais escassa foi degradada relativamente menos rápido que a classe mais abundante. Finalmente, a porcentagem degradada em cada classe proteica a cada intervalo de tempo analisado foi maior no

TABELA 11

Taxa de degradação das frações proteicas do endosperma de Maya normal e Maya opaco-2 nos primeiros 12 dias de crescimento

Frações	Dias	Maya normal		Maya opaco-2	
		$\mu\text{g.dia}^{-1}$	% do tot.	$\mu\text{g.dia}^{-1}$	% do tot.
Albuminas e	3-7	357	44	666	36
Globulinas	7-12	327	55	415	30
Zeinas	3-7	1281	64	250	40
	7-12	247	20	31	5
Glutelinas	3-7	654	28	752	28
	7-12	175	10	409	20

milho normal que no opaco, refletindo que a proteína total para o milho normal foi degradada mais rapidamente (Fig.19a).

Tendo estabelecido que as classes proteicas que possuem composições de aminoácidos distintos, foram fundamentalmente diferentes entre Maya normal e Maya opaco-2 (Tabelas 7A, 8A,B e Figs. 5, 6) e que estas duas formas degradaram as classes proteicas mais abundantes da reserva numa taxa mais rápida (Fig. 18, 19 e Tabela 11), admitiu-se que os vários aminoácidos liberados pelas proteases e fornecidos ao eixo em crescimento o fossem em proporções diferentes para Maya normal e Maya opaco-2. Assim foi interessante analisar-se a atividade de transaminases nas duas formas de Maya, já que estas enzimas são importantes na interconversão dos aminoácidos da reserva em outros que serão utilizados pelo eixo na síntese de proteínas protoplasmáticas.

Num experimento preliminar foi testada a eficiência de dois aceptores do grupo amino, alfa-cetogluturato (α KG) ou o piruvato (PIR), para a formação do oxaloacetato e o aminoácido correspondente numa reação de transaminação (vide Material e Métodos (i), (ii)). Os produtos das duas reações foram separados por cromatografia de camada delgada e após a revelação com ninhidrina que mostrou a presença dos aminoácidos, os quais se diferenciaram pela cor e mobilidade, notou-se que a reação (i) foi muito mais eficiente na produção do seu aminoácido, glutamina (Glu) do que a reação (ii) que produz alanina (Ala). Estabeleceu-se assim que o alfa-cetogluturato foi melhor acceptor de grupos amino e que, mais oxaloacetato foi produzido, podendo subseqüentemente ser reduzido a malato na presença de NADH. Este resultado tam-

bém foi confirmado espectrofotometricamente, quando na presença de extratos de raízes de milho a oxidação do NADH foi mais rápida na presença do alfa-cetogluturato do que com o piruvato. Assim, o alfa-cetogluturato, na reação (i), foi escolhido como cetoácido para os ensaios subsequentes de transaminação.

Os resultados apresentados na Figura 20a mostram a diminuição da densidade óptica (340 nm) devido ao desaparecimento do NADH utilizando-se um extrato do escutelo de milho. Notou-se que no controle (curva superior) na ausência de aspartato não houve oxidação de NADH. Na curva inferior, entretanto, na presença de aspartato (ensaio completo) notou-se inicialmente uma oxidação rápida e linear do NADH pelo extrato. Pôde também ser visto que a atividade do escutelo foi alta e oxidou todo o NADH presente em 36 segundos, sugerindo que no extrato houve níveis endógenos de malatodesidrogenase suficientes para permitir esta oxidação. Isto foi ainda confirmado pelo fato de que a adição de NADH ao ensaio após 36 segundos de reação produziu um retorno da densidade óptica ao valor inicial que foi subsequentemente diminuindo, na mesma taxa anterior, estabelecendo que o patamar observado após este tempo de reação representou a oxidação total do NADH e não um limite da reação pela falta de malatodesidrogenase.

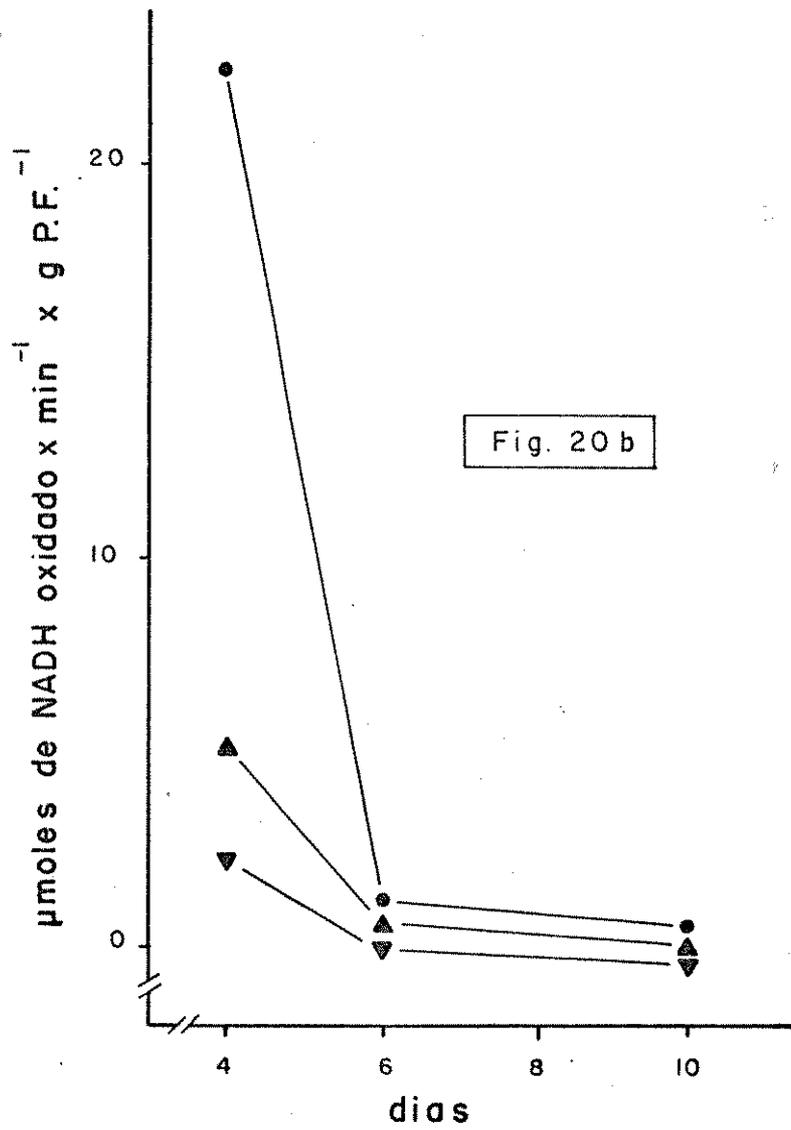
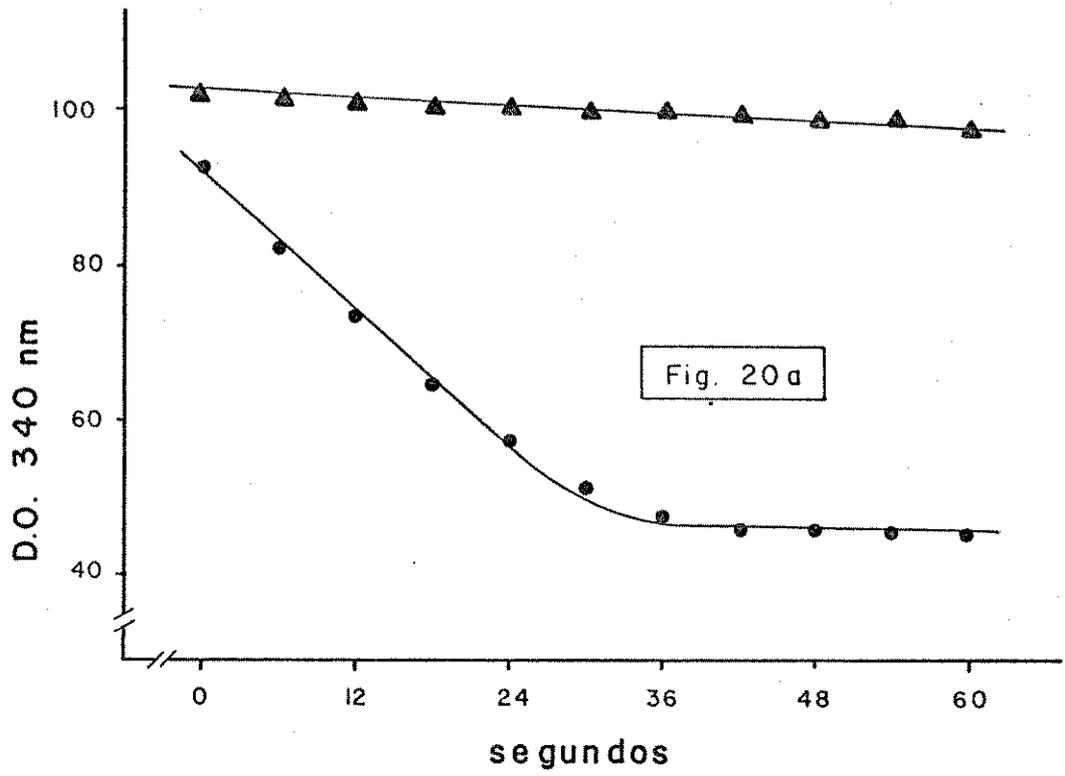
Num primeiro experimento, a atividade de transaminases de Maya normal foi dosada nos quarto, sexto e décimo dias de crescimento, no endosperma, parte aérea e raiz e escutelo (Fig. 20b). Notou-se que a atividade após o quarto dia de crescimento foi extremamente baixa em todos os ór -

Figura 20. Atividade de transaminases do escutelo de milho (Maya normal), medida pela oxidação do NADH (diminuição da D.O. à 340 nm) num intervalo de 60 segundos (20a)

- (▲) controle (sem Aspartato)
- (●) ensaio completo.

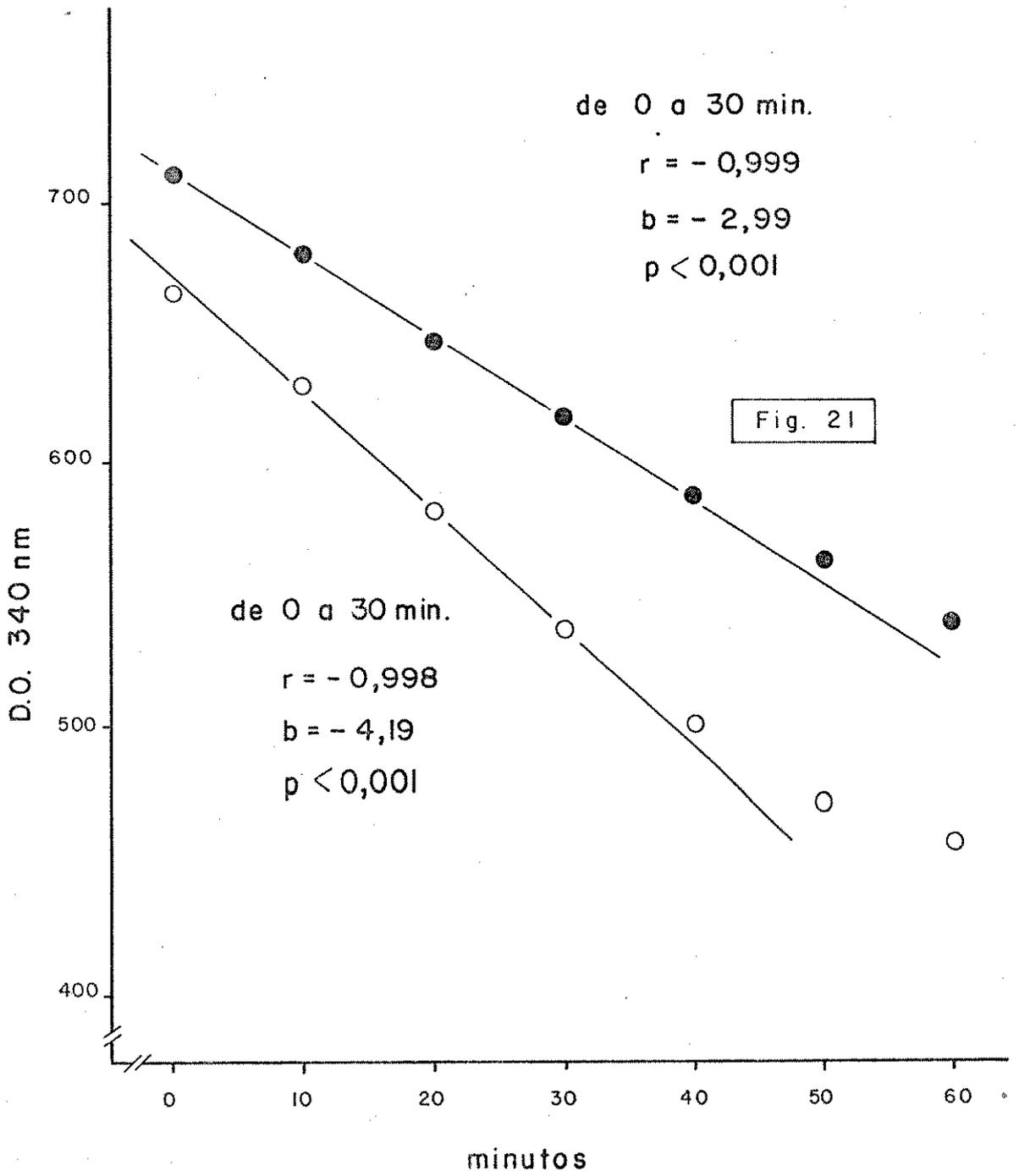
Atividade de transaminases (μ moles de NADH oxidado por minuto por grama de peso fresco), nos dias quatro, seis e dez de crescimento, no endosperma (▼), parte aérea e raiz (▲) e escutelo (●) de plantas de Maya normal (20b).

P.F. = peso fresco



gãos, e no quarto dia, a atividade foi muito maior no escutelo do que nos outros órgãos, sendo mais baixa ainda no endosperma, sugerindo que os aminoácidos provenientes da degradação de proteínas do endosperma são transformados principalmente no escutelo antes de serem transportados para a parte aérea e eixo. Tendo sido estabelecido que a atividade de transaminases do escutelo foi cinco vezes maior que a da parte aérea e raiz, somente a atividade deste órgão foi analisada numa comparação entre Maya normal e Maya opaco-2. A atividade das transaminases do escutelo de plântulas com dois dias de idade foi analisada e para melhor estudar a oxidação do NADH, os extratos do escutelo foram muito diluídos e assim a reação pode ser acompanhada no intervalo de uma hora. Os resultados apresentados na Figura 21 mostram que durante os primeiros 30 minutos de reação esta foi linear ($p < 0,001$) e que a taxa de oxidação do NADH, indicada pela inclinação (b) da reta, foi maior em Maya normal. Na fase linear da reação, em Maya normal, 29,0 μ moles de NADH foram oxidados por minuto por grama de peso fresco do escutelo, enquanto que em Maya opaco-2, este valor foi de 13,5 μ moles ou seja, somente 46% da atividade do primeiro. Notou-se também que este valor de 29,0 μ moles de NADH oxidado obtido no escutelo de Maya normal foi ainda maior que o valor de 22,4 μ moles obtido no quarto dia de crescimento no experimento anterior (Fig. 20b), indicando que a atividade das transaminases foi bem alta no escutelo desde o início da germinação, e, após o quarto dia, quando a metade das reservas proteicas do endosperma já foram degradadas (Fig. 14a) diminuiu rapidamente. Esta atividade alta das transamina -

Figura 21. Atividade de transaminases do escutelo de Maya normal (o) e Maya opaco-2 (●), medida indiretamente pela oxidação do NADH (diminuição da D.O. 340 nm), num intervalo de 60 min.



ses no escutelo, também concordou com os dados anteriores que demonstraram que a degradação de proteína ocorre nos primeiros dias de germinação, pois os substratos das transaminações são aminoácidos.

III. ATIVIDADE AMILOLÍTICA E PROTEOLÍTICA DURANTE O CRESCIMENTO INICIAL E O EFEITO DE REGULADORES

Após terem sido analisados os resultados da degradação das reservas proteicas e amiláceas do grão, foi estudada a atividade das enzimas responsáveis por esta degradação, as proteases e amilases. Também, analisou-se o efeito do ácido giberélico e citocininas sobre estas enzimas, já que se conhece o importante papel destes reguladores sobre o controle destas em alguns cereais.

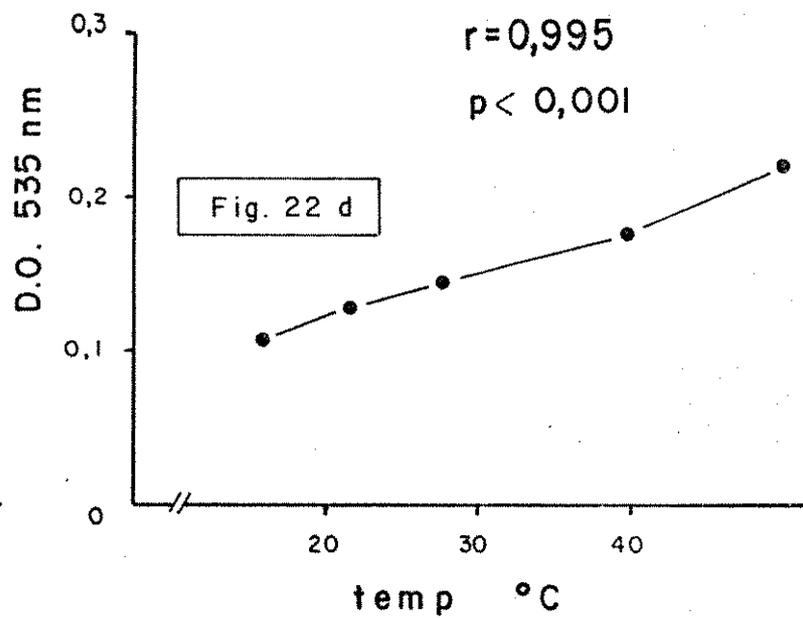
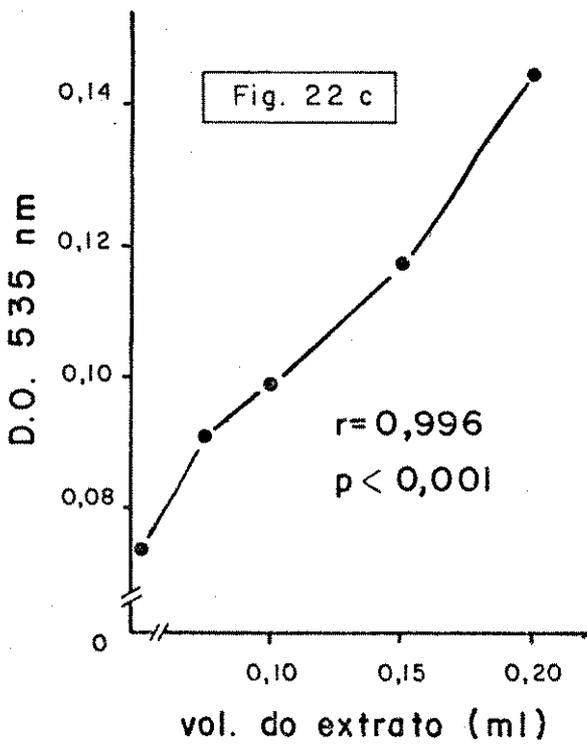
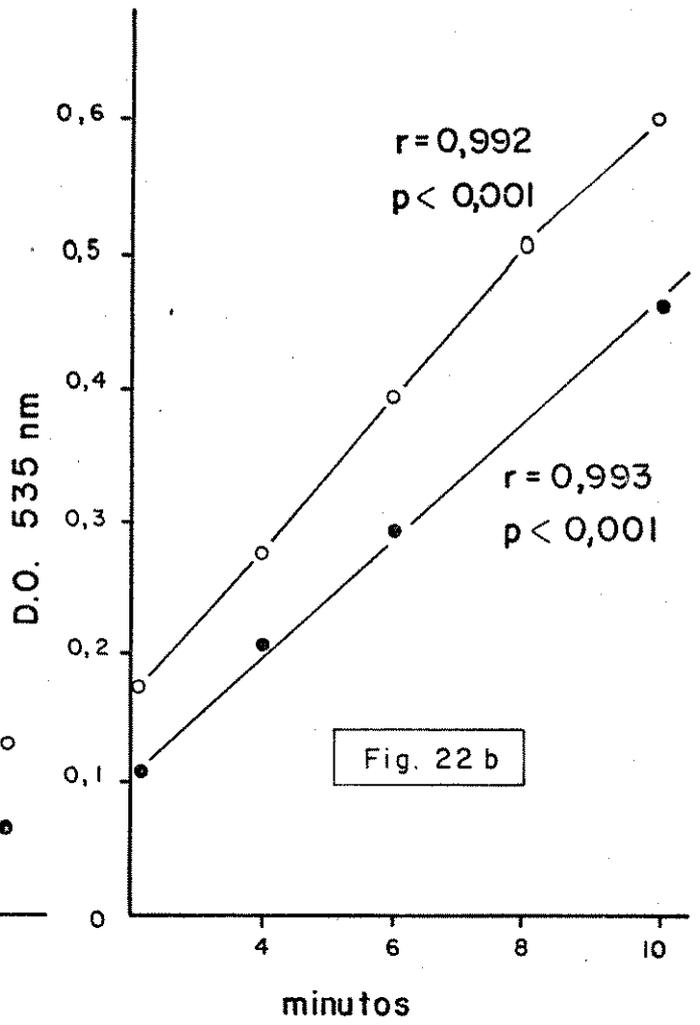
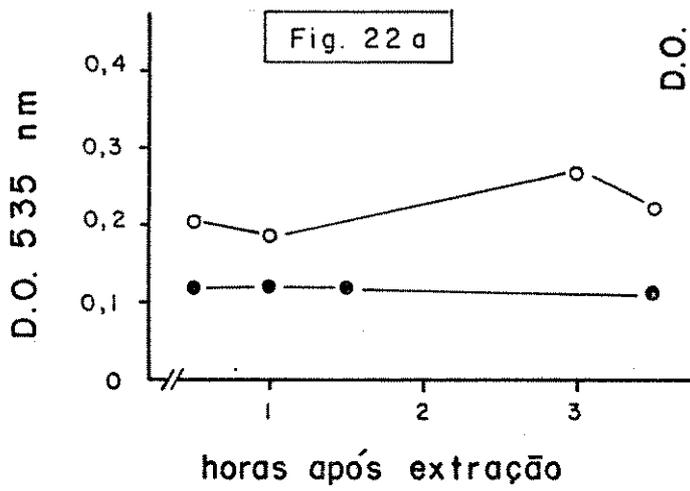
Para iniciar os estudos das atividades destas enzimas foi necessário se estabelecer alguns pontos de metodologia, tais como a escolha de um substrato adequado, a estabilidade da enzima após a extração, o tempo, a temperatura e o pH ideais para a reação. Para analisar a atividade amilolítica através das medidas da maltose produzida pela degradação do amido, foi necessário utilizar um substrato essencialmente livre deste composto. Vários tipos de amido foram inicialmente testados e obteve-se maior atividade com a fécula de mandioca associada ao amido de milho (Arrozina - Idisa - SP). A Fig. 22a mostra resultados de dois experimentos onde notou-se que a atividade amilolítica não sofreu mudanças no período de 3 horas e meia após a extração, sugerindo que neste intervalo de tempo, as enzimas permaneceram

Figura 22. Atividade amilolítica (D.O. 535 nm) de 0,2 ml de extrato de endosperma de milho, após sete minutos de reação a 40°C durante um período de três horas e meia após a extração em 2 experimentos - experimento 1 (●); experimento 2 (○) (22a)

Atividade amilolítica (D.O. 535 nm) de 0,2 ml de dois extratos de endospermas de plântulas de milho com 7 (○) e 5 (●) dias de idade durante diferentes tempos de reação a 40°C (22b)

Atividade amilolítica (D.O. 535 nm) de diferentes volumes (vol.) de extrato de endosperma de milho durante sete minutos de reação a 40°C (22c)

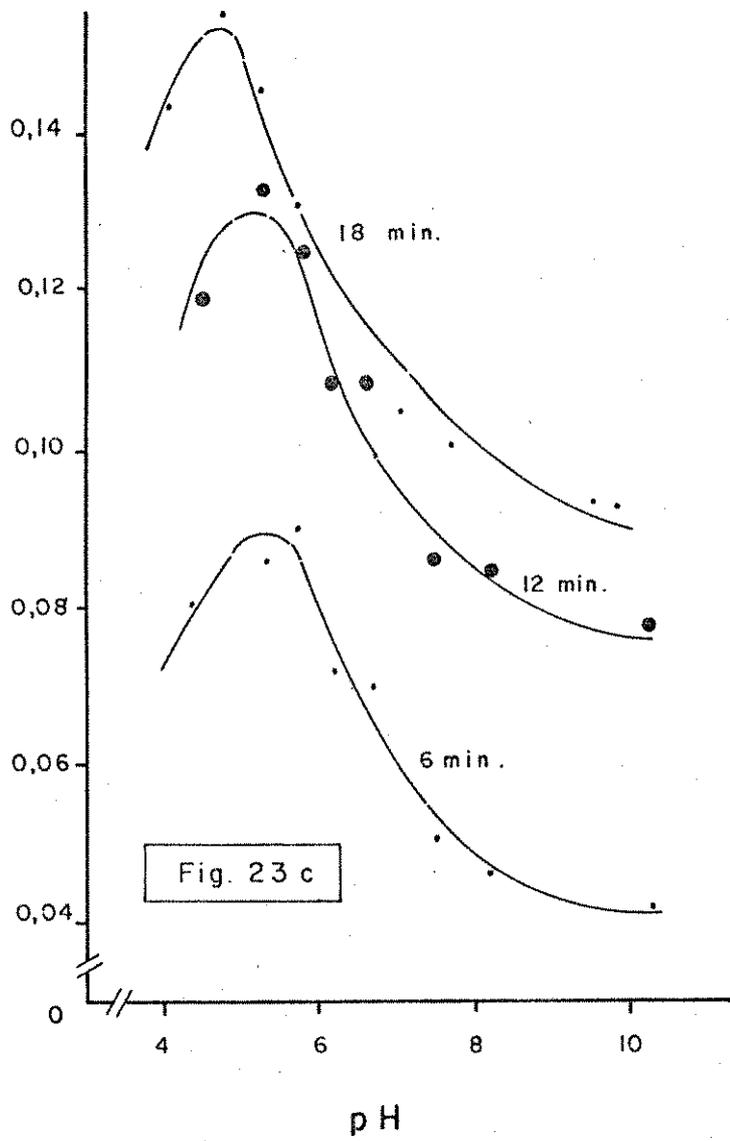
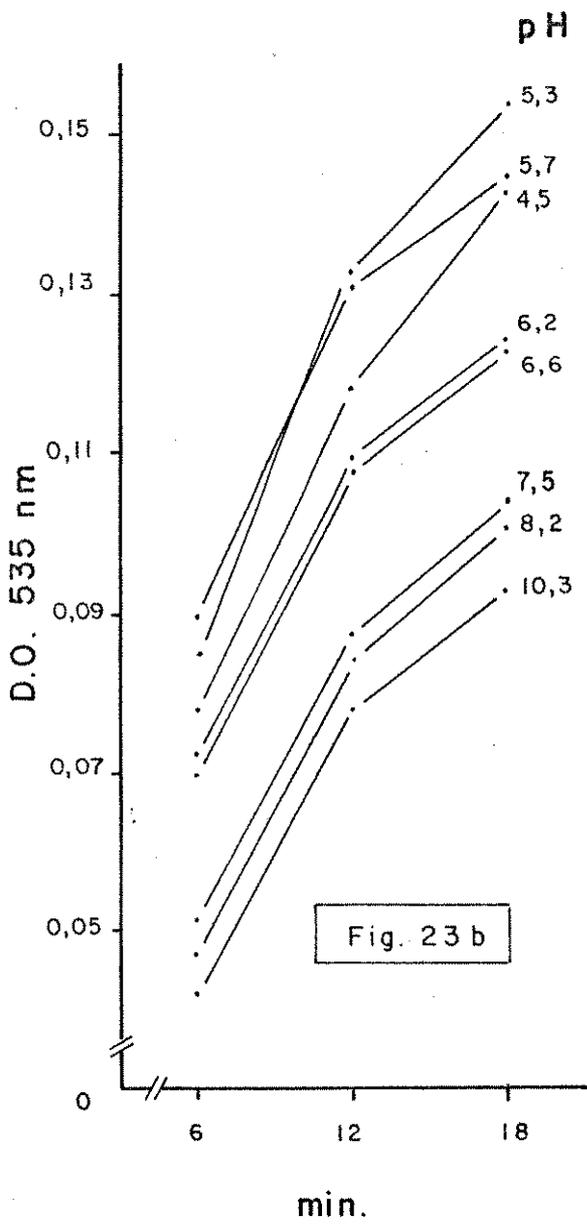
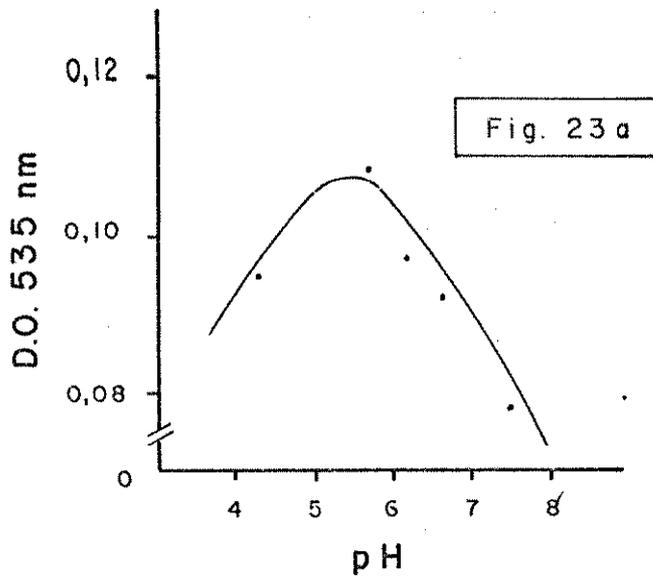
Atividade amilolítica de 0,2 ml do extrato de endosperma de milho, durante sete minutos de reação em diferentes temperaturas (temp.) (22d)



estáveis, sem perder atividade. Já que os ensaios subsequentes foram realizados num intervalo de tempo menor que uma hora após o tecido ter sido macerado, não houve perda apreciável de atividade neste período.

Na Fig. 22b pôde ser visto que a atividade enzimática em dois extratos de plântulas de idades diferentes permaneceu linear ($r = 0,991$; $p < 0,001$) dentro de 10 minutos de reação, mostrando que mesmo no extrato de plântulas com sete dias de crescimento, cuja atividade amilolítica foi maior, o substrato não foi limitante. Também foi notado (Fig. 22c) que a atividade amilolítica do extrato foi uma função do volume da alíquota utilizada na reação ($r = 0,996$; $p < 0,001$) e novamente, dentro dos 10 minutos em que foi realizada a reação o substrato não foi limitante mesmo para a maior alíquota utilizada (0,2 ml). O efeito da temperatura também foi analisado (Fig. 22d) e verificou-se que o aumento em atividade foi linear entre 16 e 50°C ($r = 0,995$; $p < 0,001$). Notou-se que nas diferentes temperaturas, o aumento de 1°C aumentou a atividade amilolítica em 3,3 unidades de densidade óptica. Assim, para dobrar a atividade observada a 16°C ($D.O_{535} = 0,106$) a temperatura da reação teve que ser triplicada. O efeito do pH, entre 4,0 e 8,0 sobre a atividade amilolítica, também foi analisado, num ensaio de 10 minutos e é ilustrado na Fig. 23a, onde pode ser visto que o pH teve um nítido efeito sobre a maltose liberada na reação de hidrólise do amido, sendo a atividade amilolítica máxima observada no pH 5,7. O pH ótimo da reação foi confirmado ser ao redor de 5,5 num segundo experimento (Fig. 23 b,c), sendo então utilizado nos ensaios subsequentes.

Figura 23. Efeito do pH sobre a atividade amilolítica (D.O. 535 nm) de 0,2 ml do extrato de endosperma de milho, durante dez minutos (23a) 6, 12 e 18 minutos (23b, 23c) de reação a 40°C



No caso das proteases, dois substratos, a caseina e a hemoglobina bovina, foram testados (Fig. 24a). Em cada pH analisado, a atividade proteolítica foi invariavelmente maior quando a hemoglobina foi usada como substrato, e extremos de pH tiveram efeito menor sobre a atividade proteolítica com a hemoglobina. Com a caseina a atividade proteolítica diminuiu rapidamente entre o pH 5,1 e 7,3. Além disso este substrato não foi solúvel em pH menor que 5,0, onde pareceu, com a hemoglobina como substrato, que a atividade proteolítica foi maior. Assim, nos ensaios subsequentes foi utilizado a hemoglobina em pH 3,6 como substrato. Comparada com a atividade da amilase, a da protease foi muito mais lenta permanecendo linear ($r = 0,994$) até pelo menos 5 horas de reação (Fig. 24b). Como para as amilases, a atividade proteolítica dos extratos foi uma função das alíquotas utilizadas no ensaio ($r = 0,991$; $p < 0,001$) e nas 5 horas em que foi realizado o ensaio o substrato não foi limitante mesmo na presença de 0,6 ml de extrato (Fig. 24c).

Nos primeiros experimentos onde foram medidas as atividades enzimáticas, a atividade amilolítica do endosperma do milho normal foi analisada e os resultados de dois experimentos independentes são mostrados nas Figs. 25 e 26. Observou-se que durante o período de análise o eixo aumentou linearmente em peso (Fig. 25a) indicando que estava na fase de utilização das reservas. Para o primeiro experimento são mostrados resultados de análises de peso fresco e para o segundo de peso seco; pôde ser visto que ambos os parâmetros serviram para a descrição do desenvolvimento do eixo. A Fig. 25(a,b) mostra claramente que no primeiro ex-

Figura 24. Efeito do pH sobre a atividade proteolítica (D.O. 620 nm) de 0,5 ml do extrato de endosperma de milho durante 5 horas de reação a 40°C utilizando como substrato caseína (cas.) e hemo - globina (hem.) (24a)

Atividade proteolítica (D.O. 620 nm) de 0,5 ml do extrato de endosperma de milho durante diferentes tempos de reação a 40°C (24b)

Atividade proteolítica (D.O. 620 nm) de diferentes volumes do extrato de endosperma de milho durante 5 horas de reação a 40°C (24c)

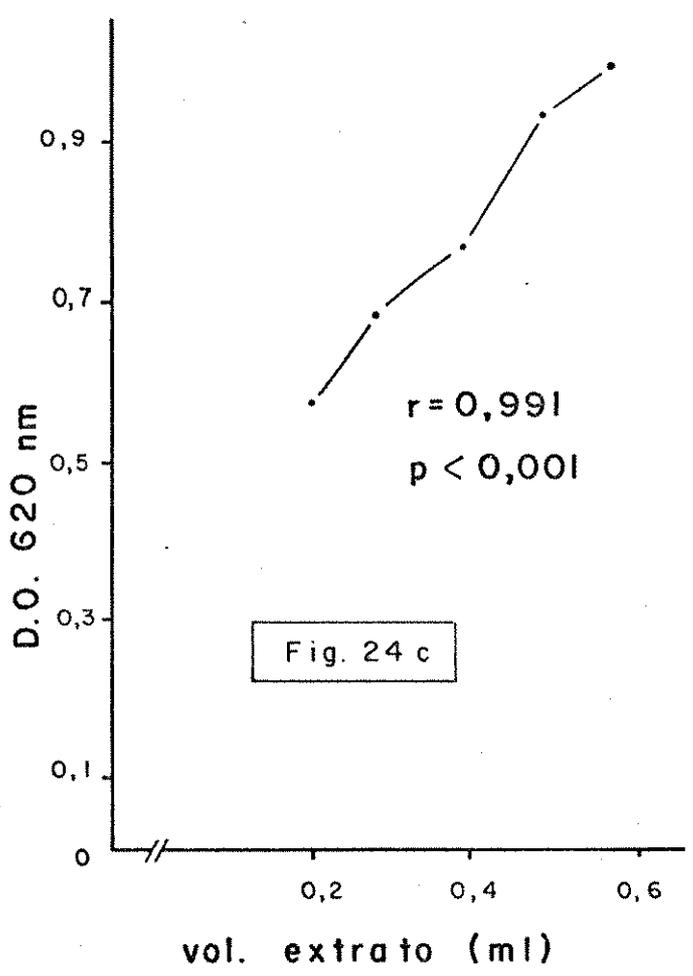
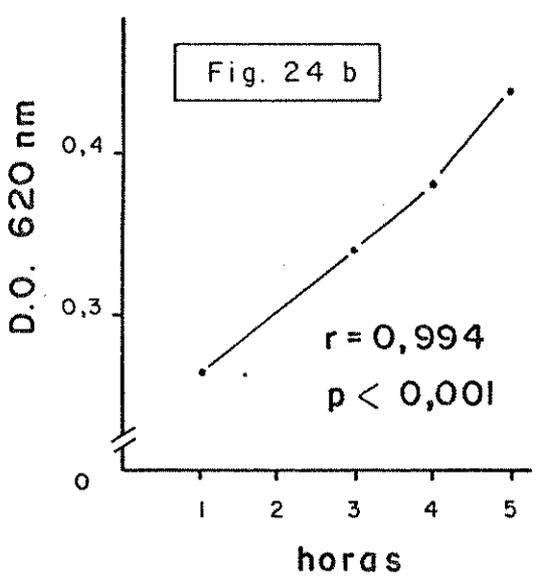
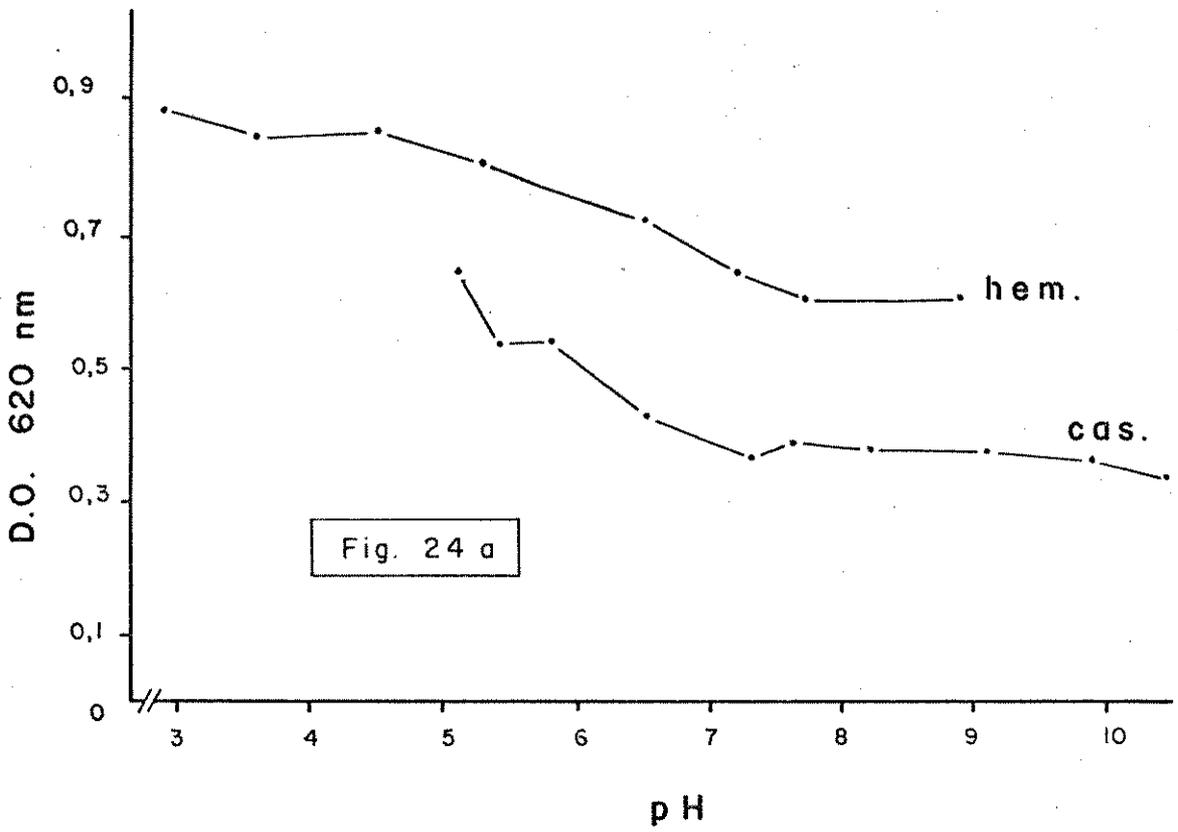


Figura 25. Aumento do peso fresco, experimento 1 (o) e seco, experimento 2 (Δ) de eixos de plântulas de milho (Maya normal) durante os primeiros dias de crescimento em dois experimentos independentes (25a)

Atividade amilolítica (μg de maltose liberadas) de endospermas de milho (Maya normal) com 2 (25b), 4 (25c) e 6 (25d) dias de idade durante 18 minutos de reação a 40°C .

Cada ponto representa a média de 6 valores

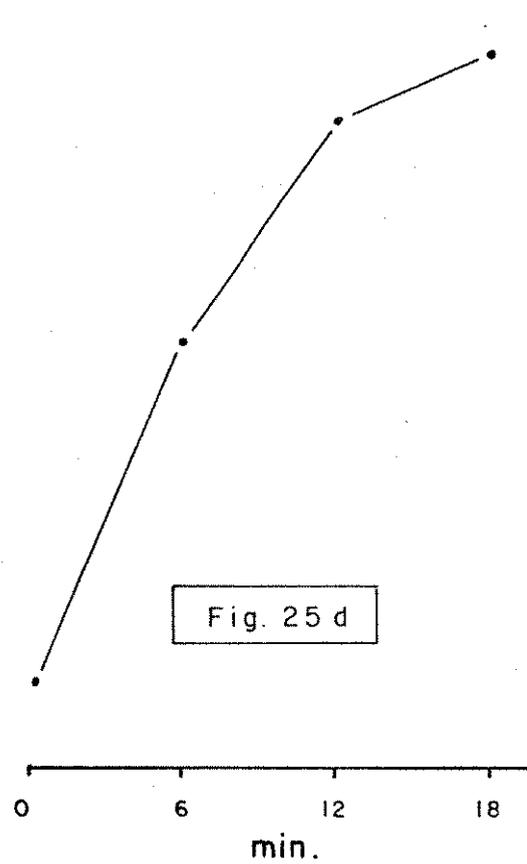
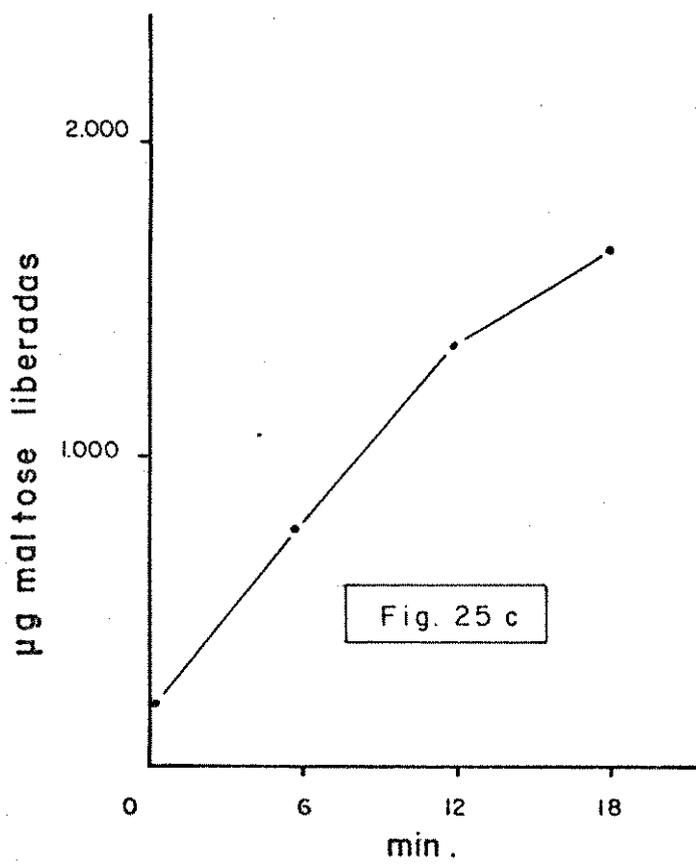
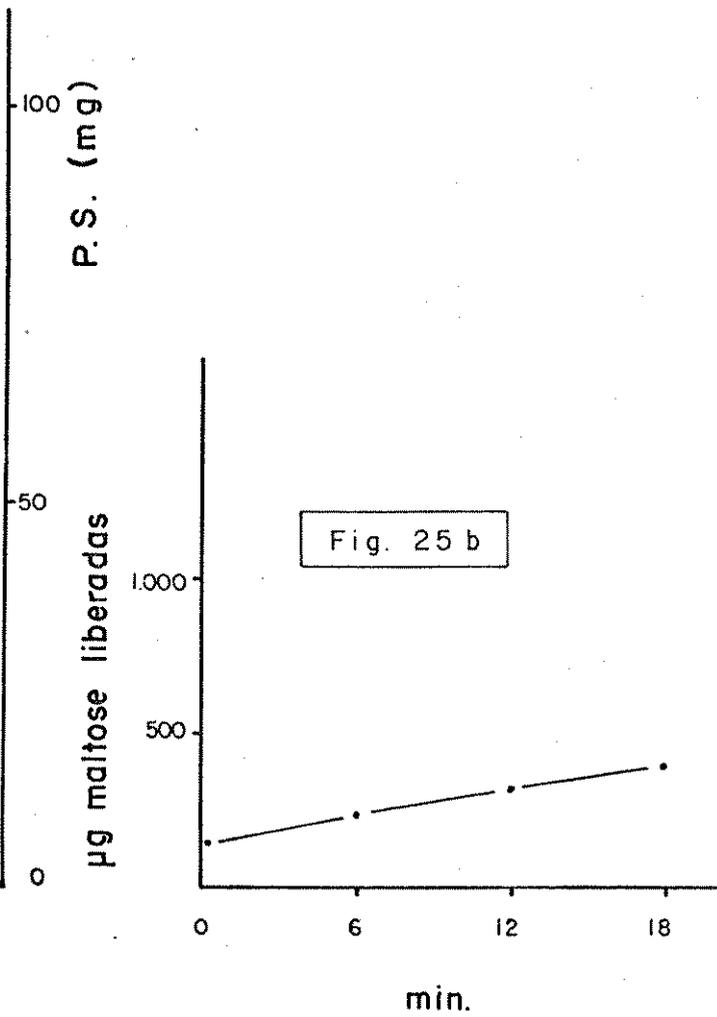
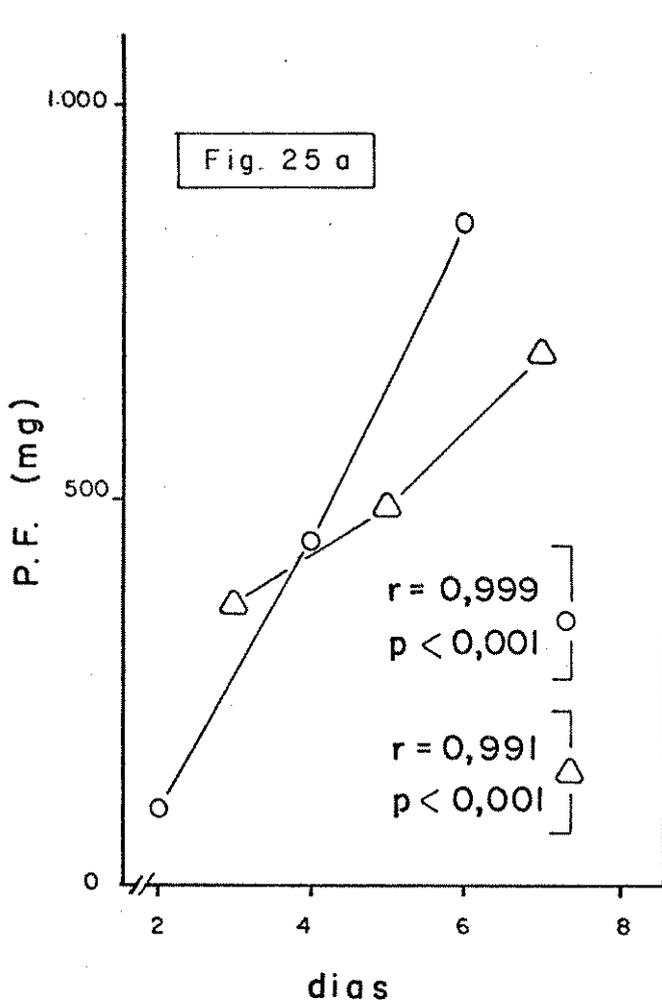
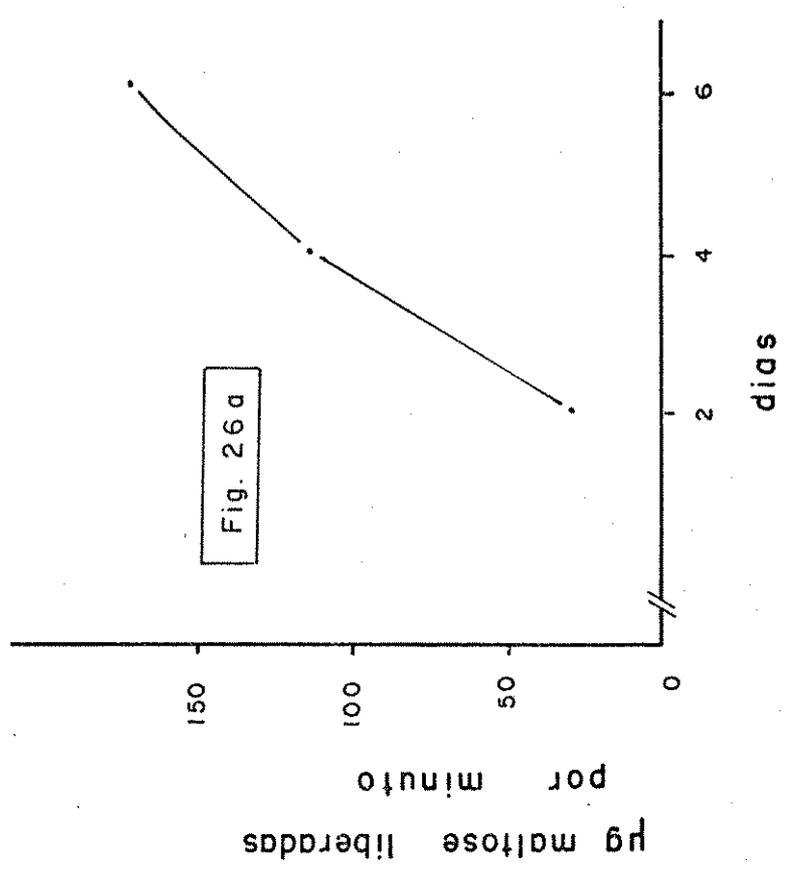
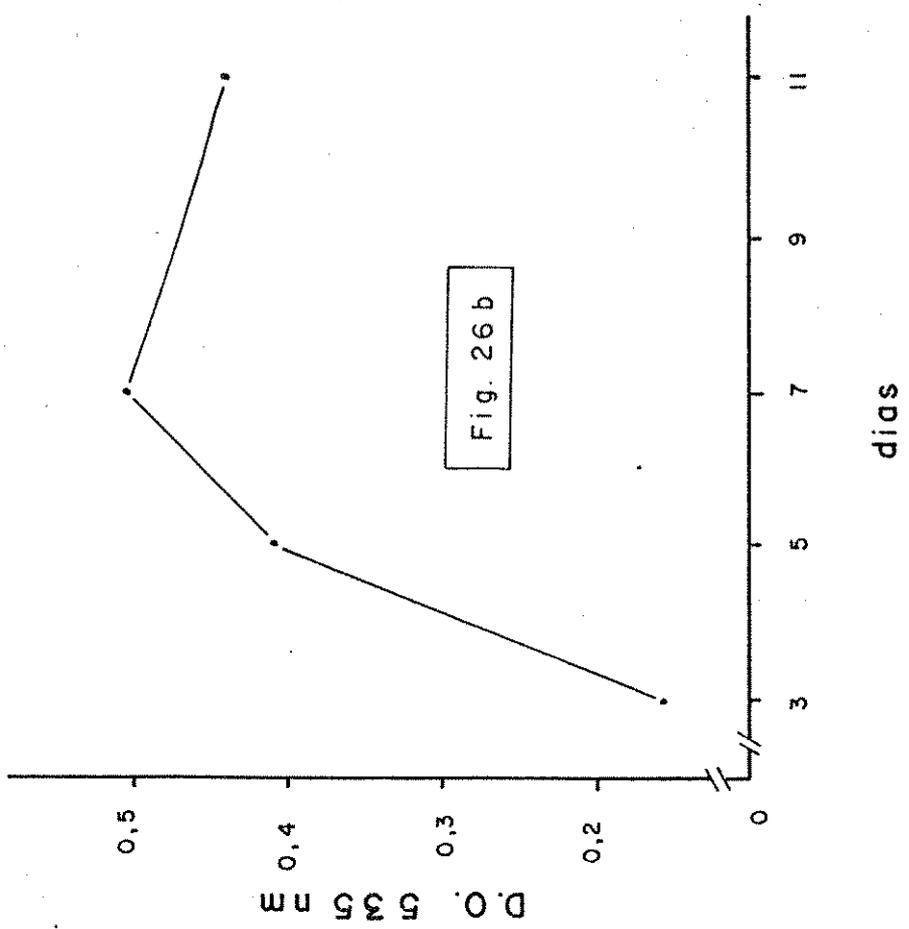


Figura 26. Mudanças na atividade amilolítica de endosperma de milho (Maya normal) durante os primeiros dias de crescimento em dois experimentos independentes (26a, 26b)

Cada ponto representa a média de 6 valores



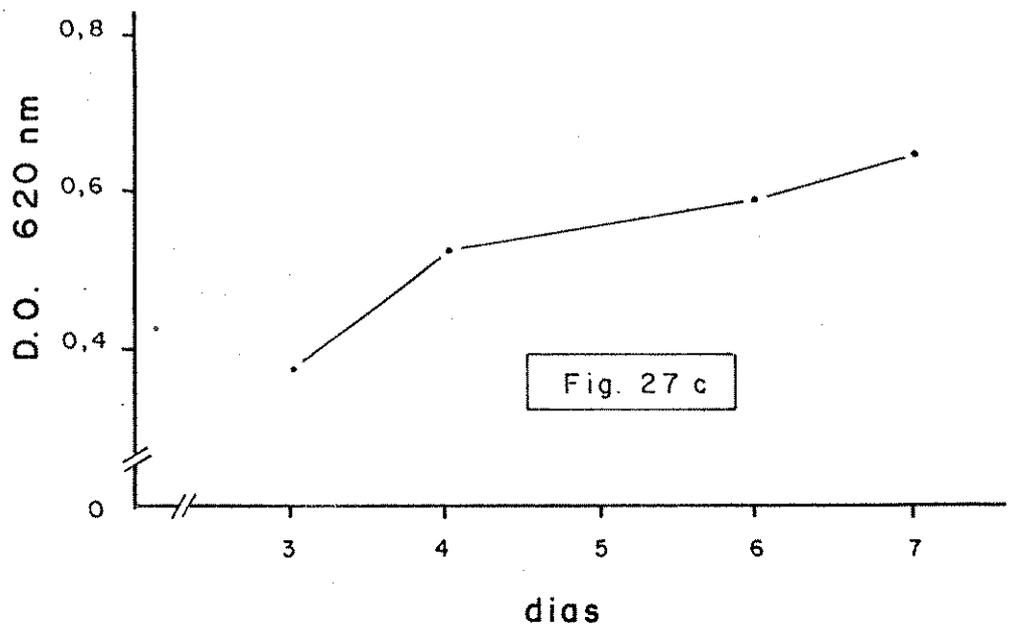
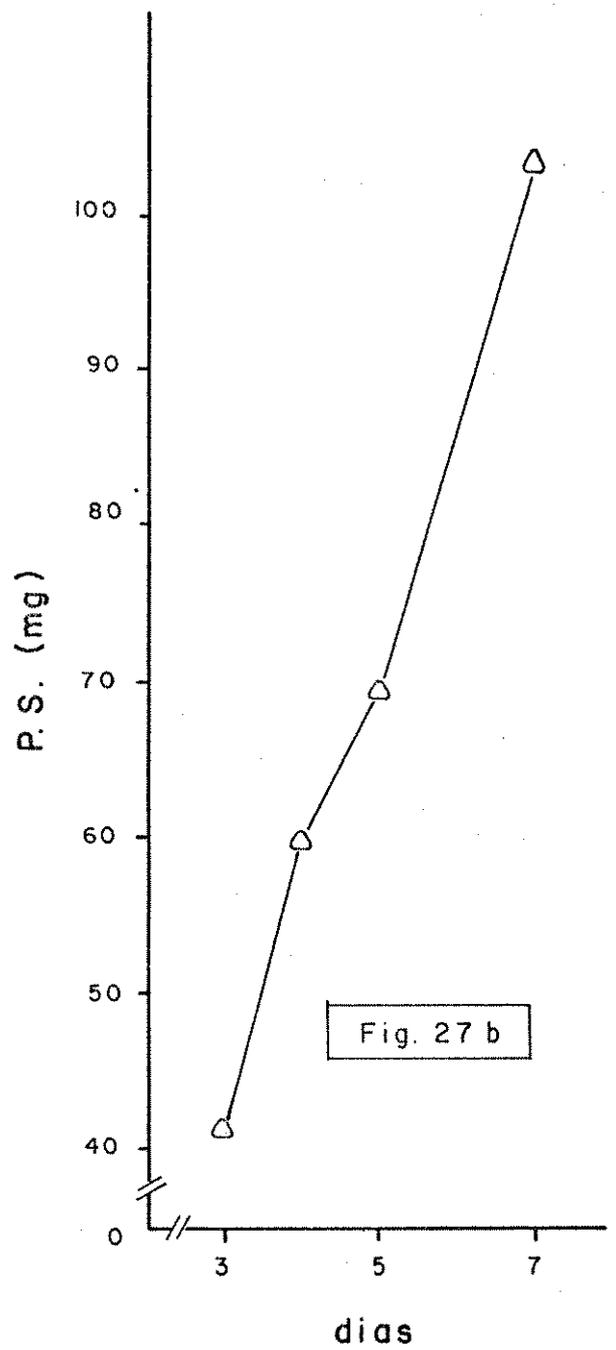
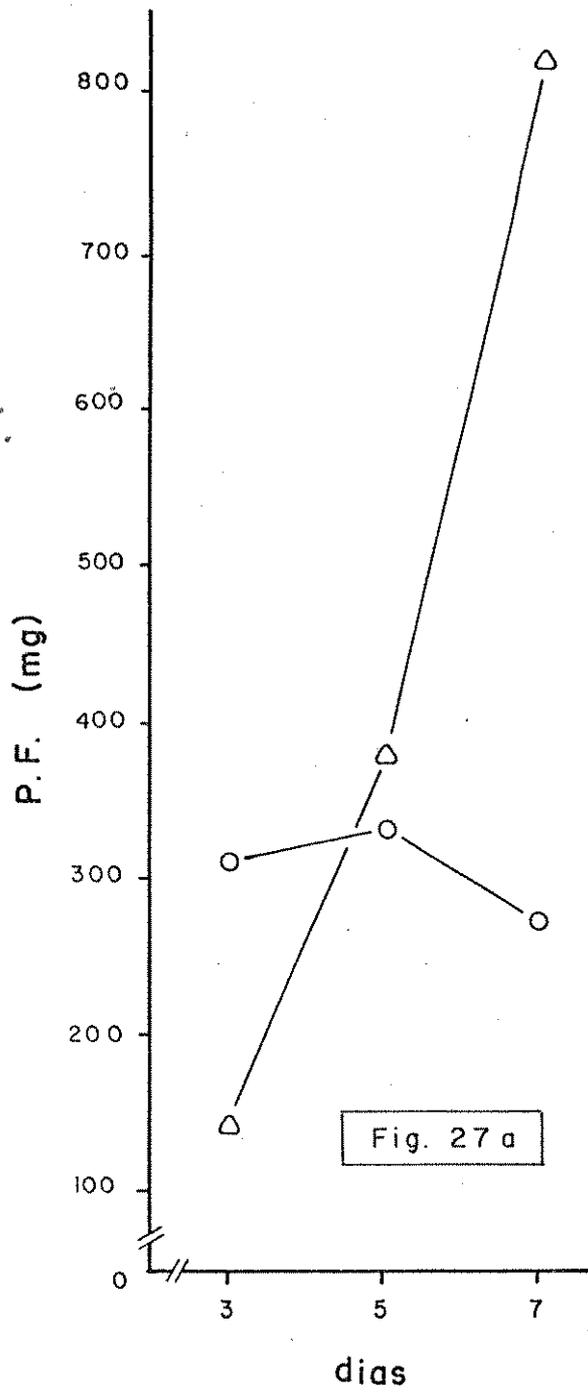
perimento a atividade amilolítica aumentou no período analisado, do segundo ao sexto dia de crescimento. Assim, comparando a maltose liberada após 6 minutos de reação, tempo em que o substrato não foi limitante em nenhuma das idades, foi verificado que a atividade amilolítica no quarto dia foi somente 60% da observada no sexto dia, enquanto que a no segundo dia foi 18%. Este aumento na atividade amilolítica também foi refletido na forma das curvas que representam esta atividade em cada dia de análise; assim, no segundo dia, onde a atividade foi baixa (Fig. 25b), a reação foi linear nos 18 minutos analisados, no quarto dia, o substrato tornou-se limitante após 12 minutos (Fig. 25c), e no sexto dia após 6 minutos (Fig. 25d). As mudanças nas taxas de hidrólise de amido nos dois experimentos, cujos períodos de análise foram diferentes, pode ser vista na Fig. 26 (a,b). Comparando-se os dois, notou-se que houve boa concordância e que a atividade aumentou continuamente até o sétimo dia de crescimento, sendo triplicada entre o terceiro e sétimo dias (Fig. 26b) e mostrando, após este período, uma pequena diminuição.

A atividade das proteases também foi analisada num terceiro experimento, nos terceiro, quarto, sexto e sétimo dias de crescimento (Fig. 27 a,b,c). Novamente, a análise do crescimento do eixo mostrou que o aumento em peso seco e fresco foi linear (Fig. 27 a,b) indicando um desenvolvimento normal do embrião e assim as atividades proteolíticas em dias diferentes puderam ser comparadas. A atividade das proteases aumentou continuamente até o sétimo dia de crescimento, embora a maior mudança na atividade o-

Figura 27. Mudanças no peso fresco do endosperma (o) e embrião (Δ) (27a) e no peso seco do eixo (27b) de milho (Maya normal), durante os primeiros sete dias de crescimento

Mudanças na atividade proteolítica (D.O. 620 nm) do endosperma de milho (Maya normal) durante os primeiros sete dias de crescimento (27c)

Cada ponto representa a média de 6 valores.



correu entre o terceiro e quarto dias, sendo este aumento quatro vezes maior que o dos próximos 3 dias (Fig. 27c). O último experimento desta série, analisou tanto a atividade amilolítica como a proteolítica, num período de tempo mais prolongado, até o décimo quarto dia de crescimento, quando se sabia que as reservas do endosperma estavam esgotadas. Os resultados desta análise são apresentados na Fig. 28. Novamente, foi observado que o eixo ganhou peso continuamente durante o período de análise e isto foi acompanhado por uma diminuição no peso do endosperma. Considerando, primeiramente as amilases (Fig. 28a) notou-se, novamente, que a atividade destas enzimas aumentou linearmente do início da embebição até o sexto dia. Entre o sexto e décimo segundo dia de crescimento a atividade permaneceu praticamente constante sendo observada apenas uma ligeira diminuição, entretanto, após o décimo segundo dia houve uma diminuição brusca da atividade amilolítica, indicando que as reservas amiláceas (substrato para esta enzima) haviam se extinguido. Foi observado que a atividade amilolítica no endosperma antes do início da embebição foi extremamente baixa.

Para as proteases, novamente houve um aumento rápido no início do desenvolvimento seguido por uma fase quase que constante, sendo o pequeno aumento, observado no décimo quarto dia, não significativo (Fig. 28b).

Todos os estudos apresentados a respeito da atividade amilolítica e proteolítica em milho foram feitos com Maya normal já que em experimentos iniciais foi notado que esta forma apresentou maior atividade hidrolítica que Maya opaco-2. Assim, na Tabela 12 (A, B) são apresentados

Figura 28. Mudanças na atividade amilolítica (D.O. 535 nm) (28a) e proteolítica (D.O. 620 nm) (28b) de endospermas de milho (Maya normal) durante os primeiros 14 dias de crescimento.

Cada ponto representa a média de 6 valores

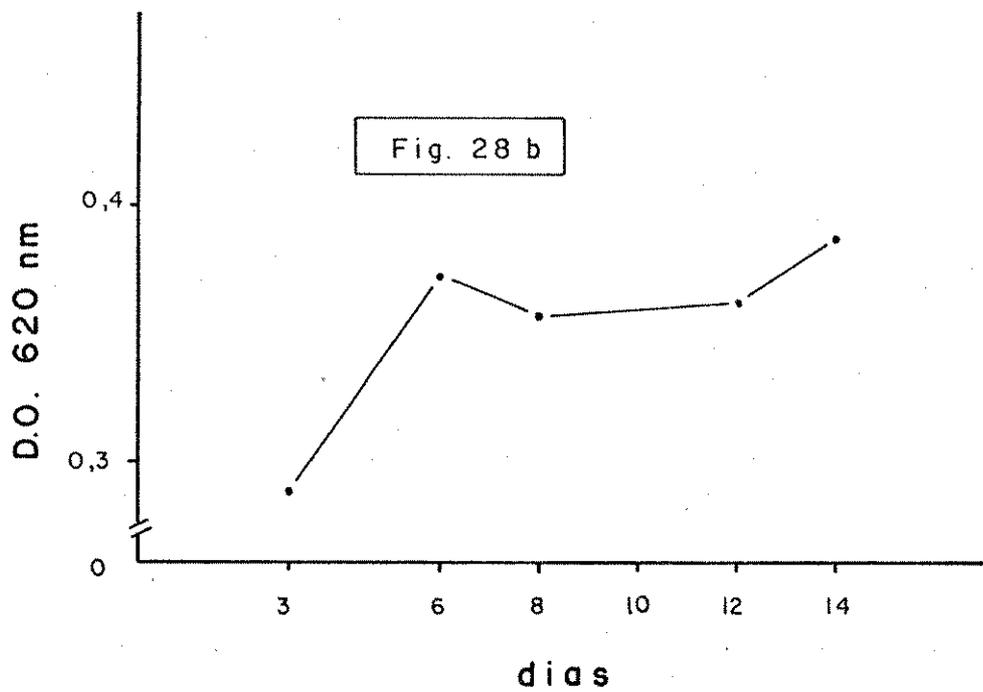
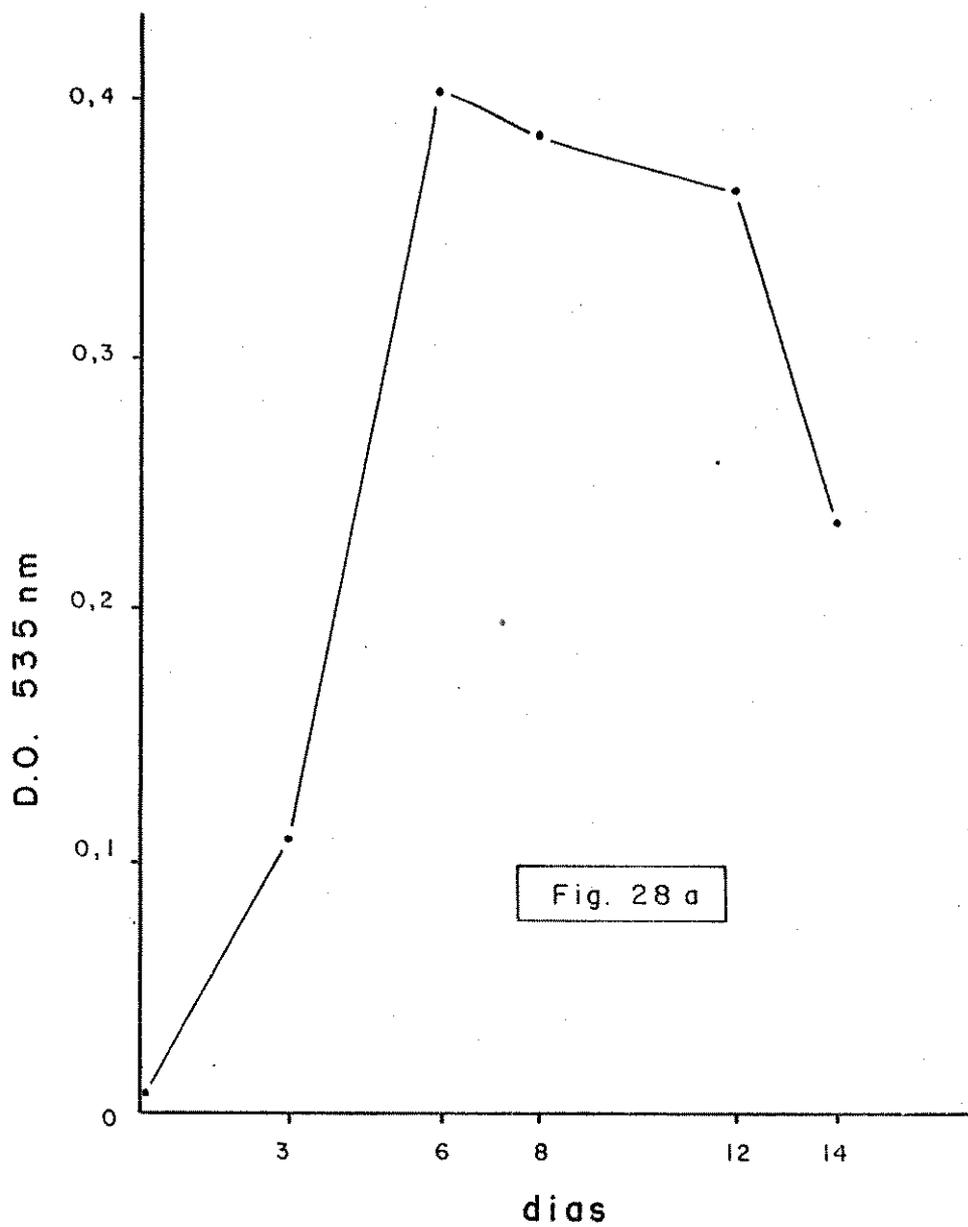


TABELA 12

Atividade amilolítica (D.O. 535 nm); coluna 1; proteolítica (D.O. 620 nm); coluna 2; e açúcar livre (D.O. 630 nm); coluna 3; em endospermas individuais de Maya normal (Mn) e Maya cpaco-2 (Mop) em 2 experimentos nos dias 4 (A) e 6 (B) de crescimento

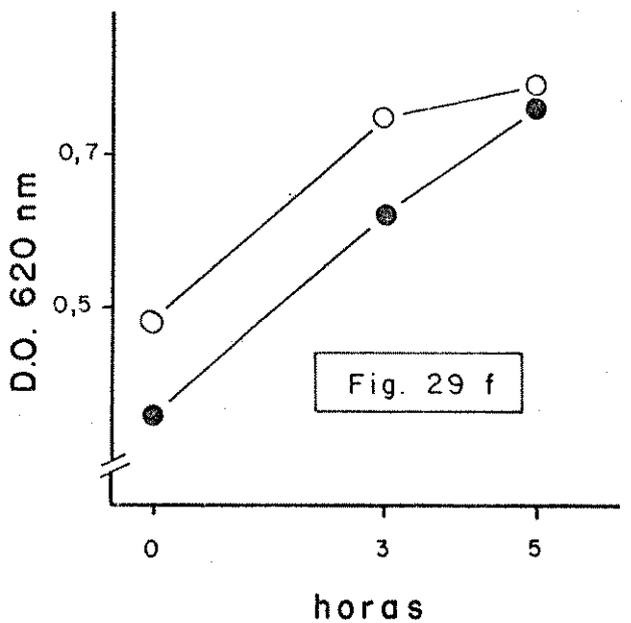
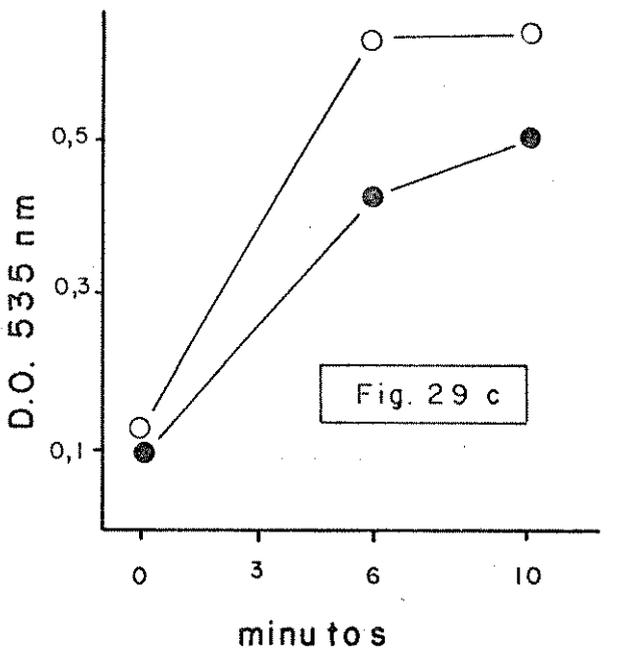
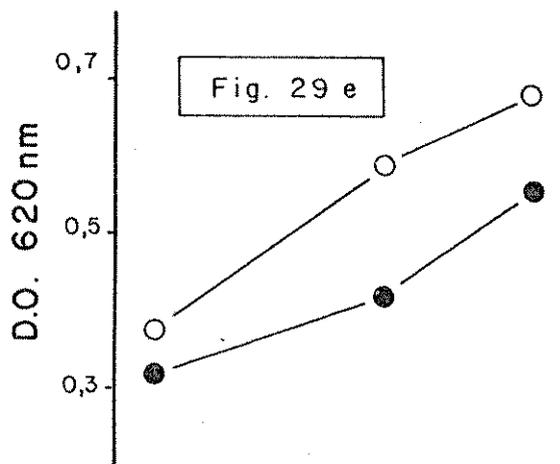
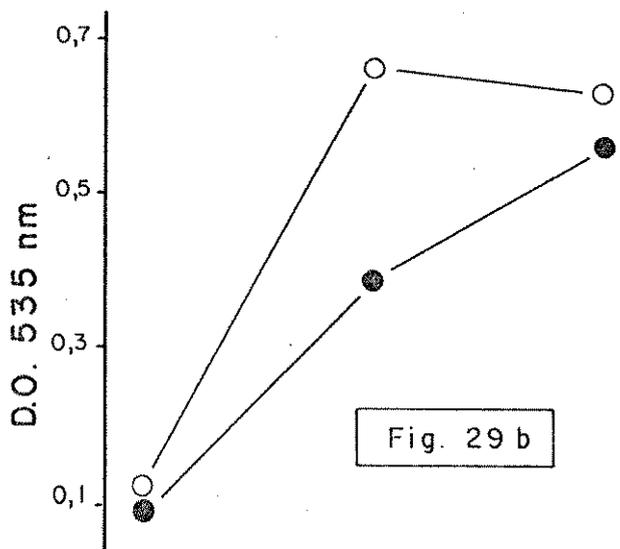
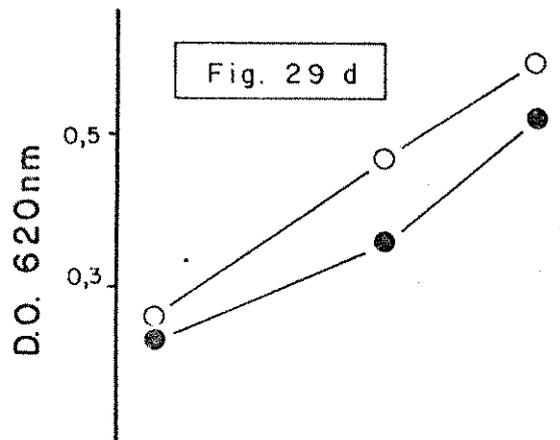
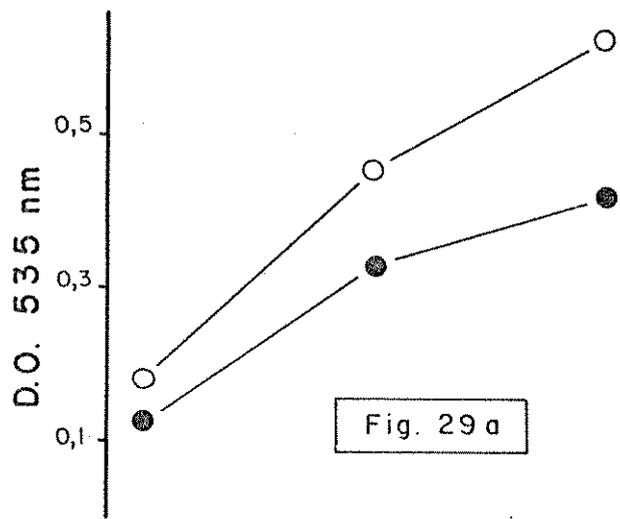
A - endospermas	1		2		3	
	Mn	Mop	Mn	Mop	Mn	Mop
1	0,23	0,20	0,81	0,65	0,93	0,40
2	0,28	0,22	0,84	0,75	0,53	0,37
3	0,28	0,22	0,79	0,71	0,59	0,44
4	0,23	0,17	0,76	0,67	0,34	0,39
5	0,25	0,20	1,03	0,63	0,65	0,50
6	0,24	0,16	-	-	0,82	0,26
Média	0,25	0,20	0,85	0,68	0,64	0,39

B -	1		2		3	
	Mn	Mop	Mn	Mop	Mn	Mop
1	0,14	0,10	0,84	0,56	0,70	0,30
2	0,16	0,07	0,76	0,65	0,97	0,70
3	0,23	0,11	0,85	0,60	0,86	0,73
4	0,23	0,03	0,82	0,52	0,94	0,34
5	0,15	0,07	0,85	0,60	0,52	0,39
6	0,17	-	0,81	-	0,69	-
Média	0,18	0,08	0,82	0,59	0,78	0,49

os resultados para as medidas da atividade amilolítica e proteolítica em endospermas de plântulas normais e opaco-2 de diferentes idades obtidos em dois experimentos independentes. Embora as densidades ópticas dos dois experimentos não pudessem ser comparadas diretamente, as diferenças entre Maya normal e opaco-2, tanto na atividade amilolítica e proteolítica, como nos quarto e sexto dias de crescimento foram nítidas. O conteúdo de açúcar livre do endosperma nas duas idades analisadas foi maior no milho normal que no opaco-2, que só apresentou 60% do açúcar livre encontrado no normal, parecendo, este fato, ser um reflexo da atividade amilolítica (Tabela 12 A e B, coluna 3). Também foi observado que a diferença entre as duas formas de Maya no sexto dia de crescimento, foi muito maior que no quarto dia. Esta diferença foi mais marcante em termos de atividade amilolítica, assim, no quarto dia de crescimento, endospermas de plântulas de Maya opaco-2 apresentaram 80% da atividade dos de Maya normal e no sexto dia de crescimento mostraram somente 40% da atividade do normal. No caso das proteases, embora as diferenças tenham sido significantes, estas não foram tão grandes; assim, no quarto dia de crescimento a atividade dos endospermas de Maya opaco-2 representou 80% da dos de Maya normal e no sexto dia 70%.

Outros experimentos, utilizando plântulas de Maya normal e opaco-2 com 3, 5 e 7 dias de idade confirmaram estas observações iniciais. Pode ser visto na Figura 29 (a-f) que a atividade tanto amilolítica como proteolítica, foi invariavelmente maior nos endospermas de Maya normal que nos de Maya opaco-2 em todas as idades analisadas, ape-

Figura 29. Atividade amilolítica (D.O. 535 nm) durante 12 minutos de reação (29a, 29b, 29c) e proteolítica (D.O. 620 nm) durante 5 horas de reação (29d, 29e, 29f) de endospermas de Maya normal (o) e Maya opaco (●) nos dias 3 (29a, 29d), 5 (29b, 29e) e 7 (29c, 29f) de crescimento. Cada ponto representa a média de 3 valores.



sar de falta nos substratos, por causa da alta atividade hidrolítica, terem aparentemente diminuído a atividade das amilases de endospermas de plântulas com 5 dias de idade após doze minutos de reação (Fig. 29b) e a das proteases de endospermas de plântulas com sete dias de idade, após 5 horas de reação (Fig. 29f). Assim pôde ser notado nestes exemplos, como também nas outras idades, que para as duas formas de Maya, as atividades tanto amilolítica como proteolítica apresentaram as maiores diferenças após 6 minutos e 3 horas de reação respectivamente.

As relações entre o peso seco de eixos e a atividade amilolítica e proteolítica, no tempo de reação referido acima são mostradas nas Figuras 30 a,b respectivamente. Primeiramente, notou-se que a relação entre peso seco do eixo e atividade amilolítica e proteolítica foi muito forte ($p < 0,01$) em todas as idades analisadas. Em segundo lugar, pôde-se observar que as regressões foram distintas entre as duas formas, normal e opaco-2, demonstrando que eixos no mesmo estágio de desenvolvimento, em termos de peso seco, tiveram endospermas com atividade maior em Maya normal que em Maya opaco-2. Estes dados sugeriram que esta diferença foi real e não pôde ser atribuída a uma possível maior fonte de consumo em Maya normal sendo possivelmente um reflexo de uma diminuição na atividade amilolítica e proteolítica devido à presença do gene opaco-2.

Estas diferenças na atividade hidrolítica entre as duas formas de Maya foram analisadas com mais detalhes numa comparação entre elas nos terceiro, sexto e oitavo dias de crescimento. A Figura 31 mostra as mudanças no peso fresco

Figura 30. Relação entre peso seco do eixo e atividade amilolítica (D.O. 535 nm) de endospermas de plântula de Maya normal (símbolos vazios) e Maya opaco-2 (símbolos cheios) nos dias 3 (círculos) , 5 (triângulos) e 7 (quadrados) de crescimento (30a)

Relação entre peso seco do eixo e atividade proteolítica (D.O. 620 nm) de endospermas de plântulas de Maya normal (símbolos vazios) e Maya opaco-2 (símbolos cheios) nos dias 3 (círculos), 5 (triângulos) e 7 (quadrados) de crescimento (30b)

P.S. = peso seco

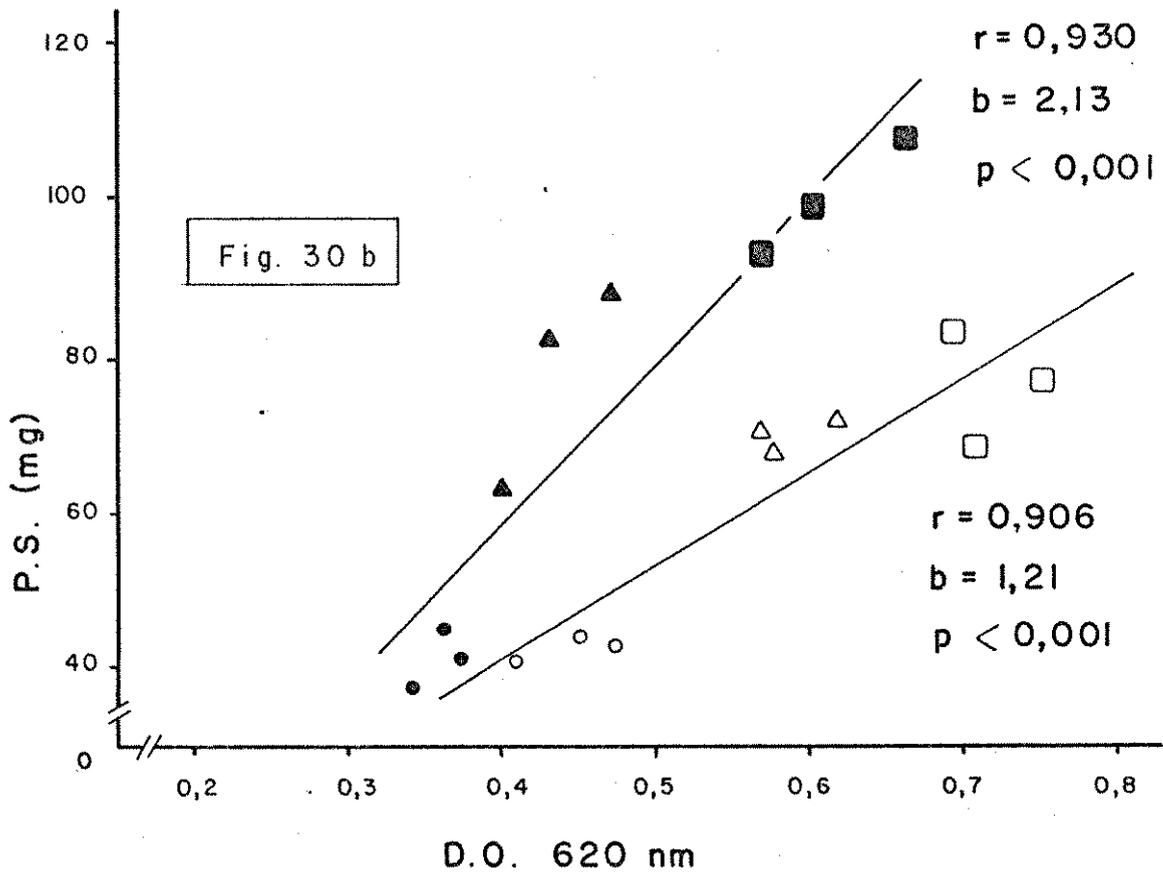
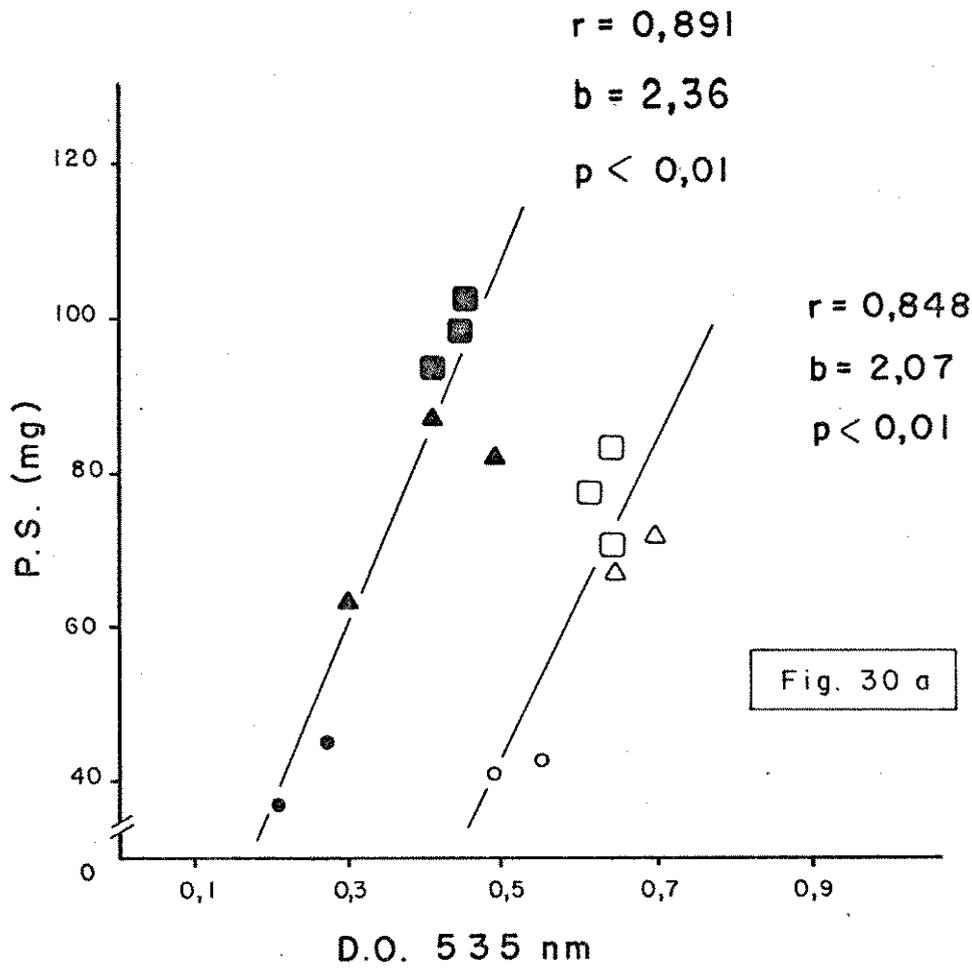
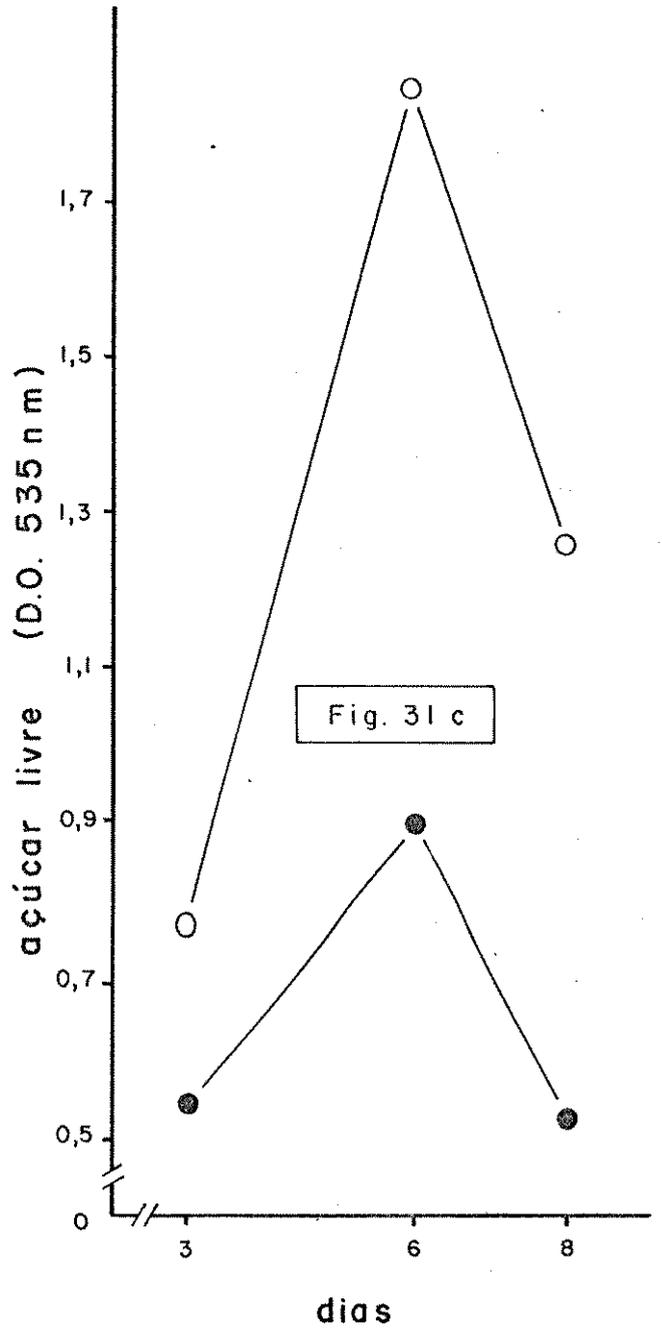
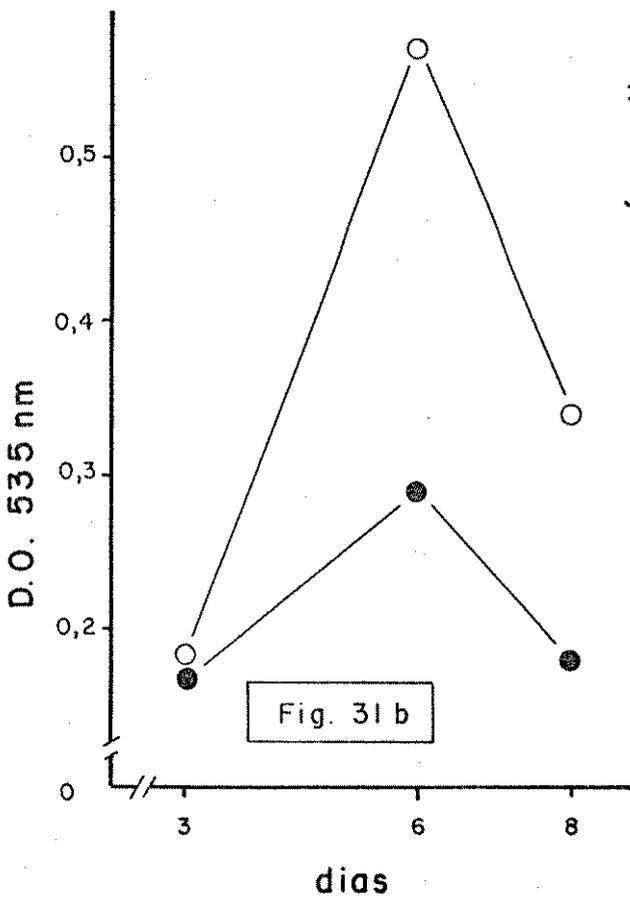
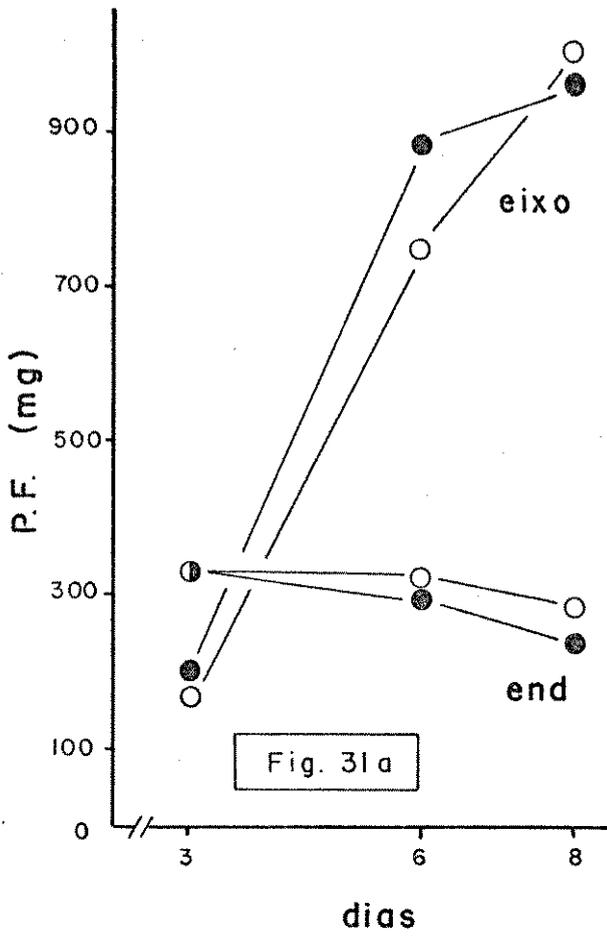


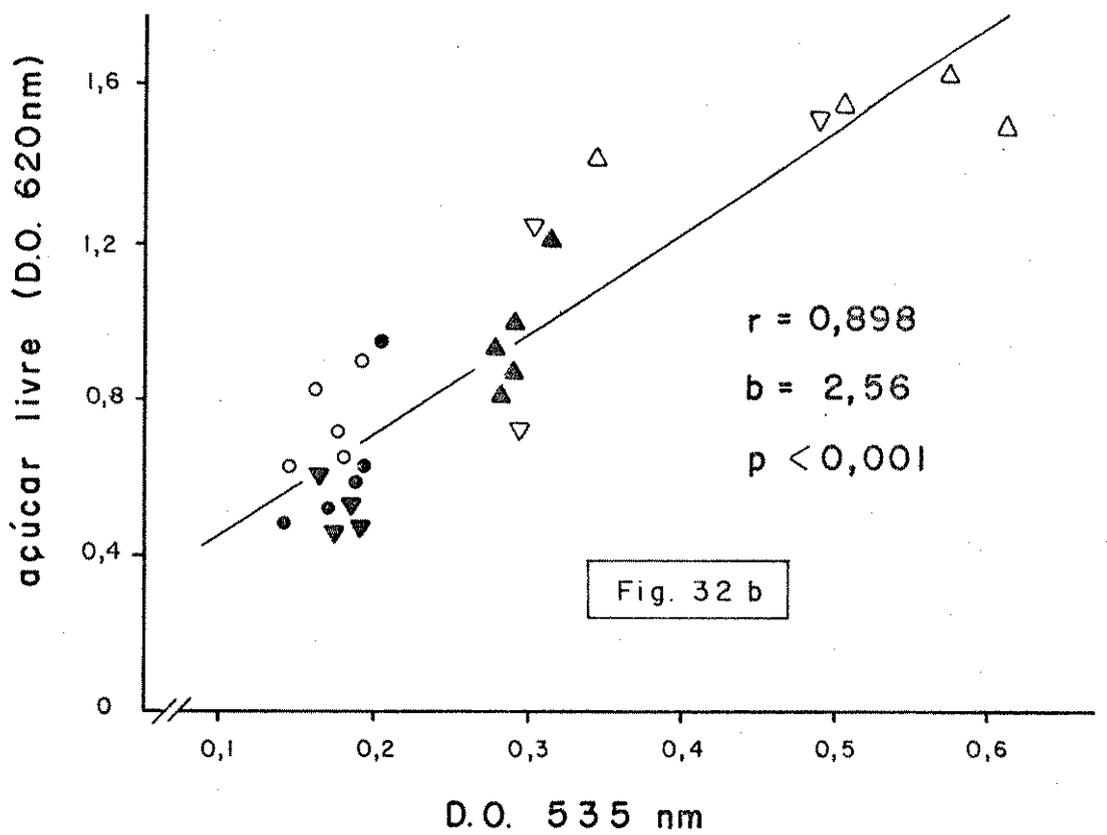
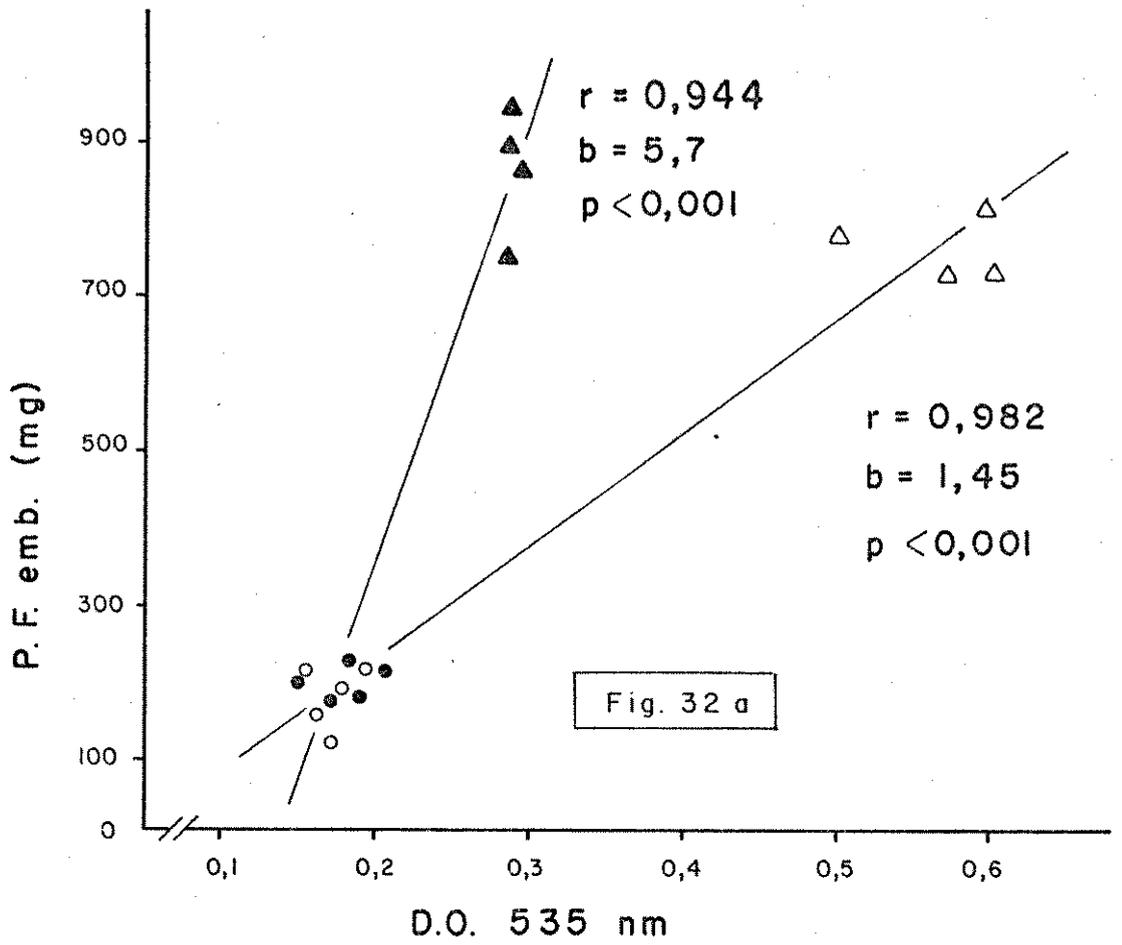
Figura 31. Mudanças no peso fresco (P.F.) do eixo (emb) e endosperma (end.) (31a); na atividade amilolítica (D.O. 535 nm) (31b) e no conteúdo de açúcar livre (31c) de endospermas de plântulas de Maya normal (o) e Maya opaco-2 (●) durante os oito primeiros dias de crescimento

Cada ponto representa a média de 5 valores



co do eixo e endosperma (Fig. 31) no conteúdo de açúcar livre no endosperma (Fig. 31c) e na atividade de amilases (Fig. 31b), durante esta análise. Apesar de ter sido novamente observado não haver diferenças no crescimento entre Maya normal e opaco-2, fato este indicado pelo mesmo padrão, para as duas formas, de aumento no peso do eixo e diminuição do peso do endosperma (Fig. 31a), novamente foram observadas grandes diferenças em termos de atividade amilolítica. Como estabelecido anteriormente (Tabela 12A), as diferenças entre as atividades amilolíticas de Maya normal e opaco-2 foram inicialmente pequenas e entre o terceiro e sexto dia de crescimento a atividade aumentou no endosperma das duas formas de Maya, sendo que na normal este aumento foi muito maior que na opaco-2 e assim, no sexto dia de crescimento a atividade para a primeira foi mais que o dobro da para a última, confirmando o observado na Tabela 12B. Para ambas as formas de Maya a atividade no oitavo dia de crescimento foi menor do que a observada no sexto dia concordando com o padrão de atividade amilolítica durante o crescimento analisado anteriormente (Fig. 25a). Este decréscimo na atividade após o sexto dia foi maior para Maya normal que para Maya opaco-2. Novamente, o conteúdo de açúcar livre no endosperma foi um reflexo da atividade amilolítica sendo invariavelmente maior em Maya normal e baixo no terceiro dia, aumentando até um pico no sexto dia e diminuindo a partir desta data. Na Figura 32 são apresentadas as relações entre o peso fresco do eixo e atividade amilolítica (Fig. 32a) e entre o conteúdo de açúcar livre no endosperma e a atividade amilolítica (Fig. 32b) para Maya normal e Maya opaco-2.

Figura 32. Correlação entre o peso fresco (P.F.) do eixo e a atividade amilolítica, medida a 535 nm, nos dias 3 e 6 de crescimento (32a) e entre o conteúdo de açúcar livre e a atividade amilolítica (32b) do endosperma para Maya normal (símbolos vazios) e Maya opaco-2 (símbolos cheios) nos dias 3 (círculos), 6 (triângulos) e 8 (triângulos invertidos) de crescimento



Pôde ser notado que enquanto o peso fresco do eixo e a atividade amilolítica do endosperma foram fortemente correlacionados ($p < 0,001$), esta relação foi marcadamente diferente entre Maya normal e Maya opaco-2. Ficou novamente claro que as diferenças entre as duas formas na atividade amilolítica, foram insignificantes no terceiro dia e distintas no sexto dia. Estes dados estabelecem uma diferença significativa na atividade amilolítica das duas formas, mas não no crescimento da plântula como visto anteriormente, assim, esta diferença não poderia ser atribuída a uma possível desigualdade na fonte de consumo entre as duas formas, que talvez influísse na taxa de hidrólise do endosperma. Os resultados obtidos na medida da atividade amilolítica de endospermas no nono dia de crescimento não puderam ser relacionados com os dados do terceiro e sexto dias. A razão para este fato foi que, após o nono dia de crescimento a atividade amilolítica estava diminuindo (Fig. 28a), enquanto o eixo continuava aumentando em peso representando então uma relação negativa distinta daquela antes do pico de atividade amilolítica quando ambos os parâmetros aumentaram conjuntamente.

Foi interessante notar, que embora se obtivesse duas relações distintas dependentes da presença do gene opaco-2 entre peso de eixo e atividade amilolítica, a relação entre o conteúdo de açúcar livre do endosperma e a atividade amilolítica foi uma relação contínua, sendo os valores obtidos para Maya normal e Maya opaco-2 distribuídos uniformemente em relação a uma mesma reta (Fig. 32b). Assim, o conteúdo de açúcar livre parece ser uma função da atividade

de amilolítica independente da presença do gene opaco-2.

Tendo sido estabelecido o padrão normal do desenvolvimento da atividade das amilases e proteases durante o crescimento, o papel do eixo e reguladores de crescimento neste desenvolvimento foi estudado pois eles estão envolvidos no controle da hidrólise das reservas. Este estudo foi feito com o milho normal já que foi encontrada atividade hidrolítica maior nesta forma de milho. Num experimento inicial, foi analisado o efeito da remoção do eixo, após 3 horas de embebição, na hidrólise das reservas. O peso fresco e seco do eixo e o peso fresco de endospermas isolados ou intactos são mostrados na Fig. 33 (a,b). Nos grãos intactos o peso do eixo aumentou linearmente mostrando que seu desenvolvimento foi normal e o peso fresco dos seus endospermas diminuiu enquanto que o dos isolados permaneceu constante e maior, mostrando que o eixo constitui importante fonte de consumo do material hidrolisado da reserva. Assim, no sétimo dia após o início da embebição o peso seco dos endospermas intactos foi somente 60% daqueles isolados. A atividade proteolítica foi analisada (Fig. 33 c,d) no quinto e sétimo dias de crescimento e estes mostraram que o eixo não foi absolutamente necessário para o início da atividade proteolítica, mas na presença dele a taxa de degradação proteica foi consideravelmente maior. Foi observado também que a atividade amilolítica (Fig. 34 a,b,c) foi maior no endosperma intacto que naqueles isolados e que novamente, no endosperma intacto a atividade aumentou no período de tempo analisado (até o sétimo dia de crescimento). Assim, após 8 minutos de reação a atividade no sétimo dia foi quase cinco

Figura 33. Mudanças no peso fresco do eixo (o) e endosperma isolado (●) e intacto (Δ) (33a) e no peso seco do eixo (33b) de Maya normal

Atividade proteolítica (D.O. 620 nm) de endospermas de Maya normal, isolados (●) ou intactos (Δ) nos dias 5 (33c) e 7 (33d) de embebição durante 5 horas de reação

Cada ponto representa a média de 6 valores

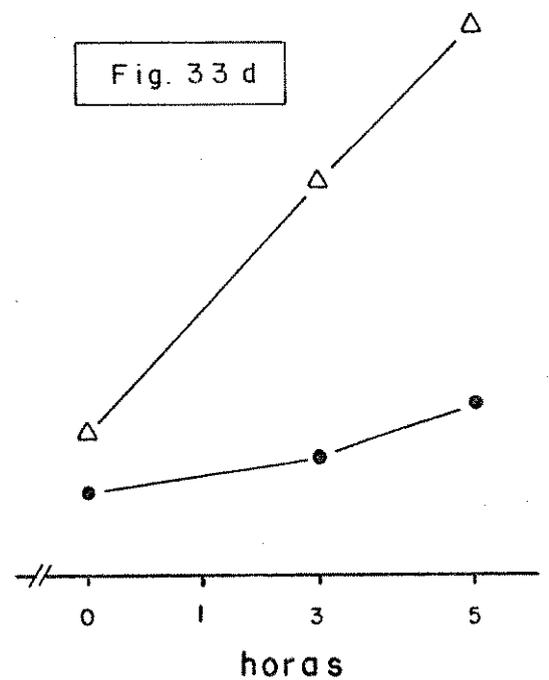
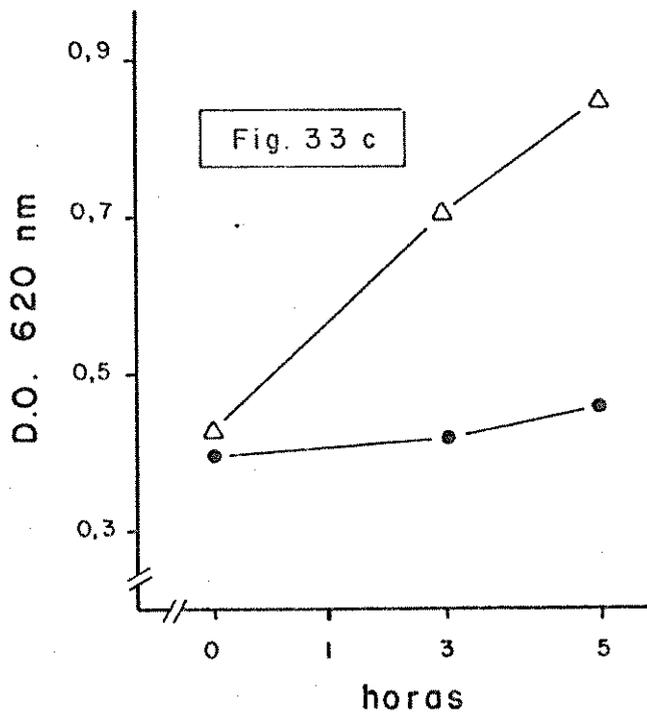
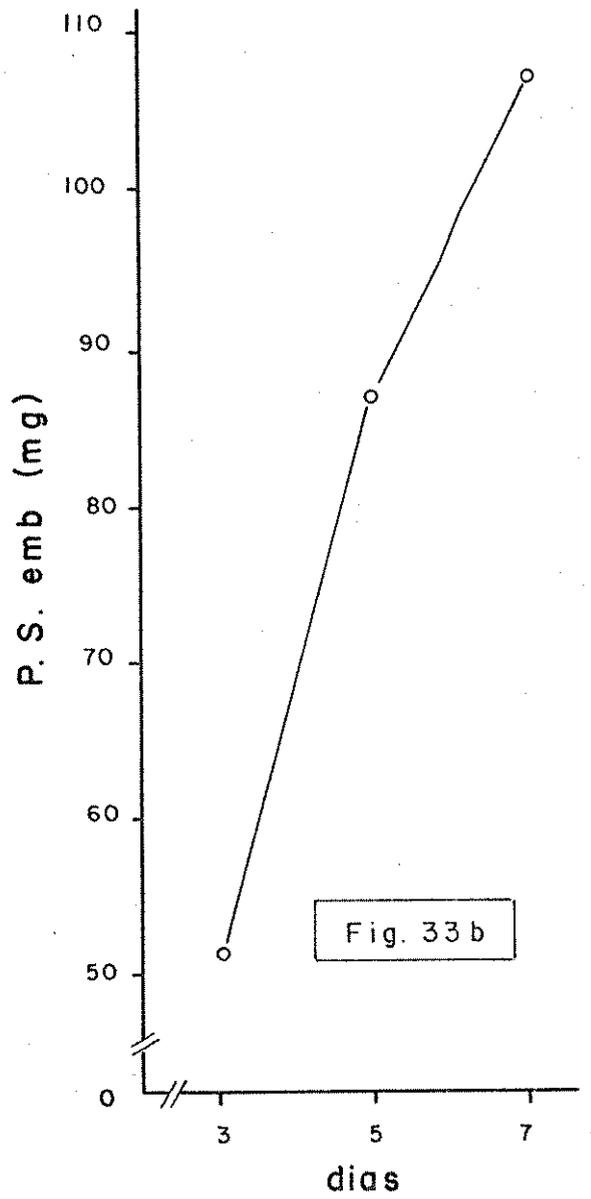
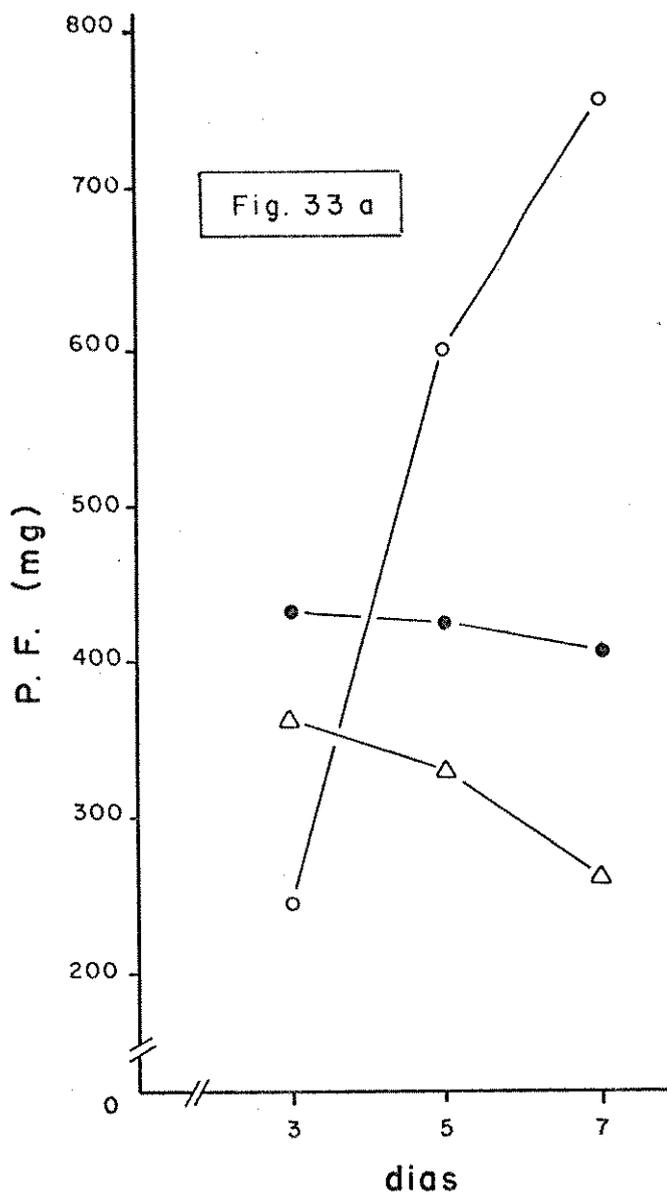
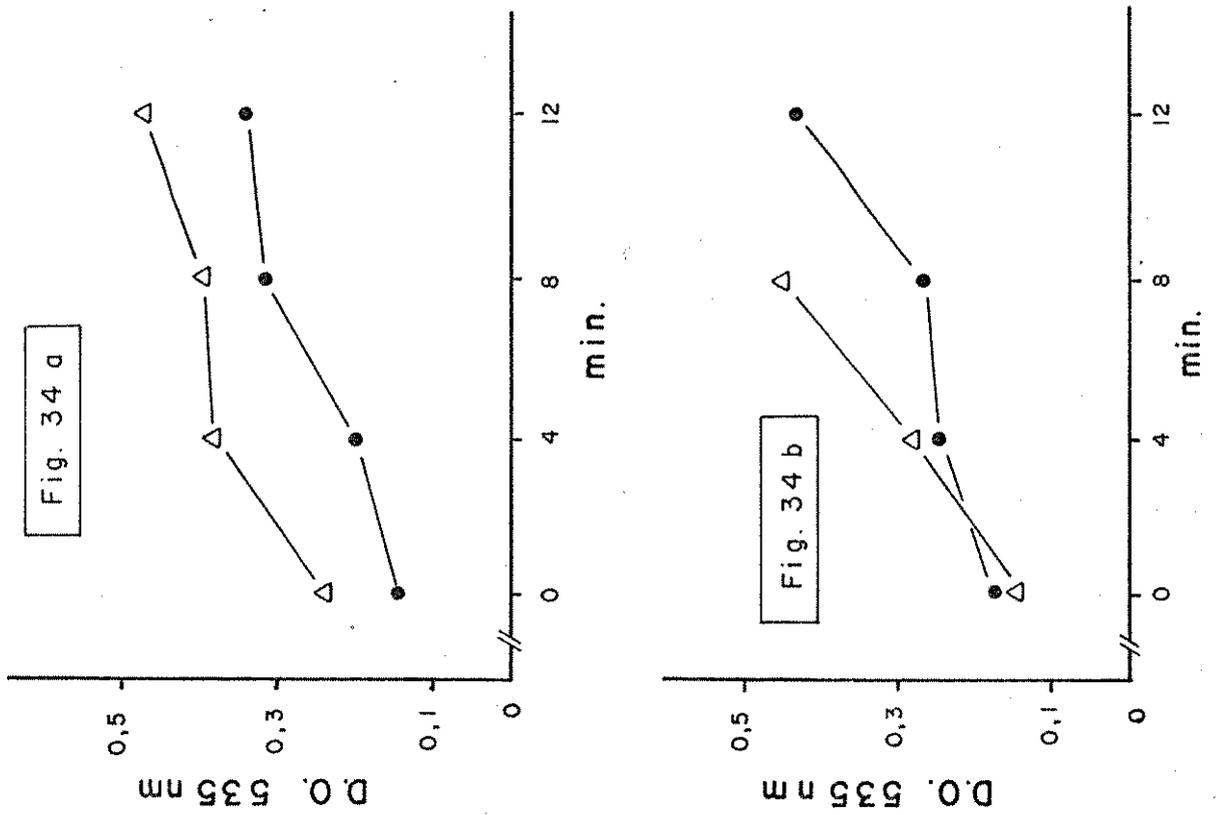
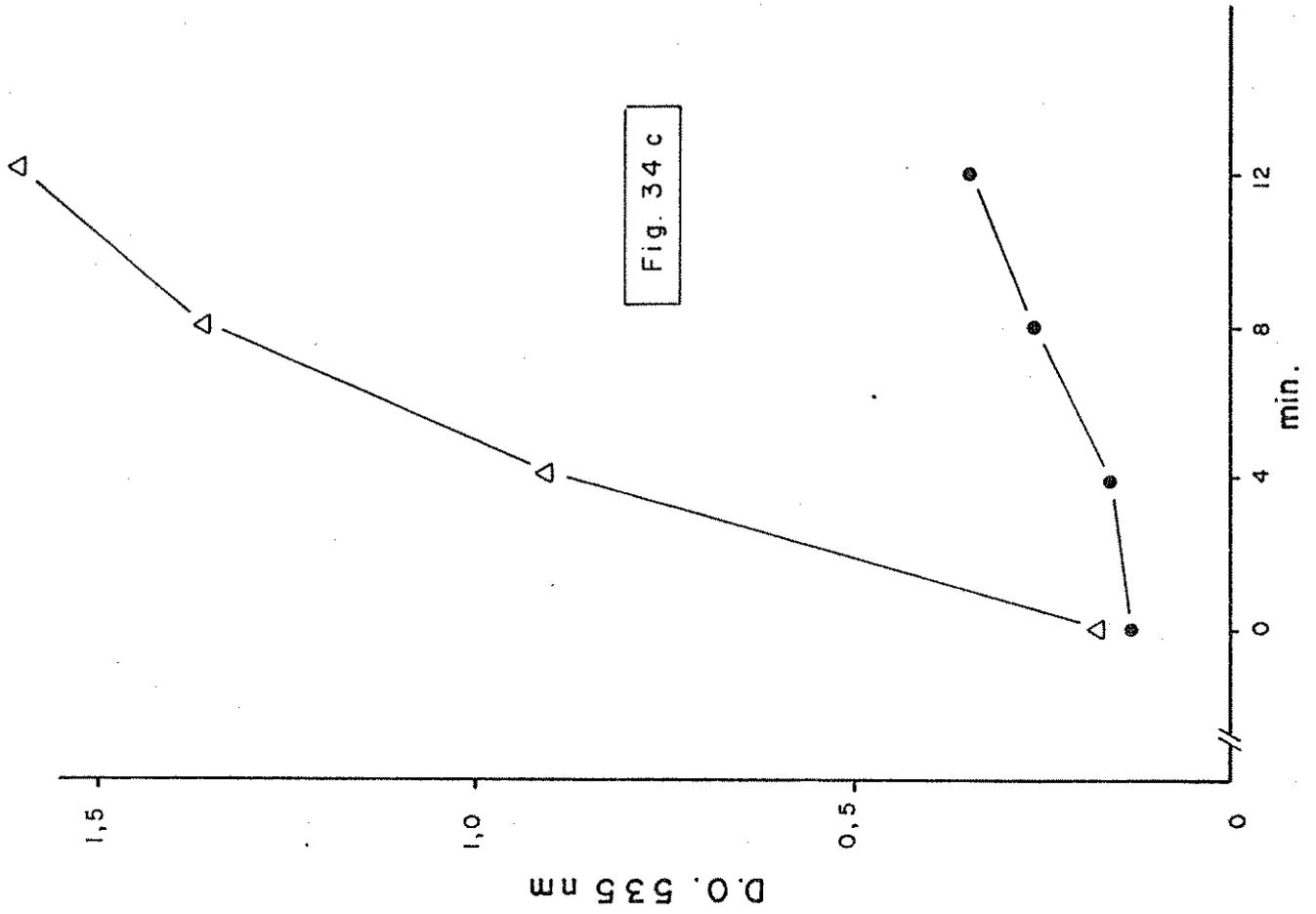


Figura 34. Atividade amilolítica (D.O. 535 nm) de endospermas de Maya normal isolados (●) ou intactos (Δ) nos dias 3 (34a), 5 (34b) e 7 (34c) de embebição durante 12 minutos de reação

Cada ponto representa a média de 5 valores



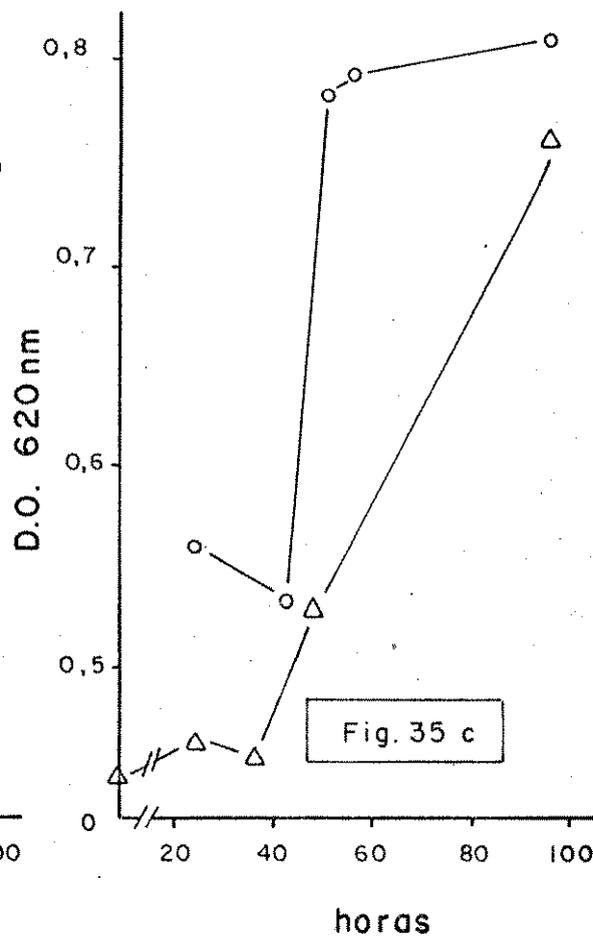
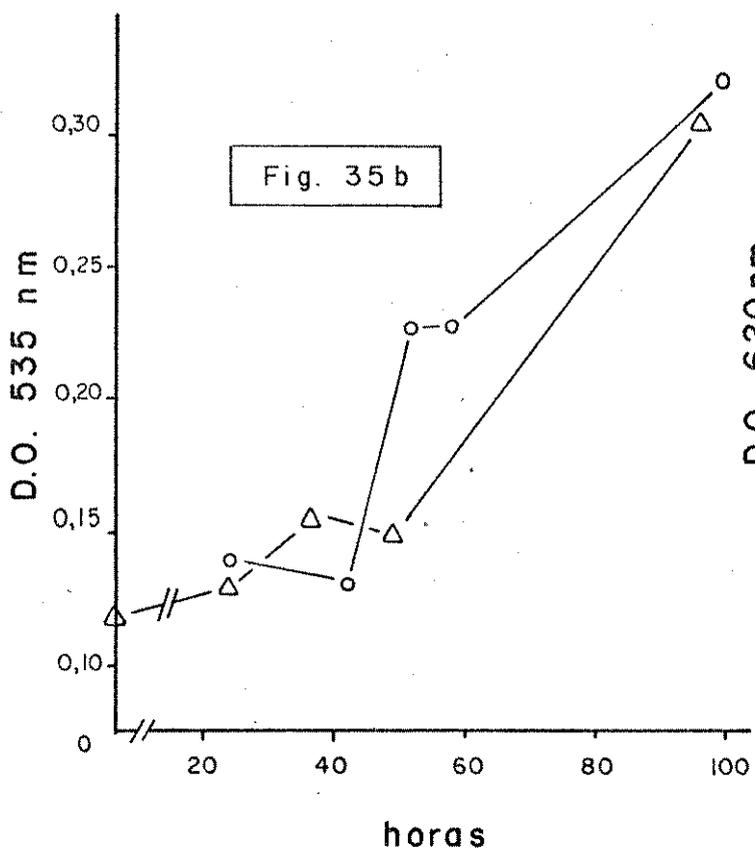
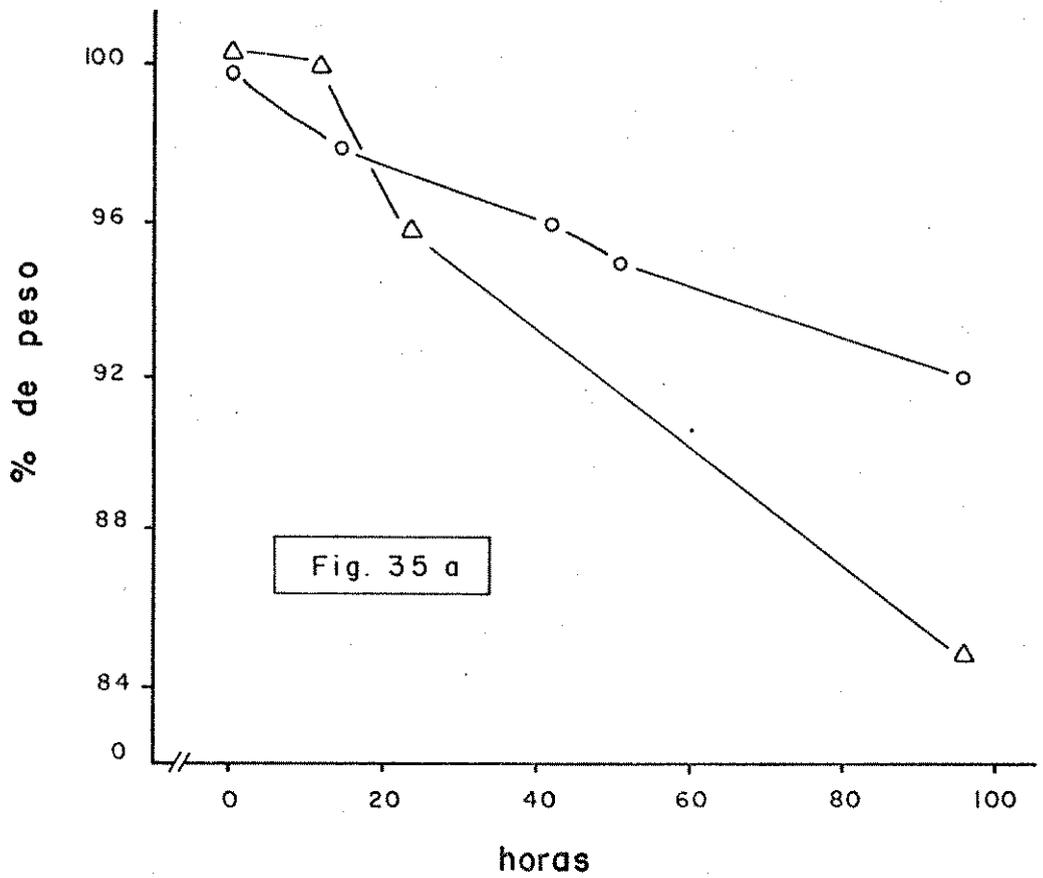
vezes maior que a observada no terceiro dia (Fig. 34 a,c) . No caso dos endospermas isolados, embora tenha sido notada atividade amilolítica, esta permaneceu baixa e a taxa de hidrólise não mudou durante o período analisado. No sétimo dia após o início da embebição as medidas da maltose liberada nos grãos intactos foram 40% maiores que nos endospermas isolados. Estes resultados tornaram possível estabelecer novamente que embora o eixo não seja absolutamente necessário para o início da atividade amilolítica ele tem papel importante no desenvolvimento desta atividade. O fato da inclinação (b) das retas que representam a atividade amilolítica em grãos intactos ter mudado em relação a dos endospermas isolados, ficando muito maior nas etapas finais do experimento, sugeriu que a presença contínua do eixo foi necessária para que o máximo de hidrólise do amido fosse atingido. Estes fatos sugerem que um fator proveniente do eixo estimularia a atividade hidrolítica e que talvez a presença contínua do eixo fosse necessária para manter esta atividade.

Esta hipótese foi testada num segundo tipo de experimento, onde o eixo foi removido do endosperma em diferentes etapas do desenvolvimento e a atividade amilolítica e proteolítica foi analisada após o quarto dia de embebição . Resultados de dois experimentos são mostrados na Fig. 35 (a,b,c). Em relação ao peso fresco do endosperma (Fig.35a) notou-se em ambos os experimentos que este foi menor em endospermas que permaneceram mais tempo na presença do eixo , sugerindo maior taxa de hidrólise e consumo dos produtos das reservas. Em todos os tratamentos, tanto para amilases co-

Figura 35. Porcentagem do peso de endosperma de Maya normal, cujos eixos foram removidos após diferentes tempos de embebição em relação ao isolado antes do início da embebição (35a) em 2 experimentos - experimento 1 (o); experimento 2 (Δ)

Mudanças na atividade amilolítica (D.O. 535 nm) (35b) e proteolítica (D.O. 620 nm) (35c) de endospermas de milho Maya normal cujos eixos foram removidos após diferentes tempos de embebição em 2 experimentos (experimento 1 (o); experimento 2 (Δ))

Cada ponto representa a média de 5 valores



mo para proteases, foi observada atividade enzimática no endosperma independentemente da etapa do desenvolvimento em que o eixo foi removido, estabelecendo novamente que ele não é absolutamente necessário para iniciar a atividade hidrolítica. Em ambos os experimentos como para ambas as enzimas, a remoção do eixo antes de cerca de 40 horas de embebição teve pouco efeito na atividade enzimática (Fig. 35 b,c). Talvez pode-se dizer que para as amilases, no segundo experimento onde mais pontos foram analisados neste período de 40 horas, houve um pequeno aumento de atividade em endospermas nos quais o eixo permaneceu mais tempo. Entretanto, este aumento foi insignificante comparado com os aumentos observados quando o eixo foi retirado após cerca de 40 horas. O aumento na atividade amilolítica e proteolítica foi muito nítido. Assim, para as amilases, no primeiro experimento uma diferença de somente 8 horas na presença do embrião (entre 43 e 51 horas) quase que dobrou a atividade amilolítica e no caso das proteases significativamente, no mesmo intervalo, a atividade também aumentou marcadamente. Isto tornou possível estabelecer que ao redor de 40 horas após a embebição um fator que estimula hidrólise proveio do eixo. A hipótese sugerida anteriormente, de que a presença contínua do eixo seria essencial para o desenvolvimento da atividade hidrolítica máxima, foi aqui comprovada, quando, analisando-se endospermas com o mesmo tempo de embebição se observou que a atividade foi maior nos que permaneceram mais tempo na presença do eixo.

Tendo estabelecido que o eixo tem papel importante na atividade hidrolítica e que parece haver um fator, que

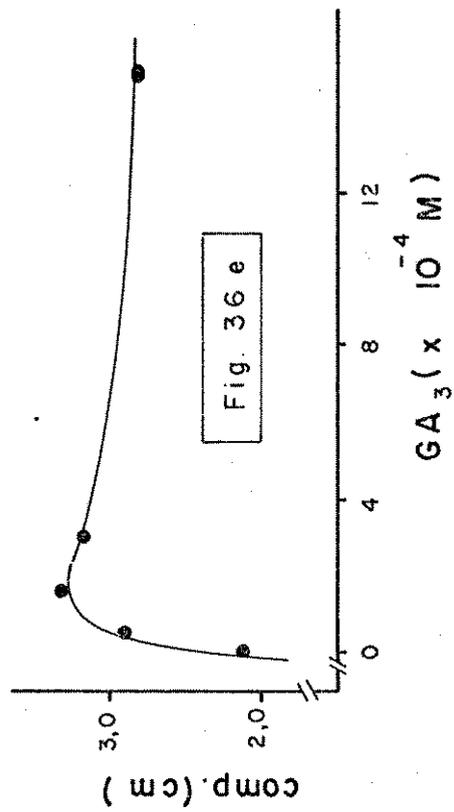
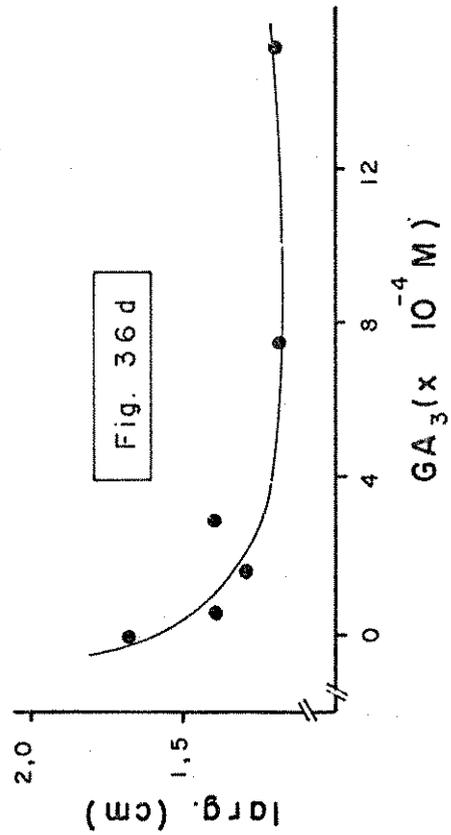
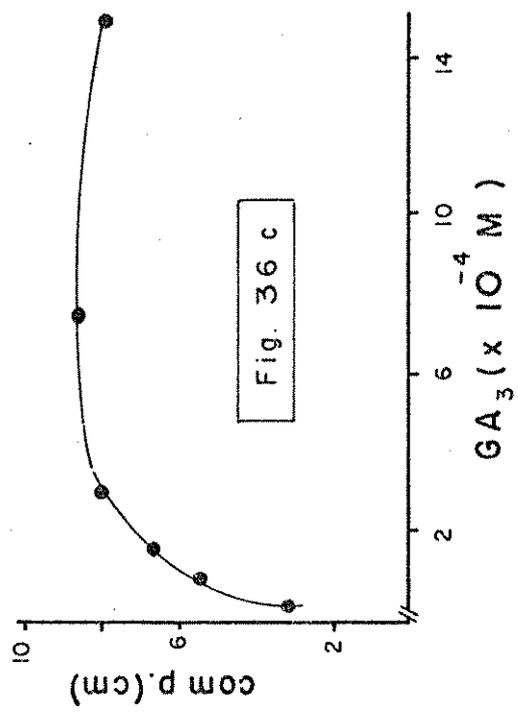
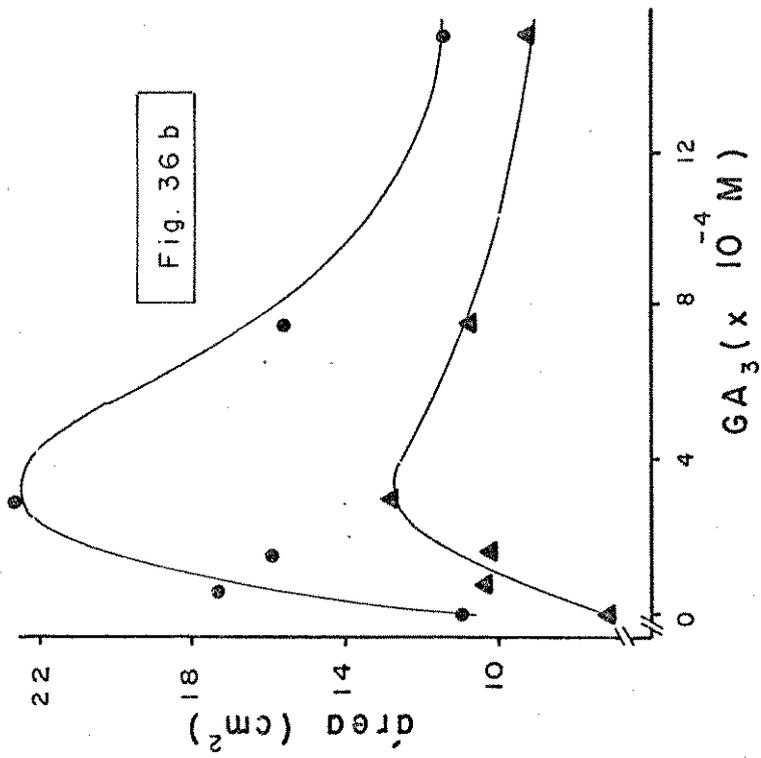
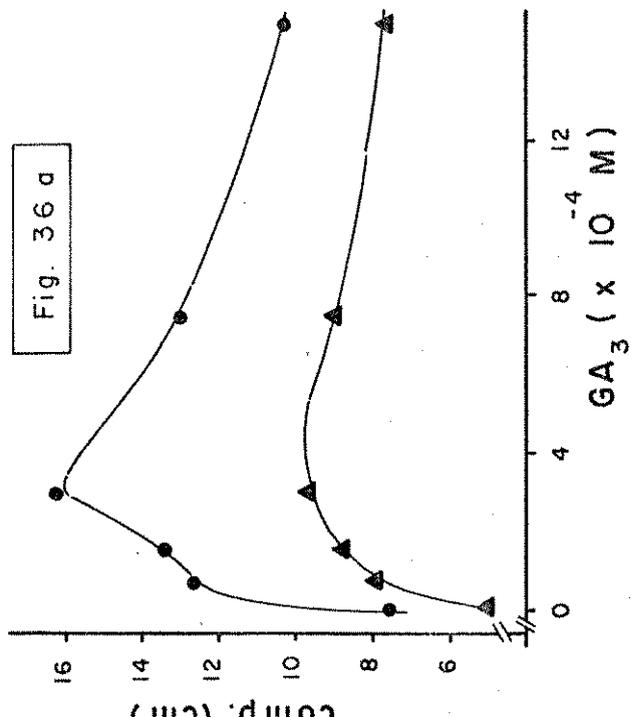
é produzido por ele após cerca de 40 horas, que estimula esta atividade, foi interessante verificar os efeitos do ácido giberélico (GA_3) e citocinina (6BA) neste aspecto, desde que estes hormônios (*) são importantes no controle da síntese, liberação e ativação destas enzimas. Em experimentos preliminares foi necessário primeiramente determinar se estes hormônios têm algum efeito sobre o crescimento inicial da plântula e através destes estudos selecionar a concentração ideal para a obtenção do efeito máximo. Assim, os efeitos de diferentes concentrações de GA_3 (25-500 ppm que correspondem a $0,75 - 15 \times 10^{-4} M$) fornecidas durante 48 horas de embebição foram testados sobre o peso seco e morfologia dos órgãos de plântulas de milho com 13 dias de idade. Em relação à morfologia da plântula os efeitos do GA_3 foram marcantes, em geral produzindo uma plântula mais alta devido a alongamento da parte aérea, tanto da lâmina foliar (Fig. 36 a,b) como da bainha (Fig. 36c). Assim, a lâmina foliar teve seu comprimento aumentado tanto na primeira como segunda folhas, de tal maneira que em plântulas tratadas com GA_3 a $3 \times 10^{-4} M$ (100 ppm) foi observado o efeito máximo e em termos absolutos o comprimento foi dobrado. A área foliar também aumentou e este aumento foi totalmente atribuído ao aumento em comprimento, desde que a largura das folhas (Fig. 36d) diminuiu e nas concentrações mais altas esta diminuição foi de cerca de 30%; assim as folhas de plântulas tratadas com GA_3

(*) O termo "hormônio" foi utilizado por ser mais conveniente mas a citocinina utilizada, 6BA, por ser sintética é denominada "regulador" de crescimento.

Figura 36. Efeitos de diferentes concentrações de GA_3 fornecidas durante as primeiras 48 horas de embebição em plântulas de milho Maya normal com 13 dias de idade, no:

- comprimento (comp.) (36a) e área (36b) da primeira (Δ) e segunda (\ominus) lâminas foliares
- comprimento do coleoptile (36c) e da bainha foliar (36e)
- largura (larg.) das folhas (36d)

Cada ponto representa a média de 7 valores



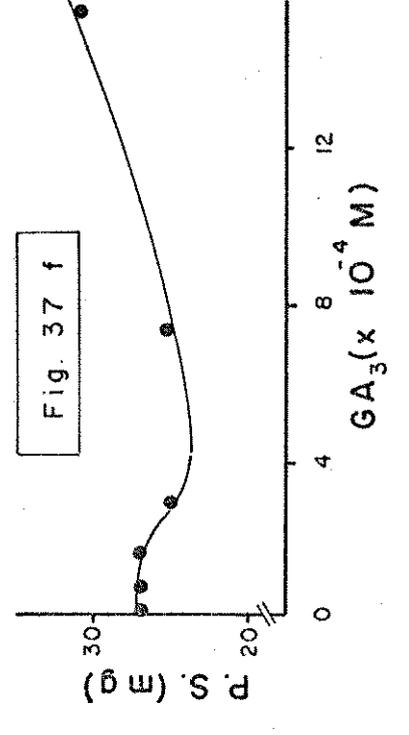
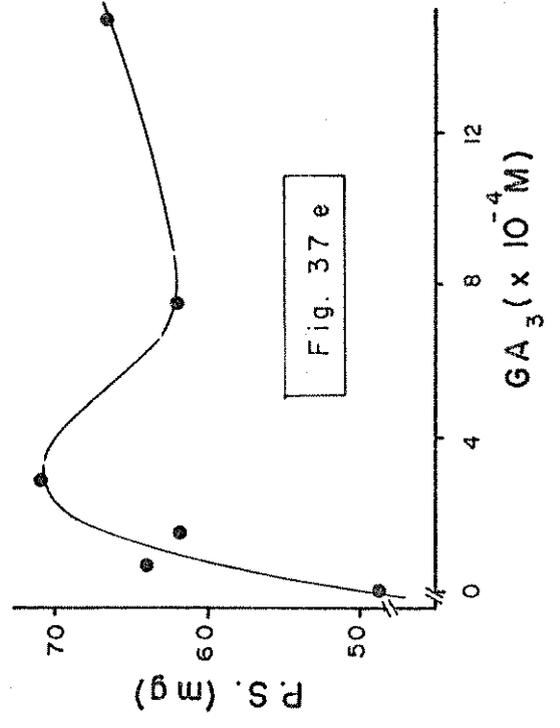
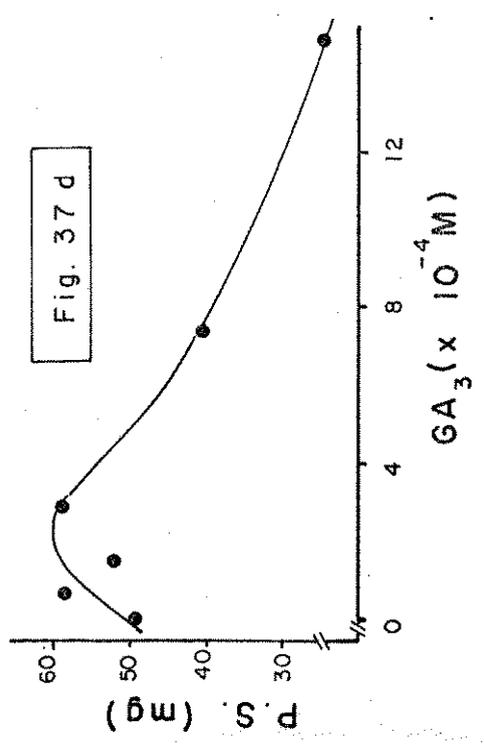
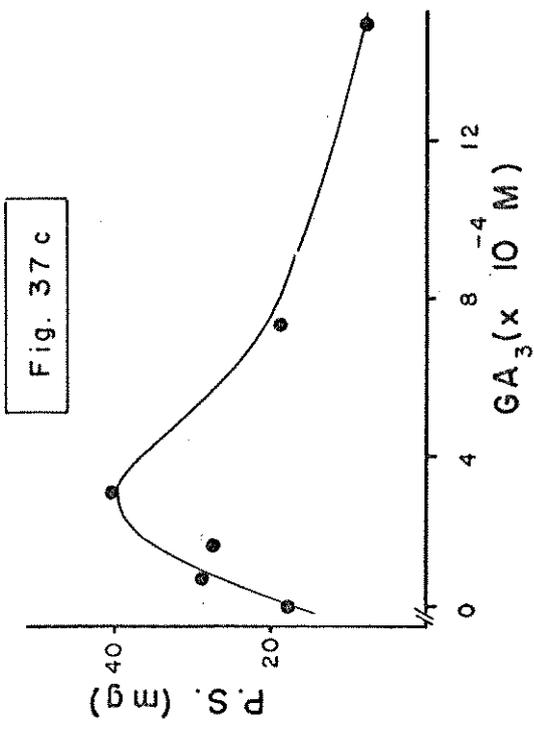
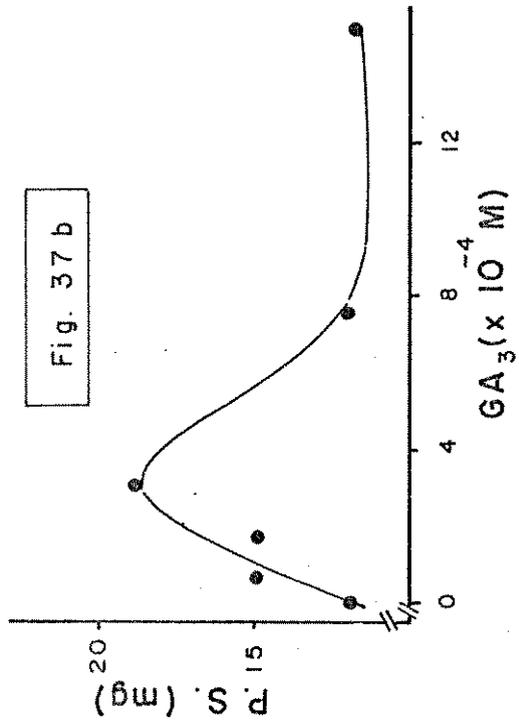
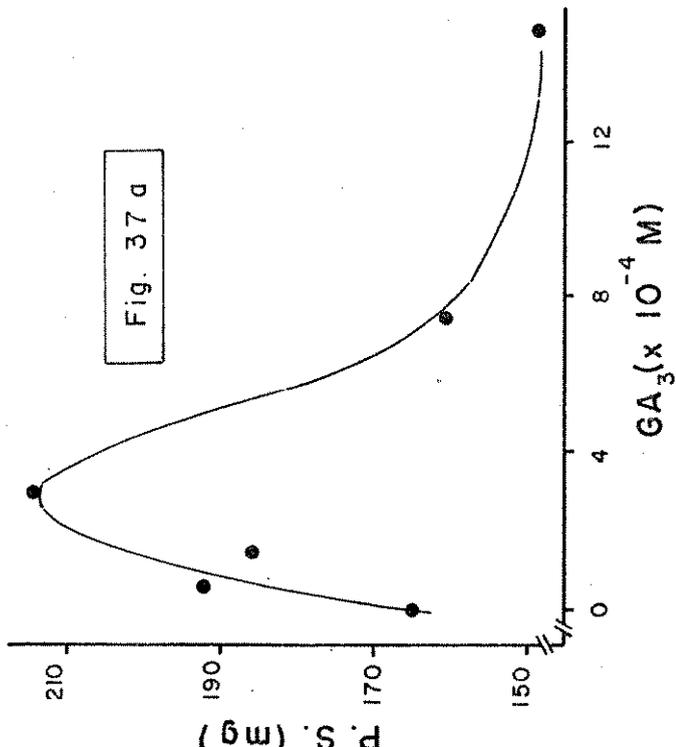
ficaram mais estreitas e compridas. A lâmina foliar foi o órgão mais sensível ao GA₃, não somente porque mostrou respostas maiores na concentração ótima mas também concentrações acima desta diminuíram este efeito, embora na concentração mais alta a lâmina foliar ainda permaneceu mais alongada do que no controle. A bainha foliar (Fig. 36e) e o coleoptile (Fig. 36c) também sofreram alongamento, novamente a concentração de 3×10^{-4} M mostrando a resposta ótima. No caso da bainha foliar, este aumento no comprimento foi de 150% e para o coleoptile foi de 60%. Entretanto, em ambos os casos concentrações mais altas não diminuíram esta resposta.

O peso seco total e dos vários órgãos da plântula em diferentes concentrações de GA₃ são mostrados na Fig. 37. Notou-se um aumento no peso total (Fig. 37a) de 90% na concentração de 3×10^{-4} M em relação ao controle, mas em concentrações mais altas que esta houve uma diminuição do peso, sendo um reflexo da diminuição em tamanho das folhas (Fig. 36 a,b). Este fato foi confirmado pela análise do peso seco das folhas (Fig. 37 b,c) onde novamente observou-se um pico na concentração de 3×10^{-4} M, mas acima desta concentração houve uma pequena inibição em relação ao controle. A raiz foi ainda mais sensível a altas concentrações de GA₃ (Fig. 37d), mostrando somente 50% do peso da do controle; entretanto a concentração de 3×10^{-4} M provocou uma pequena promoção neste órgão. Novamente, observou-se uma promoção em termos de peso na bainha, em concentrações crescentes de GA₃ (Fig. 37c) até 3×10^{-4} M e acima desta houve diminuição do peso desta parte da plântula. Os e-

Figura 37. Efeitos de diferentes concentrações de GA_3 fornecidas durante as primeiras 48 horas de embebição em plântulas de milho Maya normal com 13 dias de idade no:

- peso seco (P.S.) total (37a)
- peso seco da primeira (37b), segunda e terceira folhas (37c)
- peso seco da raiz (37d), da bainha (incluindo o escutelo) (37e) e do endosperma (37f)

Cada ponto representa a média de 7 valores



feitos no peso seco do endosperma das diferentes concentrações de GA_3 utilizadas não foram significativos, com exceção da concentração mais alta, $15 \times 10^{-4}M$ (500 ppm), onde este órgão teve um peso seco um pouco maior, talvez devido à inibição provocada no crescimento do eixo, que não utilizou normalmente as reservas. Em todas as concentrações de GA_3 testadas, notou-se efeitos tanto morfológicos como no peso das diferentes partes da plântula. Estes efeitos não foram gerais para cada órgão, assim, por exemplo na concentração de $7,5 \times 10^{-4}M$ (250 ppm) pôde-se notar um efeito inibidor no peso da raiz, nenhum no peso do endosperma e um aumento no da bainha, uma diminuição na largura das folhas, mas ao mesmo tempo aumentando a área destas. Entretanto, a concentração de $3 \times 10^{-4}M$ mostrou efeitos promotores e máximos em quase todos os parâmetros estudados e assim foi escolhida para os próximos estudos.

Como parece que folhas de plântulas tratadas com GA_3 se apresentaram mais amareladas, talvez indicando diminuição da síntese de clorofila, decidiu-se analisar o conteúdo desta e de proteínas na primeira lâmina foliar, de plântulas tratadas ou não com GA_3 a $3 \times 10^{-4}M$. Os resultados deste experimento são apresentados na Tabela 13. Confirmando o que já havia sido observado anteriormente, o tratamento com GA_3 aumentou em 60% a área de primeira folha em relação ao controle, aumentando também o peso fresco, desta cerca de 35% (Tab. 13, colunas 1 e 2). Entretanto, em termos absolutos o conteúdo proteico diminuiu 25% em relação ao controle (coluna 3). Também, em termos relativos, devido à maior área e peso da folha, as diferenças no conteúdo proteico, entre folhas de plântulas tratadas ou não com GA_3 ,

TABELA 13

Efeito do GA₃ no conteúdo proteico e de clorofila na primeira lâmina foliar. Cada valor representa a média de 5 medidas

	1	2	3	4	5	6	7	8
Parâmetro	Área (cm ²)	Peso fresco (mg)	Proteína (µg)	Clorofila (µg)	Prot/área (µg.cm ²)	Prot/peso (µg.mg ⁻¹)	Clor/área (µg.cm ⁻¹)	Clor/peso (µg.mg ⁻¹)
Tratamento								
Controle	7,2	94,2	508	100	84,0	6,45	13,9	1,06
GA ₃	11,4	127,2	452	120	39,6	3,55	10,5	0,94

foram maiores (colunas 5 e 6). Embora tenha sido notado, em termos absolutos, um pequeno aumento no conteúdo de clorofila de folhas de plântulas tratadas com GA_3 (coluna 4), em termos relativos (colunas 7 e 8) a clorofila foi mais concentrada em folhas de plântulas não tratadas, especialmente em termos de área devido ao seu menor tamanho (coluna 7) corroborando com a observação feita anteriormente, que folhas de plântulas tratadas com GA_3 eram mais claras que as não tratadas.

Os efeitos de uma citocinina sintética, a 6-benzil-adenina (6BA) sobre o crescimento inicial do milho, também foram testados. Em plântulas tratadas com 6BA, em concentrações maiores que $10^{-6}M$, as folhas não se expandiram e ficaram enrugadas. Também, nestas concentrações, observou-se uma diminuição no número de raízes, que se apresentaram mais grossas, e um alongamento no eixo, principalmente na região do mesocótilo. Os resultados para este experimento são apresentados na Figura 38 (a-d). A concentração de 6BA que promoveu um aumento na área foliar (Fig. 38c) foi a de $10^{-7}M$, através tanto do alargamento das folhas 1 e 2 (Fig. 38a) como no alongamento destas (Fig. 38b). Entretanto, em plântulas submetidas a concentrações dez vezes maiores ($10^{-6}M$) notou-se uma inibição destes parâmetros. Foi observada uma diminuição no peso seco da raiz e parte aérea em todos os tratamentos sendo este efeito maior na raiz. O contrário foi observado para o endosperma que teve o peso seco aumentado em concentrações crescentes de 6BA sugerindo possível diminuição na degradação das reservas. Já que concentrações de 6BA maiores que $10^{-7}M$ interferiram com o cres-

Figura 38. Efeitos de diferentes concentrações de 6BA, fornecidas durante as primeiras 48 horas de embebição, em plântulas de milho Maya normal com 8 dias de idade:

- na largura (larg.) (38a), comprimento (comp.) (38b) e área (38c) das primeira (●) e segunda (△) lâminas foliares
- nos pesos secos (P.S.) (38d) do endosperma(o), parte aérea (●) e raiz (△)

Cada ponto representa a média de 7 valores

Fig. 38 b

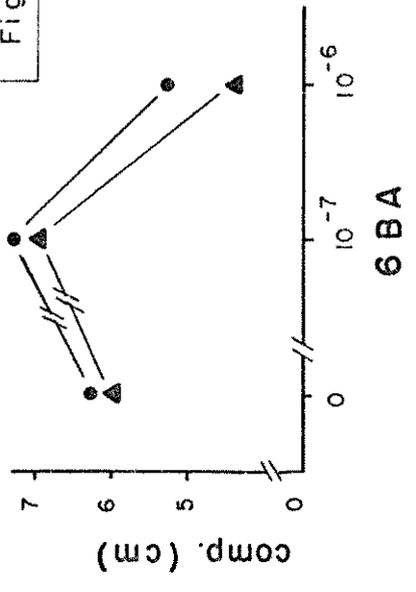


Fig. 38 a

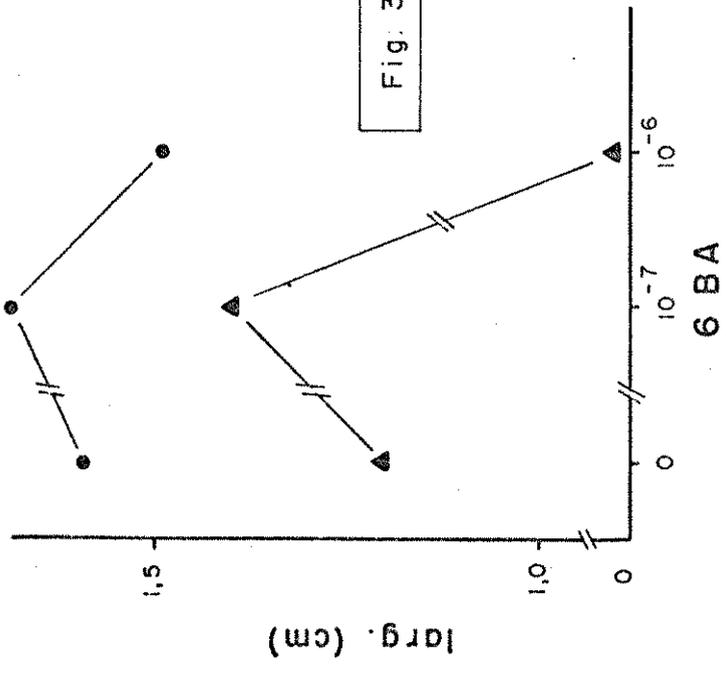


Fig. 38 d

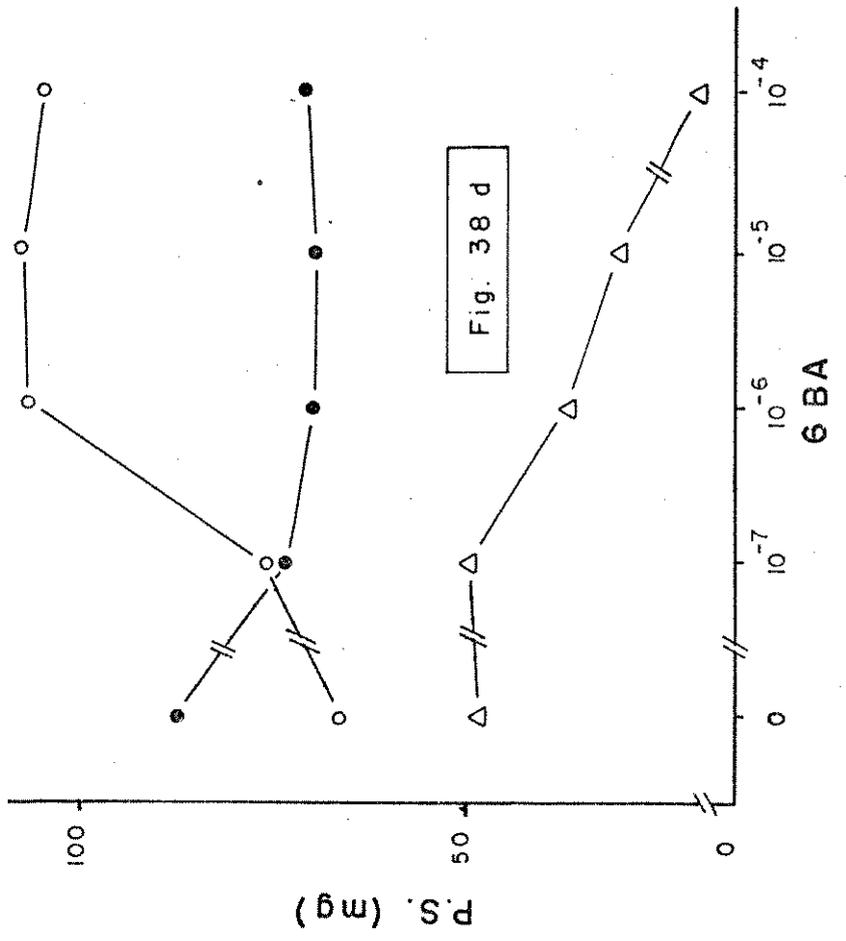
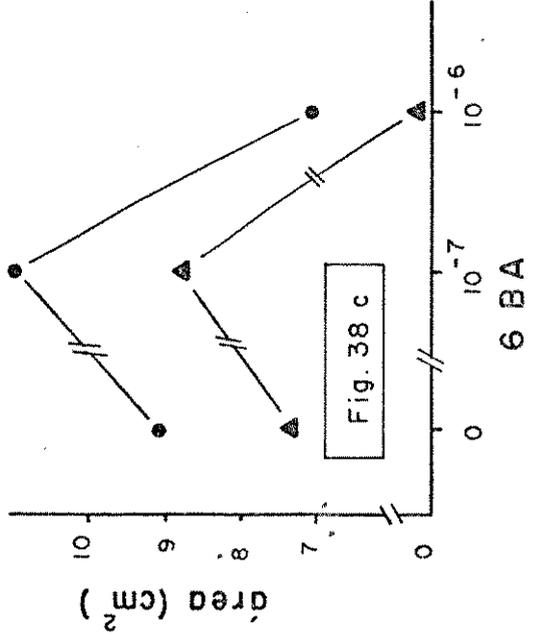


Fig. 38 c



cimento normal da plântula e nesta concentração alguns efeitos morfológicos foram observados, em experimentos subsequentes usou-se sempre 10^{-7} M de 6BA.

Estes experimentos preliminares mostraram que, tanto o GA_3 como o 6BA, tiveram efeito no crescimento inicial da plântula e assim passou-se a analisar o efeito destes hormônios sobre a atividade amilolítica e proteolítica no endosperma. Assim, vários ensaios analisando a atividade amilolítica e proteolítica em endospermas de plântulas em etapas diferentes de desenvolvimento foram realizados. Após terem sido feitos cinco ensaios nos quais se mediu a atividade hidrolítica de endospermas de plântulas tratadas ou não com GA_3 a 3×10^{-4} M, concluiu-se que no geral este tratamento não teve efeito marcante sobre a atividade destas enzimas. Um exemplo ilustrando resultados típicos desta série de experimentos em endospermas de plântulas com 2, 4 e 6 dias de idade é mostrado na Fig. 39 (a,b,c,d). Embora tenha sido notado que a atividade foi baixa no segundo dia e aumentou rapidamente no quarto dia de crescimento, como já havia sido observado anteriormente (Fig. 28a), não se notou efeitos promotores ou inibidores do GA_3 sobre as amilases em comparação com plântulas não tratadas. Também, até o sexto dia de crescimento este hormônio não teve efeito sobre o crescimento do eixo ou na degradação da matéria seca do endosperma (Fig. 39d), sugerindo que os efeitos notados anteriormente sobre o desenvolvimento da plântula só se manifestam mais tarde. Os mesmos resultados foram observados para a atividade proteolítica (Fig. 40 a,b,c). O desenvolvimento da atividade foi maior entre o terceiro e quarto dia

Figura 39. Atividade amilolítica (D.O. 535 nm) de endospermas de milho Maya normal tratados (—) ou não (--) com GA_3 durante as primeiras 48 horas de embebição nos dias 2 (39a), 4 (39b) e 6 (39c) de crescimento

Cada reta representa a atividade, durante 18 minutos, do endosperma de uma plântula individual

Mudanças no peso fresco do eixo e endosperma (end.) de plântulas tratadas (—) ou não (--) com GA_3 nos primeiros seis dias de crescimento

Cada ponto representa a média de 6 valores (39d)

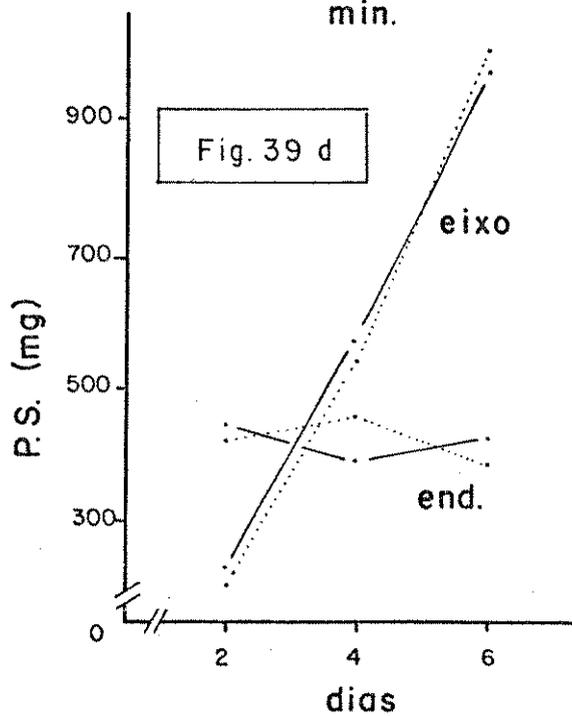
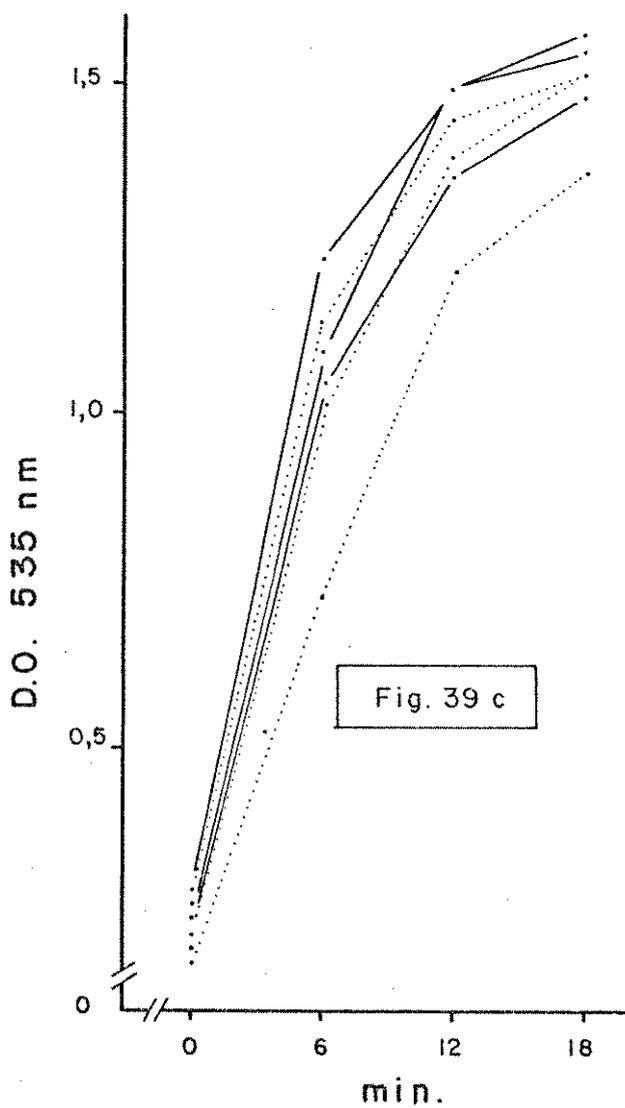
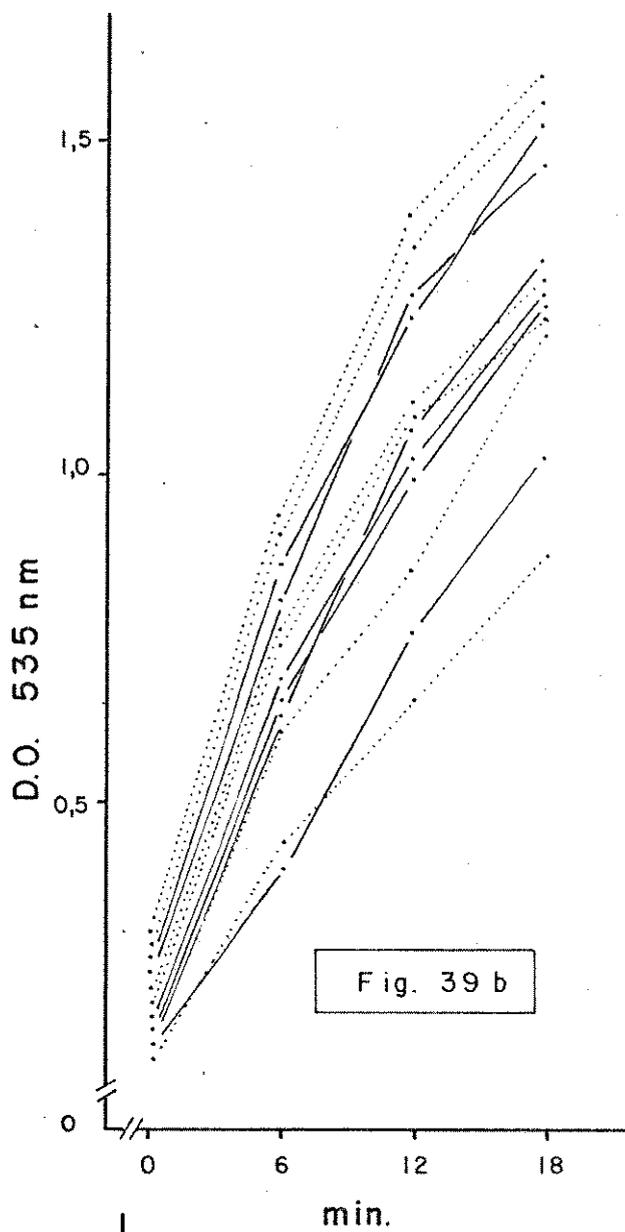
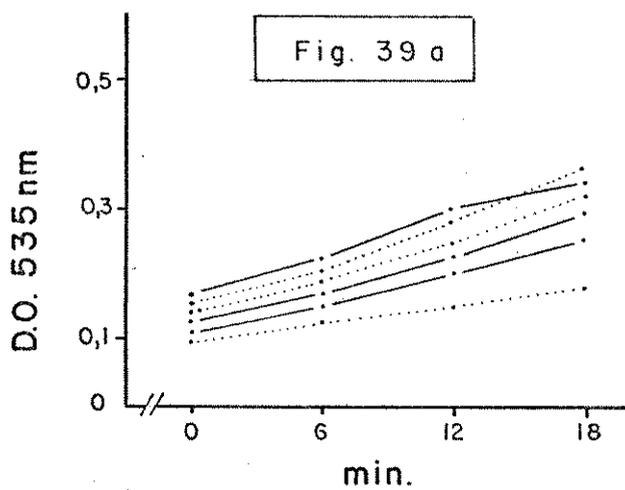
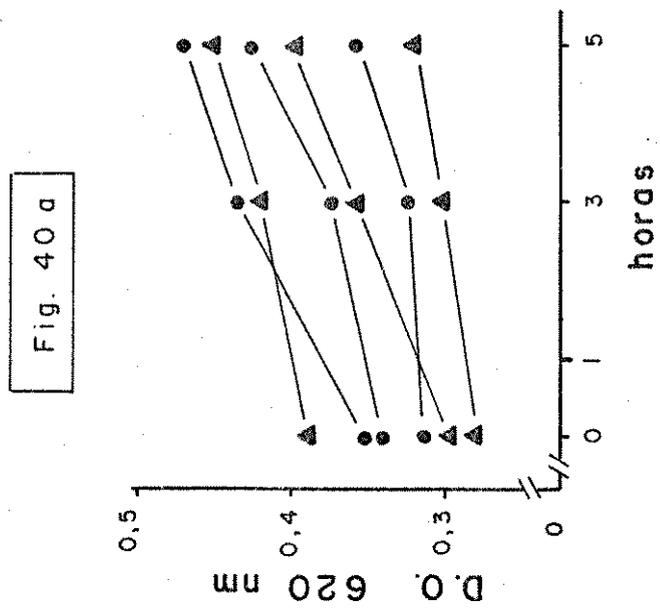
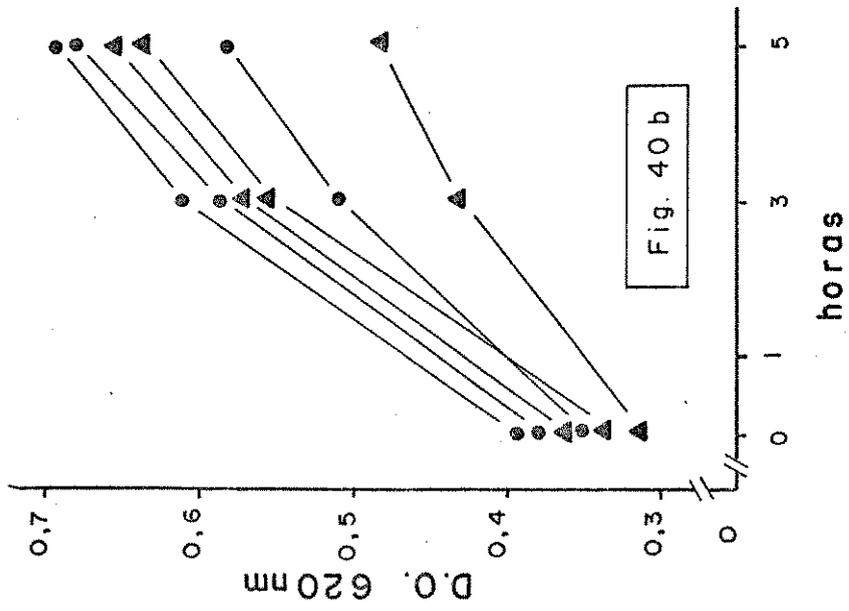
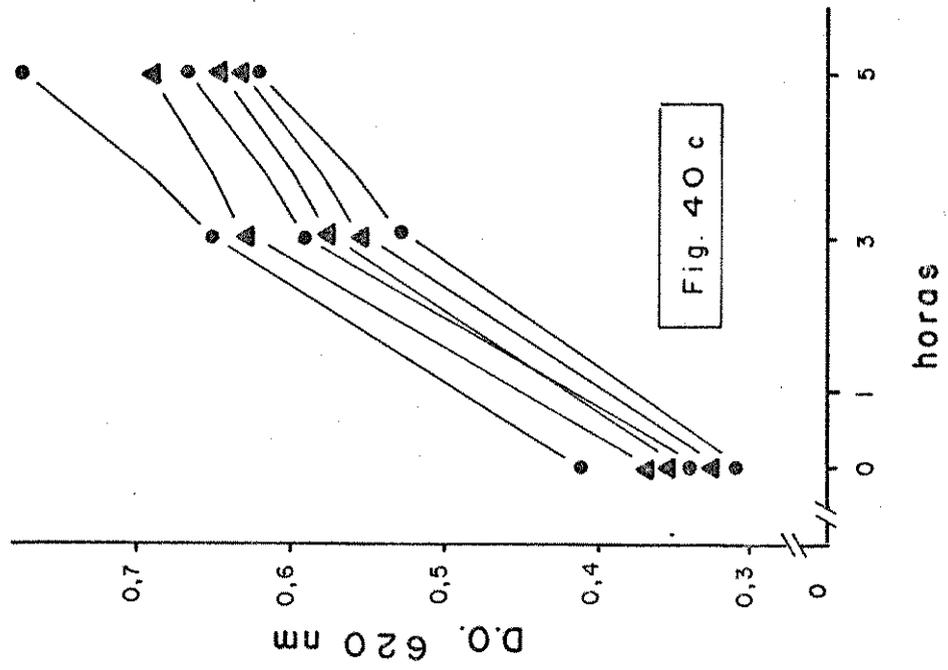


Figura 40. Atividade proteolítica (D.O. 620 nm) de endospermas individuais de plântulas de milho Maya normal, submetidas ao tratamento com GA₃ (●) ou não (▲), com 3 (40a), 4 (40b) e 6 (40c) dias de idade, durante 5 horas de reação



de crescimento tornando-se constante após este período, confirmando o observado anteriormente (Fig. 27, 28b); entretanto este padrão de desenvolvimento de atividade foi independente dos tratamentos com GA_3 .

Embora, no geral tenha ficado evidente que o GA_3 não teve efeito sobre a atividade hidrolítica, observou-se, em todos os ensaios, que endospermas de plântulas individuais que apresentaram as maiores atividades foram os de plântulas tratadas com GA_3 e as mais baixas em plântulas controle; não foi entretanto, possível distinguir a atividade da maioria das plântulas, tratadas ou não com GA_3 . Em um dos ensaios preliminares, todas as plântulas mostraram atividade amilolítica maior que as não tratadas, o que sugeriu um efeito promotor real do GA_3 neste caso (Fig. 41 a,b,c). Também foi notado neste exemplo que os eixos de todas as plântulas tratadas apresentaram maior peso seco (Fig. 41d) sugerindo talvez um efeito da fonte de consumo na hidrólise da reserva. Assim, a relação entre o peso seco do eixo e a atividade amilolítica foi analisada durante várias etapas do desenvolvimento não somente neste experimento (Fig. 42a), mas também nos outros anteriores, dos quais os apresentados na Fig. 42 (b,c) são exemplos característicos, onde o GA_3 , no geral, não mostrou efeitos nem na atividade nem no crescimento do eixo. Primeiramente, notou-se que a relação entre o peso seco do eixo e a atividade amilolítica foi positiva e altamente significativa ($p < 0,001$), como já havia sido observado anteriormente na comparação entre Maya normal e Maya opaco-2. Adicionalmente, os valores (b) para as inclinações das retas obtidos pela relação entre os aumentos no peso seco do eixo e na atividade amilolítica do en-

Figura 41. Atividade amilolítica (μg de maltose liberadas) de endospermas individuais de milho Maya normal submetidos ao tratamento com GA_3 (●) ou não (▲) nos dias 4 (41a), 6 (41b) e 8 (41c) do crescimento, durante 12 minutos de reação. Aumento do peso seco (P.S.) do eixo, nos dias 4, 6 e 8 de crescimento em plântulas tratadas (●) ou não (▲) com GA_3 (41d)

Cada ponto representa a média de 3 valores

Fig. 41a

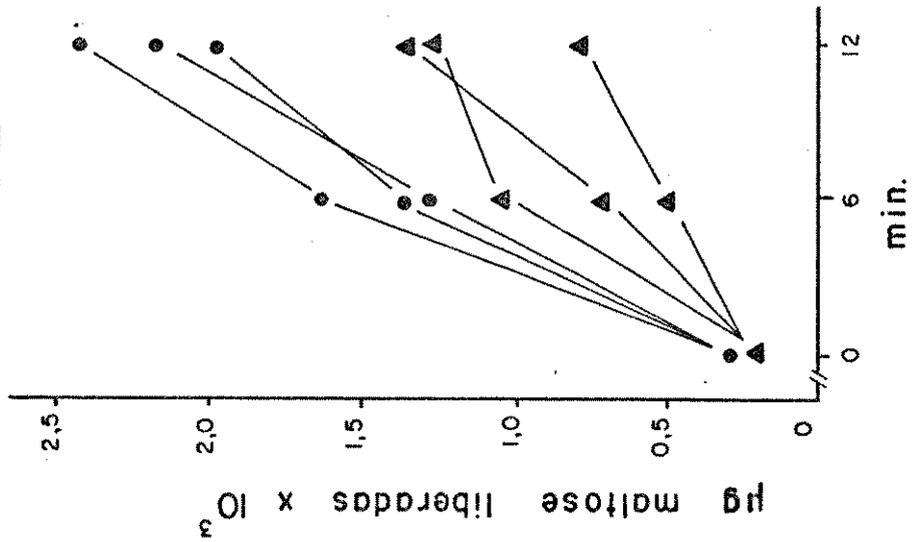


Fig. 41b

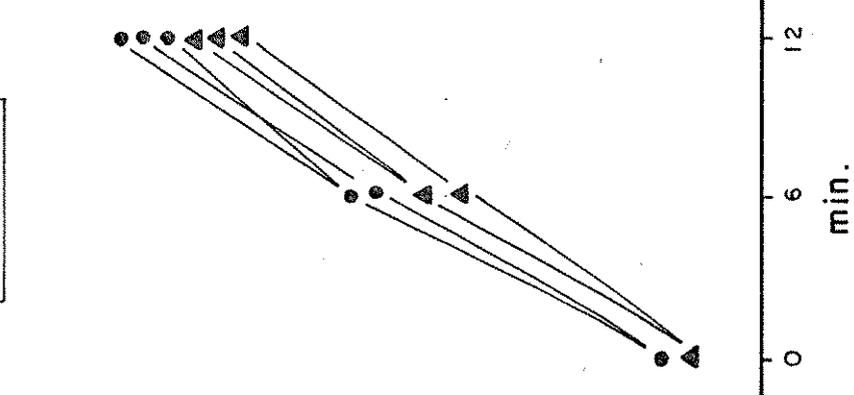


Fig. 41c

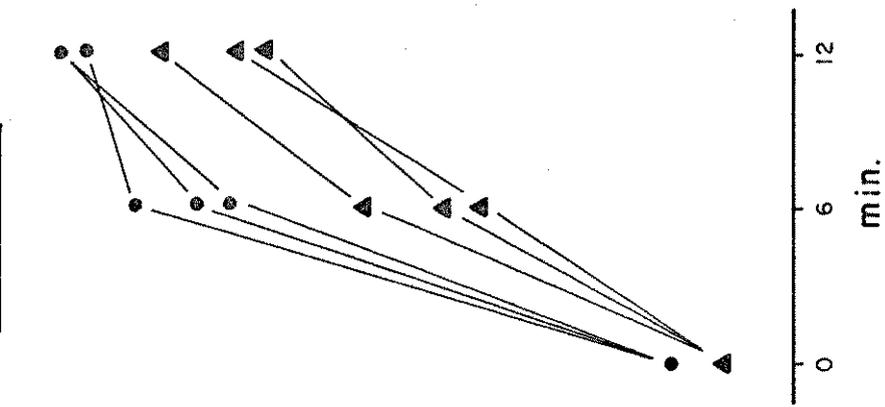


Fig. 41d

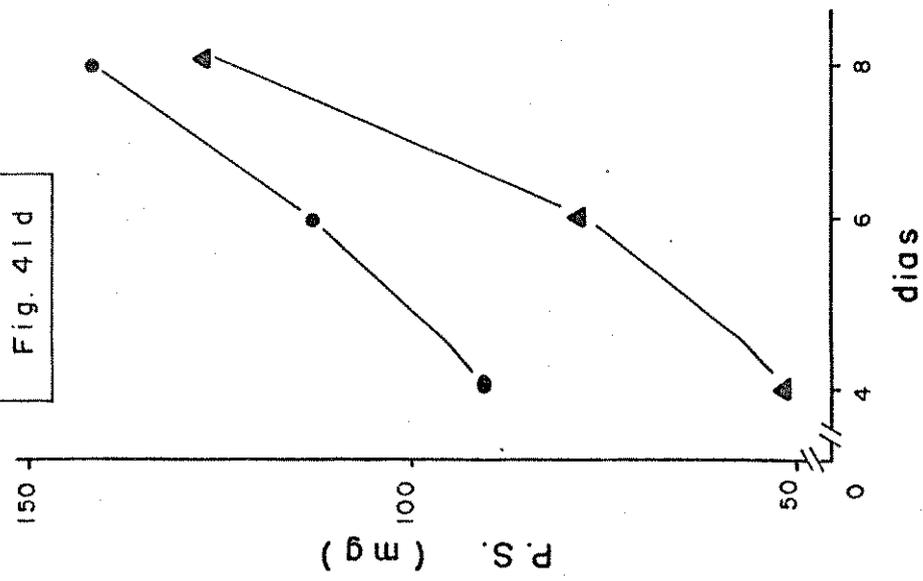
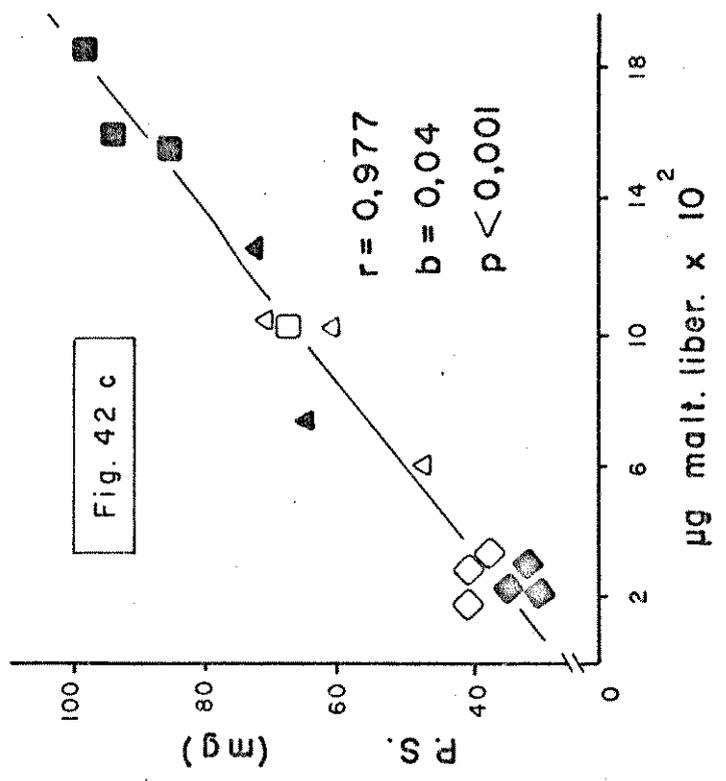
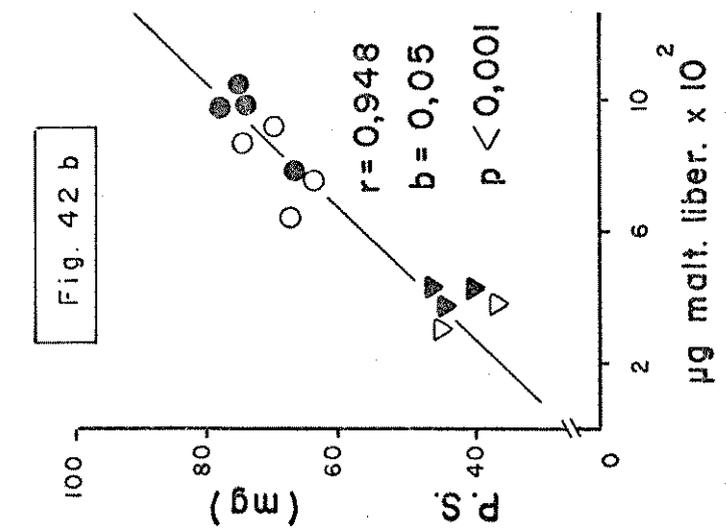
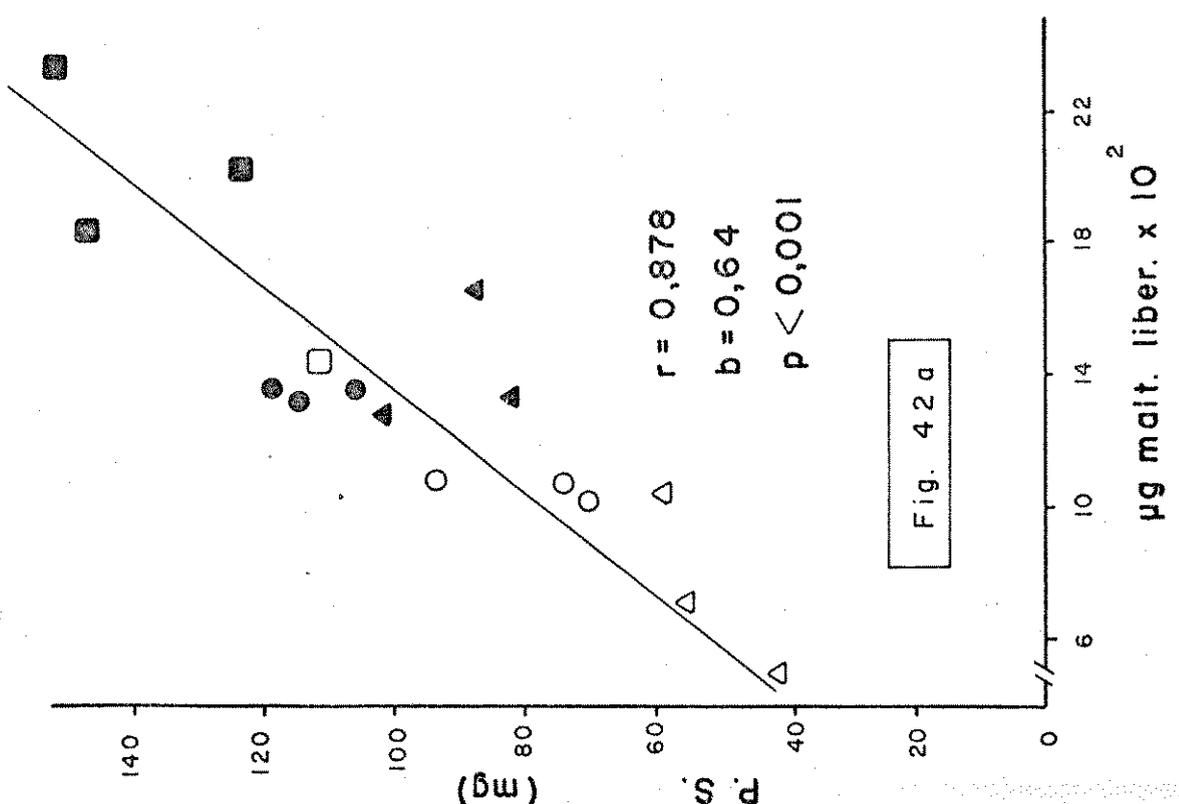


Figura 42. Relação entre o peso seco (P.S.) do eixo e atividade amilolítica (μg maltose liberadas) de endospermas individuais de plântulas de milho Maya normal com 4 (Δ), 5 (o) e 6 (\square) dias de idade (42a) ou 3 (∇) e 5 (O) dias de idade (42b) ou 2 (\diamond), 4 (\triangle) e 6 (\square) dias de idade (42c) tratadas (símbolos cheios) ou não com GA_3 (símbolos vazios)



dosperma, foram semelhantes, indicando que esta relação foi constante e é reproduzível apesar de existirem pequenas variações experimentais não controláveis, tanto nas condições de cultura como nas do ensaio. Entretanto, o efeito do GA_3 não ficou esclarecido. Assim, notou-se (Fig. 42a) que embora tivesse havido relação significativa entre atividade amilolítica, peso seco do eixo e a idade da plântula durante as três etapas (dias 4, 5 e 6) do desenvolvimento analisadas, em cada etapa, as plântulas tratadas com GA_3 mostraram invariavelmente peso seco e atividade amilolítica maiores que as plântulas não tratadas, sugerindo um efeito promotor do GA_3 . Entretanto em análises de outros experimentos (Fig. 42 b,c) o efeito promotor do GA_3 não foi observado, sendo que os valores obtidos para a relação da atividade amilolítica do endosperma com o peso seco do eixo, tanto para plântulas tratadas com GA_3 como para as não tratadas, foram distribuídas uniformemente em relação a reta de correlação dentro de cada etapa do desenvolvimento. Assim, não foi possível definir se a atividade amilolítica maior, observada tanto em plântulas tratadas como nas não tratadas com GA_3 , foi simplesmente função do crescimento do eixo, mais ativo em algumas plântulas que em outras, ou se realmente houve um efeito do GA_3 na promoção tanto no crescimento do eixo como na atividade amilolítica do endosperma ou na promoção de um destes fatores através do outro. Novamente esta relação só pôde ser analisada na fase em que a atividade amilolítica está aumentando juntamente com o peso seco do eixo. Por este motivo, a relação entre atividade proteolítica e o peso se -

co do eixo não pôde ser feita, uma vez que as análises feitas no quarto e sexto dias já representaram atividades máximas (Fig. 27c).

O fato do GA₃ não estar produzindo efeitos marcantes na atividade hidrolítica de endospermas de plântulas tratadas, talvez seja devido ao tratamento com concentrações relativamente altas deste hormônio, que produzem efeitos morfológicos em etapas mais adiantadas do crescimento, mas não afetam a atividade das enzimas hidrolíticas. Assim, três experimentos foram realizados utilizando-se concentrações menores que a de 3×10^{-4} M de GA₃ (10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M). Novamente não foi possível se observar um efeito nítido do GA₃ embora pareça que estas concentrações foram mais efetivas do que 3×10^{-4} M de GA₃ na promoção da atividade amilolítica nos casos em que esta promoção ocorreu. Na Tabela 14 (ABC) são mostrados os valores obtidos para as atividades amilolíticas de endospermas de plântulas individuais tratadas ou não com GA₃ em diferentes concentrações em três experimentos.

Para melhor visualização dos resultados, os valores de atividade amilolítica foram organizados, em cada coluna, em ordem crescente. Novamente, as mesmas tendências notadas nos tratamentos com GA₃ a 3×10^{-4} M foram aparentes. Assim, os maiores valores de atividade amilolítica encontrados foram para endospermas de plântulas tratadas com GA₃ sendo esta tendência mais marcante em concentrações de 10^{-5} M, embora os outros valores obtidos para plântulas tratadas tivessem permanecido dentro da variação dos valores encontrados para plântulas não tratadas. Confirmando as ob

TABELA 14

Atividade amilolítica (D.O. 535 nm) de edospermas de milho normal tratados ou não com GA₃ a 10⁻⁷M, 10⁻⁶M e 10⁻⁵ M em três experimentos (A, B, C)

Tratamento		Controle	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M
<u>Plantas</u>					
<u>A</u>	1	0,47	0,70	0,67	0,67
	2	0,71	0,78	0,72	0,84
	3	0,75	0,79	0,82	0,94
	4	0,77	0,81	0,89	1,04
	5	-	0,82	0,95	1,06
<u>B</u>	1	0,31	0,35	0,30	0,45
	2	0,32	0,37	0,40	0,47
	3	0,33	0,44	0,44	0,53
	4	0,34	0,47	0,49	0,53
	5	0,44	0,56	0,50	0,58
	6	0,46	0,68	0,50	0,67
<u>C</u>	1	0,26	0,28	0,35	0,27
	2	0,33	0,39	0,35	0,37
	3	0,38	0,54	0,48	0,46
	4	0,38	0,69	0,51	0,50
	5	0,42	-	0,84	0,51

servações anteriores, a relação entre peso seco do eixo e atividade amilolítica (Fig. 43) nos diferentes tratamentos com GA_3 foi fortemente significativa e positiva ($p < 0,01$). Entretanto, a análise destes dados, mostrou que os valores de atividade obtidos para plântulas não tratadas e para cada tratamento estão dispostos uniformemente em relação a reta que correlaciona peso seco e atividade. Assim não foi possível definir uma concentração de GA_3 que produzisse um efeito ótimo e novamente não foi possível dizer com certeza se a maior atividade foi um efeito direto do GA_3 na síntese, ativação ou liberação de enzimas ou indiretamente promovendo o crescimento do eixo ou uma combinação destes fatores.

Nos experimentos subsequentes, possíveis efeitos do 6BA a $10^{-7}M$ sobre a atividade hidrolítica do endosperma, foram analisados sendo também novamente acompanhados os efeitos do GA_3 ($10^{-5}M$). Na Tabela 15 são apresentados os valores de atividade amilolítica e proteolítica encontrados em endospermas de plântulas com sete dias de idade nos diferentes tratamentos. Notou-se não haver promoção ou inibição destas duas enzimas em qualquer dos tratamentos, indicando novamente que o GA_3 não teve efeito marcante sobre a atividade hidrolítica do endosperma e que talvez com o 6BA aconteça o mesmo.

Como os resultados indicaram, pareceu que possíveis efeitos destes reguladores são pequenos e variáveis e já que foi observado que a atividade hidrolítica precisa de um estímulo proveniente do eixo (Fig. 35) e que endospermas isolados apresentam atividade amilolítica baixa (Fig. 34) foi decidido testar o efeito do 6BA e do GA_3 separados

Figura 43. Correlação entre o peso seco (P.S.) do eixo e atividade amilolítica (D.O. 535 nm) de endospermas individuais de milho Maya normal de plântulas com 9 (43a) e 6 (43b) dias de idade tratadas com GA₃ a 10⁻⁵M (●), 10⁻⁶M (△), 10⁻⁷M (△) ou não (○) durante as primeiras 48 horas de embebição

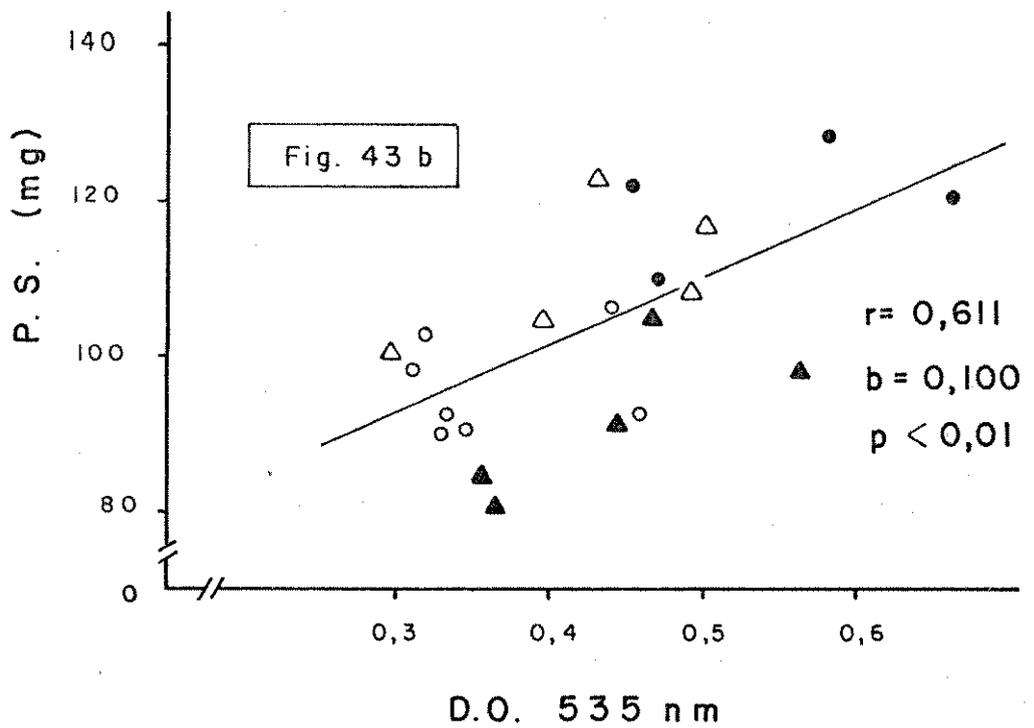
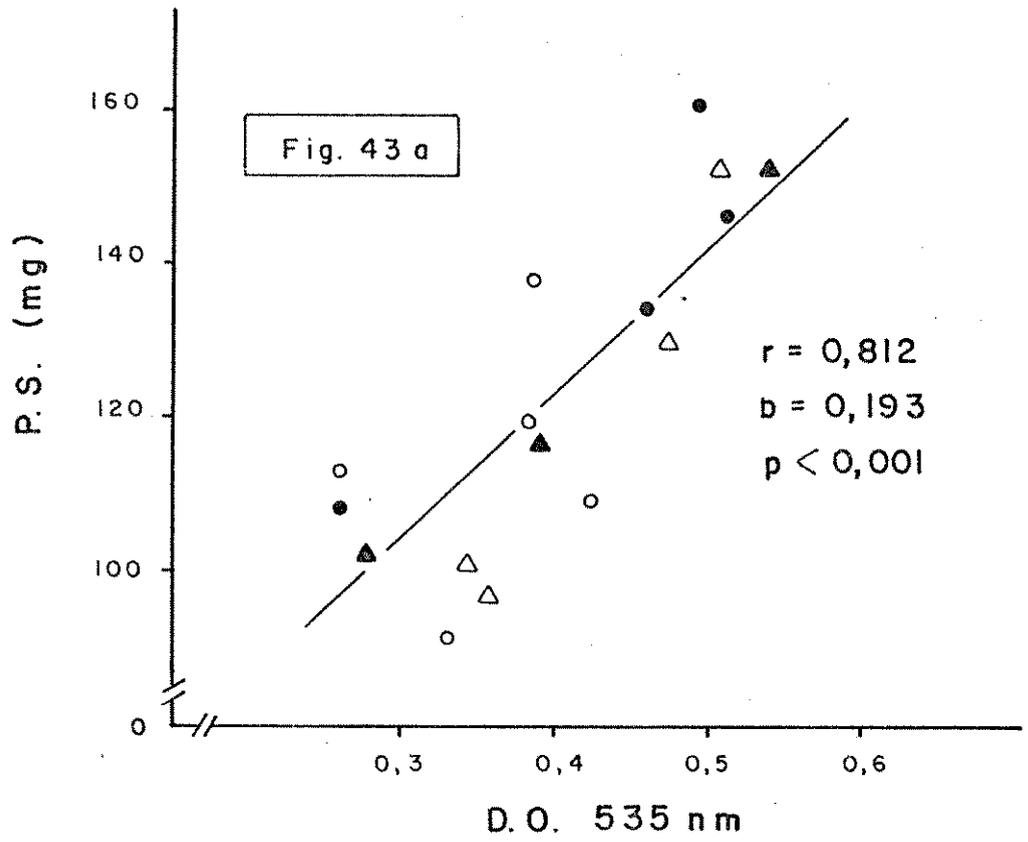


TABELA 15

Atividade amilolítica (D.O. 535 nm) após 6 minutos de reação (A) e proteolítica (D.O. 620 nm) após 3 horas de reação (B) de endospermas de plântulas de milho normal com 7 dias de idade tratadas ou não com GA_3 ($10^{-5}M$) e 6BA ($10^{-7}M$)

		Tratamento		
Plantas		Controle	GA_3	6BA
A	1	0,38	0,23	0,29
	2	0,25	0,27	0,26
	3	0,28	0,31	0,38
	4	0,26	0,30	0,30
	5	0,30	0,24	0,27
	6	0,22	0,27	0,31
\bar{X}	(média)	0,28	0,27	0,28

		Tratamento		
Plantas		Controle	GA_3	6BA
B	1	0,64	0,48	0,50
	2	0,53	0,53	0,49
	3	0,64	0,63	0,52
	4	0,51	0,66	0,64
	5	0,62	0,49	0,67
	6	0,42	0,59	-
\bar{X}	(média)	0,56	0,56	0,56

ou juntos em endospermas isolados para melhor detectar pequenas mudanças na atividade hidrolítica. Assim, as atividades amilolítica e proteolítica de endospermas isolados ou intactos tratados ou não com GA_3 e 6BA foram analisadas após sete dias de embebição. Os resultados obtidos nas medidas da atividade amilolítica em dois experimentos independentes são mostrados na Tabela 16. Foi observado, que em ambos os experimentos a atividade amilolítica de endospermas com eixos não foi significativamente afetada por tratamentos com GA_3 ou 6BA (Tabela 16 A e B; colunas 1, 2 e 3; e 16C) confirmando os resultados obtidos anteriormente (Fig. 39; Tab. 15). Também não foram observadas diferenças significativas na atividade amilolítica de endospermas isolados entre os três tratamentos (Tabela 16 A e B, colunas 4, 5 e 6; e 16C). Entretanto, comparando a atividade de endospermas com eixo com a dos isolados, a diferença observada foi altamente significativa, independente do tratamento. Este fato, estabeleceu novamente que a presença do eixo é necessária para o desenvolvimento normal da atividade amilolítica que ficou reduzida a trinta por cento nos endospermas isolados em relação aos com eixo e ainda, que os pré-tratamentos com estes reguladores não foram capazes de substituir o eixo. Os resultados obtidos para a atividade proteolítica foram semelhantes, não sendo observados efeitos promotores ou inibidores do GA_3 ou 6BA em endospermas com ou sem eixos, sendo que a atividade nestes últimos foi bem menor, como já havia sido observado anteriormente (Fig. 33 c,d; Fig. 34). Também, nestes experimentos foram testados pré-tratamentos com GA_3 seguidos pelo tratamento com 6BA ou pré-tra-

TABELA 16

Atividade amilolítica (D.O. 535 nm) em endospermas de milho normal com (+) ou sem (-) embriões tratados ou não com GA_3 ($10^{-5}M$) e 6BA ($10^{-7}M$) em 2 experimentos (16 A, B). Análise de significância dos resultados obtidos (16 C)

		com embrião			sem embrião		
		1 controle	2 GA_3	3 6BA	4 controle	5 GA_3	6 6BA
A	1	0,64	0,64	0,96	0,15	0,23	0,25
	2	0,69	0,50	0,73	0,26	0,36	0,20
	3	0,46	0,58	0,74	0,17	0,32	0,24
	4	0,59	0,63	0,61	0,27	0,33	0,26
	5	0,42	0,71	0,61	0,19	0,34	0,14
	\bar{X}	0,56	0,61	0,73	0,21	0,32	0,22
B	1	0,37	0,50	0,52	0,19	0,11	0,14
	2	0,61	0,58	0,43	0,13	0,17	0,16
	3	0,67	0,51	0,34	0,21	0,14	0,12
	4	0,60	0,48	0,48	-	-	-
	5	0,58	0,37	0,39	-	-	-
	\bar{X}	0,57	0,49	0,43	0,18	0,14	0,14
C	cont. (+)	cont. (-)	GA (+)	GA (-)	6BA (+)	6BA (-)	
Cont. (+)		***	N.S.	***	N.S.	***	
Cont. (-)			***	N.S.	***	N.S.	
GA (+)				***	N.S.	***	
GA (-)					***	N.S.	
6BA (+)						***	

(*) N.S. - diferença não significativa

*** - diferença significativa a nível de 0,001%

tamentos com 6BA seguidos por GA_3 e não foram observadas diferenças significativas tanto em endospermas com eixos como nos isolados.

Finalmente, como foi estabelecido existir diferença entre a atividade amilolítica do endosperma de Maya normal e a do Maya opaco-2 (Tabela 12, Fig. 29-32) foi interessante verificar se o GA_3 teria algum efeito em Maya opaco-2 cuja atividade foi mais baixa talvez devido ao nível endógeno deste hormônio. Assim a atividade amilolítica do endosperma de plântulas com sete dias de idade (próximo ao pico de atividade das amilases) tratadas ou não com GA_3 , foi analisada e os resultados são mostrados na Fig. 44. Verificou-se que o GA_3 não teve efeito sobre a atividade amilolítica tanto em Maya normal, como era esperado, como em Maya opaco-2. Entretanto, pôde-se notar novamente a diferença anteriormente observada entre as atividades amilolíticas do endosperma das duas formas de Maya sendo a do opaco-2 bem mais baixa que a do normal.

Figura 44. Atividade amilolítica (D.O. 535 nm) durante 10 min, de endosperma de plântulas de Maya normal (quadrados) e Maya opaco-2 (círculos) com 7 dias de idade, tratadas (símbolos cheios) ou não (símbolos vazios) com GA_3 ($10^{-5}M$) nas primeiras 48 horas de embebição

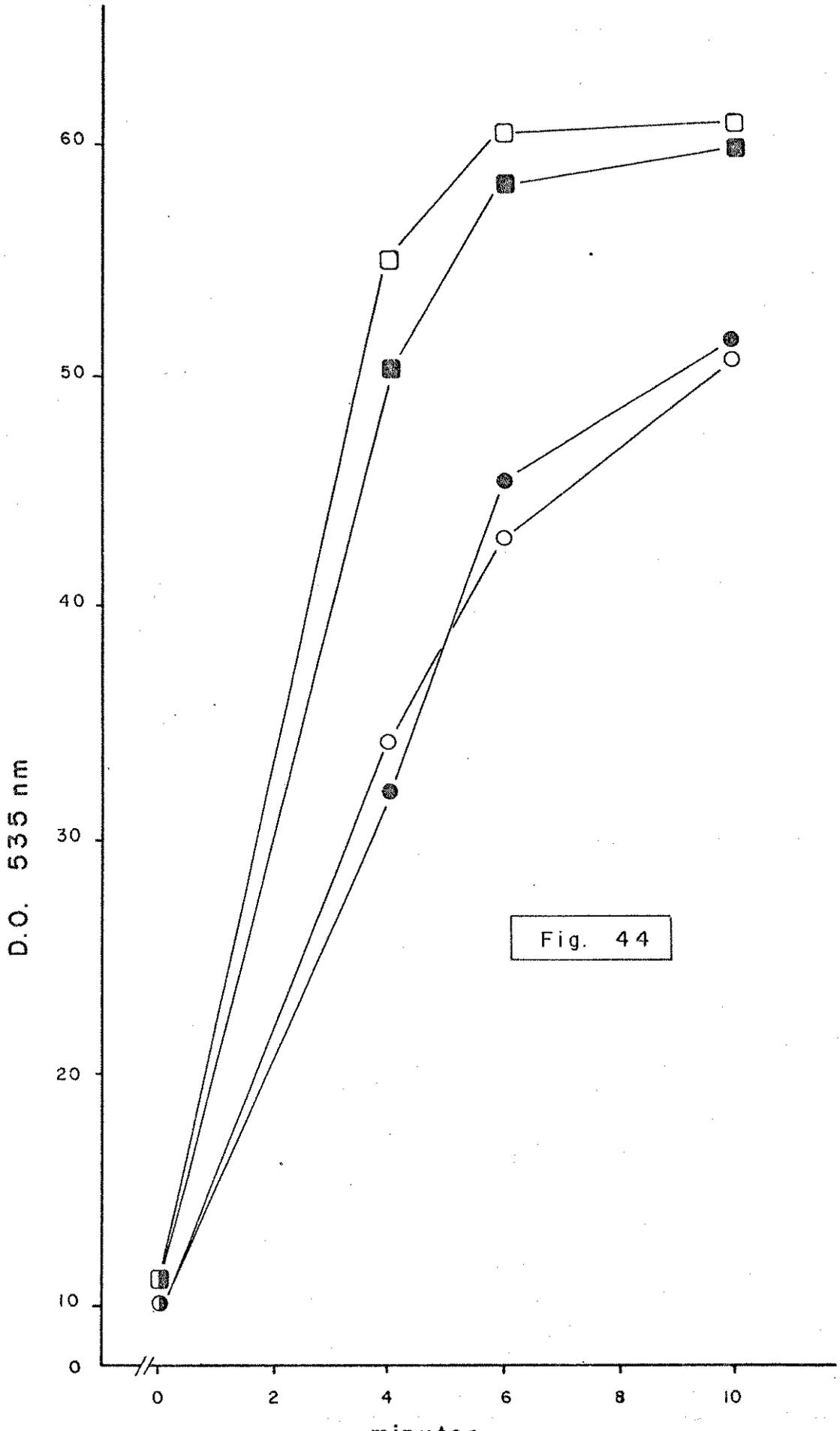


Fig. 44

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Verificou-se, no presente trabalho, a existência de diferenças na aparência dos grãos de milho opaco-2 e normal; os do opaco 2 eram amarelados, com um endosperma farinhento e quebradiço. Já os do normal tendiam ao alaranjado e eram mais resistentes à moagem, concordando com as observações de Alexander et al. (1969).

Concordando com Nelson (1966) observou-se que os grãos de milho opaco-2 tinham uma tendência a serem menores e mais leves (Fig. 1 a,b) do que os do normal.

Os embriões de Maya opaco-2 eram invariavelmente mais pesados, tanto em termos absolutos como relativos, que os de Maya normal em grãos de mesmo peso (Fig. 2 a,b ; Tab. 3), sendo esta diferença atribuída ao escutelo que era mais pesado em Maya opaco-2 (Fig. 12 a,b).

O conteúdo proteico do grão de milho opaco - 2 era maior que o do normal (Tab. 5, Fig. 4 a,b) tanto no endosperma como no embrião (Tab. 6, colunas 2, 3 e 4). Entretanto, nas duas formas o conteúdo proteico era positivamente correlacionado com o peso do grão ($p < 0,001$), tanto em termos absolutos como relativos. Em ambas as formas, por causa do seu maior volume, o endosperma apresentava um conteúdo proteico maior que o embrião (Tab. 6, colunas 2 e 3). O mesmo, entretanto, não ocorria em termos relativos (Tab. 6, colunas 6 e 7), demonstrando que o embrião é órgão rico em proteína. Novamente, o embrião do milho opaco-2 sempre apresentou maior conteúdo proteico, tanto em termos relati-

vos como absolutos, que o do normal. Foi interessante notar que com o aumento do peso do grão, a relação da distribuição da proteína da reserva entre o endosperma e o embrião era oposta para os dois tipos de milho. Em grãos leves de Maya normal, o embrião, como componente do grão inteiro, era relativamente mais pobre em proteínas que o do opaco-2 (em grãos de mesmo peso); em grãos mais pesados esta diferença diminuiu (Tab. 6, coluna 5). O mesmo não foi verdade para o conteúdo proteico do endosperma, onde a maior diferença entre a forma opaco e normal foi observada em grãos mais pesados, sendo esta diferença diminuída em grãos de menor peso. Assim, enquanto grãos de pesos iguais da forma opaco-2 sempre apresentam maior conteúdo proteico que os da normal, em grãos mais pesados estas diferenças podem ser atribuídas principalmente ao endosperma, e em grãos mais leves a diferença no conteúdo proteico pode ser atribuída ao embrião (eixo e escutelo).

Comparações entre as classes de proteína do endosperma de Maya normal e opaco-2 (Fig. 6, Tab. 7A, Tab. 8 A e B) baseadas no método de fracionamento sequencial de Landry e Moureaux (1970), confirmaram os efeitos do gene opaco-2 sobre a composição das proteínas do endosperma (Mertz, Batès e Nelson, 1964). Isto refletiu o fato de que o aumento em lisina, de grande importância no melhoramento de milho, observado no mutante, ocorreu não devido a mudanças dos aminoácidos em si, mas sim através de um aumento nas albuminas e globulinas, acompanhado por uma diminuição na zeína, classe proteica particularmente pobre em aminoácidos básicos (Sodek e Wilson, 1971a; Paulis, Bietz e Wall, 1975). Além disto, Righetti, Gianazza, Viotti e Soave

(1977) observaram que não seria provável a existência de mutantes de milho com zeína enriquecida por lisina pois, para serem "empacotadas" pela membrana do corpo proteico, onde as zeínas são normalmente encontradas (Christiansson et al. 1969; Wolf et al. 1967), parece que não podem tolerar altas concentrações de aminoácidos básicos na sua estrutura. Assim, no presente trabalho verificou-se que no milho normal a zeína representou 40% da proteína do endosperma e foi reduzida para 13% no opaco (Tab. 8A), enquanto que a fração solúvel em soluções salinas que representou 15% no normal, aumentou no opaco para 35%. Também observou-se um aumento nas glutelinas do opaco-2, embora este tenha sido menor. É de interesse que, embora ambas as albuminas e globulinas foram aumentadas na reserva do opaco-2, este aumento foi relativamente maior nas globulinas (Tab. 7 e 8B). Assim, por eletroforese, Paulis et al. (1975) verificaram que várias bandas presentes nas globulinas do opaco-2 eram quase que ausentes no milho normal. Como as albuminas e globulinas representam as enzimas do grão, talvez este fato reflita diferenças nas atividades destas enzimas, o que também foi sugerido por Dalby e Davies (1967) e Wilson e Alexander (1967).

. Todos estes dados, a respeito das diferenças nos grãos, tanto em termos de peso como de proteínas, provocadas por diferenças fundamentais no metabolismo durante a maturação do grão na espiga, refletem a hipótese de Munck (1972) que sugere que talvez o gene opaco-2 possa afetar o metabolismo geral da plântula, embora sua expressão seja mais facilmente manifestada no endosperma.

Folkes (1970) levantou a hipótese de que os níveis relativos das proteínas da reserva em cereais são determinados pelo fornecimento de aminoácidos durante a maturação; e se assim for talvez as proporções dos órgãos (endosperma, escutelo e eixo) nos grãos possam também ser modificadas, pois cada um tem uma composição proteica diferente.

Foi verificado que em grãos de cevada o conteúdo das prolaminas é relativamente maior em grãos com alto conteúdo proteico (Bishop, 1928; Urion e Golovtchenko, 1940; Metivier, 1976). Estes grãos são geralmente produzidos em condições em que o nitrogênio do solo não é limitante até o fim da maturação do grão. Assim, a espiga não somente recebe aminoácidos das folhas senescentes, mas também sintetizados pela raiz. Esta observação levou Folkes (1970) a sugerir que na semente em desenvolvimento, as prolaminas, com alto conteúdo de prolina e glutamina, utilizam aminoácidos provenientes das raízes e estes são incorporados diretamente em hordeína (prolamina de cevada) sem sofrerem modificações.

Estudos sobre as mudanças na síntese das proteínas da reserva durante a formação do grão, revelaram que no milho opaco-2 a síntese de albuminas e globulinas aumenta continuamente durante a maturação do grão na espiga, ao contrário do que é observado no milho normal que apresenta níveis constantes e baixos de síntese destas classes. A síntese de zeína, entretanto, é comparativamente baixa no milho opaco-2, enquanto que no normal aumenta rapidamente 30 dias após a fertilização (Murphy e Dalby, 1971; Moureaux e Landry, 1972). Como os maiores grãos nas espigas de cereais

são geralmente os que foram fertilizados primeiro, e subsequentemente tiveram mais tempo para serem preenchidos (Miltorpe e Moorby, 1974), os dados do presente trabalho poderiam ser correlacionados com aqueles sobre o desenvolvimento do grão do milho opaco-2 e normal. Assim, nos maiores grãos do milho normal, o endosperma apresentou relativamente mais proteína que o embrião, quando comparado com grãos pequenos, refletindo que neste tipo de milho a síntese de zeína foi máxima, e aumentou até o final da maturação. Em grãos menores, o opaco-2 foi muito mais rico em proteína no embrião, refletindo uma maior síntese de albuminas e globulinas armazenadas no escutelo e eixo, proporcionando uma distribuição proteica mais balanceada no grão. Esta maior síntese de albuminas e globulinas, talvez provoque maior crescimento relativo do escutelo e eixo no milho opaco-2, como foi observado (Fig. 12 a,b; Tab. 3). Assim, as albuminas e globulinas, além das reservas proteicas principais (zeínas e glutelinas) podem ser fonte importante de nitrogênio para o embrião em desenvolvimento em grãos pequenos com baixo conteúdo proteico, como foi também verificado por Ingversen e Kjøie (1972). Este fato foi confirmado por Metivier (1976) que mostrou que as albuminas e globulinas, constituem uma proporção relativamente maior da proteína total em grãos de baixo conteúdo proteico, quando comparados com os de alto conteúdo proteico dentro da mesma variedade, corroborando a hipótese de Folkes (1970), de que as fontes de aminoácidos desta fração são principalmente as folhas senescentes e que os aminoácidos provenientes da raiz, no fim da estação do crescimento, são incorporados diretamente nas

prolaminas. Mais recentemente, entretanto, foi mostrado que algumas interconversões de aminoácidos podem acontecer durante a maturação do grão, assim Sodek e Wilson (1970) verificaram que ^{14}C -lisina foi encontrada como glutamina e prolina no endosperma do milho normal. Significativamente, pouca interconversão foi verificada no endosperma do opaco-2, correlacionado ao seu alto conteúdo de lisina. No milho normal todas as interconversões aconteceram principalmente no endosperma e também nas etapas finais do desenvolvimento do grão, quando a síntese de zeína está no máximo.

Estudos da germinação e crescimento inicial das plântulas de Maya opaco-2 e Maya normal, mostraram que a taxa de embebição ocorreu em duas fases, uma rápida, até sete horas, seguida por outra mais lenta, mas que aumentou continuamente (Fig. 8 a,b). A primeira fase, pode ser considerada puramente física, sendo afetada por fatores ambientais como temperatura e composição das reservas do grão (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975). É interessante notar, que o aumento em peso fresco durante a fase de embebição analisada foi maior na forma opaco, fato relacionado com seu conteúdo proteico mais alto (Beevers, 1976). Metivier (1975) também notou em cevada, um aumento mais rápido no peso fresco em formas com maior conteúdo proteico dentro de uma mesma variedade, eliminando possíveis diferenças intervarietais. Sodek (1973) observou que o nível de aminoácidos livres é significativamente maior no milho opaco-2; estes também po

deriam atuar como agentes osmóticos. Na segunda fase da absorção de água, que pode ser considerada ativa, o opaco-2 continuou apresentando maior peso fresco que o normal, mas manteve sempre a mesma diferença devida à fase inicial de absorção. Entretanto, a longo prazo, estas pequenas diferenças iniciais na absorção de água, como as maiores verificadas na composição da reserva e tamanho do embrião, não afetaram o crescimento inicial de Maya opaco-2 quando comparado com o normal (Figs. 10-14).

O crescimento inicial foi caracterizado por uma diminuição no peso seco e proteína do endosperma, acompanhada por um aumento dos dois no eixo (Figs. 9-19), indicando que as reservas amiláceas e proteicas foram degradadas e transportadas para o eixo em desenvolvimento (Beevers, 1976). Este padrão de utilização de reservas é característico sendo observado tanto para monocotiledôneas como para dicotiledôneas, independentemente da plântula ser epígea ou hipógea, como foi observado em alface, feijão, mamona, Vigna, ervilha, aveia e cevada, embora nas epígeas o próprio cotilédone pode se tornar fotossintetizante e contribuir com fotossintatos para o crescimento do eixo (Prisco et al. 1975 ; Metivier e Dale, 1977a; Bewley e Black, 1978; Paulilo, 1980).

Notou-se que o peso seco total diminuiu até o quinto dia de crescimento (Fig. 9 a,b) indicando, possivelmente, grandes perdas respiratórias. Após este período, o peso se estabilizou coincidindo com o aparecimento da primeira lâmina foliar que se expandiu rapidamente após esta data (Fig. 10a), indicando que as perdas respiratórias estavam sendo compensadas pelos ganhos com a fotossíntese. Após

o nono dia de crescimento, quando a parte aérea estava bem desenvolvida (Fig. 13b) a taxa de fixação do carbono já com pensou as perdas respiratórias e assim o peso seco total au mentou continuamente. Este fato estabeleceu a importância da primeira folha no desenvolvimento da plântula, pois a expan são da segunda e terceira lâminas foliares é dependente da exportação de carbono da primeira que por sua vez é depen dente das reservas do grão (Felippe e Dale, 1972). Assim, em cereais o vigor da plântula é fortemente correlacionado com a qualidade da sua reserva (Schweizer e Ries, 1969; Ries, 1971; Lowe e Ries, 1973) e qualquer fator que iniba o desenvolvimento máximo desta folha, como o sombreamento ou baixos níveis de proteína no grão, pode afetar o crescimento de todas as folhas hierarquicamente, diminuindo até a produção final da planta (Dale, Felippe e Fletcher, 1972; Felippe e Dale, 1973; Metivier, 1979).

Em milho, foi notado por Dure (1960a) que a diminuição no peso total, no início da germinação foi devida à rápida utilização na respiração, das reservas estocadas no próprio embrião, antes da fase de degradação das reservas do endosperma. Dure atribuiu, este fato à rápida degradação de lipídeos estocados no escutelo e a demonstração de que o ciclo de glioxilato funciona neste órgão (Oaks e Beevers, 1964), indica que uma parte destes lipídeos devem ser convertidos em açúcar para o fornecimento de energia à parte aérea e raiz. Ingle et al. (1964) também notaram o desaparecimento de lipídeos do escutelo nos primeiros dois dias de germinação, os quais não apareceram em outros órgãos, sugerindo que tenham sido transformados em açúcar ou

respirados. Este fato foi comprovado pelos valores de RQ (quocientes respiratórios) menores que 1 encontrados tanto em milho (Dure, 1960a) como em cevada (James e James, 1940), embora, no segundo caso, além dos lipídeos também foram estocados no embrião altos níveis de rafinose e estaquiose que podem ser utilizados nas primeiras etapas da germinação.

Como o crescimento do eixo se dá às expensas da hidrólise da reserva do endosperma, a curva que representa o ganho em matéria seca ou proteína pelo eixo se cruza com a que representa a diminuição destas reservas no endosperma (Fig. 9 a,b; 11 a,b; 12 a,b; 14a; 15 a,b). Assim, este ponto, onde o peso e conteúdo proteico do eixo equivalem àqueles que restam no endosperma, representa a etapa onde aproximadamente 50% das reservas translocáveis foram incorporadas no eixo. É interessante notar que este ponto tenha ocorrido mais cedo para proteínas, ao redor do quarto dia de crescimento, do que para matéria seca sendo observado dois dias mais tarde, no dia 6 (Fig. 15 a,b). Este fato indicou que as reservas proteicas são utilizadas relativamente mais rápido que as reservas amiláceas, representadas na sua maior parte pelo peso seco. Este fato também foi verificado em milho por Ingle et al. (1964) e parece ser comum para cereais em geral, sendo também observado em aveia (Sutcliffe e Baset, 1973) e cevada (Folkes, Willis e Yemm, 1952; Metivier e Dale, 1977a). Os últimos autores atribuíram este evento ao fato de que cereais geralmente são pobres em proteínas em relação às reservas amiláceas e esta taxa mais rápida de utilização proteica fornece uma nutrição balanceada de carbono e nitrogênio ao embrião, no início do seu desen-

volvimento. Assim, a reserva de nitrogênio endógeno em cevada, se torna limitante rapidamente e se nitrogênio exógeno não for fornecido após o segundo dia de germinação, o crescimento do embrião é diminuído afetando particularmente o desenvolvimento da primeira lâmina foliar cuja taxa de fotossíntese fica reduzida através da grande diminuição no seu conteúdo de carboxilase (Metivier e Dale, 1977b).

A mais rápida utilização de proteínas, quando comparada com a de matéria seca foi indicada também pelos cálculos das taxas de degradação de proteína e matéria seca (Tab. 9A,B; Fig. 16 a,b). Observou-se que a maior taxa de degradação de proteína ocorreu inicialmente, diminuindo constantemente durante o crescimento (Tab. 9A). Foi interessante notar que houve uma defasagem entre a degradação de proteína no endosperma e a incorporação desta no eixo (Tab. 9 A,C). Assim, Ingle, Beevers e Hageman (1964) e Melville e Scandalios (1972) mostraram que em milho o conteúdo de aminoácidos livres do endosperma mostrou um pico entre o terceiro e quarto dias de germinação, corroborando com a observação feita no presente trabalho que esta é a fase de maior atividade proteolítica (Fig. 28b). Entretanto, Ingle et al. (1964) não observaram grande acúmulo de aminoácidos no endosperma, mas sim no eixo durante a germinação, estabelecendo que o transporte dos aminoácidos do endosperma para o eixo acompanha a taxa de hidrólise das proteínas. Isto também foi observado em cevada, por Folkes e Yemm (1958). Para a matéria seca entretanto, as mais altas taxas de degradação ocorreram mais tarde, ao redor do sexto dia (Tab. 9B), novamente coincidindo com a

época de maior atividade amilolítica no endosperma (Fig.28a). Ao contrário do observado para os aminoácidos, Ingle et al. (1964) verificaram que a taxa de hidrólise de amido foi maior que sua taxa de utilização. Assim, o conteúdo de açúcar livre aumentou em todas as partes do grão (endosperma e embrião). Entretanto, a análise da degradação da matéria seca e sua incorporação no eixo (Tab. 9B,D) é complicada, devido ao fato de que uma proporção considerável dela, além de ser transportada é respirada e eliminada sob a forma de CO₂ enquanto que no eixo além dos carboidratos provenientes da reserva ocorre a fixação de carbono pela primeira lâmina foliar após o quarto dia de crescimento. Assim, a longo prazo, a incorporação de carbono na plântula aumenta enquanto que o total de nitrogênio permanece constante na ausência de uma fonte exógena.

O peso seco (Fig. 12a,b) e o conteúdo proteico (Fig. 14b e 17b,c) do escutelo não sofreram grandes modificações durante o crescimento inicial. Isto corrobora as observações de Dure (1960a) e de Ingle et al. (1964) refletindo o fato de que o escutelo é um órgão especializado na absorção dos produtos de hidrólise, situado entre a reserva e o eixo. Embora não tenham sido notadas grandes modificações no peso e conteúdo proteico do escutelo, foi demonstrado que ele é um órgão metabolicamente ativo (Boulter, e Barber, 1963; Splittstoesser, 1967). Assim, modificações de aminoácidos ocorrem neste tecido e as hexoses formadas pela hidrólise, são convertidas a sacarose, sendo esta forma de açúcar transportada para o embrião. Confirmando este fato foi observado que o escutelo é rico em mitocôndrias e todas

as enzimas responsáveis por estas interconversões foram encontradas neste órgão (Edelman, Shibiko e Keys, 1959; Hanson, Vatter, Fisher e Bils, 1959; Hawker, 1971; Humphreys, 1975).

Relativamente, mais material, tanto proteico (Fig. 17b) como amiláceo (Fig. 17a; Fig. 13 a,b) foi transportado para a parte aérea do que para a raiz, sendo esta diferença maior na distribuição de proteína. Assim, após o terceiro dia de crescimento a proteína translocada para a raiz diminuiu enquanto que aquela para a parte aérea aumentou continuamente (Tab. 10). Este não foi o caso para a matéria seca, cuja translocação aumentou continuamente em ambas as partes, embora nas últimas etapas tenha sido maior para a parte aérea. Apesar disto notou-se que nos primeiros dias de crescimento a incorporação de matéria seca foi maior na raiz que é a parte do embrião que primeiro se desenvolve como foi sugerido por Stein e Quastler (1963) que observaram que em milho a síntese de DNA se inicia na raiz 40 horas antes de na parte aérea. Todos estes dados corroboram as observações de Metivier e Dale (1977 a,b) de que a parte aérea é importante fonte de consumo de proteínas, principalmente pelas enzimas envolvidas na fotossíntese.

Análises da degradação das três principais classes proteicas da reserva do endosperma, mostraram grandes diferenças entre a forma opaco e normal em termos absolutos, devido a composição diferente das duas (Fig. 18 e 19). Em ambas as formas, as albuminas e globulinas foram as únicas frações que aumentaram no início da germinação (Fig. 18). Este fato foi também observado em milho por Harvey e

Oaks (1974b) e também por Prisco et al. (1975) em Vigna. Baseando-se nesta observação, pôde-se sugerir que logo no início da germinação há uma síntese de novo de enzimas hidrolíticas importantes para a degradação das reservas (Filner e Varner, 1967; Varner e Ram-Chandra, 1964). É de interesse notar, que houve uma diferença relativa na degradação desta fração, solúvel em soluções salinas, entre os dois tipos de milho; assim, mesmo que o opaco-2 tenha degradado mais albuminas e globulinas, em termos absolutos, o normal que inicialmente tinha menos, utilizou uma proporção maior destas proteínas (Tab. 11) e neste caso é provável que esta fração represente importante fonte de nitrogênio para o eixo como já foi sugerido anteriormente (Ingversen e Kjøie, 1972).

Para as proteínas de reserva, zeinas e glutelinas, não se observou aumento inicial sendo que a degradação começou logo no início da embebição sendo inicialmente maior para as glutelinas (Fig. 19 b,d; Tab. 11). Isto talvez tenha sido um reflexo da disposição das proteínas na reserva, onde as zeinas estão no interior de corpos proteicos, imersas numa matriz de glutelinas (Christianson et al., 1969). Assim, a matriz tem que sofrer degradação antes que os corpos proteicos possam ser expostos às enzimas hidrolíticas.

Em termos absolutos, a degradação de cada classe proteica acompanhou sua abundância no endosperma (Tab. 11); a degradação da zeína foi muito maior no milho normal do que aquela observada no opaco (Fig. 19d) enquanto que o contrário foi verdade para as glutelinas (Fig. 19b), confirmando os resultados obtidos por Harvey e Oaks (1974b), que

trabalhando com variedades de milho com níveis diferentes de zeína e glutelina mostraram o mesmo padrão de degradação observado neste trabalho.

Folkes (1970) notou que a composição dos aminoácidos da reserva é bem diferente da das proteínas protoplasmáticas do eixo, mas verificou que no caso de cevada o endosperma podia fornecer 75% dos aminoácidos requeridos, sem necessidade de transformação (Folkes e Yemm, 1958; Joy e Folkes, 1965).

Desde que existe um melhor balanço de aminoácidos na presença do gene opaco-2 devido ao aumento nas albuminas e globulinas e diminuição na zeína, talvez fosse esperado que menos interconversões seriam necessárias em plântulas opaco-2. Isto foi confirmado no presente trabalho, onde verificou-se que a atividade das transaminases foi consideravelmente menor em Maya opaco-2 (Fig. 21). O órgão mais importante nesta interconversão foi o escutelo (Fig. 20), estabelecendo sua importância na transformação dos produtos de hidrólise (Splittstoesser, 1967; Boulter e Barber, 1963; Sodek e Wilson, 1973). É evidente que somente uma parte dos aminoácidos, aqueles presentes em excesso em termos de proteínas protoplasmáticas, vão sofrer interconversões; assim em milho normal, com baixo conteúdo de lisina, não houve grande transformação deste aminoácido, embora o conteúdo de leucina, aminoácido abundante na zeína, decresceu durante a germinação (Sodek e Wilson, 1973). Adicionalmente, foi observado neste trabalho que a maior atividade destas enzimas foi no início da germinação, até o quarto dia de crescimento, coincidindo com a fase de maior hidrólise proteica no endosperma (Fig. 28b) hidrólise esta que fornece substrato para estas enzimas.

Os testes realizados para os métodos empregados na dosagem de amilases e proteases provaram a sua eficiência (Fig. 22-24) indicando que os extratos tiveram alto poder hidrolítico. Assim a liberação dos produtos, maltose no caso das amilases e tirosina no caso das proteases, foi linear com o tempo (Fig. 22b e 24b), o extrato não perdeu atividade durante o período em que foi utilizado (Fig. 22a e 24b), sendo esta uma função do volume do extrato utilizado (Fig. 22c e 24c) e não estando presente em extratos fervidos. O pH ótimo para as amilases foi 5,5 (Fig. 23) o que concordou com os resultados de Dure (1960b) para milho e com dados para outros cereais como o sorgo, trigo e cevada (Bernfeld, 1951; Fischer e Stein, 1960; French, 1960).

No caso das proteases a atividade máxima foi encontrada no pH 3,6 (Fig. 24a) corroborando as observações de Harvey e Oaks (1974a) para proteases de milho. Esta maior atividade de proteases em condições ácidas também foi encontrada por Basha e Beevers (1975) em ervilha, por Garg e Virupaksha (1970) em sorgo, por Prisco et al. (1975) em Vigna e por Preston e Kruger (1976) em trigo. Prisco et al. (1975) também verificaram a superioridade da hemoglobina em relação a caseína como substrato (Fig. 24a).

A atividade amilolítica foi extremamente baixa no grão seco, mas aumentou rapidamente nos primeiros 6 dias de crescimento, quando um patamar de máxima atividade foi atingido permanecendo constante até o décimo segundo dia de crescimento (Fig. 25, 26 e 28a). Este padrão de atividade acompanhou as mudanças observadas no peso do endosperma que inicialmente diminuiu lentamente sendo a diminuição, entre

o segundo e décimo quarto dia de crescimento, mais rápida (Fig. 12 a,b). A atividade amilolítica também foi altamente correlacionada com o nível de açúcares livres no endosperma (Fig. 31b, 32b). Foi interessante que a atividade das amilases permaneceu alta, só começando a diminuir quando a reserva foi esgotada por volta do décimo segundo dia de crescimento (Fig. 28a, 9 a,b); assim, uma vez sintetizadas, as enzimas permanecem no grão, não sendo degradadas até que falte substrato. Dure (1960b) também verificou o mesmo padrão de atividade amilolítica em milho e atribuiu este aumento inicial de atividade observado principalmente após o terceiro dia de crescimento (Fig. 25), ao aparecimento da alfa-amilase que é rapidamente sintetizada, enquanto que a beta-amilase, já presente no endosperma do grão seco (French, 1960) é apenas um baixo componente da atividade amilolítica total e mantém-se constante durante o período de degradação do amido.

A atividade proteolítica aumentou até o quarto ou quinto dia de crescimento, permanecendo constante após este período até o dia 14 (Fig. 27c, 28b). Novamente o pico de atividade destas enzimas coincidiu com a época de máxima degradação das proteínas (Fig. 14a, 15 a,b, 16b, 18 e 19) como também foi observado por Tully e Beevers (1978). Sendo o pico de atividade proteolítica mais adiantado que o para as amilases pôde-se confirmar a utilização mais rápida pelo embrião, da reserva proteica. Este fato corrobora as observações de Harvey e Oaks (1974b) em milho e as de Sutcliffe e Baset (1973) que também encontraram um pico de atividade proteolítica antes do da amilolítica. Harvey

e Oaks (1974b) também verificaram que a ciclohexamida inibiu a atividade de ambas alfa-amilase e protease, sugerindo que as duas enzimas são sintetizadas de novo durante as primeiras etapas da germinação, talvez refletindo o aumento nesta fase das albuminas e globulinas observado neste trabalho (Fig. 18).

Análises da atividade amilolítica e proteolítica de Maya normal e opaco-2 mostraram que embora o padrão de atividade tenha sido igual nas duas formas, a primeira apresentou atividade hidrolítica maior durante todo o desenvolvimento.

A atividade proteolítica mais alta em Maya normal refletiu a maior degradação da proteína da reserva anteriormente observada após o quinto dia de crescimento (Fig. 19a).

Em ambos os tipos de milho, a atividade amilolítica foi altamente correlacionada com o peso do eixo, como também com os níveis de açúcares livres no endosperma (Fig. 29-32, Tab. 12) sendo os maiores níveis encontrados no endosperma normal (Fig. 31c). É interessante notar que a atividade amilolítica no milho normal e opaco-2 foi igual no terceiro e quarto dias de crescimento (Fig. 31b, 32a, Tab. 12), mas que no sexto dia o normal apresentou o dobro da atividade do opaco-2 sugerindo que a síntese de alfa-amilase acaba prematuramente no endosperma do opaco-2 em comparação com a do normal. Novamente, este fato pode ser talvez relacionado com o aumento das albuminas e globulinas no início da germinação que foi menor no milho opaco-2. O fato de que o crescimento do eixo foi igual para as duas variedades

des eliminou a possibilidade de que a maior atividade observada no milho normal poderia ser atribuída a uma fonte de consumo mais ativa, parecendo assim que a menor hidrólise do amido no opaco-2 possa ter ocorrido devido a presença do gene opaco-2 (Fig. 30a, 32a) lembrando a hipótese de Munck (1972) que sugeriu que este gene poderia afetar profundamente o metabolismo da planta. Assim, Jolivet et al. (1970) mostraram diferenças no metabolismo dos ácidos carboxílicos e de aminoácidos em folhas jovens de plantas opaco-2 onde se observou níveis mais baixos destes compostos quando comparados com as do normal. Também, Sodek e Wilson (1970) mostraram que o milho opaco-2 teve pequena capacidade de transformar lisina em ácido glutâmico e prolina, em qualquer estágio do desenvolvimento e que no milho normal essa capacidade foi menor nos primeiros estágios.

Foi verificado, no presente trabalho, que embora o embrião não tenha sido absolutamente necessário para o início da atividade proteolítica e amilolítica, a presença dele foi fundamental para o desenvolvimento normal da atividade (Fig. 33-35). Estes dados, sugeriram que baixos níveis destas enzimas já estão presentes no grão seco ou que os hormônios necessários para iniciar a síntese destas enzimas já estão presentes no endosperma, mas somente em níveis sub-ótimos, necessitando um estímulo proveniente do embrião para que os níveis normais destas enzimas sejam atingidos (MacLeod e Palmer, 1966; Radley, 1969). Em experimentos onde o embrião foi removido após diferentes intervalos de embebição, notou-se que um estímulo proveniente do embrião após 48 horas aumentou marcadamente, tanto a atividade amilolítica como a proteolítica, sugerindo que o es-

tímulo é o mesmo para as duas (Fig. 35). Estes dados corroboram os de Ingle e Hageman (1965b) que também verificaram a necessidade de um estímulo para a degradação das reservas de milho recebido pelo endosperma entre 36 e 48 horas de embebição. Assim, a atividade amilolítica baixa encontrada na ausência do embrião (Fig. 34) poderia ser devida à beta-amilase (Dure, 1960b) pré-existente no grão de milho, fato que também foi verificado em outros cereais como trigo (Roswell e Goad, 1962), cevada (Tronier e Ory, 1970) e centeio (Engel, 1947). A alta atividade amilolítica verificada após a estimulação pelo embrião (Fig. 35b) poderia ser atribuída a síntese de novo da alfa-amilase, sob controle hormonal (Varner e Ram-Chandra, 1964; Filner e Varner, 1967). Deste modo verificou-se que a presença do embrião em milho não foi necessária para o início da degradação, confirmando as observações de Toole (1924), Harvey e Oaks (1974b) e Goldstein e Jennings (1975), que também foram semelhantes às aquelas feitas em outras espécies, como aveia (Naylor, 1969) e feijão (Paulilo, 1980), embora tenham sido diferentes daquelas feitas em trigo e cevada, onde na ausência do embrião não houve nenhuma hidrólise, entretanto, o embrião pôde ser substituído por tratamento hormonal (Yomo, 1961; Chrispeels e Varner, 1967a; Khan, Verbeek, Waters e Van Onckelen, 1973).

A baixa atividade proteolítica encontrada em endospermas sem embriões (Fig. 33 c,d) também poderia ser atribuída a proteases presentes no grão seco como foi mostrado, em milho, por Adams, Watson e Novellie (1975), sendo que também em cevada e sorgo foram encontradas proteases no interior de corpos proteicos (Ory e Henningsen, 1969; Adams

e Novellie, 1975). Entretanto, do mesmo modo que para as a milases, a maior parte da atividade proteolítica foi devida a proteases sintetizadas de novo, exigindo a presença do em brião (Fig. 35c) e o estímulo hormonal (Ingle e Hageman , 1965b; Harvey e Oaks, 1974b; Bewley e Black, 1975).

Tanto para as amilases como para as proteases , a maioria dos trabalhos feitos com cereais, apesar das controvérsias a respeito da necessidade do embrião, concordam que o estímulo necessário para o desenvolvimento normal da atividade hidrolítica é uma giberelina, com exceção do trigo, onde as citocininas também parecem estar envolvidas (Eastwood, Tavener e Laidman, 1969). Entretanto, no presente trabalho, apesar de tratamentos com GA_3 e 6BA terem mostrado efeitos na morfologia da plântula (Tab. 13 e Fig. 36-38) estes tratamentos não alteraram significativamente a atividade hidrolítica das amilases (Fig. 39; Tab. 14, 15A e 17) ou proteases (Fig. 40, Tab. 15B) tanto no milho normal co mo no opaco-2 (Fig. 44). Estes resultados concordaram com os de Harvey e Oaks (1974c) e de Goldstein e Jennings (1975) que verificaram também que o GA_3 não teve efeito marcante na hidrólise proteica e amilácea, embora tenha sido capaz de reverter o efeito inibidor do ácido abscísico (ABA), mas não de inibidores de síntese proteica, como a ciclohexamida e a actinomicina D.

Entretanto, análises das atividades amilolíti - cas de plântulas individuais sugeriram um possível efeito do GA_3 em alguns casos (Fig. 41 a-d; Tab. 14) de modo que, em vários experimentos a atividade mais alta teve uma ten - dência a estar associada a plântulas tratadas, embora as a - tividades da maioria das plântulas, tanto tratadas como não,

terem sido indistinguíveis. Este tipo de observação sugere a hipótese de que o material utilizado nestes experimentos pode ter apresentado respostas diferentes ao tratamento com GA_3 devido a diferentes níveis endógenos deste hormônio em cada grão; assim, grãos com alto nível de GA_3 endógeno mostraram respostas fracas à aplicação exógena deste hormônio, enquanto que aqueles com baixo conteúdo de gibberelina responderam melhor ao tratamento. Estas diferenças endógenas nas sementes poderiam ser atribuídas às condições durante a maturação do grão, à posição deste na espiga, como também a diferenças genéticas entre elas já que os dois tipos de milho utilizados não constituíam linhagens isogênicas.

Esta hipótese, de que as respostas variáveis ao GA_3 , em milho, encontradas na literatura, poderiam ser atribuídas a diferenças endógenas nas giberelinas também foi sugerida por Harvey e Oaks (1974b) e por Goldstein e Jennings (1975). Os primeiros autores mostraram que diferentes linhagens de milho apresentaram respostas desiguais a tratamentos com GA_3 e além disso, verificaram que o milho anão d_5 , deficiente em giberelina, apresentou resposta marcante na atividade amilolítica quando tratado com GA_3 . Os mesmos autores também mostraram que compostos como o CCC, phosphon D e AMO 1618, inibidores da síntese de giberelinas, mas não da sua ação, não tiveram efeitos na atividade amilolítica. Adicionalmente a observação de que o GA_3 pode reverter o efeito do ABA, levou-os a concluir, que como no caso de outros cereais, o papel do GA_3 é o mesmo, estando envolvido no controle das enzimas hidrolíti

cas, mas que o conteúdo endógeno deste hormônio em milho é variável. Goldstein e Jennings (1975) também concordaram com esta hipótese e o mesmo tipo de sistema também foi observado em aveia (Naylor, 1966). Esta hipótese talvez explique as conclusões de Ingle e Hageman (1965b) e Dure (1960b) de que o GA_3 proveniente do embrião é necessário para a iniciação da hidrólise das reservas, se as variedades de milho utilizadas por estes pesquisadores tivessem originalmente um baixo nível de giberelina endógena, como também explica as diferentes respostas obtidas para plântulas individuais no presente trabalho.

RESUMO

No presente trabalho foram analisados os efeitos do gene opaco-2 e reguladores de crescimento na utilização das reservas durante o crescimento inicial do milho cv. Maya.

Os grãos de milho opaco-2 eram morfologicamente distintos dos do normal, geralmente mais leves, com escutelo maior e um conteúdo proteico mais alto tanto no embrião como no endosperma. Em ambos os tipos o conteúdo proteico foi positivamente correlacionado com o peso do grão, sendo as diferenças entre as duas formas de milho, nos grãos mais pesados, atribuídas ao endosperma e nos mais leves ao embrião. Análises da composição proteica indicaram que o gene opaco-2 aumentou as albuminas, globulinas e glutelinas do grão, reduzindo ao mesmo tempo a zeína. Apesar da taxa de embebição inicial ter sido mais rápida no milho opaco - 2 não foram notadas diferenças significativas entre as duas formas no crescimento inicial das plântulas, que foi caracterizado por uma rápida degradação da matéria seca e proteína do endosperma, sendo a última utilizada, relativamente mais rápido. Maiores quantidades de matéria seca e proteína foram translocadas para a parte aérea, particularmente para a primeira lâmina foliar que se expandiu rapidamente após o quinto dia de crescimento.

Em termos absolutos, a degradação das classes proteicas individuais acompanhou sua abundância no endosper

ma; no entanto, zeínas, albuminas e globulinas foram utilizadas numa taxa relativamente maior no milho normal que no opaco-2, onde a degradação relativa das glutelinas foi mais rápida.

A atividade de transaminases, significativamente maior no milho normal, foi alta no segundo dia, decrescendo rapidamente até o sexto dia, particularmente no escutelo, quando comparado com o eixo e endosperma.

A atividade amilolítica, máxima no pH 5,5, foi baixa no grão seco, aumentou rapidamente até o sexto dia, permanecendo constante até o décimo segundo dia, quando começou a decrescer. O pico de atividade proteolítica, máxima no pH 3,6, ocorreu relativamente mais cedo, no quarto dia, permanecendo constante até o décimo quarto dia. As atividades máximas de ambas as enzimas coincidiram com a época de maior degradação de matéria seca e proteínas da reserva, embora o milho normal tenha, invariavelmente, mostrado maior atividade em todas as etapas do desenvolvimento.

Embora em endospermas isolados tenham sido encontradas somente baixas taxas hidrolíticas, estabelecendo que a presença do embrião não era absolutamente necessária para o início deste processo, um estímulo proveniente do embrião e recebido pelo endosperma após 48 horas de embebição foi necessário para o desenvolvimento normal da atividade hidrolítica.

Aplicações exógenas de ácido giberélico (GA_3) aumentaram o comprimento da bainha, assim como a área foliar e o peso seco da parte aérea e raiz em concentrações até 4×10^{-4} M; acima desta, o efeito foi diminuído e no

caso das raízes o peso seco foi reduzido quando comparado com o controle.

A 6-benzil-adenina (6BA) em concentrações de 10^{-7} M promoveu comprimento, largura e área das lâminas foliares; altas concentrações reduziram o tamanho das folhas, como também o peso seco da raiz e parte aérea.

Não foi observado efeito do 6BA sobre as amilases e proteases, tanto quando aplicado sozinho, como com GA_3 em grãos intactos ou de-embrioados.

O efeito do GA_3 foi variável. Embora não fossem observados efeitos marcantes sobre a atividade hidrolítica, foi notada uma tendência para uma minoria de plântulas tratadas com este hormônio exibirem atividades amilolíticas e proteolíticas mais altas quando comparadas com as do controle. Este fato foi atribuído a diferenças nos níveis endógenos de giberelinas no grão, que talvez controlem o grau da resposta.

No geral, os resultados obtidos neste trabalho, estabeleceram que a presença do gene opaco-2 produziu efeitos marcantes sobre a composição do endosperma e atividade de transaminases, amilases e proteases e que no entanto não afetou marcadamente a taxa de crescimento das plântulas. Giberelinas, mas não citocininas, parecem estar envolvidas no controle da degradação das reservas; entretanto, seu papel continua não muito bem esclarecido e outros fatores provenientes do embrião devem ser necessários, pois o GA_3 exógeno não pôde substituir o embrião em endospermas de-embrioados.

SUMMARY

This project analyzed the effect of the opaque-2 gene and growth regulators upon the degradation of endosperm reserves during the early seedling growth of maize cv. Maya.

Grains of opaque-2 maize were morphologically distinct, generally lighter with a larger scutellum and showed a higher total protein content in both the embryo and endosperm. For both types protein content was positively correlated with grain weight though for heavier grain differences in protein content were greatest in the endosperm, whereas in lighter grain differences were greatest in the germ. Analysis of protein composition revealed that albumin, globulin and glutelin were increased in opaque-2 grain whereas zein was considerably reduced.

In spite of initial faster imbibition rates in opaque-2 maize no differences were discernible in initial plant growth, which was accompanied by a rapid decrease in endosperm dry matter content and protein in both forms, though the latter was utilized relatively faster. Greater quantities of dry matter and protein were translocated to the shoot, particularly the first leaf lamina which expanded rapidly from day 5.

In absolute terms degradation was more rapid in the most abundant protein classes, however zein and salt soluble fractions were utilized relatively faster in

normal maize when compared with opaque-2 maize where glutelin degradation was relatively greater.

Transaminase activity in the scutellum, significantly greater in normal maize, was high on day 2 and fell rapidly to day 6; activity in the axis and endosperm was comparatively low.

Total amylase activity, maximal at pH 5,5, was low in the dry grain, increased rapidly to day 6, there after remaining constant until a decrease on day 12. The peak of protease activity, maximal at pH 3,6, was relatively sooner on day 4 thereafter remaining constant until day 14. For both enzymes peak activity coincided with the greatest period of dry matter and protein degradation though normal maize invariably showed greater activity at all stages of development.

De.embryonated grain showed only low rates of hydrolysis, establishing, however that the presence of the embryo was not absolutely expedient for the initiation of this process. The presence of the embryo 48 hours from inhibition greatly augmented reserve hydrolysis suggesting that at this time a diffusible factor, originating in the germ, was promoting enzyme synthesis.

Exogenous application of gibberelic acid (GA_3) increased sheath, lamina and coleoptile length as well as leaf area and the dry weight of the shoot and root up to concentrations of $4 \times 10^{-4} M$, above this the effect was diminished and in the case of roots dry weight was reduced in relation to the control.

6-Benzyladenine (6BA), at a concentration of

10^{-7} M promoted leaf length, width, and area: higher concentrations reduced leaf size as well as root and shoot dry weight.

No effect of 6BA was apparent upon amylase or protease activity either alone or in combination with GA_3 upon intact or de-embryonated grain.

The effect of GA_3 was variable. While no marked effects upon hydrolytic activity were observed there was a marked tendency for a minority of plants treated with this hormone to exhibit higher amylolytic and proteolytic activities when compared with controls. This was attributed to differing endogenous gibberellin levels within the material which may govern the degree of response.

In total the data established that the presence of the opaque-2 gene has marked effects upon endosperm composition, and activity of transaminases, amylases and proteases which however do not markedly affect seedling growth rates. Gibberellins, but not cytokinins, appear to be involved in the degradation of endosperm reserves, however its position remains unclear and other factors from the embryo may be necessary since exogenous GA_3 could not replace the axis in isolated endosperms.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, C.A. and NOVELLIE, L. 1975. Acid hydrolases and autolytic properties of protein bodies and spherosomes isolated from ungerminated seeds of Sorghum bicolor (Linn.). Moench. Pl. Physiol., 55: 7-11.
- ADAMS, C.A.; WATSON, T.G. and NOVELLIE, L. 1975. Lytic bodies from cereals hydrolysing maltose and starch. Phytochem., 14: 953-956.
- ALEXANDER, D.E.; LAMBERT, R.J. and DUDLEY, J.W. 1969 . Breeding problems and potentials of modified protein maize. New approaches to breeding for improved plant protein. IAEA/FAO, STI/PUB 212, Vienna: 55-56.
- ASHTON, F.M. 1976. Mobilization of storage proteins of seeds. Ann. Rev. Plant Physiol., 27: 95-117.
- BAUDET, J.; MOSSÉ, J.; LANDRY, J. et MOUREAUX, T. 1966 . Étude sur les protéines du maïs. I. Composition en acides aminés des fractions azotées du grain. Ann. Physiol. Vég., 8: 321.
- BASHA, S.M.M. and BEEVERS, L. 1975. The development of proteolytic activity and protein degradation during the germination of Pisum sativum L. Planta, 124: 77-87.
- BEEVERS, L. 1976. Nitrogen metabolism in plants. Arnold, London.
- BENNETT, P.A. and CHRISPPEELS, M.J. 1972. De novo synthesis of ribonuclease and β -1,3-glucanase by aleurone cells of barley. Pl. Physiol., 49: 445-447.

- BERNFELD , P. 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis. Adv. in enzymol., 12: 342-379.
- BEWLEY, J.D. and BLACK, M. 1978. Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination. I. Springer-Verlag, Berlin.
- BILDERBACK, D.E. 1974. Amylases from layers and starchy endosperm of barley seeds. Pl. Physiol., 53: 480-484.
- BISHOP, L.R. 1928. The composition and quantitative estimation of barley proteins. J. Inst. Brew., 34: 101-118.
- BOULTER, D. and BARBER, J.T. 1963. Aminoacid metabolism in germinating seeds of Vigna faba L. in relation to their biology. New Physiol., 62: 301-316.
- BRESSANI, R.; ALVARADO, J. and VITEN , F. 1970. Evaluation in children of the protein quality of opaque-2 maize . Arch. Latin. amer. Nutricion., 19: 129-140.
- BRESSANI, R.; URRUTIA, J.J. and ELIAS, L.G. 1976. Nutritive quality improvement of diets based on corn. In: Improving the nutrient quality of cereals, II. H.L. Wilcke , University of Colorado: 288-319.
- BRIAN, P.W. 1966. The gibberelins as hormones. Int. Rev. Cytol., 19: 229-266.
- BRIGGS, D.E. 1972. Enzyme formation, cellular breakdown and the distribution of gibberellins in the endosperm of barley. Planta, 108: 351-358.
- BUTTROSE, M.S. 1963, Ultrastructure of developing endosperm. Aust. J. Biol. Sci., 16: 305-317.
- CHEN, R.F. and JONES, R.L. 1974a. Studies on the release of barley aleurone cell proteins: Kinetics of labelling. Planta (Berl.), 119: 193-206.

- CHEN, R.F. and JONES, R.L. 1974b. Studies on the release of barley aleurone cell proteins: Autoradiography. Planta (Berl.), 119: 207-220.
- CHRISPEELS, M.J. and VARNER, J.E. 1967a. Gibberelic acid enhanced synthesis and release of alpha-amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. Pl. Physiol., 42: 398-406.
- CHRISPEELS, M.J. and VARNER, J.E. 1967b. Hormonal control of enzyme synthesis: on the mode of action of gibberellic acid and abscisin in aleurone layers of barley. Pl. Physiol., 42: 1008-1016.
- CHRISPEELS, M.J.; TENNER, A.J. and JOHNSON, K.D. 1973 . Synthesis and release of sucrose by the aleurone layer of barley: regulation by gibberellic acid. Planta, 113: 35-46.
- CHRISTIANSSON, D.D.; NIELSEN, H.C.; KHOO, V.; WOLF, M.J. and WALL, J.S. 1969. Isolation and chemical composition of protein bodies and matrix proteins in corn endosperm. Cereal Chem., 46: 372-381.
- DALBY, A. and CAGAMPANG, G.B. 1970. Ribonuclease activity in normal, opaque-2 and flowry-2 maize endosperm during development. Pl. Physiol., 46: 142-144.
- DALBY, A. and DAVIES, I.I. 1967. Ribonuclease activity in the developing seeds of normal and opaque-2 maize. Science, 155: 1573-1575.
- DALE, J.E.; FELIPPE, G.M. and FLETCHER, G.M. 1972. Effects of shading the first leaf on growth of barley plants I. Longterm experiments. Ann. Bot., 36: 397-409.

- DA SILVA, W.J.; TEIXEIRA, J.P.F.; ARRUDA, P. and LOVATO, M. B. 1978. Nutrimaiz, a tropical sweet corn cultivar of high nutritional value. Maydica XXIII: 129-136.
- DECHARY, J.M. and ALTSCHUL, A.M. 1966. Major seed proteins and the concept of aleurins. Ad. Chem., World protein resources. R.F. Gould. 57: 148-157.
- DIMLER, R.J. 1966. Alcohol insoluble proteins of cereal grains. Fed. Proc., 25: 1670.
- DOIG, R.I.; COLBORNE, A.J.; MORRIS, G. and LAIDMAN, D.L. 1975. Enzymes of intermediary metabolism in the aleurone cells of germinating wheat. J. exp. Bot., 26: 399-410.
- DURE, L. 1960a. Cross nutritional contributions of maize endosperm and scutellum to germination growth of maize axis. Pl. Physiol., 35: 919-925.
- DURE, L. 1960b. Site of origin and extent of activity of amylases in maize germination. Pl. Physiol., 35: 925-934.
- DUVICK, D.N. 1961. Protein granules of maize endosperm cells. Cereal Chem., 38: 374-385.
- EASTWOOD, D. and LAIDMAN, D.L. 1971. The mobilization of macronutrient elements in the germinating wheat grains. Phytochem., 10: 1275-1284.
- EASTWOOD, D.; TAVENER, R.J.A. and LAIDMAN, D.L. 1969. Sequential action of cytokinin and gibberellic acid in wheat aleurone tissue. Nature, 221: 1267.
- EDELMAN, J.; SHIBKO, S.I. and KEYS, A.J. 1959. The role of scutellum of cereal seedlings in the synthesis and transport of sucrose. J. exp. Bot., 10: 178-189.

- ENGEL, C. 1947. The distribution of enzymes in resting cereals I. The saccharogenic amylase in wheat, barley and rye. Biochem. Biophys. Acta, 1: 42-49.
- EVERS, A.D. 1970. Development of the endosperm of wheat. Ann. Bot. (London), 34: 547-555.
- EVINS, W.H. 1977. Enhancement of polyribosome formation and induction of tryptophan-rich proteins by gibberellic acid. Biochem. N.Y., 10: 4295-4303.
- FELIPPE, G.M. and DALE, J.E. 1972. The uptake of $^{14}\text{CO}_2$ by developing first leaves of barley and partition of labelled assimilates. Ann. Bot., 36: 411-418.
- FELIPPE, G.M. and DALE, J.E. 1973. Effects of shading the first leaf of barley plants on growth and carbon nutrition of the stem apex. Ann. Bot., 37: 45-56.
- FIRN, R.D. 1975. On the secretion of α -amylase by barley aleurone layers after incubation in gibberellic acid. Planta, 125: 227-233.
- FILNER, P. and VARNER, J.E. 1967. A test for de novo synthesis with H_2^{18}O of barley α -amylase induced by gibberellic acid. Proc.-Nat. Acad. Sci., 58: 1520-1526.
- FISCHER, E.H. and STEIN, E.A. 1960. α -amylases. In: The Enzymes. IV. ed. Paul D. Boyler. Academic Press. New York: 313-343.
- FOLKES, B.F. 1970. The physiology of the synthesis of aminoacids and their movement into the seed proteins of plants. Proc. Nutr. Soc., 29: 12-20.
- FOLKES, B.F. and YEMM, E.W. 1956. The aminoacid content of the proteins of barley grains. Biochem J., 62:4-11.

- FOLKES, B.F. and YEMM, E.W. 1958. The respiration of barley plants. X. Respiration and metabolism of aminoacid proteins in germinating grain. New Physiol., 57: 106-131.
- FOLKES, B.F.; WILLIS, A.J. and YEMM, E.W. 1952. The respiration of barley plants. VII. The metabolism of nitrogen and respiration in seedlings. New Phytol., 51: 317-341.
- FRENCH, D. 1960. β -amylases. In: The Enzymes. IV. ed. Paul D. Boyler. Academic Press. New York: 345-368.
- FRYDENBERG, O. and NIELSEN, G. 1966. Amylase isoenzymes in germinating barley seeds. Hereditas, 54: 123-129.
- GARG, G.K. and VIRUPAKSHA, T.K. 1970. Acid protease from germinated sorghum. I. Purification and characterization of the enzyme. Eur. J. Biochem., 17: 4-12.
- GIBSON, R.A. and PALEG, L.G. 1972. Lysosomal nature of hormonally induced enzymes in wheat aleurone cells. Biochem. J., 128: 367-375.
- GLOVER, D.V. 1976. Improvement of protein quality in maize. In: Improving the nutrient quality of cereals II. H.L. Wilcke. University of Colorado: 69-97.
- GOLDSTEIN, L.D. and JENNINGS, P.H. 1975. The occurrence and development of amylase enzymes in incubated, de-embryonated maize kernels. Plant Physiol., 55: 893-898.
- GRAHAM, J.S.D.; MORTON, R.K. and RAISON, J.K. 1963. Isolation and characterization of protein bodies from developing wheat endosperm. Aust. J. Biol. Sci., 16: 375-383.
- HANSON, J.B.; VATTER, A.E.; FISHER, M.E. and BILS, R.F. 1959. The development of mitochondria in the scutellum of germinating corn. Agron. J., 51: 295-301.

- HARDIE, D.J. 1975. Control of carbohydrase formation by gibberellic acid in barley endosperm. Phytochem., 14: 1719-1722.
- HARVEY, B.M.R. and OAKS, A. 1974a. Characteristics of an acid protease from maize endosperm. Plant Physiol., 53: 449-452.
- HARVEY, B.M.R. and OAKS, A. 1974b. The hydrolysis of endosperm protein in Zea mays. Plant Physiology, 53: 453-457.
- HARVEY, B.M.R. and OAKS, A. 1974c. The role gibberellic acid in the hydrolysis of endosperm reserves in Zea mays. Planta (Berl.), 121: 67-74.
- HAWKER, J.S. 1971. Enzymes concerned with sucrose synthesis and transformation in seeds of maize, broad bean and castor bean. Phytochem., 10: 2313-2322.
- HIGGINS, T.J.V., ZWAR, J.A. and JACOBSEN, J.V. 1976. Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for amylase in barley aleurone layers. Nature, 260: 166-169.
- HO, D.T. and VARNER, J.E. 1974. Hormonal control of messenger ribonucleic acid metabolism in barley aleurone layers. Proc. Nat. Acad. Sci., 71: 4783-4786.
- HUMPHREYS, T.E. 1975. Maltose uptake in the Zea mays scutellum. Phytochem., 14: 333-340.
- INGLE, J. and HAGEMAN, R.H. 1965a. Metabolic changes associated with the germination of corn II: Nucleic acid metabolism. Plant Physiol., 40: 48-53.
- INGLE, J. and HAGEMAN, R.H. 1965b. Metabolic changes associated with germination of corn III: Effects of gibberellic acid on endosperm metabolism. Plant Physiol., 40: 672-675

- INGLE, J.; BEEVERS, L. and 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.
- INGVERSEN, J. and KØIE, B. 1972. Lysine rich proteins in the salt soluble fraction of barley. Phytochem., 12: 73-78.
- JACOBSEN, J.V. and KNOX, R.B. 1973. Cytochemical localization and antigenicity of α -amylase in barley aleurone tissue. Planta (Berl.), 112: 213-224.
- JACOBSEN, J.V. and VARNER, J.E. 1967. Gibberellic acid induced synthesis of protease by isolated aleurone layers. Plant Physiol., 42: 1596-1600.
- JACOBSEN, J.V. and ZWAR, J.A. 1974. Gibberellic acid causes increased synthesis of RNA which contains poly (A) in barley aleurone tissue. Proc. Nat. Acad. Sci., 71: 3290-3293.
- JACOBSEN, J.V.; SCANDALIOS, J.G. and VARNER, J.E. 1970. Multiple forms of amylase induced by gibberellic acid in isolated barley aleurone layers. Plant Physiol., 45: 367-371.
- JAMES, W.O. and JAMES, A.L. 1940. The respiration of barley germinating in the dark. New Phytol., 39: 145-176.
- JENNINGS, A.C.; MORTON, R.K. and PALK, B.A. 1963. Cytological studies of protein bodies of developing wheat endosperm. Austr. J. Biol. Sci., 16: 366-374.

- JOLIVET, E.; NICOL, M.; BOUDET, J. et MOSSÉ, J. 1970 .
Differences dans l'incorporation de $^{14}\text{CO}_2$, la lumière
chez de jeunes maïs normal et opaque-2. In: Improving
plant proteins by nuclear techniques. IAEA/FAO, STI/
PUB, Vienna, 258: 391-401.
- JONES, R.L. 1969a. The fine structure of barley aleurone
cells. Planta (Berl.), 85: 359-375.
- JONES, R.L. 1969b. Gibberellic acid and the fine structure
of barley aleurone cells I: Changes during the lag phase
of α -amylase synthesis. Planta (Berl.), 87: 119-133.
- JONES, R.L. 1969c. Gibberellic acid and the fine structure
of barley aleurone cells II: Changes during synthesis
and secretion of α -amylase. Planta (Berl.), 88: 73-86.
- JONES, R.L. 1971 . Gibberellic acid enhanced release of
 β -1,3-glucanase from barley aleurone cells. Plant
Physiol., 47: 412-416.
- JONES, R.L. 1972. Fractionation of the enzymes of the
barley aleurone layer: evidence for a soluble mode of
release. Planta (Berl.), 103: 95-109.
- JONES, R.L. and ARMSTRONG, J.E. 1971. Evidence for osmotic
regulation of hydrolytic enzyme production in germinating
barley seeds. Plant Physiol., 48: 137-142.
- JONES, R.L. and CHEN, R.F. 1976. Immunohistochemical loca-
lization of α -amylase in barley aleurone cells. J. Cell
Sci., 20: 183-198.
- JOY, K.W. and FOLKES, B.F. 1965. The uptake of aminoacids
and their incorporation into the proteins of excised
barley embryos. J. exp. Bot., 16: 646-666.

- JULIANO, B.O. and VARNER, J.E. 1969. Enzymic degradation of starch granules in cotyledons of germinating peas. Plant Physiol., 44: 886-892.
- JULIANO, B.O.; IGNACIA, C.C.; PANGANIBAN, J.M. and PEREZ, C.M. 1968. Screening for high protein rice varieties. Cereal Sci. Today, 13: 3.
- KHAN, A.A.; VERBEEK, A.; WATERS, E.C. and VAN ONCKELEN, H.A. 1973. Embryoless wheat grain. Plant Physiol., 51: 641-645.
- KHOO, V. and WOLF, M.J. 1970. Origin and development of protein granules in maize endosperms. Ann. J. Bot., 57: 1042-1050.
- LANDRY, J. et MOUREAUX, T. 1970. Hétérogénéité des glutelines du grain de maïs: extraction selective et composition en acides aminés de trois fractions isolées. Bull. Soc. Chem. Biol., 52: 1021-1026.
- LOCKER, A. and ILAN, I. 1975. On the nature of the hormonal regulation amylase activity in cotyledons of germinating peas. Plant and Cell Physiol., 16: 449-454.
- LOWE, L.B. and 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. and RIES, S.K. 1972. Relationship of seed protein and aminoacid composition to seedling vigour and yield of wheat. Agron. J., 64: 608-611.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

- MACLEOD, A. 1967. Gibberellin acid and malting. Wallerstein Laboratories Comm., 30 n^o 102/103: 85-95.
- MACLEOD, A. and PALMER, G.H. 1966. The embryo of barley in relation to modification of the endosperm. J. Inst.Brew., 72: 580-589.
- MACLEOD, A. and PALMER, G.H. 1967. Gibberellin from barley embryos. Nature (Lond.), 216: 1342-1343.
- MACLEOD, A. and PALMER, G.H. 1969. Interaction of indolyl-acetic acid and gibberellic acid in the synthesis of amylase by barley aleurone. New Phytol., 68: 295-304.
- MACWILLIAM, I.C. and HARRIS, G. 1959. The separation of limit dextrinase from R-enzyme and aspects of the activities of separated enzymes. Arch. Biochem. Biophys., 84: 442-454.
- MANNERS, D.J.; MARSHALL, J.S. and YELLOWLEES, D. 1970. The specificity of cereal limit dextrinases. Biochem. J., 116: 539-541.
- MAYER, A.M. and POLJAKOFF-MAYBER, A. 1975. The germination of seeds. Second Edition. Pergamon-Oxford.
- MCCOMB, A.J. 1961. "Bound" gibberellins in mature runner bean seeds. Nature (Lond.), 192: 575-576.
- MCNEIL, M.; ALBERSHEIM, P.; TAIZ, L. and JONES, R.L., 1975. The structure of plant cell walls. VII. Barley aleurone cells. Plant Physiol., 55: 64-68.
- MELVILLE, J.C. and SCANDALIOS, J.G. 1972. Maize endopeptidase. Genetic control, chemical characterization and relationship to an endogenous trypsin inhibitor. Biochem. Genet., 7: 15-31.

- MERTZ, E.T.; BATES, L.S. and NELSON, O.E. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content in maize endosperm. Science, 45: 279-280.
- MERTZ, E.T.; LLOYD, N.E. and BRESSANI, R. 1958. Studies on corn proteins II: Electrophoretic analysis of germ and endosperm extracts. Cereal Chem., 35: 146.
- METIVIER, J.R. 1975. Studies on the growth and photosynthesis of barley as affected by grain nitrogen and exogenously supplied nitrate. PhD Thesis - University Edinburgh.
- METIVIER, J.R. 1976. Quantitative and qualitative aspects of proteins in barley grain of differing endogenous nitrogen levels. Hoehnea, 6: 11-22.
- METIVIER, J.R. 1979. The effect of time of nitrate application upon the growth of barley cultivars of differing endogenous nitrogen levels: Longer term experiments. Ann. Bot., 43: 753-764.
- METIVIER, J.R. and DALE, J.E. 1977a. The utilization of endosperm reserves during early growth of barley cultivars and the effect of time application of nitrogen. Ann. Bot., 41: 715-728.
- METIVIER, J.R. and DALE, J.E. 1977b. The effects of grain nitrogen and applied nitrate on growth photosynthesis and protein content in the first leaf of barley cultivars. Ann. Bot., 41: 1287-1296.
- MILTHORPE, F.L. and MOORBY, J. 1974. An introduction to crop physiology. Cambridge University Press - Cambridge.

- MIKOLA, J. and KOLEHMAINEN, L. 1972. Localization and activity of various peptidases in germinating barley. Planta (Berl.), 104: 167-177.
- MISRA, P.S.; JAMBUNATHAN, R.; MERTZ, E.T.; GLOVER, D. F.; BARBOSA, H.M. and MACWHIRTE, K.L. 1972. Endosperm protein synthesis in maize mutants with increased lysine content. Science, 176: 1425-1427.
- MORINLA, M.A. and MICHAEL, G. 1973. Gibberellin like substances in developing barley grain and their relation to dry weight increase. Physiol. Plant., 29: 274-276.
- MOSSÉ, J.; BAUDET, J.; LANDRY, J. et MOUREAUX, T. 1966. Étude sur les protéines 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.
- MOUREAUX, T. et LANDRY, J. 1968. Extraction sélective des protéines du grain de maïs et en particulier de la fraction "glutelines". C.R. Acad. Sci., Paris, 266D; 2302.
- MOUREAUX, T. et LANDRY, J. 1972. La maturation du grain de maïs. Evolution qualitative et quantitative des différentes formes azotées. Physiol. Vég., 10: 1-19.
- MUNCK, L. 1972. Improvement of nutritional value in cereals. Hereditas, 72: 1-128.
- MURPHY, J.J. and DALBY, A. 1971. Changes in the protein fractions of developing normal and opaque-2 maize endosperm. Cereal Chem., 48: 336-349.

- NAGY, D.; WEIDL, W. and HIXON, R.M. 1941. Factors affecting the solubility of corn proteins. Cereal Chem., 18: 514.
- NAYLOR, J.M. 1966. Dormancy studies in seed of Avena fatua. 5. On the response of aleurone cells of gibberellic acid. Can. J. Bot., 44: 19-32.
- NAYLOR, J.M. 1969. Regulation of enzyme synthesis in aleurone tissue of Avena species. Can. J. Bot., 47: 2068 - 2072.
- NELSON, O.E. 1966. Mutant genes that change the composition of maize endosperm proteins. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 25: 1676-1678.
- NELSON, O.E. 1970. Improvement of plant protein quality. In: Improving plant proteins by nuclear techniques. IAEA/FAO, STI/PUB. Vienna, 258: 49-54.
- NELSON, O.E.; MERTZ, E.T. and BATES, L.S. 1965. Second mutant gene affecting the aminoacid pattern of maize endosperm proteins. Science, 150: 1469-1470.
- OAKS, A. 1965a. The regulation of nitrogen loss from maize endosperms. Can. J. Bot., 43: 1077-1082.
- OAKS, A. 1965b. The effect of leucine on the biosynthesis of leucine in maize root tips. Plant Physiol., 40: 149-155.
- OAKS, A. 1966. Transport of aminoacids to the maize root. Plant Physiol., 41: 173-180.
- OAKS, A. and BEEVERS, H. 1964. The glyoxylate cycle in maize scutellum. Plant Physiol., 39: 431-434.

- O'BRIEN, J.A. Jr. 1942. Cytoplasmic inclusions in the granular epithelium of wheat and rye. Amer. Jour. Bot., 29: 479-491.
- OGAWA, Y. 1966. Effects of various factors on the increase of α -amylase in rice endosperm induced by gibberellin A₃. Plant Cell Physiol., 7: 509-517.
- ORY, R.L. and HENNINGSEN, K.W. 1969. Enzymes associated with protein bodies isolated from ungerminated barley seeds. Plant Physiol., 44: 1488-1498.
- OSBORNE, T.B. 1895. The chemical nature of diastase. J. Amer. Chem. Soc., 17: 587-603.
- PALEG, L.G. 1960a. Physiological effect of gibberellic acid. I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. Plant Physiol., 35: 293-299.
- PALEG, L.G. 1960b. Physiological effect of gibberellic acid. II. On starch hydrolysing enzymes of barley endosperm. Plant Physiol., 35: 902-906.
- PALEG, L.G.; COOMBE, B.G. and BUTTROSE, M.S. 1962. Physiological effects of gibberellic acid. V. Endosperm responses of barley, wheat and oats. Plant Physiol., 37: 798-803.
- PALMIANO, E.P. and JULIANO, B.O. 1972. Biochemical changes in the rice grain during germination. Plant Physiol., 49: 751-756.
- PAULILO, M.T. 1980. Efeito de ácido giberélico e 6 benzil-adenina na utilização das reservas da semente de Phaseolus vulgaris L. cv. carioca. Tese de mestrado - UNICAMP.

- PAULIS, J.W. and WALL, J.S. 1971. Fractionation and properties of alkylated reduced corn glutelin proteins. Biochem. Biophys. Acta, 251: 57-70.
- PAULIS, J.W.; BIETZ, J.A. and WALL, J.S. 1975. Corn protein subunits: Molecular weights determined by sodium dodecyl - sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. J. Agr. Food Chem., 23: n^o 2, 197-201.
- PAULIS, J.W.; JAMES, C. and WALL, J.S. 1969. Comparison of glutelin proteins in normal and high-lysine corn endosperm. J. Agr. Food Chem., 17: 1301.
- PENNER, D. and ASHTON, F.M. 1967. Hormonal control of proteinase activity in squash cotyledons. Plant Physiol., 42: 791-796.
- POLLARD, C.J. 1969. A survey of the sequence of some effects of gibberellic acid in the metabolism of cereal grains. Plant Physiol., 44: 1227-1232.
- POLLARD, C.J. and NELSON, D.C. 1971. Apparent distinctiveness of the actions of gibberellic acid in aleurone layers. Biochem. Biophys. Acta, 244: 372-376.
- PRESTON, K.R. and KRUGER, J.E. 1976. Purification and properties of two proteolytic enzymes with carboxy-peptidase activity in germinated wheat. Plant Physiol., 58: 516-520.
- PRISCO, J.T.; ARNIOUZ, I.L. and MELO, S. de C. 1975. Changes in nitrogenous compounds and proteases during germination of Vigna sinensis seeds. Physiol. Plant., 33: 18-21.
- RADLEY, M. 1967. Site of production of gibberellin - like substances in germination of barley embryos. Planta (Berl.), 75: 164-171.

- RADLEY, M. 1969. The effect of the endosperm on the formation of gibberellin by barley embryos. Planta (Berl.), 86: 216-223.
- REED, H.S. 1904. A study of the enzyme secreting cells in seedlings of Zea mays and Phoenix dactylifera. Ann.Bot., 18: 267-287.
- RIES, S.K. 1971. The relationship of protein content and size of bean seed with growth and yield. Am Soc. Hort. Sci., 96: 557-560.
- RIGHETTI, P.G.; GIANAZZA, E.; VIOTTI, A. and SOAVE, C. 1977. Heterogeneity of storage proteins in maize. Planta (Berl.), 136: 115-123.
- ROSWELL, E.V. and GOAD, L.J. 1962. Latent β -amylase of wheat: its mode of attachment to glutelin and its release. Biochem. J., 84: 73-74.
- SCHWEIZER, C.J. and RIES, S.K. 1969. Protein content of seed increases growth and yield. Science, N.Y., 165: 73-75.
- SGARBIERI, V.C.; da SILVA, W.J.; ANTUNES, P.L. and AMAYA, F.J. 1977. Chemical composition and nutritional properties of a sugary 1-opaque-2 (su_1o_2) variety of maize (Zea mays L.). J. Agr. Food Chem., 25: 1098-1101.
- SNEDECOR, G.W. 1962. Statistical Methods. The Iowa State University Press, USA.
- SODEK, L. 1973. Corn proteins. Boletim 011 do Centro de Energia Nuclear da Agricultura - CENA - Piracicaba - Brasil.
- SODEK, L. and WILSON, C.M. 1970. Incorporation of leucine- ^{14}C and lysizine- ^{14}C into protein in the developing en -

- dosperm of normal and opaque-2 corn. Arch. Biochem. Biophys., 140: 29-38.
- SODEK, L. and WILSON, C.M. 1971. Aminoacid composition of proteins isolated from normal, opaque-2 and flowry-2 corn endosperms by a modified Osborne procedure. J. Agr. Food Chem., 19 n^o 6: 1144-1150.
- SODEK, L. and WILSON, C.M. 1973. Metabolism of lysine and leucine derived from storage protein during the germination of maize. Biochem. Biophys. Acta, 304: 353-362.
- SPLITTSTOESSER, W.E. 1967. The metabolism of glutamate and leucine by maize tissues. Phytochem., 6: 933-939.
- STEIN, O.L. and QUASTLER, H. 1963. The use of tritiated thymidine in the study of tissue activation during germination in Zea mays. Am. J. Bot., 50: 1006-1011.
- STEWART, C.R. 1971. Some characteristics of the uptake of glutamine by corn scutellum. Plant Physiol., 47: 157-161.
- STODDART, J.L. 1971. Sequential changes in amylase iso - enzymes during grain maturation in barley. Planta (Berl.) 97: 70-82.
- SUBRAMANIAN, S.J.; JAMBUNATHAN, R.; CONCON, J.M. and MERTZ, E.T. 1970. Simple methods for determining lysine and tryptophan in high-lysine and normal maize. Federation Proc., 29: 761.
- SUGE, H. and GALLARDIO, M.F. 1977. Changes of gibberellins during seed and pericarp development in common bean with special reference to abortion. J. Crop. Sci., 46 n^o 3: 371-378.

- SUNDBLOM, N. and MIKOLA, J. 1972. On the nature of protei-
nases secreted by the aleurone layer of barley grain .
Physiol. Plant, 27: 281-284.
- SUTCLIFFE, J.F. and BASET, Q.A. 1973. Control of hydro -
lysis of reserve materials in the endosperm of germinat-
ing oat grains. Plant Sci. Le H., 1: 15-20.
- TAIZ, L. and HONIGMAN, W.A. 1976. Production of cell wall
hydrolyzing enzymes by barley aleurone layers in response
to gibberellic acid. Plant Physiol., 58: 380-386.
- TAIZ, L. and JONES, R.L. 1970. Gibberellic acid, β -1,3 -
glucanase and the cell walls of barley aleurone layers.
Planta (Berl.), 92: 73-84.
- TAIZ, L. and JONES, R.L. 1973. Plasmodesmata and an asso-
ciated cell wall component in barley aleurone tissue .
Am. J. Bot., 60: 67-75.
- TAVENER, R.J.A. and LAIDMAN, D.L. 1972. The induction of
lipase activity in the germinating wheat grain. Phytochem.
11: 989-997.
- TOOLE, E.H. 1924. The transformations and course of deve -
lopment of germinating maize. Amer. J. Bot., 11: 325-350.
- TRONIER, B. and ORY, R.L. 1970. Association of bound α -
amylase with protein bodies in barley. Cereal Chem., 47:
484.
- TULLY, R.E. and BEEVERS, H. 1978. Protease and peptidases
of castor bean endosperm. Plant Physiol., 62: 746-750.
- TURNER, N.A. and REDGWELL, R.J. 1966. A mixed layer for
separation of aminoacids by thin layer chromatography .
J. Chromatogr., 21: 129-132.

- URION, E. et GOLOVTCHENKO, V. 1940. Composition azotée de l'orge: influence de la finesse de mouture sur l'extraction saline. Bull. Soc. Chim. Biol. Paris, 22: 203-212.
- URRUTIA, J.J.; GARCIA, B.; BRESSANI, R. and MATA, L.J. 1976. Report of the maize fortification project in Guatemala. In: Improving the nutrient quality of cereal. II. H.L. Wilcke. University of Colorado: 28-68.
- VAN ONCKELEN, H.A.; CAUBERGS, R. and DE GREEF, J.A. 1977. Effect of light treatment and endogenous growth hormones on α and β -amylase activities in cotyledons of Phaseolus vulgaris L. Plant cell Physiol., 18: 1029-1040.
- VARNER, J.E. and MENSE, R.M. 1972. Characteristics of the process of enzyme release from secretory plant cells. Plant Physiol., 49: 187-189.
- VARNER, J.E. and RAM-CHANDRA, G. 1964. Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm. Proc. Nat. Acad. Sci., 52: 100-106.
- VIGIL, E.L. and RUDDAT, M. 1973. Effect of gibberellic acid and actinomycin D on the formation and distribution of rough endoplasmatic reticulum in barley aleurone cells. Plant Physiol., 51: 549-558.
- WILSON, C.M. and ALEXANDER, D.E. 1967. Ribonuclease activity in normal and opaque-2 mutant endosperm of maize. Science, 157: 556-557.
- WOLF, M.J. and KHOO, U. 1970. Mature cereal grain endosperm: Rapid glass knife sectioning for examination of proteins. Stain Technol., 45: 277-283.

- WOLF, M.J.; KHOO, U. and SECKINGER, H.L. 1967. Subcellular structure of endosperm in high lysine and normal corn. Science, 157: 556-557.
- WOLF, M.J.; KHOO, U. and SECKINGER, H.L. 1969. Distribution and subcellular structure of endosperm in varieties of ordinary and high lysine maize. Cereal Chem., 46: 253-263.
- YEMM, E.W. and WILLIS, A.J. 1954. The estimation of carbohydrates in extracts by anthrone. Biochem. J., 57: 508-514.
- YOMO, J. 1961. Amylase-activating substance in the culture solution of barley embryo and the extract of barley green malt. Chem. Abst., 55: 26145.

* * *