

PAULO ARRUDA

Síntese de Aminoácidos e Proteínas, e Características Físicas e Químicas em Endospermas normal e *sugary opaque-2*, durante o Desenvolvimento da semente do Milho.

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

Orientador: William José da Silva

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP

AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PRE-
ÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: Paulo Arruda

Nº de Identificação: 775389

Endereço para Correspondência: Depto. Genética e Evolução, IB - UNICAMP

Curso: Biologia Vegetal

Nome do Orientador: Prof.Dr. William José da Silva

Título da Dissertação ou Tese: Síntese de Aminoácidos e Proteínas, e Caracterís-
ticas Físicas e Químicas em Endospermas normal e sugary opaque-2, durante o desen-
volvimento da Semente do Milho.

Data proposta para a Defesa: 06/12/79

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir des-
ta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou
Tese a interessados.

13 / 11 / 79

Data

assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a
partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha
Dissertação ou Tese a interessados.

/ /

Data

assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consul-
te, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o forne-
cimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a in-
teressados.

/ /

Data

assinatura do aluno

De acordo

Orientador

A minha esposa Regina

Dedico

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. William José da Silva, Chefe do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela orientação decisiva, pela visão de ciência com que nos estimula e sobretudo pela grande amizade.

Ao Engenheiro Agrônomo João Paulo Feijão Teixeira, Chefe da seção de Fitoquímica do Instituto Agrônômico de Campinas, pela colaboração prestada, amizade e disponibilidade de seu laboratório para a realização de algumas análises químicas.

Ao Dr. José Romano Gallo, que gentilmente cedeu o uso de aparelhos de seu laboratório, na seção de Química Analítica do Instituto Agrônômico de Campinas.

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

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

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações gerais	1
1.2. Aspecto nutricional	2
1.3. Proteínas do milho	3
1.4. Localização das proteínas no endosperma	4
1.5. Fracionamento das proteínas do endosperma ...	7
1.6. Mutantes que afetam o metabolismo de protei - nas e aminoácidos no endosperma	14
2 - OBJETIVOS	24
3 - MATERIAL E MÉTODO	26
3.1. Germoplasma e técnica de polinização	26
3.2. Material para análise	30
3.3. Preparação dos endospermas	30
3.4. Extração de exudato do sistema vascular do pe- dúnculo da espiga	32
3.5. Análises químicas e bioquímicas	33
3.5.1. Determinação de nitrogênio total	35
3.5.2. Fracionamento de proteínas	35
3.5.3. Análise de aminoácidos	35
3.5.4. Determinação de potássio, magnésio e fósforo	38
4 - RESULTADOS	39
4.1. Acúmulo de matéria seca, nitrogênio, água, po- tássio, magnésio e fósforo nos endospermas .	39
4.2. Distribuição de nitrogênio nas frações protei- cas	45
4.2.1. Fração 1	45
4.2.2. Zeína	47
4.2.3. Glutelina-1	51
4.2.4. Glutelina-2	51
4.2.5. Glutelina-3	51
4.2.6. Resíduo	52
4.3. Conteúdo de aminoácidos no exudato do sistema vascular do pedúnculo	52

4.4. Comparação entre as composições de aminoácidos dos endospermas normal e <i>sugary opaque-2</i>	54
4.5. Conteúdo dos aminoácidos no endosperma : estimado vs observado	62
4.5.1. Aminoácidos da família do aspartato	62
4.5.2. Ácido glutâmico, glutamina, leucina e alanina	71
4.5.3. Triptofano	75
5 - DISCUSSÃO	77
5.1. Interrelações entre características físicas e químicas do endosperma, durante o desenvolvimento da semente	77
5.2. Biossíntese de aminoácidos	83
6 - CONCLUSÕES	90
7 - RESUMO	92
8 - SUMMARY	95
9 - BIBLIOGRAFIA	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pag.
1 - Técnica de polinização dupla, utilizada para obtenção de endospermas normais e duplo mutante na mesma espiga	28
2 - Espigas obtidas através de polinização dupla (direita) e através de mistura de polen normal com duplo mutante na proporção de 1:1 (esquerda).....	31
3 - Sistema para extração de exudato dos feixes vasculares do pedúnculo de espigas de milho.	34
4 - Acúmulo de matéria seca, água, nitrogênio, potássio, magnésio e fósforo nos endospermas normal (quadrados) e <i>sugary opaque-2</i> (círculos), durante o desenvolvimento da semente. As barras indicam LSD a nível de 5% de probabilidade	42
5 - Distribuição das frações proteicas nos endospermas normal (quadrados) e <i>sugary opaque-2</i> (triângulos) durante o desenvolvimento da semente (mg/endosperma)	48
6 - Comparação entre as aminogramas do exudato (A) e dos endospermas <i>sugary opaque-2</i> (B) e normal (C) analisados aos 7 DAP	57
7 - Comparação entre os aminogramas do exudato (A) e dos endospermas <i>sugary opaque-2</i> (B) e normal (C) analisados aos 14 DAP	58
8 - Comparação entre os aminogramas do exudato (A) e dos endospermas <i>sugary opaque-2</i> (B) e normal (C) analisados aos 28 DAP	60
9 - Comparação entre os aminogramas do exudato (A) e dos endospermas <i>sugary opaque-2</i> (B) e normal (C) analisados aos 42 DAP	61

10 -	Biossíntese dos aminoácidos da família do aspartato	63
11 -	Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de ácido aspártico + asparagina nos endospermas <i>sugary opaque-2</i> (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente	65
12 -	Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de lisina nos endospermas <i>sugary opaque-2</i> (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente	66
13 -	Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de metionina nos endospermas <i>sugary opaque-2</i> (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente.	67
14 -	Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de treonina nos endospermas <i>sugary opaque-2</i> (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente	68
15 -	Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de isoleucina nos endospermas <i>sugary opaque-2</i> (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente	69
16 -	Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de ácido glutâmico + glutamina nos endospermas <i>sugary opaque-2</i> (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente	72
17 -	Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de leucina nos endospermas <i>sugary opaque-2</i> (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente.	73
18 -	Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de alanina nos endospermas, <i>sugary opaque - 2</i> (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente.	74

- 19 - Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de triptofano nos endospermas *sugary opaque-2* (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente 76

LISTA DAS TABELAS

TABELA	Pág.
1 - Esquema de OSBORNE para classificação de proteínas	4
2 - Sequência <u>D</u> do método de LANDRY-MOUREAUX (1970) pa ra a extração seletiva das proteínas do milho.....	36
3 - Comparação entre o endosperma normal e endosperma duplo mutante, quanto as quantidades de nitrogênio total, umidade, potássio, magnésio e fósforo, du - rante o desenvolvimento da semente	40
4 - Coeficiente de correlação entre as características físicas e químicas dos endospermas normal (valores superiores) e <i>sugary opaque-2</i> (valores inferiores)	44
5 - Distribuição de Nitrogênio nas frações proteicas (porcento/N total) dos endospermas normal e <i>sugary opaque-2</i> durante o desenvolvimento da semente.....	46
6 - Coeficiente de correlação entre a fração 1 e o con teúdo de água e minerais nos endospermas normal (valores superiores) e <i>sugary opaque-2</i> (valores in feriores)	49
7 - Diferenças de N total e zeína entre os endospermas normal e <i>sugary opaque-2</i> durante o desenvolvimen to da semente.....	50
8 - Conteúdo de nitrogênio e composição de aminoácidos no exudato do sistema vascular do pedúnculo duran te o desenvolvimento da espiga.....,.....	53
9 - Composição de aminoácidos (mol%) nos endospermas normal e <i>sugary opaque-2</i> , durante o desenvolvimen to da semente	55

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações gerais

Uma grande proporção das proteínas que o homem neceta para a sua nutrição, são fornecidas pelos vegetais. Em algumas áreas desenvolvidas do mundo, os cereais constituem a base da alimentação, atuando principalmente como fonte de calorias. Contribuem ainda, com uma proporção significativa do total de proteínas consumido pelos animais.

Entre os cereais, o milho destaca-se como o terceiro mais importante produto para o consumo humano, sendo superado somente pelo arroz e o trigo (JOHNSON e LAY, 1974). Em alguns países da América Latina e África, o milho constitui-se numa das principais fontes de calorias e proteínas na dieta humana.

Muito embora o milho seja considerado, uma excelente fonte de carboidratos, suas proteínas são relativamente de baixa qualidade nutritiva, em virtude do baixo teor dos aminoácidos essenciais lisina e triptofano. Essa deficiência constitui-se no maior obstáculo para a utilização do milho na nutrição hu

mana.

1.2 - Aspecto nutricional

Em sua composição, o milho apresenta todas as principais classes de alimentos, ou sejam, carboidratos, óleos e proteínas. Cem gramas de milho contém aproximadamente 83,0 g de carboidratos, 4,9 g de lipídeos e 10,6 g de proteínas. As diferentes partes da semente de milho, possuem diferentes proporções desses componentes. O germe, que representa cerca de 11% da semente, encerra em média 35% de óleo e cerca de 20% de proteínas. O endosperma, armazena a maior parte dos carboidratos e das proteínas da semente. Nesse tecido, ocorre em média 89,0% de carboidratos, 9,5% de proteínas e cerca de 1,0% de óleo.

Dos tres componentes básicos, somente a proteína é nutricionalmente deficiente, tendo em vista que 50% da proteína total do endosperma, correspondente a fração de prolamínas, apresenta apenas traços de lisina e triptofano (BAUDET *et al.*, 1966; MOSSÉ *et al.*, 1966).

As proteínas do endosperma, que compreendem cerca de 85% da proteína total da semente, contem aproximadamente 1,7% de lisina, estando pois muito abaixo do valor 4,2% estabelecido pela FAO (Food and Agricultural Organization of The United Nations, 1957), como requerimento de lisina na alimentação humana. A pequena quantidade não só de lisina como também de triptofano, resulta numa deficiência nutricional quando o milho é utilizado como única fonte de proteínas. Crianças em

desenvolvimento, alimentadas com uma grande proporção de milho em sua dieta ficam letárgicas, e mais vulneráveis às doenças (SODEK, 1973). Esses efeitos ocorrem com frequência em populações pobres dos países subdesenvolvidos.

Essas deficiências tem estimulado os melhoristas de milho a realizarem grandes esforços na tentativa da melhoria da qualidade nutritiva do milho, apesar do aumento da quantidade do produto ser ainda prioritário, em regiões subdesenvolvidas.

Vários mutantes tem sido identificados nos últimos anos (MERTZ *et al.*, 1965), os quais possuem teores mais elevados de lisina e triptofano no endosperma. Esses novos tipos, quando testados quanto a sua qualidade nutritiva, apresenta-se invariavelmente superiores ao milho comum (MERTZ *et al.*, 1965; CHI e SPEERS, 1973; NELSON e MERTZ, 1973).

Esses mutantes, além do significado econômico, oferecem ainda, grandes possibilidades para a execução de estudos básicos visando um melhor entendimento dos mecanismos de controle da síntese de aminoácidos e proteínas no endosperma. Esses conhecimentos são de fundamental importância para a orientação de programas de melhoramento visando o aumento da qualidade nutritiva do milho.

1.3 - Proteínas do milho

As proteínas do milho podem ser classificadas de acordo com suas solubilidades, através de um esquema básico estabelecido por OSBORNE e colaboradores (CHITTENDEN e OSBORNE, 1891; OS-

BORNE, 1897; OSBORNE e MENDEL, 1914). Esse sistema classifica as proteínas, com base nas suas solubilidades em quatro solventes bem definidos: água, solução salina (NaCl 0,5 M), etanol 70-80% e hidróxido de sódio diluído (Tabela 1).

Tabela 1 - Esquema de OSBORNE para a classificação de proteínas.

Solvente	Classe Proteica	Proteína do milho
Água	Albuminas	Albuminas
Solução salina	Globulinas	Globulinas
Etanol 70-80 %	Prolaminas	Zeína*
NaOH diluído	Glutelinas	Glutelinas

*A denominação zeína à prolamina do milho, deve ao nome da espécie *Zea mays* L.

As albuminas e globulinas encontram-se solubilizadas no citoplasma das células do endosperma. As enzimas encontradas nesse tecido acompanham essas frações (DALBY e DAVIES, 1967; WILSON e ALEXANDER, 1967). As prolaminas e glutelinas, específicas de cereais, são as principais proteínas de reserva que ocorrem no endosperma.

1.4 - Localização das proteínas no endosperma

Esse tecido que encerra cerca de 85% da proteína to-

tal da semente de milho, apresenta 80% desse total como zeína e glutelina, sendo a zeína responsável por 50% desse conteúdo.

Durante o desenvolvimento da semente dos cereais , as proteínas de reserva são sintetizadas nas células do endosperma e depositados em grânulos bem definidos, delimitados por uma membrana simples e descontínua (ASHTON, 1976), denominados corpúsculos proteicos (C.P.) (DUVICK, 1961; CHRISTIANSON *et al.*, 1969; CHRISTIANSON *et al.*, 1974; MORTON *et al.*, 1964 ; KHOO e WOLF, 1970; INGVERSEN, 1975; BURR e BURR, 1975; BURR e BURR, 1977).

Cerca de 95% da proteína do corpúsculo proteico é constituída de zeína (RIGHETTI *et al.*, 1977). O aparecimento desses corpúsculos coincide com o início da síntese de zeína e a máxima taxa de seu crescimento está positivamente correlacionada com a máxima taxa de síntese de zeína (DUVICK, 1961). Na semente madura esses corpúsculos encontram-se imersos numa matriz proteica amorfa. Embora a composição de aminoácidos da matriz seja diferente da composição da glutelina (CHRISTIANSON *et al.*, 1969), alguns autores tem considerado essa proteína como a responsável pela constituição da matriz proteica amorfa (KHOO e WOLF, 1970). Uma vez iniciada a formação dos corpúsculos proteicos, estes aumentam em número e tamanho, sendo inicialmente visíveis nas primeiras camadas de células de amido (KHOO e WOLF, 1970). Com o decorrer do desenvolvimento da semente, os corpúsculos proteicos são mais abundantes nas células sob a camada de aleurona, diminuindo progressivamente de tamanho em direção ao interior do endosperma (DUVICK, 1961; KHOO e WOLF, 1970; BAENZIGER e GLOVER, 1977).

Em mutantes ricos em lisina, o número e o tamanho dos corpúsculos proteicos são drasticamente reduzidos (CHRISTIANSON *et al.*, 1974) ou praticamente ausentes (BAENZIGER e GLOVER, 1977; WOLF *et al.*, 1969). Paralelamente a esse efeito há um aumento da proteína que constitui a matriz amorfa (BAENZIGER e GLOVER, 1977).

A diminuição ou ausência desses corpúsculos proteicos em mutantes ricos em lisina está correlacionada com a diminuição na síntese de zeína nesses tipos de endosperma.

Quanto a origem dos corpos proteicos, alguns autores tem revelado opiniões divergentes. MORTON e RAISON, 1964, concluíram em seus trabalhos, que os corpúsculos proteicos originam-se em plastídeos especiais, formadores de proteínas os quais possuem polirribossomos distintos daqueles encontrados no retículo endoplasmático rugoso (RER). Por outro lado, KHOO e WOLF (1970), analisando a ultraestrutura de sementes de milho em desenvolvimento, concluíram que os corpúsculos originam-se em visículas produzidas pelo RER.

Estudos mais recentes, envolvendo isolamento de polirribossomos e síntese de proteínas *in vitro*, tem demonstrado que as prolaminas do corpúsculo proteico de endosperma de milho (BURR e BURR, 1976; LARKINS *et al.*, 1976; LARKINS e DALBY, 1975; JONES *et al.*, 1977a; JONES *et al.*, 1977b) e em endosperma de cevada (BRANDT e INGVERSEN, 1977), são sintetizadas pelos polirribossomos ligados à membrana do corpúsculo. Em vista disso, alguns autores tem concluído que essas estruturas são sítios de síntese de proteínas, altamente diferenciadas (BURR e BURR, 1976; WALK e HOCK, 1977).

Recentemente, LARKINS *et al.* (1978) demonstraram que a membrana que envolve o corpúsculo proteico, apresenta continuidade com o RER, e que as prolaminas, sintetizadas pelos polirribossomos ligados a membrana do C. P. e pelos ribossomos ligados ao RER são similares. Esses resultados, associados à análise ultraestrutural detalhada levaram esses autores a concluir que os C. P. são formados simplesmente a partir de depósitos dentro das cisternas do RER, concordando assim com o que havia sido proposto por KHOO e WOLF (1970).

Em resumo, os estudos sobre a localização das proteínas no endosperma de milho, revelam que:

- 1 - As albuminas e globulinas, sendo proteínas salino-solúveis, devem estar solubilizadas no citoplasma das células do endosperma.
- 2 - A zeína apresenta-se em visfículas envolvidas por uma membrana simples, originadas a partir de depósitos dessa proteína ao longo das cisternas do retículo endoplasmático rugoso.
- 3 - As glutelinas parecem apresentar-se como uma matriz amorfa, ao longo do citoplasma das células do endosperma.

1.5 - Fracionamento das Proteínas do endosperma

As proteínas do endosperma de milho são uma mistura complexa de polipeptídeos, cuja heterogenidade dificulta a caracterização das diversas classes proteicas. As frações de albuminas, globulinas e zeína, podem ser separadas através de uma

extração sequencial, com água, solução salina (NaCl 0,5 M) e etanol 70%, segundo o método básico, já citado, estabelecido por OSBORNE. A proteína residual, constituída por glutelina, é a segunda maior proteína de reserva de milho e pode ser extraída com NaOH 0,2% segundo OSBORNE e MENDEL, (1914). Entretanto esse procedimento não é satisfatório, pois a glutelina assim extraída, apresenta quantidades variáveis de zeína (contaminação) (DALBY, 1966; DIMLER, 1966; PAULIS *et al.*, 1969).

Com base no procedimento de OSBORNE, algumas modificações foram efetuadas, tentando-se melhorar a extração de proteínas do milho. A inclusão de uma extração a quente com etanol 70% (MOSSÉ *et al.*, 1966) logo após a extração da zeína, extrai uma proteína com uma composição de aminoácidos entre prolamínas e glutelinas. Provavelmente a extração alcoólica a quente reduz alguns grupos S-S, descontaminando levemente a glutelina.

Outra tentativa para a solução desse problema, consiste na adição de acetato de sódio 0,5%, na solução alcoólica para a extração da zeína (PAULIS *et al.*, 1969). Essa inclusão extrai uma quantidade maior de zeína, com uma composição de aminoácidos um pouco diferente daquela extraída somente com etanol 70%.

MERTZ e colaboradores, (MERTZ e BRESSANI, 1957 ; MERTZ *et al.*, 1958; LLOYD e MERTZ, 1958; BRESSANI e MERTZ, 1958) introduziram um método de extração, no qual primeiramente toda a proteína é extraída com uma solução de cobre alcalina. Em seguida o extrato é ajustado a pH 3 para precipitar a zeína e a

glutelina, deixando as proteínas ácido-solúveis (albuminas e globulinas) no sobrenadante. O precipitado é dissolvido em etanol a pH 11,5 , e em seguida baixado para o pH 6, para precipitar as glutelinas, deixando a zeína no sobrenadante. O procedimento de MERTZ tem uma desvantagem, pois a zeína e a fração ácido-solúvel apresenta-se contaminadas com proteínas de outras classes.

Em 1968, MOUREAUX e LANDRY, propuseram modificações no método de OSBORNE, tentando eliminar o problema de contaminação da glutelina. Eles propuseram uma segunda extração alcoólica da zeína , com a adição de 2-mercaptoetanol, o qual reduz as ligações dissulfeto que provavelmente fazem pontes entre a zeína e a glutelina. Nesse procedimento solubilizou-se uma proteína semelhante à zeína na composição de aminoácidos , e que participa com cerca de 10% do nitrogênio total do endosperma . Mais tarde essa proteína passou a ser denominada de zeína - 2 (Z-2) por (SODEK e WILSON, 1971).

O fracionamento de proteínas do endosperma de milho assumiu um novo aspecto com o trabalho de LANDRY e MOUREAUX , (1970). Esses autores apresentaram um novo método, no qual a glutelina pode ser separada em tres subfrações; glutelina - 1 (G-1), glutelina-2 (G-2) e glutelina-3 (G-3). Nesse procedimento as albuminas e globulinas são extraídas na mesma fração, com uma solução de cloreto de sódio 0,5 M. Após essa extração salina, as proteínas salino-solúveis são precipitadas com ácido tricloroacético 5%, para se efetuar a separação dos aminoácidos livres que também são solubilizados nessa fração. Em seguida , procede-se a extração da zeína com isopropanol 70%. A composi-

ção de aminoácidos da zeína solubilizada com isopropanol aquoso é semelhante àquela extraída com etanol pelo método de OSBORNE. Depois da extração da zeína, uma extração alcoólica com isopropanol 70%, contendo 0,6% de 2-mercaptoetanol é efetuada para extrair a glutelina-1 (G-1). É importante ressaltar que essa fração corresponde a zeína-2 (Z-2) do método de OSBORNE modificado. As características de prolaminas são apenas atenuadas em G-1, pois esta se assemelha à zeína verdadeira. Após a extração de G-1, a glutelina-2 é extraída com tampão borato pH 10 contendo 0,6% de 2-ME. Essa proteína se diferencia da zeína por apresentar uma frequência de cargas básicas semelhantes as proteínas salino-solúveis. Por outro lado ela diferencia das proteínas salino-solúveis por ser deficiente em lisina. A fração G-2 apresenta uma característica singular. É intermediária entre as proteínas salino-solúveis e prolaminas sendo entretanto mais próxima da segunda. Finalmente a glutelina-3 (G-3) é extraída com o mesmo solvente de G-2, contendo em adição 0,5% de dodecil sulfato de sódio. A fração G-3 é bastante semelhante às proteínas salino-solúveis, porém com um pequeno conteúdo de resíduos básicos compensado por uma quantidade de resíduos hidrófobos. Parece ser originada em parte de agregações de albuminas e globulinas através de pontes dissulfeto (MOREAUX e LANDRY, 1972).

Apesar do método de LANDRY-MOREAUX apresentar uma ótima resolução no fracionamento das proteínas do milho, PAULIS e colaboradores tem se utilizado de um método de fracionamento, mais simplificado, e também mais rápido, o qual é bastante indicado para análises de rotina (PAULIS e WALL, 1971; PAULIS *et al.*, 1975; PAULIS e WALL, 1977).

Nesse método, as albuminas são extraídas segundo os métodos tradicionais (NaCl 0,5 M). A zeína é extraída com etanol 70% contendo 0,5% de acetato de sódio. Essa extração tem sido mais eficiente que os outros métodos pois extrai uma quantidade maior de zeína. Após a extração da zeína, PAULIS trata o resíduo com etanol 70% contendo 0,5% de acetato de sódio mais a adição de 0,1 M de 2-ME, solubilizando uma proteína a qual ele denominou de glutelina reduzida solúvel em álcool (ASG). Essa proteína apresenta as mesmas características de G-1 de LANDRY-MOUREAUX (1970) e Z-2 de SODEK e WILSON (1971). Recentemente PAULIS e WALL, (1977) demonstraram que essa fração pode ser dividida em duas subfrações, das quais uma apresenta alta concentração de metionina. Finalmente o nitrogênio proteico residual é considerado por PAULIS e colaboradores como sendo glutelina.

Os estudos relacionados com o fracionamento das proteínas do milho não ficaram somente na separação das classes proteicas ou nas suas subfrações, mas continuaram com métodos mais sofisticados tais como eletroforese em gel, filtração em gel, focusção isoeletrica, etc., com vistas a uma melhor caracterização das subunidades das classes proteicas. O interesse foi ainda maior, com a descoberta dos mutantes de endosperma ricos em lisina (MERTZ *et al.*, 1964; NELSON *et al.*, 1965), pois diferenças qualitativas e/ou quantidades entre as proteínas do endosperma desses mutantes em comparação com o endosperma normal, começaram a ser procuradas, para se tentar elucidar a ação primária desses genes. Assim, com a aplicação da eletroforese e da cromatografia em gel, verificou-se que tanto as albuminas quanto as globulinas são uma mistura heterogênea de proteínas ou po

lipeptídeos, apresentando mais de 10 subunidades cada uma, com pesos moleculares bem distintos variando entre 10 e 120.10^3 daltons (MOUREAUX e SALLANTIN, 1967; PAULIS *et al.*, 1975; PAULIS e WALL, 1969).

Embora existam alguns estudos com relação as proteínas salino-solúveis, a maior atenção tem sido dada a fração de zeína, principalmente pelo fato desta ser drasticamente reduzida nos mutantes de endosperma ricos em lisina. A zeína, extraída com soluções alcoólicas pelo método de OSBORNE modificado, pode ser separada em dois componentes α e β -zeína, sendo que a primeira subfração representa cerca de 80% da zeína total do endosperma. Quando as ligações dissulfeto dessas duas subfrações são reduzidas, tanto a α quanto a β -zeína produzem padrões eletroforéticos semelhantes. Se as ligações dissulfeto não são reduzidas a β -zeína não migra no gel. Com isso, TURNER *et al.*, (1965) concluíram que a β -zeína é um agregado de pequenas subunidades polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto.

Duas subfrações de zeína designadas de *zeína-1* (Z-1) e *zeína-2* (Z-2), foram estudadas também por SODEK e WILSON, (1971). Tanto Z-1 como Z-2 apresentam duas bandas maiores e duas menores em gel de poliacrilamida, sendo que Z-2 possui as bandas maiores, semelhantes à Z-1, e as bandas menores com maior intensidade. Esses dados foram confirmados posteriormente através de eletroforese e focalização isoeletrica por SOAVE *et al.*, (1975) e GIANAZZA *et al.*, (1976), porém com um pouco mais de detalhe. Uma mistura de zeína (Z-1 + Z-2) apresentaram quatro subunidades; duas com pesos moleculares de 23000 (Z-23) e 21000 (Z-21), uma com peso molecular de 13500 (Z-13,5) e outra com

peso molecular de 9600 (Z-9,6). As bandas maiores representam cerca de 70% da zeína total do endosperma, sendo que Z-1 consiste essencialmente de uma população misturada de Z-23 e Z-21. A subunidade Z-2 é rica em Z-21 e contém uma população adicional de Z-13,5 e Z-9,6 (RIGUETTI *et al.*, 1977).

Estudos mais detalhados, usando focusão isoelétrica, tem revelado uma heterogenidade ainda maior da fração de zeína (RIGUETTI *et al.*, 1977; GIANAZZA *et al.*, 1977). Tanto Z-1 como Z-2 apresentam cerca de 15 subunidades com pontos isoelétricos bem distintos, variando entre pH 5 e 9. As duas subunidades maiores de zeína apresentam um grupo central de bandas, sendo que Z-2 apresenta bandas adicionais com pI baixos, enquanto que Z-1 apresenta bandas adicionais com pI altos.

A heterogenidade de uma pequena porção de zeína é causada pela presença de grupos prostéticos, sendo que de 3 a 5% da população total dessa proteína foi considerada lipoproteína que participa provavelmente da membrana que envolve o corpúsculo proteico (RIGUETTI *et al.*, 1977). Além disso, cerca de 90% dos ácidos glutâmico e aspártico dessa proteína apresentam-se como asparagina e glutamina, e uma possível deaminação *in vivo* pode ser responsável pela sua heterogenidade.

Quanto às glutelinas, existem poucas informações com respeito a sua composição. PAULIS *et al.*, (1975) mostraram que elas também são bastante heterogêneas, apresentando cerca de 17 subunidades em gel de poliacrilamida, com pesos moleculares variando entre 11 e 127.10^3 daltons.

Do ponto de vista genético, esses estudos tem sido de grande importância pois nos revelam que a síntese das proteínas de reserva no endosperma de milho, não se processa de maneira simples, mas sim, através de um sistema bastante complexo, se admitirmos a existência de pelo menos um gene para cada uma das bandas encontrada nesses trabalhos de subfracionamento.

1.6 - Mutantes que afetam o metabolismo de proteínas e aminoácidos no endosperma.

A semente tem sido considerada por DURE (1975) , como um excelente órgão para o estudo de genética em plantas superiores. Como o endosperma apresenta síntese de substâncias de reserva em grande quantidade, o produto gênico torna-se de fácil identificação e isolamento.

O milho, apresenta pelo menos 13 mutantes de endosperma, todos recessivos, os quais afetam o metabolismo da semente de várias maneiras, quase sempre alterando a biossíntese de carboidratos e/ou de proteínas.

Os mutantes que afetam o metabolismo de proteínas, tem merecido grande atenção dos pesquisadores, tendo em vista a utilização dos mesmos em programas de melhoramento da qualidade nutritiva da proteína do endosperma, bem como em estudos básicos de genética, concernentes à compreensão do processo regulatório da síntese de proteínas nesse cereal.

Dentre os mutantes mais estudados, destacam - se

o *opaque-2* (*o2*), *floury* (*fl2*), *shrugen* (*sh*), *shrugen-2* (*sh2*), *shrugen-4* (*sh4*), *brittle* (*bt*), *brittle-2* (*bt2*), *sugary-2* (*su2*). Todos esses mutantes apresentam quantidades de lisina quase sempre maior que os tipos normais, com o *o2* no extremo superior, e os outros numa posição intermediária entre o *o2* e os tipos normais (DALBY e TSAI, 1975 ; MISRA *et al.*, 1972).

O endosperma de milho, contém uma alta proporção de zeína (40 - 60% da proteína do endosperma), sendo que essa proteína contém apenas traços de lisina (BAUDET *et al.*, 1966 ; MOSSÉ *et al.*, 1966).

Para melhor entendermos a ação dos mutantes no metabolismo de proteínas do endosperma, é preciso que se tenha uma idéia da ontogenese da semente, do ponto de vista do metabolismo de nitrogênio.

A semente de milho inicia seu desenvolvimento logo após a polinização, apresentando nas duas primeiras semanas após a polinização (SAP), um período de intensa divisão celular, onde se observa pouca atividade de síntese e acúmulo de substâncias de reserva (KHOO e WOLF, 1970). Após esse período de divisão celular, onde praticamente todas as células que constituem o endosperma já estão formadas, inicia-se o período de intensa atividade de síntese de substâncias de reserva, notadamente carboidratos (amido) e proteínas (MISRA *et al.*, 1975a; MOUREAUX e LANDRY, 1972;; SOAVE *et al.*, 1975; BRESANI e CONDE, 1961).

Do ponto de vista de síntese de proteínas, observa-se uma atividade intensa dos 15 aos 45 dias após a

polinização (DAP) , correspondendo os estágios intermediários, entre 25 e 35 DAP, ao pico máximo da síntese proteica (MOUREAUX e LANDRY, 1972; SODEK e SILVA, 1977; TSAI *et al.*, 1978). Após os 40-45 DAP quase toda proteína do endosperma já foi sintetizada, observando-se a partir desse estágio um patamar que se estende até a fase da semente seca.

Durante o período de síntese de proteínas, observa-se um aumento no conteúdo de RNA do endosperma, com uma rápida diminuição nos estágios finais do desenvolvimento da semente (WILSON, 1975). Enquanto isso uma RNase, a RNase I, apresenta uma alta atividade, que é conservada até o estágio de semente seca (WILSON, 1967, 1968, 1971, 1973 , 1975).

As diferentes classes de proteínas do endosperma são sintetizadas em padrões diferentes, durante o desenvolvimento da semente. Nos primeiros estágios entre 10 e 20 DAP, observa-se no endosperma, uma grande quantidade de albuminas, globulinas e aminoácidos livres (DALBY e TSAI, 1975; MOUREAUX e LANDRY, 1972; MURPHY e DALBY, 1971; BRESSANI e CONDE, 1961; ARRUDA *et al.*, 1978). Com o desenvolvimento da semente, as classes proteicas de maior conteúdo no endosperma, zeína e glutelina, aumentam rapidamente (DALBY e TSAI, 1974; DALBY e TSAI, 1975; MISRA *et al.*, 1975; MURPHY e DALBY, 1971; BRESSANI e CONDE, 1961; TSAI *et al.*, 1978; SODEK, 1973; ARRUDA *et al.*, 1978), sendo que existem evidências que essas proteínas são sintetizadas às expensas das proteínas salino-solúveis (MOUREAUX e LANDRY, 1972; SODEK e WILSON , 1970; BRESSANI e CONDE, 1961).

As mutações no endosperma de milho atuam em ge -

ral durante o desenvolvimento da semente, alterando os padrões de síntese de proteínas e aminoácidos ou de amido. O mutante mais estudado, o *opaque-2*, descoberto por SINGLETON e JONES, (1935), modifica as características fenotípicas do endosperma, tornando-o opaco e farináceo. O peso da semente e a produção de grãos é diminuída (NELSON, 1967; ARNOLD *et al.*, 1977b; BAUMAN, 1975; ELMORE, 1970 ; SREERAMULU e BAUMAN, 1970; AYCOCK, 1972), enquanto que o teor de umidade do endosperma é aumentado, em relação ao endosperma normal (WILSON e ALEXANDER, 1967). A quantidade de zeína do endosperma *opaque-2* é drasticamente diminuída, enquanto que as albuminas + globulinas e principalmente a glutelina é proporcionalmente aumentada (BAENZIGER e GLOVER, 1977; DALBY e TSAI, 1975; LEE *et al.*, 1976; MERTZ *et al.*, 1964; MISRA *et al.*, 1975a; LODHA *et al.*, 1977; MOSSÉ *et al.*, 1966; MURPHY e DALBY, 1971; RIGUETTI *et al.*, 1977; SODEK e WILSON, 1971 ; TSAI e DALBY, 1974; JIMENES, 1966; MOSSÉ, 1966). Essa inversão nas proporções dessas duas proteínas no endosperma *opaque-2*, faz com que este apresente cerca do dobro de lisina em relação ao endosperma normal. Esse aspecto tem sido considerado por muitos autores como sendo o principal mecanismo pelo qual o gene *opaque-2* aumenta a quantidade de lisina no endosperma do milho (MERTZ *et al.*, 1964; MOSSÉ *et al.*, 1966; MURPHY e DALBY, 1971; JIMENES, 1966).

Um segundo mutante de endosperma, o *floury - 2*, descoberto por MUMM, (1935) apresenta as mesmas características fenotípicas do mutante *opaque-2*. Esse gene reduz a quantidade da zeína do endosperma, com consequente aumento

em lisina (LEE *et al.*, 1976; MISRA *et al.*, 1972; NELSON *et al.*, 1965; SODEK e WILSON, 1971; TSAI e DALBY, 1974) e também determina um acréscimo na concentração de metionina (HANSEL *et al.*, 1973).

Alguns estudos envolvendo o fracionamento de proteínas dos mutantes ricos em lisina, tem revelado que estes aumentam o conteúdo de aminoácidos livres no endosperma (ARRUDA *et al.*, 1978; MISRA *et al.*, 1975; SODEK e WILSON, 1971), provavelmente acumulando alguns aminoácidos encontrados em grande quantidade na zeína (ARRUDA *et al.*, 1978). Embora alguns autores tenham sugerido que a zeína do mutante *o2* tenha uma composição de aminoácidos atípica (MERTZ *et al.*, 1964; MURPHY e DALBY, 1971), estes resultados são conflitantes (MOSSÉ *et al.*, 1966; SODEK e WILSON, 1971; BAUDET *et al.*, 1966) e possivelmente resultam de contaminação ocorrida nessa fração proteica, advinda da metodologia empregada na extração (SODEK, 1973).

Baseados em estudos eletroforéticos, MOSSÉ (1966), JIMENES, (1968) e NELSON, (1969), sugeriram que o gene *opa-que-2* é um gene regulador para a síntese de zeína. Mais recentemente, SOAVE *et al.* (1978), confirmaram essa hipótese, mostrando que alguns genes estruturais, responsáveis por algumas bandas de zeína, estão localizados em pelo menos três posições em cromossomos diferentes, sendo que a presença ou ausência dessas bandas estão sobre o controle do gene *o2*.

Estudos mais detalhados envolvendo o subfracionamento das proteínas do endosperma através de eletroforese e focalização isoeletrica, mostram que a redução de zeína pelo ge

ne o2 afeta principalmente a subunidade Z-1, tendo pouco efeito em Z-2, enquanto que as outras frações proteicas são semelhantes ao endosperma normal (LEE *et al.*, 1976; SODEK e WILSON, 1971). O gene *opaque-2* afeta principalmente as tres maiores bandas alcalinas, que representam parte da população de Z-23 que constitue Z-1 (RIGUETTI *et al.*, 1977). Por outro lado o gene *floury-2* reduz a síntese de todas as subfrações da zeína numa mesma proporção (LEE *et al.*, 1976).

Um novo enfoque tem sido dado ao estudo da síntese e regulação de proteínas em milho, através da utilização da síntese de proteínas *in vitro* (LARKINS *et al.*, 1976; LARKINS e DALBY, 1975). Com isso demonstrou-se que o gene o2 exerce um controle regulatório na síntese de RNA mensageiro da zeína, logo nos primeiros estágios do desenvolvimento do endosperma (JONES *et al.*, 1976; JONES *et al.*, 1977a; JONES *et al.*, 1977b; METHA *et al.*, 1973). Essa redução no RNAm da zeína envolve a classe de maior conteúdo de polirribossomos, acarretando numa marcada redução da síntese *in vitro* do maior componente da zeína (Z-1) (JONES *et al.*, 1977a). Esses resultados tem sido associados a ausência de polissomos sobre o corpúsculo proteico no endosperma o2 (VIDTTI *et al.*, 1975). Em adição, trabalhos realizados *in vivo*, já citados, mostram que os mutantes ricos em lisina possuem poucos ou quase nenhum corpúsculo proteico nas células do endosperma (WOLF *et al.*, 1969; BAENZIGER e GLOVER, 1977). Outros efeitos de genes que condicionam alto teor de lisina no endosperma tem sido estudados ultimamente. Dentre esses um de fundamental importância, é a alta atividade da RNase I, encontrada no en-

dosperma o2. Esse mutante apresenta cerca de 4 a 6 vezes mais atividade da RNase que o endosperma normal (DALBY e CAGAMPANG, 1970; DALBY e DAVIES, 1967; WILSON, 1973; WILSON e ALEXANDER, 1967). Essa diferença é manifestada nos estágios intermediários do desenvolvimento da semente (DALBY e CAGAMPANG, 1970; DALBY e DAVIES, 1967), sendo que a análise eletroforética revela que a RNase do endosperma o2 é semelhante a do endosperma normal (WILSON e ALEXANDER, 1967). Assim, ficou constatado que a diferença entre os dois genótipos está associada a quantidade e não a qualidade da enzima.

Alguns autores tem sugerido que a alta atividade da RNase no endosperma o2 poderia inibir a síntese de zeína, digerindo o seu RNAm específico (WILSON e ALEXANDER, 1967; DALBY e DAVIES, 1967), porém nenhuma evidência confirma essa hipótese. Essa explicação é pouco viável, visto que o gene *floury-2*, embora condicione uma redução na quantidade de zeína do endosperma, não tem efeito algum na atividade da RNase (DALBY e CAGAMPANG, 1970). Por outro lado o estudo de linhagens com fenótipos modificados, mostrou que a atividade da RNase, o acúmulo de zeína e o fenótipo da semente podem ser alterados independentemente (DALBY e TSAI, 1974). Por sua vez, a quantidade de RNase do endosperma normal, é alta e suficiente para digerir todo o seu conteúdo de RNAm em 10 minutos (WILSON, 1975), mostrando assim a impossibilidade da ligação RNase a RNAm da zeína.

Um outro efeito do gene o2 no endosperma de milho foi demonstrado por SODEK e WILSON, (1970). Através da injeção de lisina marcada com ^{14}C no endosperma em desenvolvi -

mento, esses autores verificaram que no endosperma normal , uma boa parte da lisina foi convertida em ácido glutâmico e prolina enquanto que no endosperma o2 essa conversão se verificou em escala muito menor. Resultados semelhantes foram obtidos por BRANDT (1975) em cevada, mostrando que a conversão de lisina deve ser um mecanismo importante para determinar o nível desse aminoácido na semente.

A associação do gene *opaque-2* com qualquer outro mutante de endosperma não altera as propriedades desse mutante, tanto do ponto de vista bioquímico, como nutricional. Quando combinado com mutantes que atuam na redução da síntese de amido, ocorre um efeito sinérgico, aumentando ainda mais o conteúdo de lisina e reduzindo bem mais a quantidade de zeína (MISRA *et al.*, 1972; MISRA *et al.*, 1975a; SGARBIERI *et al.*, 1977; SILVA *et al.*, 1978; MISRA *et al.*, 1975b; ARRUDA *et al.*, 1978).

Outros efeitos no metabolismo do endosperma, tem sido atribuído ao gene o2, tais como o aumento no conteúdo de RNA e diminuição na quantidade de DNA (VIOTTI *et al.*, 1975), alterações no padrão de isoenzimas (LODHA *et al.*, 1974) , maior requerimento de íons Mn para a atividade de uma RNAPolimerase (MEHTA *et al.*, 1975) e maior conteúdo de elementos minerais em relação ao endosperma normal (ARNOLD *et al.*, 1977a; ARNOLD *et al.*, 1977b; GOODSELL, 1968). Entretanto , não se sabe até que ponto esses efeitos são causas diretas do gene mutante nessas características do endosperma.

Outros mutantes de endosperma, com efeito na síntese de zeína e aumento de lisina tem sido descritos na li-

temperatura. Alguns deles com características semelhantes ao *o2*, tais como *opaque-6*, *opaque-7* e *floury-2*, aumentam o conteúdo de lisina no endosperma e possuem também uma maior quantidade de aminoácidos sulfurados em relação ao endosperma normal (DALBY e TSAI, 1975 ; MA e NELSON, 1975 ; MISRA *et al.*, 1972; McWHITER, 1971). Alguns mutantes, que reduzem drasticamente o conteúdo de amido no endosperma , tais como *shrunk-2 (sh2)*, *shrunk-4 (sh4)*, *brittle (bt)* *brittle-2 (bt2)* e *sugary (su)*, tem sido investigados quanto ao conteúdo de zeína e lisina no endosperma. Desses genes, o *sh4*, *bt*, *bt2* e *sh2*, condicionam uma redução no nível de zeína no endosperma e um teor de lisina semelhante ao encontrado no mutante *opaque-2* (DALBY e TSAI, 1975; MISRA *et al.*, 1972; MISRA *et al.*, 1975a; TSAI e DALBY, 1974).

A quantidade de zeína também pode ser alterada em função da quantidade de proteína no endosperma. Isso tem sido demonstrado em experiências de campo onde se efetuam ensaios com vários níveis de adubação nitrogenada. Com uma maior aplicação de nitrogênio no solo, ocorre invariavelmente uma elevação na quantidade de proteína no endosperma, resultante de um aumento na fração de zeína (TSAI *et al.* , 1978; PERRY e OLSON, 1975; MALIK, 1973; DECAU e PUJOL, 1974; BRETELER, 1976; SAUBERLICH *et al.*, 1973; KEENY, 1970; MacGREGOR *et al.*, 1961; SCHNEIDER *et al.*, 1952). Desse modo , com um aumento na quantidade de proteína, há uma consequente diminuição da qualidade nutritiva do endosperma, em decorrência do menor nível de lisina. Assim é apregoada a existência de uma correlação negativa entre a quantidade de

proteína e a quantidade de lisina no endosperma (FLYNN *et al*, 1954; DRAPER, 1975). Esses efeitos tem sido constatados também em trigo (KONZAK, 1977).

2 - OBJETIVOS

Apesar do grande número de trabalhos realizados com mutantes de *endosperma de milho*, visando identificar o mecanismo de ação desses genes, pouco se sabe sobre a ação primária desses fatores genéticos no metabolismo da semente.

Neste trabalho procurou-se obter algumas informações que, complementando outros já existentes, possam esclarecer alguns pontos, sobre a ação de genes que condicionam modificações na síntese de aminoácidos e proteínas no endosperma de milho.

Para tanto, foram efetuadas análises químicas e bioquímicas, em uma variedade de milho homozigota para os genes *sugary* e *opaque-2* (*su02*), para um estudo comparativo com sementes de endosperma normal (*Su02*). Nesses dois genótipos foram analisadas as seguintes características.

- 1 - Pesos frescos e seco dos dois tipos de endosperma, para estabelecer curvas cumulativas de matéria seca e água

(umidade).

- 2 - Nitrogênio total (nitrogênio proteico), para o estudo de acúmulo de proteínas nos endospermas
- 3 - Fracionamento das proteínas do endosperma, para análise das diferenças que ocorrem entre os dois genótipos .
- 4 - Potássio, Magnésio e Fósforo, para se verificar o efeito do endosperma duplo mutante nas concentrações desses elementos minerais.
- 5 - Composição de aminoácidos do sistema vascular do pedúnculo das espigas, para se determinar as concentrações das diferentes formas nitrogenadas, que são translocadas para a formação das proteínas do endosperma.
- 6 - Composição de aminoácidos nos endospermas de ambos os genótipos , para um estudo comparativo destas, com a composição dos aminoácidos que são transportados para a semente.

Todas essas informações foram obtidas durante o desenvolvimento do endosperma.

3 - MATERIAL E MÉTODO

3.1 - Germoplasma e técnica de polinização

Nesse estudo foram utilizadas plantas de uma cultivar de milho denominada *Nutrimaiz*, desenvolvida por SILVA *et al* (1978) e da cultivar *Maya* selecionada por MIRANDA *et al* (1972). A cultivar *Nutrimaiz* é um sintético homozigoto para os genes *sugary* e *opaque-2*, enquanto que a cultivar *Maya* apresenta endosperma normal. A população *Maya* normal foi utilizada para a síntese do *Nutrimaiz*, que corresponde a 87,5% do germoplasma original desse material.

As plantas estudadas, foram cultivadas na Área Experimental da Universidade Estadual de Campinas, em linhas adjacentes de 10 m de comprimento, espaçadas de 1 m, numa densidade de plantio de 50000 plantas/ha. O experimento foi fertilizado com N, P_2O_5 e K_2O em quantidades de 60, 80 e 30 kg/ha, respectivamente. As plantas do duplo mutante *Nutrimaiz* foram utilizadas como fêmeas, e as da cultivar *Maya* normal como plantas fornecedoras de pólen. As linhas das duas cultivares foram plantadas alternadamente na proporção de

duas linhas de *Nutrimaiz* para uma de *Maya* normal. Isso foi feito de forma a facilitar o processo de polinização artificial.

Sementes normais e duplo mutantes foram produzidas numa mesma espiga, utilizando-se separadamente, duas técnicas de polinização dupla. Uma delas, desenvolvida por SILVA e SANTORO (1972) é descrita a seguir. As pontas da inflorescência feminina das plantas duplo mutante, protegidas anteriormente com saquinhos impermeáveis, foram cortadas transversalmente e os estilo-estigmas divididos em duas partes iguais, utilizando-se um cartão de computador (figura 1). Após 24 horas, tempo suficiente para que os estilo-estigmas atingissem aproximadamente 2 cm de comprimento, uma das metades foi polinizada com pólen *sugary opaque-2* e a outra metade polinizada com pólen normal. O duplo mutante, sendo recessivo, quando autofecundado produz endospermas com genótipos *sususu 020202*, numa metade da espiga e quando polinizada com pólen normal produz endospermas com genótipo *Sususu 020202*, com características fenotípicas de sementes normais na outra metade. O uso do normal heterozigoto e não do normal homozigoto para os dois genes não apresenta inconvenientes sérios, visto que aparentemente esses genes não apresentam efeitos de dosagem significativos (AYRES *et al.* 1969; PAEZ *et al.*, 1970). A polinização dupla tem a vantagem de produzir sementes com genótipos diferentes que serão comparados na mesma espiga durante o desenvolvimento do grão. As comparações, desse modo são bem mais precisas que aquelas normalmente feitas entre genótipos, em plantas diferentes



Figura 1 - Técnica de polinização dupla, utilizada para obtenção de endospermas normais e duplo mutante na mesma espiga.

que dão oportunidade para o confundimento de efeitos genéticos no endosperma com outros efeitos fenotípicos da planta. Comparações de endospermas mutantes com tipos normais heterozigotos tem sido efetuadas por alguns autores (SODEK e WILSON, 1970; ARNOLD *et al* 1977).

A polinização dupla, com a identificação das duas metades da espiga possibilita a coleta dos endospermas durante as três primeiras semanas de desenvolvimento da semente sem qualquer dificuldade. Se isso não fosse feito não haveria condições de identificação dos dois genótipos, pois até esse estágio os dois tipos de endosperma apresentam o mesmo fenótipo visual.

A partir da terceira semana após a polinização, os endospermas duplo mutante já são facilmente identificáveis. Isso permitiu o uso de uma técnica de polinização menos trabalhosa para a obtenção dos dois genótipos na mesma espiga. Para tanto, polens de plantas normais e de plantas duplo mutante foram coletados e misturados na proporção de 1:1. Essa mistura de polens foi utilizada para a polinização de plantas *sugary opaque-2*. Esse método permitiu ainda verificar se a viabilidade dos grãos de pólen dos dois genótipos são semelhantes a ponto de não ocorrer competição entre os tubos polínicos. A frequência observada na proporção de grãos normais e duplo mutantes nas espigas foi praticamente de 1:1, indicando ausência de competição entre os dois tipos de grãos de pólen.

Usando essas duas técnicas, foram polinizadas aproximadamente 105 plantas adjacentes. As polinizações fo -

ram efetuadas todas no mesmo dia, para se dar as mesmas con
dições de desenvolvimento aos endospermas. Espigas produzi
das com mistura de polens, e polinização dupla podem ser vis
tas na Figura 2.

3.2 - Material para análise

A amostragem dos endospermas e dos pendúculos ,
foi efetuada durante o desenvolvimento, em intervalos sema-
nais, iniciados aos 7 dias após a polinização (DAP). Cin-
quenta sementes de cada genótipo, retiradas do terço médio
de cada espiga, onde os grãos são mais uniformes, foram co-
letadas em 7 plantas diferentes, consideradas repetições ,
tomadas inteiramente ao acaso, aos 7, 14, 21, 28, 35, 42 e
51 DAP. A maturação fisiológica detectada pelo aparecimento
da camada de abscisão (*black layer*) foi observada no período
entre 42 e 51 DAP.

Ao mesmo tempo em que foram coletadas as semen-
tes, dez pedúnculos , incluindo aqueles provenientes das
plantas de onde foram retiradas as sementes, com aproximada-
mente 5 cm de comprimento a partir da base da espiga, foram
cortados para a extração do exudato dos feixes vasculares .
As espigas e os pedúnculos foram colocados imediatamente em
uma caixa de isopor contendo gelo, para redução da ativida-
de fisiológica do material

3.3 - Preparação dos endospermas

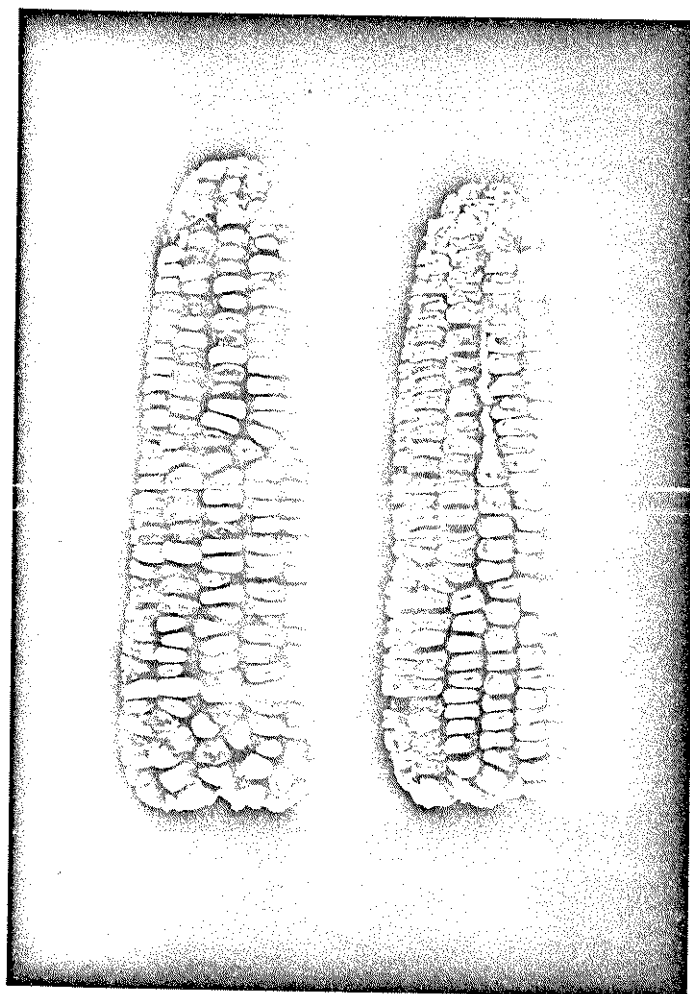


Figura 2 - Espigas obtidas através de polinização dupla (direita) e através de mistura de polen normal com duplo mutante na proporção de 1:1 (esquerda).

Das 50 sementes coletadas, 10 foram dissecadas e seus endospermas utilizados para a determinação dos pesos fresco e seco. O peso seco foi determinado após a secagem do material em estufa a 65°C durante dois dias.

As 40 sementes restantes, foram também dissecadas e seus endospermas guardados em congelador a -20°C. Durante o processo de dissecação as sementes foram sempre mantidas em baixa temperatura. Logo após a última coleta, aos 51 DAP, os endospermas foram liofilizados e moídos em um moinho de bola *Spexmill*. As amostras assim preparadas foram armazenadas em dissecador.

3.4 - Extração de exudato do sistema vascular do pedúnculo da espigas.

A extração de exudatos dos feixes vasculares de várias espécies de plantas superiores tem sido efetuada através de técnicas que consistem na coleta da seiva de vasos individuais por meio de estiletos (KENNEDY e MITLER, 1953), ou através da expulsão de líquidos contido nos feixes por meio de aplicação de pressão (ZIEGLER, 1968), ou ainda seccionando o caule e expondo o mesmo à atmosfera saturada, induzindo os vasos à exudação (BRENNAN *et al.*, 1964). Em geral essas técnicas apresentam bons resultados em espécies de plantas da família Leguminosas ou em espécies que apresentam pedúnculos bastante herbáceos. Mais recentemente foi proposto um método bem simples para a extração de exudatos em leguminosas. Nesse método, corta-se a ponta do

fruto o mais próximo possível do pedúnculo e coleta-se o exudato por meio de tubos capilares (PATE *et al.*, 1974; PATE *et al.*, 1975). Essas técnicas tem sido usadas com sucesso em algumas espécies (ATKINS *et al.*, 1975; LORENZ, 1975). Entretanto nenhuma delas pôde ser adaptada para a extração do exudato do pedúnculo de espiga de milho, pois este apresenta características bem diferentes daquelas das espécies até então estudadas. No pedúnculo de milho (*monocotiledonea*), os feixes vasculares apresentam-se dispersos na medula oferecendo desse modo, certa dificuldade para a extração do exudato.

Baseando-se nos métodos acima citados, idealizou-se uma nova técnica para a extração do exudato, em milho. Essa técnica consiste na extração do exudato, através da aplicação de pressão de vácuo, como mostra a Figura 3. Cada pedúnculo é colocado no suporte e submetido a uma pressão de vácuo de 0,5 atm. Ao mesmo tempo, aplica-se 5 ml de clorofórmio no topo do pedúnculo para facilitar o arraste do exudato. Esse procedimento foi usado para cada um dos 10 pedúnculos, e o extrato final foi separado do clorofórmio através de centrifugação a 1000 g para facilitar a separação de fases. Em seguida o extrato combinado foi guardado em congelador a -20°C. Em cada estágio do desenvolvimento da espiga, o extrato combinado foi aproximadamente de 1 ml de exudato.

3.5 - Análises químicas e bioquímicas

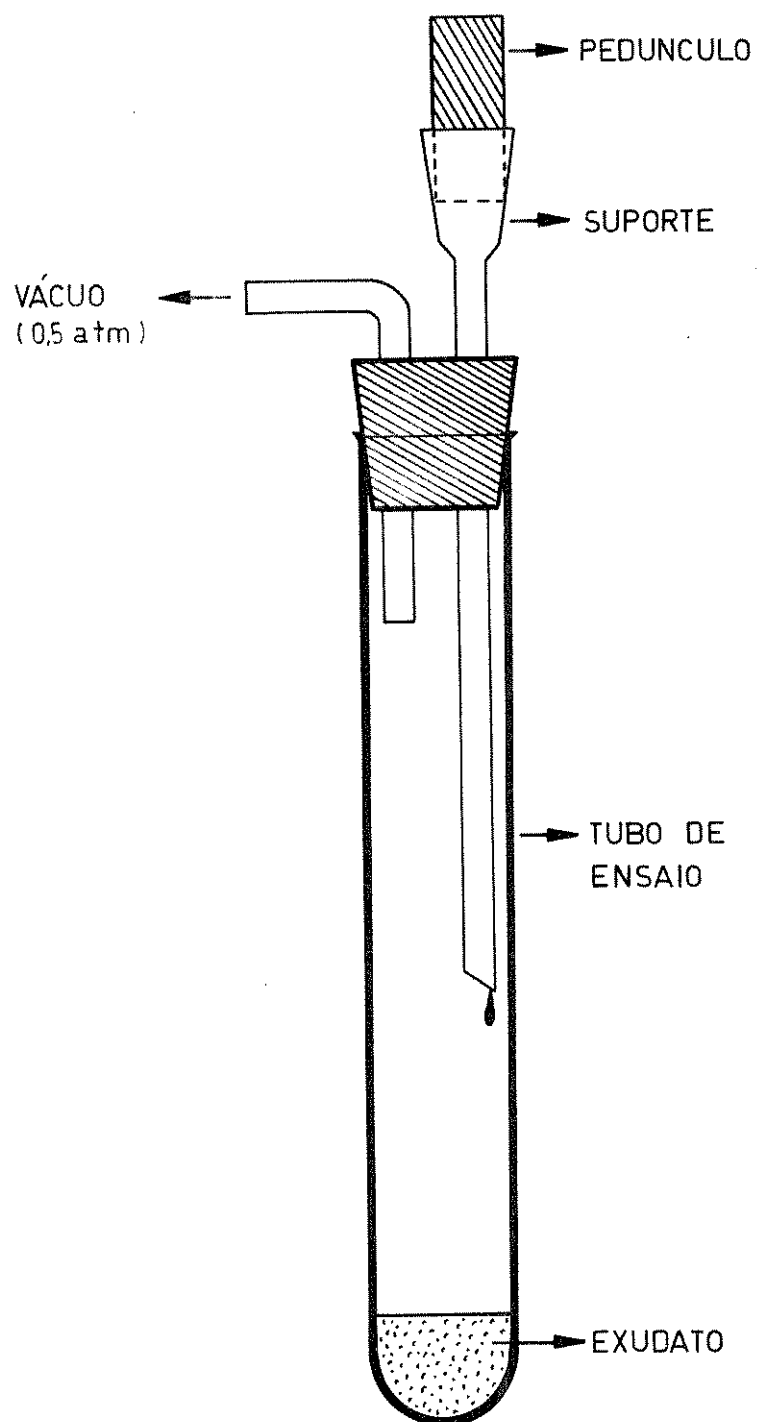


Figura 3 - Sistema para extração de exudato dos feixes vasculares do pedúnculo de espigas de milho.

3.5.1 - Determinação de Nitrogênio Total

O nitrogênio total do endosperma foi determinado em um autoanalisador Technicon, utilizando-se o sistema de GERHKE, *et al* (1973) com algumas modificações. Duas repetições de 100 mg de cada amostra foram digeridas com ácido sulfúrico, segundo o método de CONCON e SOLTESS (1973), e o extrato diluído com água destilada até o volume de 20 ml. O extrato assim preparado foi introduzido no autoanalizador para a determinação de N total, segundo a reação de BERTHELOT. Para a calibração do aparelho foram utilizadas amostras de milho com teor de N conhecido, determinado anteriormente pelo método micro Kjeldhal (Association of Official Agricultural Chemists, 1970).

3.5.2 - Fracionamento de Proteínas

O fracionamento de proteínas foi efetuado segundo a sequência D do método de LANDRY e MOUREAUX (1970) (Tabela 2). O nitrogênio das frações proteicas foi determinado pelo mesmo método do nitrogênio total.

3.5.3 - Análise de aminoácidos

Os aminoácidos tanto do exudato como dos endospermas, foram determinados em um analisador de aminoácidos, segundo o sistema básico estabelecido por SPACKMAN *et al*, (1958), utilizando-se uma coluna equilibrada com ions Zn^{++}

TABELA 2 - Sequência D do método de LANDRY-MOUREAUX (1970) para a extração seletiva das proteínas do milho.

Solvente				Tempo de agitação (minutos)	Fração Proteica
NaCl	0,5	M	4°C	60	Proteínas salino-solúveis (albuminas, globulinas e aminoácidos livres)
				30	
				30	
Água				15	
				15	
IsPrOH 70%				30	Zeína (Z-1)
				30	
				30	
IsPrOH 70% (v/v) + 0,6% de 2-ME				30	Glutelina-1 (G-1)
				30	
Tampão borato pH 10+ 0,6% de 2-ME				60	Glutelina-2 (G-2)
				30	
				15	
Tampão borato pH 10+ 0,6% de 2-ME+ 0,5% de LSS				60	Glutelina-3 (G-3)
				30	
				15	

IsPrOH = Isopropanol

2-ME = 2-Mercaptoetanol

LSS = Lauril sulfato de sódio

(PERKIN ELMER, 1971). Para o exudato, o volume extraído dos pedúnculos foi diluído 5 vezes. Duas aliquotas de 0,2 ml foram utilizadas para a determinação de nitrogênio. Uma quantidade equivalente a 70 µg de N foi injetada na coluna para a determinação de aminoácidos. As amidas foram estimadas pelas diferenças nas concentrações dos ácidos glutâmico e aspártico antes e após hidrólise com HCl 1N, durante 3 horas a 110°C. Com a hidrólise, a asparigina e a glutamina são convertidas em ácido aspártico e ácido glutâmico respectivamente (SODEK e WILSON, 1971).

Para a determinação dos aminoácidos no endosperma, 100 mg da farinha liofilizada foi hidrolizada com 5 ml de HCl 6 N a 110°C por 24 horas. A hidrólise foi efetuada em tubos de ensaio com tampa. Nitrogênio gasoso foi borbulhado nos tubos para substituir o oxigênio do interior dos mesmos e diminuir a oxidação de alguns aminoácidos. Depois da hidrólise, a solução foi filtrada e 4 ml evaporados em um evaporador rotatório a 50°C, até evaporação completa. Em seguida foram adicionados 10 ml de água destilada, seguindo-se nova evaporação completa. Esse processo foi repetido por mais duas vezes para eliminar o excesso de HCl. Finalmente os aminoácidos foram ressolubilizados em tampão acetato pH 3,1 e uma quantidade equivalente a 70 µg de N foi injetada na coluna. As quantidades de cada aminoácido foram calculadas a partir da quantidade total de aminoácidos recuperada.

O triptofano nos endospermas foi determinado colorimetricamente pelo método de VILLEGAS e MERTZ (1971), mo

dificado por SILVERSTEIN (1978).

3.5.4 - Determinação de potássio, magnésio e fósforo

O potássio e o magnésio foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, segundo o método descrito no catálogo PERKIN ELMER (1968). Para isso, 100 mg da farinha liofilizada foi preparada através da digestão com ácido nítrico e perclórico. Após a digestão, o volume de extrato foi completado para 20 ml com água destilada. O extrato final foi diluído 20 vezes para a determinação em espectrofotômetro.

O fósforo foi determinado no mesmo extrato descrito acima, utilizando-se o método da reação do fósforo com ácido molibbdico-vanadato estabelecido por LOTT *et al* , (1956). Esse método foi adaptado no autoanalisador Technicon, para que as amostras fossem analisadas automaticamente.

4 - RESULTADOS

4.1 - Acúmulo de matéria seca, nitrogênio, água, potássio, magnésio e fósforo nos endospermas.

As médias e os desvios padrões para as concentrações de N total, potássio, magnésio, fósforo e porcentagem de umidade nos endospermas encontram-se na Tabela 3. A precisão das comparações entre os dois genótipos de endosperma deve ser considerada alta, desde que os dois tipos, normal e mutante ocorrem na mesma espiga, havendo assim uma variância ambiental mínima.

A porcentagem de umidade decresce com a maturação do endosperma, porém com padrões bem distintos entre os dois genótipos. O duplo mutante *suw2* apresenta umidade bem mais elevada que o tipo normal, principalmente nos estágios intermediários do desenvolvimento da semente tendo sido encontradas diferenças que variam de 46,4 a 84,2%, dos 28 aos 42 DAP.

As concentrações dos elementos minerais K, Mg e P expressadas como porcentagem por peso seco do endosperma,

TABELA 3 - Comparação entre o endosperma normal e endosperma duplo mutante, quanto as quantidades de nitrogênio total, umidade, potássio, magnésio e fósforo, durante o desenvolvimento da semente.

Componente	DAP	Tipos de endospermas				nível de sig. nificância para valores de t	diferença co mo porcenta- gem da média do endosper- ma normal	
		normal	dp	su02	dp			
Umidade (%)	7	87,5	1,2	87,6	0,7	NS	-	0,1
	14	73,3	2,0	77,7	1,6	**	-	6,0
	21	57,1	3,0	66,9	1,8	**	-	17,2
	28	41,6	3,6	60,9	3,8	**	-	46,4
	35	36,3	2,7	60,0	3,7	**	-	65,3
	42	20,3	4,1	37,4	6,5	**	-	84,2
	51	21,0	2,9	27,7	4,5	**	-	31,9
Nitrogênio (%)	7	3,89	0,38	3,98	0,13	NS	-	2,3
	14	3,33	0,54	3,53	0,35	NS	-	6,0
	21	2,03	0,22	1,83	0,24	NS	-	9,8
	28	2,11	0,37	1,87	0,32	NS	-	11,4
	35	1,89	0,37	1,88	0,33	NS	-	0,5
	42	1,82	0,32	1,70	0,22	NS	-	6,6
	51	1,72	0,34	1,66	0,24	*	-	3,5
Potássio (%)	7	1,15	-	1,17	-	-	-	1,7
	14	0,88	0,04	0,93	0,04	NS	-	5,7
	21	0,81	0,02	0,94	0,04	**	-	16,0
	28	0,30	0,01	0,92	0,05	**	-	206,7
	35	0,26	0,02	0,57	0,03	**	-	119,2
	42	0,18	0,01	0,43	0,05	**	-	138,9
	51	0,16	0,02	0,25	0,04	**	-	56,2
Magnésio (%)	7	1,97	-	2,02	-	-	-	2,5
	14	1,21	0,16	1,23	0,10	NS	-	1,6
	21	0,51	0,06	0,69	0,04	**	-	35,3
	28	0,24	0,04	0,48	0,07	**	-	100,0
	35	0,21	0,04	0,39	0,06	**	-	85,7
	42	0,18	0,04	0,30	0,08	*	-	66,7
	51	0,13	0,03	0,24	0,04	**	-	84,6
Fósforo (%)	7	5,38	-	6,37	-	-	-	18,4
	14	3,84	0,44	4,00	0,39	NS	-	4,2
	21	1,75	0,21	2,44	0,18	**	-	39,4
	28	0,92	0,16	1,82	0,20	**	-	97,8
	35	0,78	0,25	1,58	0,29	**	-	102,6
	42	0,50	0,13	0,78	0,23	*	-	56,0
	51	0,36	0,15	0,60	0,07	*	-	66,7

Todos os valores de concentração foram calculados em termos de por - centagem por peso seco; DAP - dias após a polinização; dp - desvio padrão; NS - nao significativo; ***,** - significativo a nível de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

também diminui com o desenvolvimento da semente, com padrões bem distintos entre os dois genótipos. Esses três elementos minerais apresentam concentrações bem mais altas no endosperma duplo mutante exceto nas duas primeiras semanas após a polinização. Essas diferenças assumem valores de até 200% para K, e 100% para Mg e P, principalmente durante os estágios intermediários da maturação da semente.

Enquanto a umidade e os elementos K, Mg e P são bem mais elevados no endosperma *suo2*, as concentrações de N total são basicamente idênticas para ambos os genótipos, apresentando uma pequena diferença significativa somente no último estágio analisado. A porcentagem de nitrogênio total decresce durante o desenvolvimento da semente, tendo sido encontrados, respectivamente, para os endospermas normal e *suo2*, valores de 3,89 a 3,98%, aos 7 DAP, e de 1,70 e 1,66% aos 51 DAP.

Os componentes peso fresco, peso seco, água, nitrogênio total, potássio, magnésio e fósforo, expressos em valores absolutos (mg/endosperma), estão representados na Figura 4. Enquanto no endosperma normal o peso fresco aumenta até os 51 DAP, no endosperma *suo2* ele atinge o seu valor máximo aos 35 DAP, diminuindo rapidamente, a partir desse estágio até os 51 DAP. Entretanto o peso fresco é significativamente maior no endosperma *suo2*, dos 14 aos 35 DAP, e significativamente menor nos dois últimos estágios do desenvolvimento da semente (Figura 4-A).

O peso seco, como seria de se esperar, aumentou

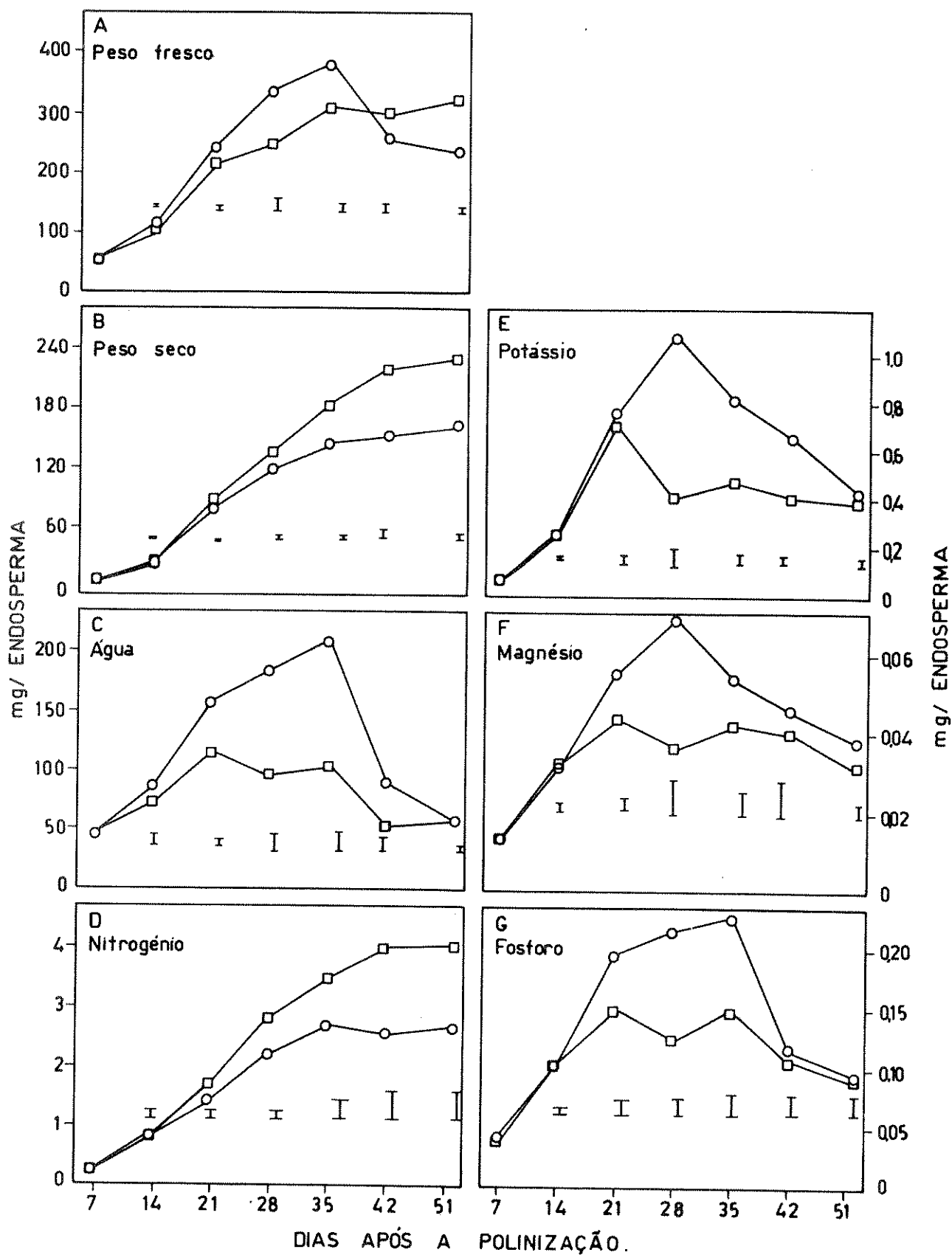


FIGURA 4 - Acúmulo de matéria seca, água, nitrogênio, potássio, magnésio e fósforo nos endospermas normal (quadrados) e *sugary opaque-2* (círculos), durante o desenvolvimento da semente. As barras indicam LSD a nível de 5% de probabilidade.

sempre com o desenvolvimento da semente. O endosperma normal mostra uma taxa de acumulação da matéria seca bem maior que o endosperma *suo2*, a partir dos 14 DAP (Figura 4-B). Enquanto o peso fresco do duplo mutante apresenta valores até 30% maiores que o observado no endosperma normal (28 DAP), este último chega a acumular 45% mais matéria seca que o endosperma duplo mutante (51 DAP).

Essa inversão no acúmulo de matéria fresca e seca, ocorrida entre os dois tipos de endosperma, determina um elevado conteúdo de água no endosperma duplo mutante (Figura 4-C). Comparando-se com o normal, o endosperma *suo2* apresenta 41, 92, 105 e 61% mais água que o endosperma normal aos 21, 28, 35 e 42 DAP, respectivamente.

O conteúdo absoluto de N, por sua vez é bem maior no endosperma normal, acompanhando basicamente as mesmas diferenças registradas no peso seco (Figura 4-D). As quantidades de K, Mg e P (Figuras 4-E, 4-F e 4-G) entretanto são bem maiores do endosperma duplo mutante acompanhando basicamente as mesmas diferenças de peso fresco. Potássio, Mg e P são, respectivamente, 170, 92 e 74% maiores no endosperma *suo2*, aos 35 DAP. Essas diferenças, tal como se verifica com o conteúdo de água, são maiores justamente nos estágios intermediários do desenvolvimento da semente.

As interrelações entre essas características físicas e químicas dos dois tipos de endosperma, podem ser facilmente visualizadas, comparando-se os coeficientes de correlação simples mostrado na Tabela 4. Enquanto o nitro-

TABELA 4 - Coeficientes de correlação entre as características físicas e químicas dos endospermas normal (valores superiores) e *sugary opaque-2* (valores inferiores).

	Peso Fresco	Peso seco	Água	N	K	Mg
Peso seco	0,96	0,80				
Água	0,32	0,05				
	0,83	0,34				
N	0,97	0,99	0,11			
	0,86	0,98	0,44			
K	0,63	0,43	0,82	0,45		
	0,90	0,61	0,85	0,66		
Mg	0,71	0,54	0,72	0,59	0,92	
	0,89	0,61	0,84	0,67	0,88	
P	0,58	0,36	0,89	0,42	0,89	0,95
	0,89	0,45	0,98	0,54	0,92	0,92

gênio total encontra-se altamente correlacionado com o peso seco do endosperma, com $r = 0,99$ e $0,98$ para os endospermas normal e *suo2*, respectivamente, K, Mg e P estão altamente correlacionados com o conteúdo de água nos dois tipos de endosperma.

4.2 - Distribuição de nitrogênio nas frações proteicas

Normalmente em estudos sobre o fracionamento de proteínas em plantas, os resultados são expressos na forma de nitrogênio total correspondente a cada fração proteica. Esse sistema também foi adotado neste trabalho.

Os dados correspondentes às concentrações das frações proteicas, obtidas pelo fracionamento de LANDRY-MOUREAUX, encontram-se na tabela 5.

4.2.1 - Fração 1

A fração 1, constituída de proteínas salino-solúveis e aminoácidos livres (LANDRY e MOUREAUX, 1970; SODEK e WILSON, 1971; ARRUDA *et al*, 1978) apresentam-se em concentrações decrescentes durante o desenvolvimento da semente, com um padrão bem distinto entre os dois genótipos (Tabela 5). Além da diminuição ser bem mais rápida no endosperma normal, atinge níveis mínimos com concentrações até 300% menor que no endosperma duplo mutante aos 51 DAP. Embora essa fração predomine nos estágios iniciais da forma-

TABELA 5 - Distribuição de Nitrogênio nas frações proteicas (porcento/N total) dos endospermas normal e *sugary opaque-2* durante o desenvolvimento da semente.

		FRAÇÕES PROTEICAS							..
Endosperma									
	DAP	Fração I	Zeína	Glut. I	Glut.II	Glut.III	Resí- duo	Total*	
normal	7	65,8	0	0	11,1	17,2	5,3	94,7	
<i>suo2</i>	7	60,3	0	0	11,1	18,3	10,3	89,7	
normal	14	28,0	25,0	3,9	14,9	23,9	4,3	95,6	
<i>suo2</i>	14	45,6	3,5	2,9	16,8	27,9	3,2	96,8	
normal	21	14,7	22,4	5,1	23,1	29,6	5,1	94,9	
<i>suo2</i>	21	38,5	4,2	3,6	21,3	27,6	4,7	95,3	
normal	28	10,0	29,7	6,0	22,1	26,6	5,5	94,5	
<i>suo2</i>	28	28,9	6,4	4,2	23,0	30,0	7,3	92,7	
normal	35	9,5	29,3	7,3	22,4	24,5	6,4	93,5	
<i>suo2</i>	35	27,1	5,5	4,9	25,5	30,5	6,6	93,4	
normal	42	5,1	37,7	8,0	20,7	21,5	7,0	93,0	
<i>suo2</i>	42	14,6	5,9	7,3	26,0	37,8	8,4	91,6	
normal	51	5,2	38,0	9,0	16,0	24,2	7,6	92,4	
<i>suo2</i>	51	14,1	8,5	9,5	24,6	34,0	9,3	90,7	

*Corresponde a porcentagem total de nitrogênio extraído

ção da semente, com concentrações de 65,8 e 60,3% do N total aos 7 DAP, nos endospermas normal e *suo2* respectivamente, ela cai para níveis mínimos no final da maturação da semente, representando cerca de 5,2 e 14,1% do N total no normal e duplo mutante, respectivamente.

Quando os dados são expressos em valores absolutos (mg/endosperma) a fração 1 apresenta-se crescente até aos 35 DAP, caindo rapidamente a partir desse estágio até o final da maturação. Esse efeito é muito mais acentuado no endosperma duplo mutante que no endosperma normal (Figura 5-A). Em valores absolutos a fração 1 é sempre maior no endosperma duplo mutante a partir dos 14 DAP. Essas diferenças são sempre superiores a 100% do conteúdo da fração 1 encontrada no endosperma normal. A fração 1 acha-se fortemente correlacionada com o conteúdo de água e minerais em ambos os endospermas. Essa associação é aparentemente ainda maior no tipo duplo mutante (Tabela 6)

4.2.2 - Zeína

Essa fração, denominada Z-1 ou zeína verdadeira (SODEK e WILSON, 1971), é sintetizada apenas a partir dos 7 DAP, não sendo detectada antes desse período, em nenhum dos dois tipos de endosperma (Tabela 5).

A zeína é drasticamente reduzida no endosperma duplo mutante, apresentando concentrações que vão de 3,5 a 8,5% do N total dos 14 aos 51 DAP, enquanto que no endosperma normal essa fração varia entre 25 e 38% do N total, nes-

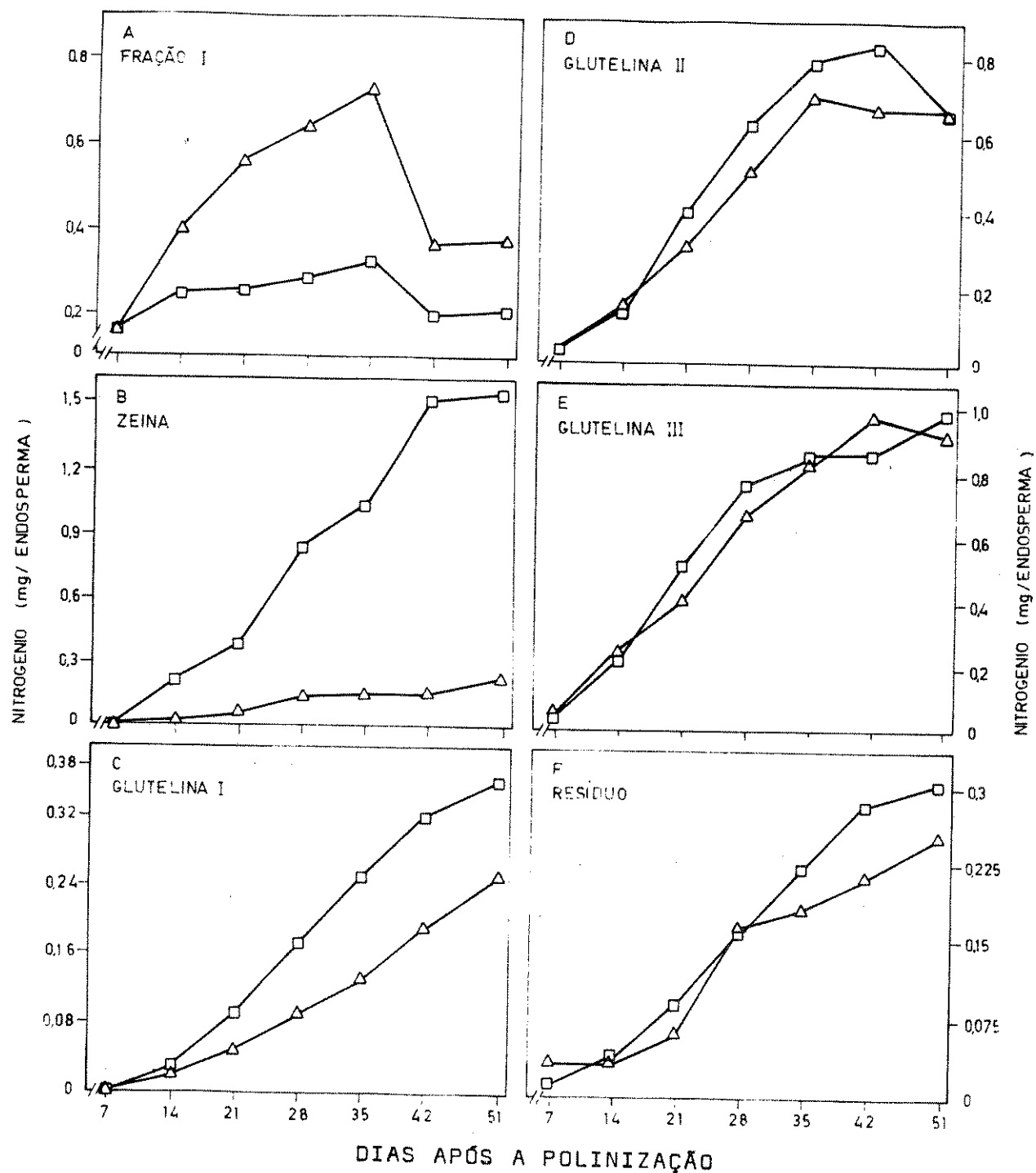


Figura 5 - Distribuição das frações proteicas nos endospermas normal (quadrados) e *sugary opaque-2* (triângulos) durante o desenvolvimento da semente (mg/endosperma).

TABELA 6 - Coeficiente de correlação entre a fração 1 e o conteúdo de água e minerais nos endospermas normal (valores superiores) e *sugary opaque-2* (valores inferiores).

	H ₂ O	K	Mg	P
Fração 1	0,72	0,76	0,89	0,85
	0,89	0,92	0,99	0,95

se mesmo intervalo.

A dinâmica de síntese da zeína está graficamente representada na Figura 5-B. A curva de síntese dessa proteína é praticamente linear para ambos os genótipos atingindo quantidades bem superiores no endosperma normal. A diferença de N total entre o endosperma normal e o duplo mutante é praticamente igual a diferença de zeína entre os dois genótipos, principalmente a partir dos 21 DAP (Tabela 7). Essa diferença implica que o ganho em nitrogênio do endosperma normal em relação ao duplo mutante, corresponde a zeína.

TABELA 7 - Diferenças de N total e zeína entre os endospermas normal e *sugary opaque-2* durante o desenvolvimento da semente.

DAP	Diferença de N total (mg/endosperma)	Diferença de zeína (mg/endosperma)
7	0	0
14	0	0,19
21	0,28	0,33
28	0,63	0,70
35	0,79	0,89
42	1,45	1,36
51	1,37	1,31

4.2.3 - Glutelina 1

Essa fração proteica, também denominada de Z-2 (SODEK e WILSON, 1971) ou ASG (PAULIS e WALL, 1977), à semelhança de Z-1 não foi detectada em ambos os tipos de endosperma aos 7 DAP. A glutelina 1 (Figura 5-C), apresenta uma concentração um pouco maior no endosperma normal nos estágios intermediários do desenvolvimento da semente, sendo praticamente igual ao duplo mutante aos 51 DAP. Em valores absolutos (mg/Endo) o endosperma normal apresenta uma quantidade maior de G-1 a partir dos 14 DAP.

4.2.4 - Glutelina 2

A glutelina 2 (G-2) apresenta uma concentração semelhante em ambos os genótipos até os 28 DAP (Tabela 5). A partir desse estágio o endosperma duplo mutante apresenta concentrações um pouco mais elevadas que o endosperma normal. Em valores absolutos ocorre o inverso. O endosperma normal apresenta uma quantidade maior de G-2 que o tipo duplo mutante (Figura 5-D).

4.2.5 - Glutelina 3

Quando tomados em concentrações, os valores de G-3 no endosperma duplo mutante são bem maiores que no endosperma normal, principalmente a partir dos 28 DAP (Tabela 5). Porém quando os valores são expressos em valores absolutos, praticamente não existem diferenças entre os

dois genótipos para essa fração proteica (Figura 5-E).

4.2.6 - Resíduo

O nitrogênio residual, apresenta quantidades semelhantes em ambos os genótipos, tanto em concentração (Tabela 5) como em valores absolutos (Figura 5-F).

4.3 - Conteúdo de aminoácidos no exudato do sistema vascular do pedúnculo.

O conteúdo de nitrogênio e a composição de aminoácidos do exudato do sistema vascular dos pedúnculos durante o desenvolvimento da espiga, encontram-se na Tabela 8. A quantidade de N total do exudato diminui com a maturação da espiga, variando de 1,7 a 1,3 mg/ml, dos 7 aos 42 DAP, respectivamente. Todos os aminoácidos que ocorrem nas proteínas do endosperma (MOSSE *et al.*, 1966; BAUDET, *et al.*, 1966; SODEK e WILSON, 1973), estão presentes no exudato, com excessão da prolina. Isso indica que a prolina é totalmente sintetizada no endosperma. No geral a composição de aminoácidos permaneceu relativamente constante durante o desenvolvimento da espiga, embora pequenas flutuações tenham ocorrido para alguns aminoácidos. A argina diminuiu de 6,3 para 2,1 mol%, dos 7 aos 42 DAP, enquanto que a glutamina diminuiu de 30,6 para 20,6 mol%, nesse mesmo intervalo. Por outro lado, a valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina e fenilalanina aumentaram levemente com o desenvolvimento da espiga. Os aminoácidos restantes foram bem constantes. A glutamina é o aminoácido translocado em maior quantidade para

TABELA 8 - Conteúdo de nitrogênio e composição de aminoácidos no exudato do sistema vascular do pedúnculo durante o desenvolvimento da espiga.

COMPONENTE	DIAS APÓS A POLINIZAÇÃO					
	7	14	21	28	35	42
Nitrogênio total (mg/ml)	1,7	1,5	1,6	1,4	1,4	1,3
Lis	4,4	4,8	4,0	5,0	4,4	2,7
His	3,3	4,4	2,6	3,2	3,2	5,5
NH ₃	6,2	4,3	5,3	6,1	4,3	6,6
Arg	6,3	5,5	3,8	1,8	2,4	2,1
Trp	4,5	5,3	5,2	4,5	4,8	2,7
Asp	9,1	12,1	12,6	7,9	10,1	9,1
Asn	5,5	6,5	5,6	5,1	6,2	7,9
Tre	3,9	3,5	4,1	5,7	4,1	3,7
Ser	6,1	5,6	6,3	8,1	6,8	7,4
Glu	1,5	1,6	3,8	3,2	1,8	1,1
Gln	30,6	28,5	25,8	17,5	20,7	20,6
Gli	3,0	1,5	2,4	4,8	3,1	3,1
Ala	5,8	5,8	6,0	4,4	3,4	4,5
Val	3,2	3,1	3,4	6,0	6,0	5,1
Met	0,9	0,9	0,8	1,3	1,7	1,4
Ileu	1,6	1,8	1,8	2,7	3,6	3,3
Leu	2,0	2,3	2,3	3,2	4,3	3,9
Tir	1,5	2,0	3,7	8,0	8,0	7,2
Fen	0,6	0,6	0,6	1,5	1,2	2,0

o endosperma. O ácido aspártico é também, uma importante fonte de nitrogênio transportada para a semente em desenvolvimento, apresentando concentrações que oscilam em torno de 10 mol%.

A asparagina, em contraste com o que ocorre em leguminosas em geral (ATKINS *et al.*, 1975; PATE, *et al.*, 1975), não parece ser uma fonte de nitrogênio muito importante para o endosperma de milho em desenvolvimento, pois as concentrações dessa amida oscilaram em torno de 6 mol%, durante o desenvolvimento da semente.

Uma das características mais importantes na concentração de aminoácidos do exudato foi o alto nível dos aminoácidos essenciais, lisina e triptofano, em relação às concentrações desses aminoácidos no endosperma. As concentrações oscilaram em torno de 4,5 e 4,9 mol% para lisina e triptofano respectivamente. Embora os níveis desses aminoácidos tenham sido baixos aos 42 DAP, isso parece não refletir muito no endosperma, pois nesse estágio a quantidade de N que chega à semente é mínima.

4.4 - Comparação entre as composições de aminoácidos dos endospermas normal e *sugary opaque-2*

Aos 7 DAP praticamente não existem diferenças na composição de aminoácidos, entre os dois tipos de endospermas (Tabela 9). Entretanto podemos notar diferenças bem contrastantes, quando comparamos ambos os endospermas com o

TABELA 9 - Composição de aminoácidos (mol%). nos endospermas normal e sugary opaque-2, durante o desenvolvimento da semente.

		DIAS APÓS A POLINIZAÇÃO													
		7		14		21		28		35		42		51	
Amino-ácidos	normal	suo2	normal	suo2	normal	suo2	normal	suo2	normal	suo2	normal	suo2	normal	suo2	normal
Lis	4,5	4,5	3,5	4,5	3,0	5,0	2,2	4,4	2,5	4,1	1,8	4,1	1,7	4,9	
His	1,8	1,9	1,0	1,0	1,8	1,4	2,3	1,9	3,1	2,1	2,3	2,7	2,2	2,6	
Arg	2,7	2,7	2,7	3,0	2,7	3,2	2,7	3,2	3,0	3,2	2,6	3,8	2,6	4,4	
Asp	8,3	9,5	7,9	9,5	6,5	5,7	5,4	8,3	6,1	8,2	5,1	9,0	5,6	8,6	
Tre	3,9	3,9	3,9	3,8	3,7	4,0	3,6	4,2	3,4	3,8	3,7	4,2	3,4	4,3	
Ser	6,0	5,7	6,4	5,5	6,0	5,5	5,9	5,7	5,7	5,4	5,9	5,8	6,0	5,9	
Glu	24,0	24,9	17,6	22,3	18,4	22,4	17,8	18,3	17,6	18,2	17,8	14,8	18,3	14,4	
Pro	5,8	5,7	8,8	7,1	10,7	8,0	11,6	8,9	11,3	10,1	11,8	11,3	11,8	11,2	
Gli	6,3	6,3	6,7	7,6	5,5	7,7	5,0	6,6	4,2	7,1	5,3	7,9	4,9	9,1	
Ala	17,9	15,9	13,7	14,2	11,6	13,8	11,7	14,3	10,7	14,2	11,5	10,5	11,4	10,8	
Cis	-	-	0,3	-	0,5	0,4	0,5	0,4	0,4	0,6	0,8	1,0	0,8	1,0	
Val	5,7	5,6	5,6	5,9	5,1	6,0	4,7	5,5	4,5	5,3	5,0	5,7	4,7	5,9	
Met	1,1	1,1	1,3	1,4	1,7	1,4	1,4	1,4	1,4	1,2	1,4	1,1	1,4	1,5	
Ileu	3,2	3,2	4,0	3,2	3,3	3,6	3,5	3,1	3,2	3,2	3,6	3,4	3,3	3,7	
Leu	6,2	6,4	12,8	7,3	17,1	7,7	15,7	8,9	15,3	8,9	15,7	9,5	15,7	6,3	
Tir	1,0	1,1	1,3	1,3	2,3	1,9	2,5	2,1	3,1	1,8	2,4	2,3	2,4	2,3	
Fen	1,7	1,7	2,5	2,1	3,4	2,3	3,7	2,6	4,5	2,4	3,3	2,8	3,6	3,1	
Trp	1,5	1,4	1,1	1,3	1,2	1,9	1,0	1,6	0,9	1,5	0,8	1,4	0,8	1,4	

Obs. O Trp foi determinado colorimetricamente e os dados estão em por cento da proteína .

exudato (Figura 6). O aumento no pico de amônia em ambos os genótipos, representa a soma do N amídico da asparigina e principalmente da glutamina, liberado durante a hidrólise ácida a qual foram submetidos os endospermas. Isso pode ser deduzido, a partir da baixa quantidade de amônia livre que é translocada para o endosperma confirmando a idéia de que a amônia, detectada em aminogramas pode ser considerada N amídico (INGLIS *et al.*, 1974). O aumento nos picos dos ácidos aspártico e glutâmico nos endospermas em relação ao exudato se deve também a hidrólise de suas respectivas amidas.

Já aos 7 DAP, ocorre em ambos os endospermas um aumento elevado de alanina, prolina, isoleucina e leucina e em menor escala de glicina, valina e fenilalanina, em relação as concentrações encontradas no exudato (Figuras 6-A, 6-B, 6-C e Tabelas 8 e 9). Nos aminogramas do endosperma não aparece o triptofano, pois este aminoácido é oxidado durante a hidrólise ácida.

Aos 14 DAP, notamos uma diferenciação na composição de aminoácidos entre os endospermas dos dois genótipos. A leucina aparece numa proporção muito maior no endosperma normal que no duplo mutante (Figuras 7-B, 7-C e Tabela 9). Nesse estágio, a lisina aparece com uma concentração menor que no estágio anterior no endosperma normal, enquanto que no endosperma duplo mutante permanece constante (Tabela 9). Em contraste, a leucina no normal, tem praticamente o dobro da concentração do duplo mutante (Tabela 9). Esse salto no conteúdo da leucina pode ser associado ao salto na síntese da zeína dos 7 aos 14 DAP, visto que esse aminoácido o-

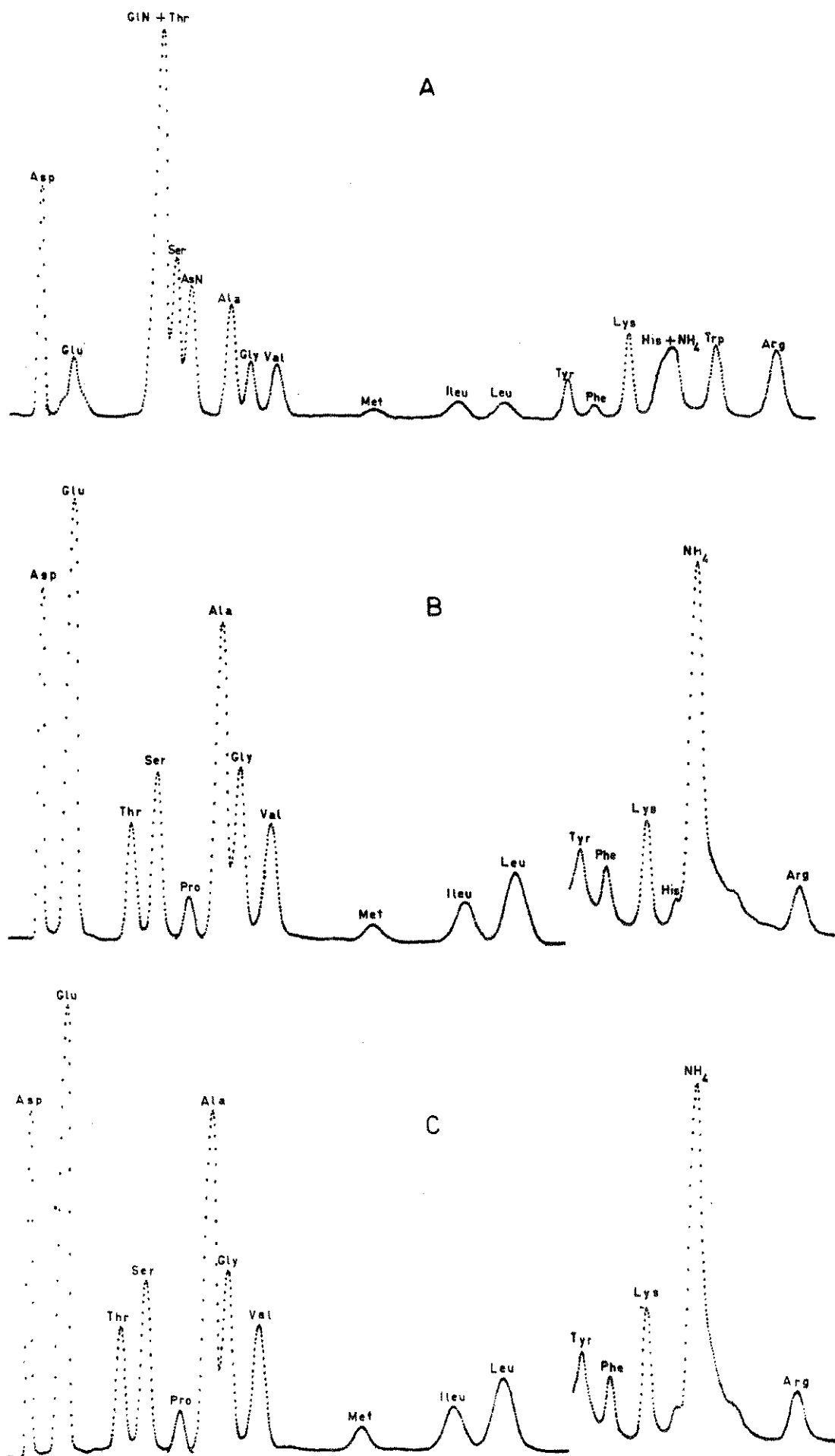


Figura 6 - Comparação entre as aminogramas do exudato (A) e dos endospermas *sugary opaque - 2* (B) e normal (C) analisados aos 7 DAP.

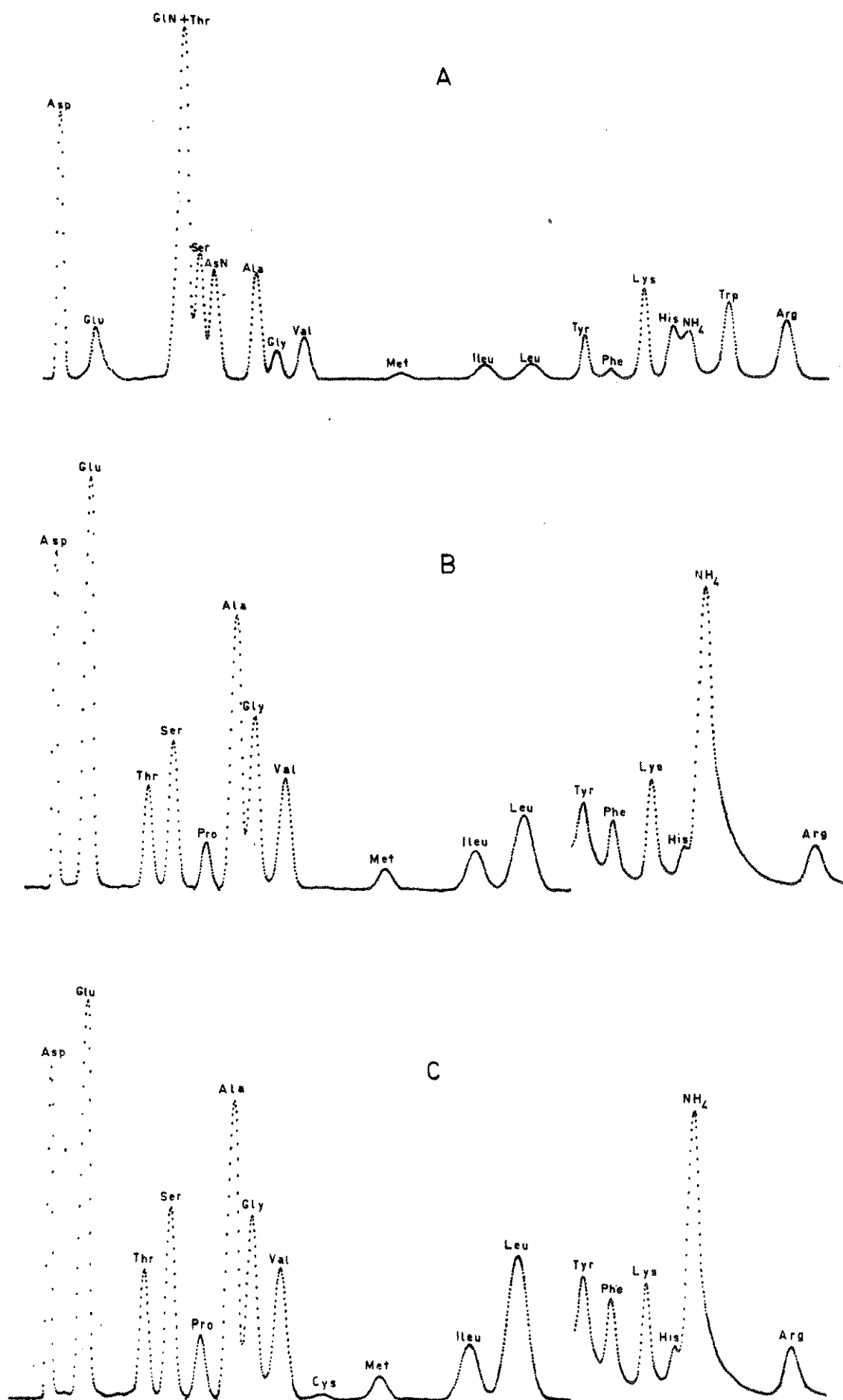


Figura 7 - Comparação entre os aminogramas do exudato (A) e dos endospermas *sugary opaque* - 2 (B) e normal (C) analisados aos 14 DAP.

corre em altas concentrações nessa proteína (MOSSÉ *et al* , 1966; SODEK e WILSON, 1971). O triptofano por sua vez diminuí em concentração no endosperma normal, porém permanece constante no duplo mutante durante o desenvolvimento do endosperma (Tabela 9). Os outros aminoácidos são praticamente idênticos em ambos os endospermas.

Essas características de aumento de leucina e diminuição de lisina no endosperma normal, são acentuadas durante todo o processo de desenvolvimento do endosperma (Figuras 8 e 9 e Tabela 9).

Uma análise detalhada da Tabela 9, mostra algumas diferenças na composição de aminoácidos dos dois tipos de endosperma. Como pode ser visto, alguns aminoácidos mantem-se em média constantes e em concentrações semelhantes em ambos os genótipos, durante o desenvolvimento da semente. Assim temos a histidina, com 2,1 mol% no endosperma nore 1,9% mol% no *suo2*; arginina , 2,7 mol% no normal e 3,3 mol% no *suo2*; treonina, 3,6 mol% no normal e 4,0 mol% no *suo2*; serina, 6,0 mol% no normal e 5,6 mol% no *suo2*; glicina, 5,4 mol% no normal e 7,5 mol% no *suo2*; valina, 5,0 mol% no normal e 5,7 mol% no *suo2*; isoleucina 3,4 mol% no normal e 3,3 mol% no *suo2*. Por outro lado, alguns aminoácidos diminuem com o desenvolvimento da semente, como é o caso do ácido aspártico, apresentando uma diminuição de 8,3 para 4,6 mol% dos 7 aos 51 DAP no endosperma normal, porém mantendo-se em níveis constantes ao redor de 8,5 mol% no endosperma *suo2*. O ácido glutâmico apresenta uma diminui-

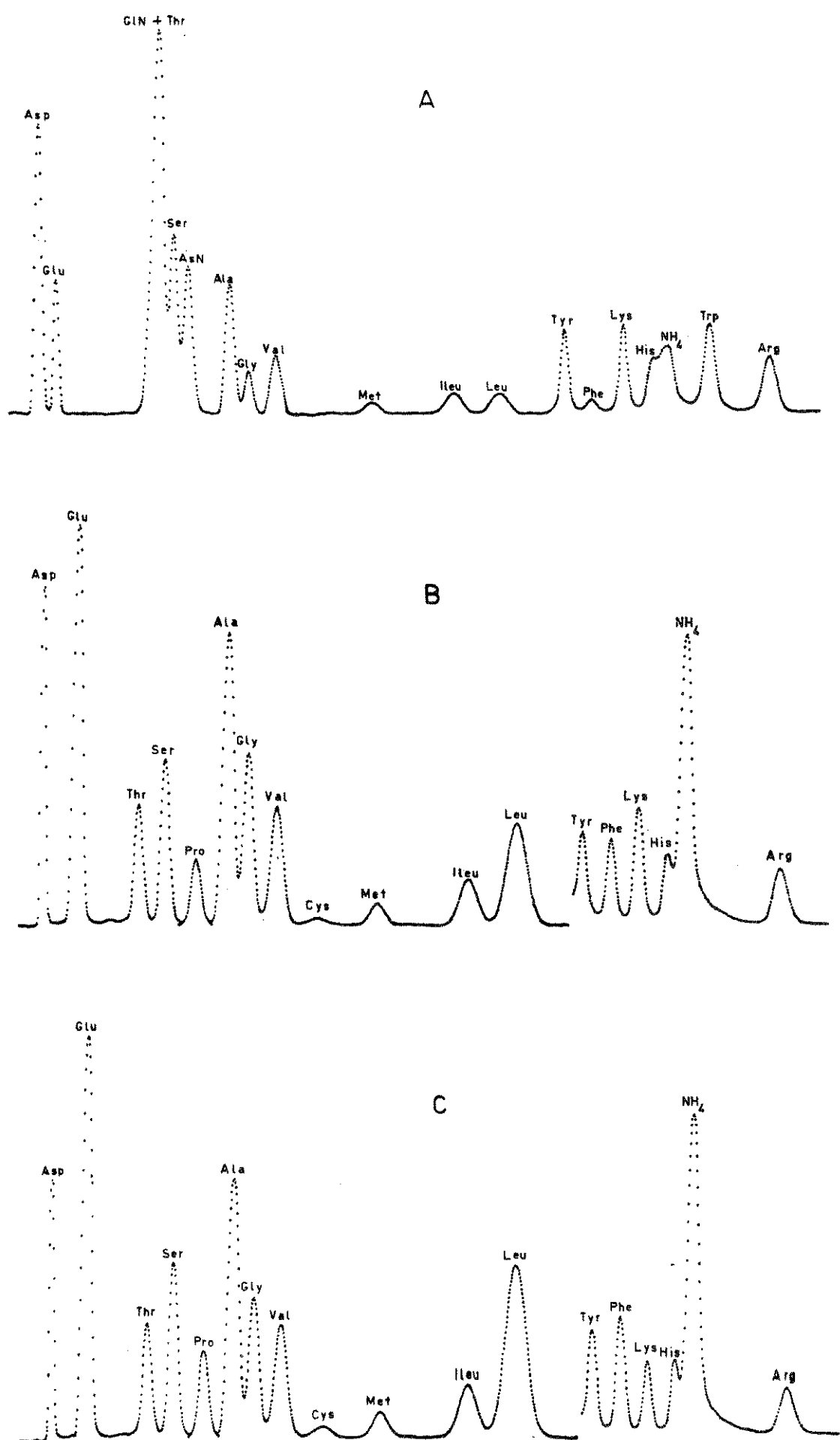


Figura 8 - Comparação entre os aminogramas do exudato (A) e dos endospermas *sugary opaque* - 2 (B) e normal (C) analisados aos 28 DAP.

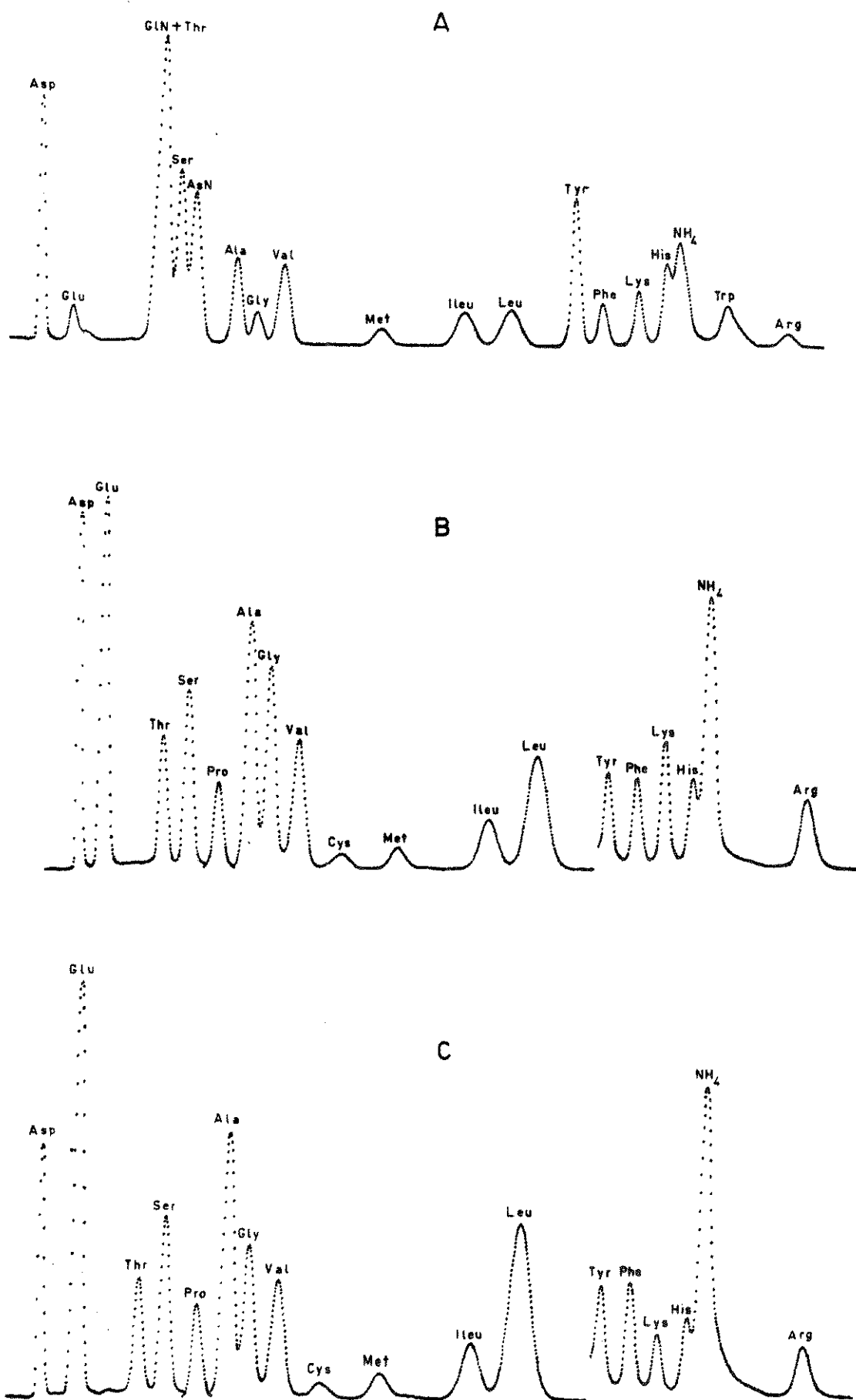


Figura 9 - Comparação entre os aminogramas do exudato (A) e dos endospermas *sugary opaque - 2* (B) e normal (C) analisados aos 42 DAP.

ção ao longo da maturação observada somente no endosperma *su02*. A alanina diminuiu dos 7 aos 14 DAP, apresentando concentrações constantes nos estágios restantes no endosperma normal. No endosperma *su02* a alanina é constante até os 35 DAP, diminuindo a partir desse estágio. A prolina, aumenta de concentração dos 7 aos 14 DAP permanecendo constante a partir desse estágio em ambos os genótipos.

4.5 - Conteúdo dos aminoácidos no Endosperma: Estimado vs Observado

Baseando-se no conteúdo de aminoácidos do pedúnculo e calculando-se o fluxo dos mesmos para o endosperma, a partir das taxas de acumulação de nitrogênio, a quantidade de aminoácidos preformados que entram no endosperma, foi estimada e comparada com os níveis dos mesmos no endosperma. Como os dois genótipos de endosperma, foram intencionalmente produzidos na mesma espiga, essa comparação fica mais precisa, visto que as formas nitrogenadas translocadas para os dois tipos de endosperma são exatamente as mesmas.

Esse método de estudo foi aplicado somente para alguns aminoácidos, visando principalmente aqueles que apresentam uma alta taxa de síntese ou catabolismo, procurando assim evidenciar a ação dos genes *sugary* e *opaque-2* no controle desses processos.

4.5.1 - Aminoácidos da família do aspartato.

Os aminoácidos da família do aspartato tem a sua biossíntese bem definida em vários procariotos e em algumas

espécies de plantas superiores. Recentemente, essa via metabólica foi evidenciada em endosperma de milho (HENKE e WAHNBAECK, 1977; GENGENBACH, *et al.*, 1978). Um esquema simplificado da síntese dos aminoácidos a partir do aspartato é mostrado na Figura 10.

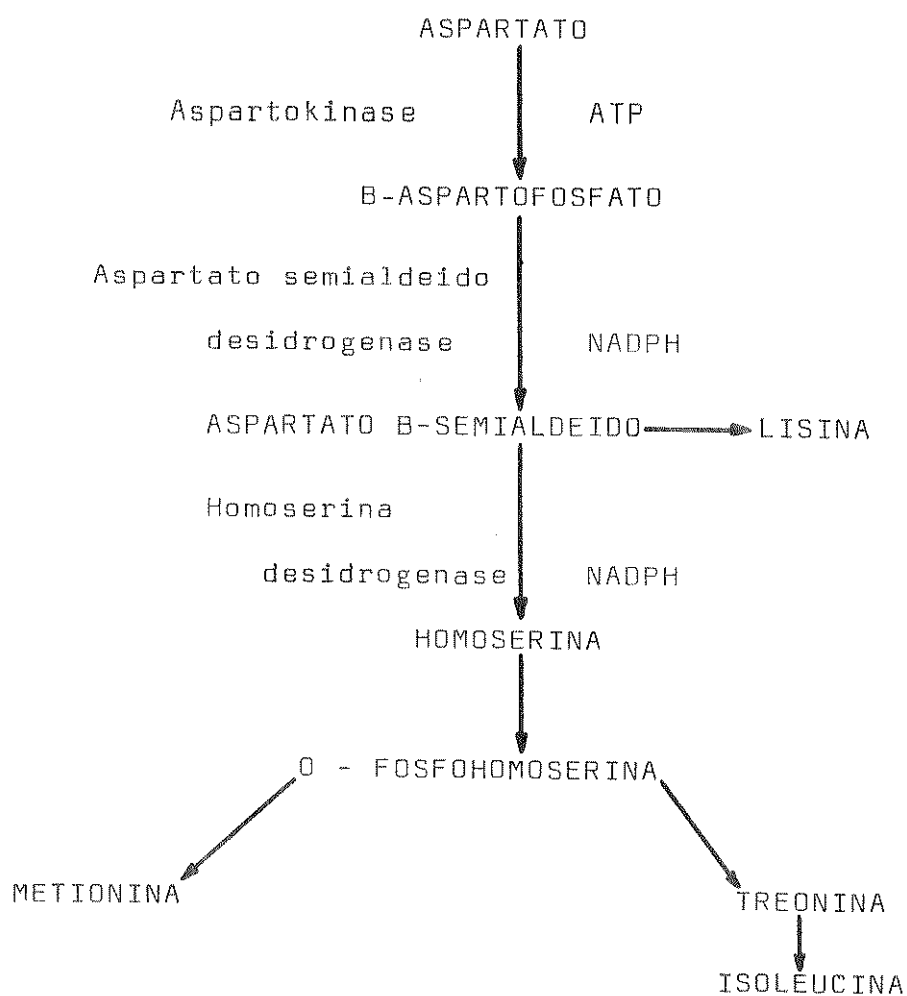


FIGURA 10 - Biossíntese dos aminoácidos da família do aspartato.

As figuras 11, 12, 13, 14 e 15 mostram as quantidades estimadas e observadas do aspartato e seus derivados. O aspartato, (Figura 11) está representado como Asx (MOUREAUX e LANDRY, 1972), correspondendo à soma do ácido aspártico e asparagina. Esse agrupamento se faz necessário tendo em vista que a asparagina do endosperma é convertida em ácido aspártico durante a hidrólise ácida.

A quantidade de Asx translocada é bem maior que aquela que se encontra incorporada no endosperma, para ambos os genótipos. Isso indica que uma parte do Asx translocado para o endosperma em desenvolvimento é catabolizado. Entretanto se compararmos as figuras 12, 13, 14 e 15 com a figura 11, veremos que apenas 30% do Asx catabolizado é aparentemente utilizado para a síntese dos aminoácidos da família do aspartato. Essa estimativa foi efetuada a partir das quantidades sintetizadas desses aminoácidos, que consiste na diferença entre as quantidades estimadas e observadas. É importante ressaltar que essas estimativas consistem no ganho ou perda líquida de cada aminoácido. Elas nos dão, em linhas gerais, uma idéia do metabolismo líquido de aminoácidos no endosperma, não podendo ser assumidos, obviamente, como valores absolutos.

Entre os aminoácidos da família do aspartato, e também considerado nutricionalmente de fundamental importância, encontra-se a lisina (Figura 10). Esse aminoácido apresenta diferenças marcantes quanto ao padrão de translocação e acúmulo entre os endospermas normal e *sugary opaque-2* (Figura 12). Enquanto as quantidades de lisina por

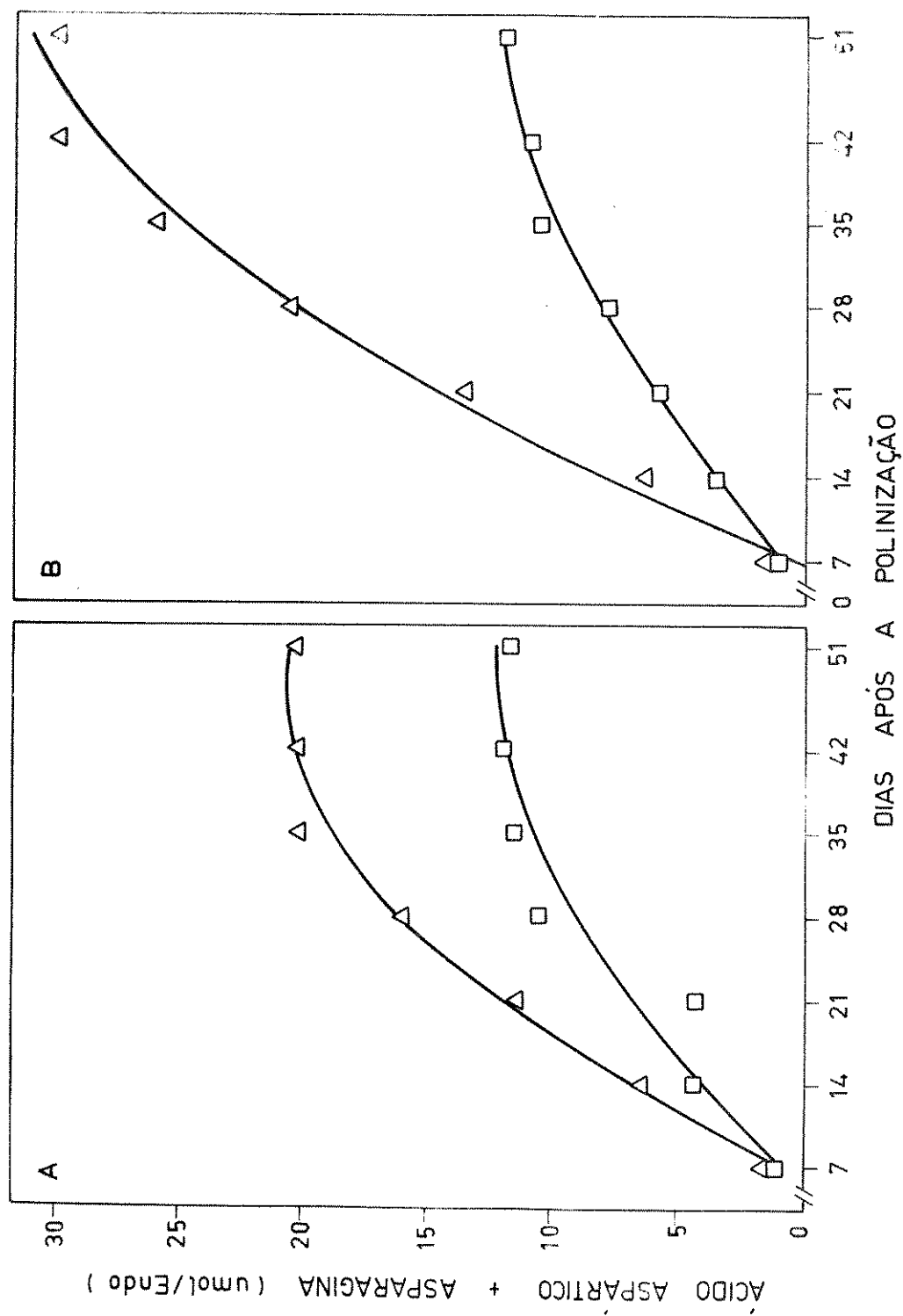


Figura 11 - Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de ácido aspártico + asparagina nos endospermas *sugary opaque - 2* (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente.

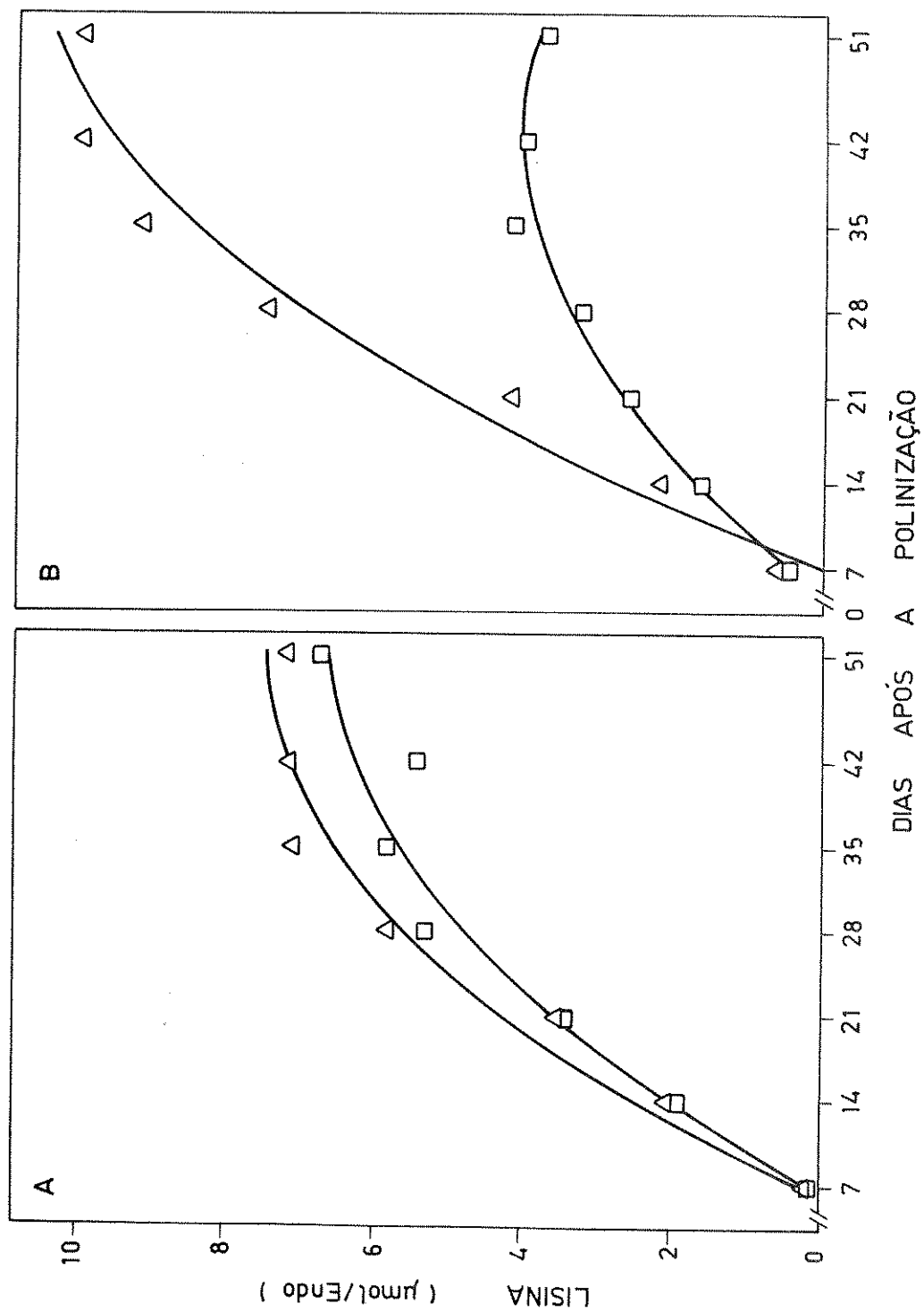


Figura 12 - Quantidades estimadas (triângulos) e observada (quadrados) de lisina nos endospermes *sugary opaque - 2* (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente.

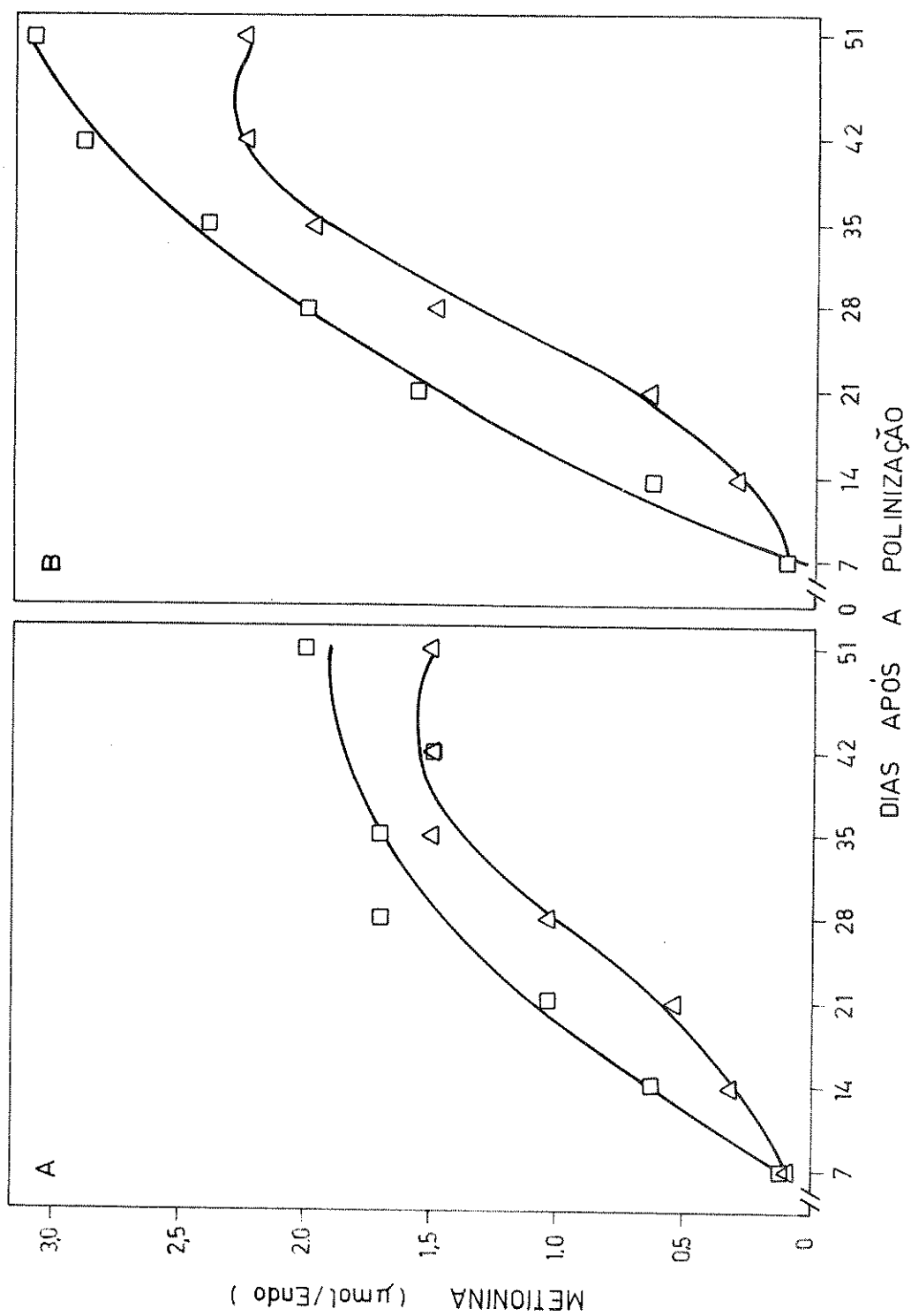


Figura 13 - Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de metionina nos endospermas *sugary opaque - 2* (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente.

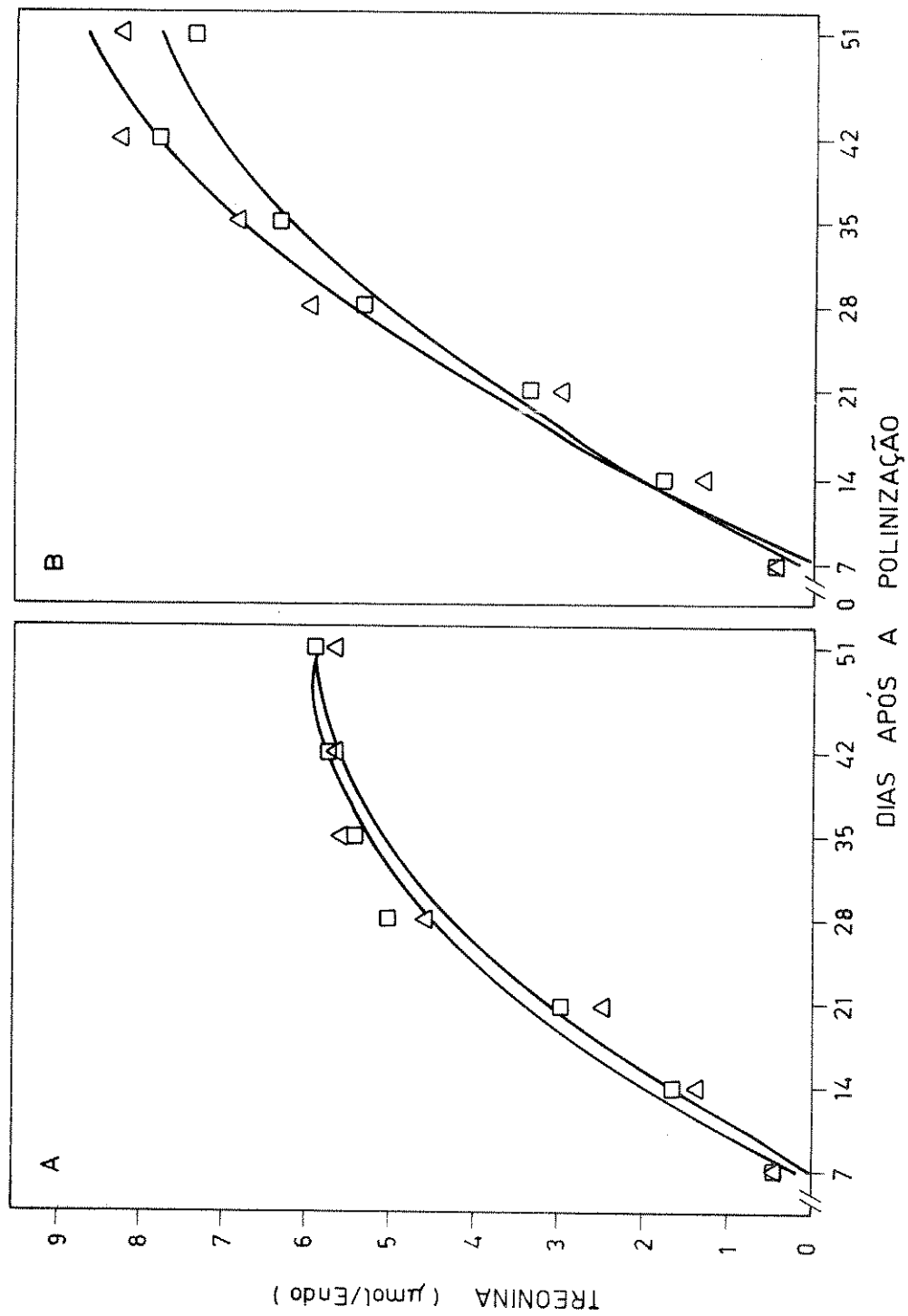


Figura 14 - Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de treonina nos endospermas *sugary opaque - 2* (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente.

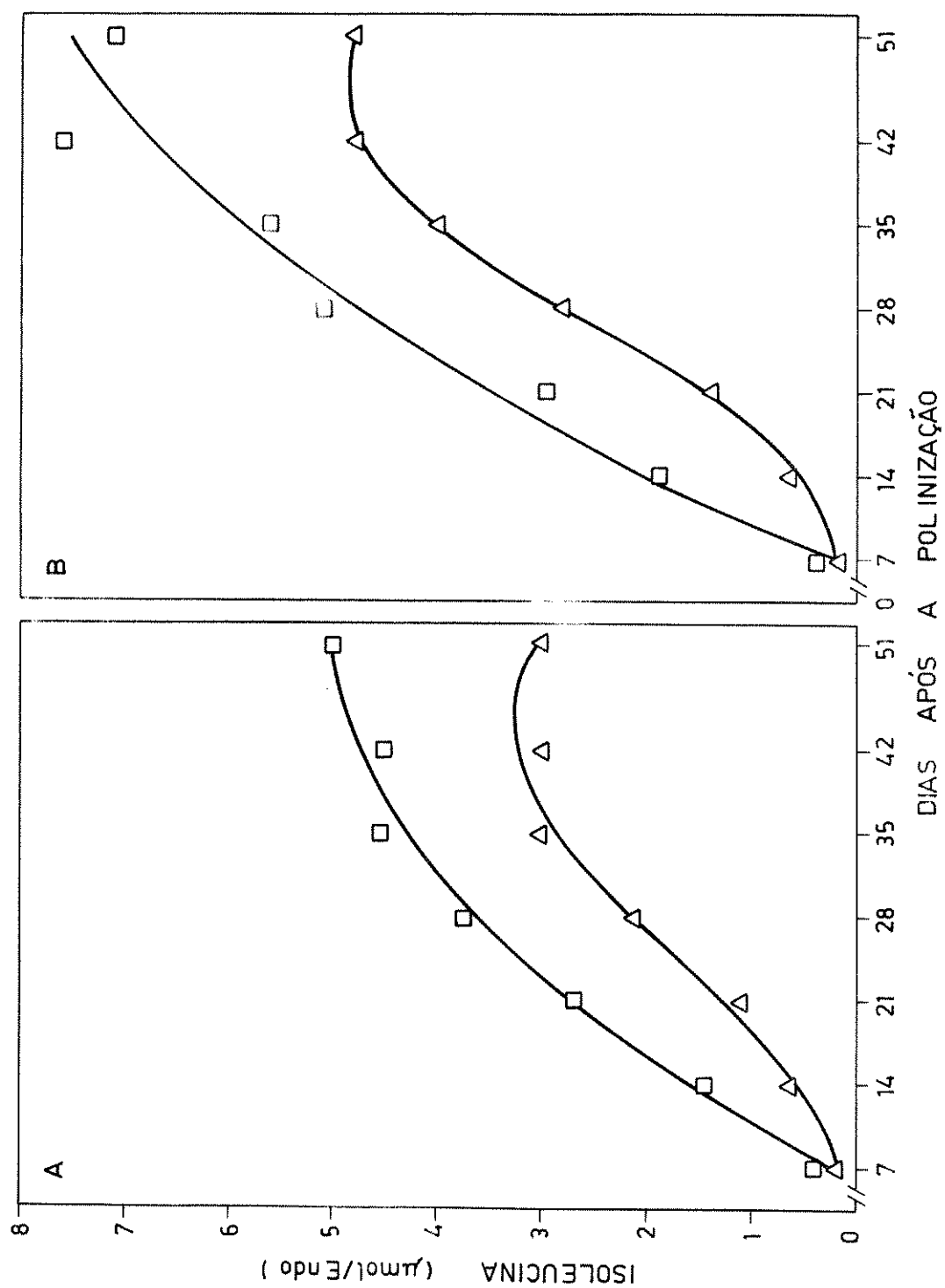


Figura 15 - Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de isoleucina nos endospermas *sugary opaque - 2* (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente.

soleucina.

Admitindo que a via do aspartato realmente ocorre de maneira como está representada na Figura 10, podemos concluir a partir dos dados obtidos que dos seus aminoácidos derivados, somente a síntese de lisina, apresenta-se sob o controle do duplo mutante.

4.5.2 - Ácido glutâmico, glutamina, leucina e alanina

A glutamina é o aminoácido translocado em maior quantidade para o endosperma (Tabela 8). No endosperma, a glutamina é transformada em ácido glutâmico (SODEK e SILVA, 1977), segundo a reação:



A figura 16 mostra as quantidades estimadas e observadas do ácido glutâmico mais glutamina (Glx). Aqui, a exemplo do aspartato, os dados estimados representam a soma de Gln e Glu. Como podemos observar, as quantidades estimadas são maiores que as quantidades observadas, sendo essa diferença semelhante para ambos os genótipos.

A leucina e a alanina, são os dois aminoácidos mais sintetizados no endosperma (Figura 17 e 18). Isso pode ser deduzido pelas diferenças entre as quantidades estimadas e observadas. Para a alanina as diferenças são semelhantes em ambos os genótipos, mas para a leucina as diferenças são bem contranstantes. A curva de síntese desse aminoáci-

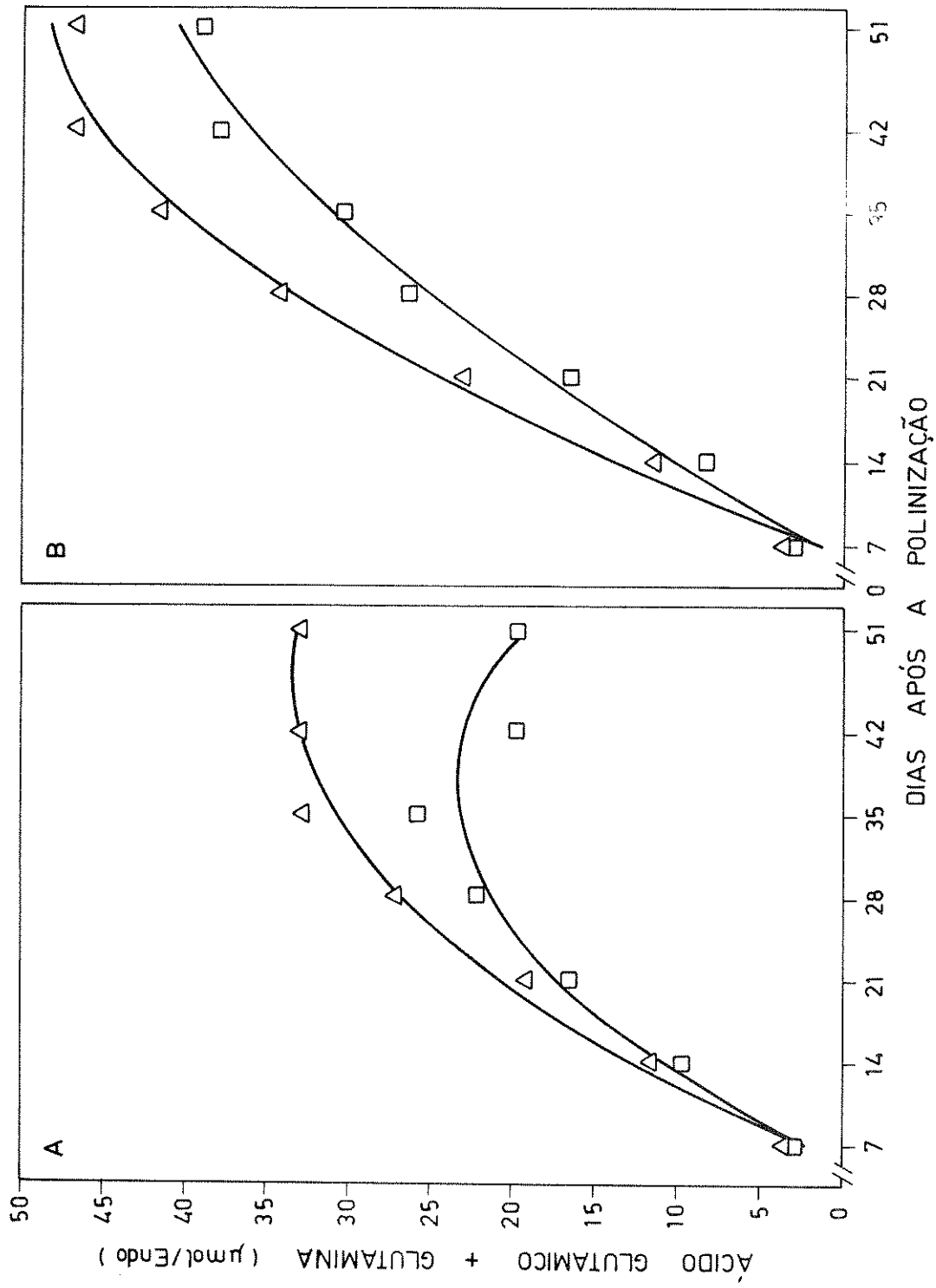


Figure 16 - Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de ácido glutâmico + glutamina nos endospermas *sugary opaque - 2* (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente.

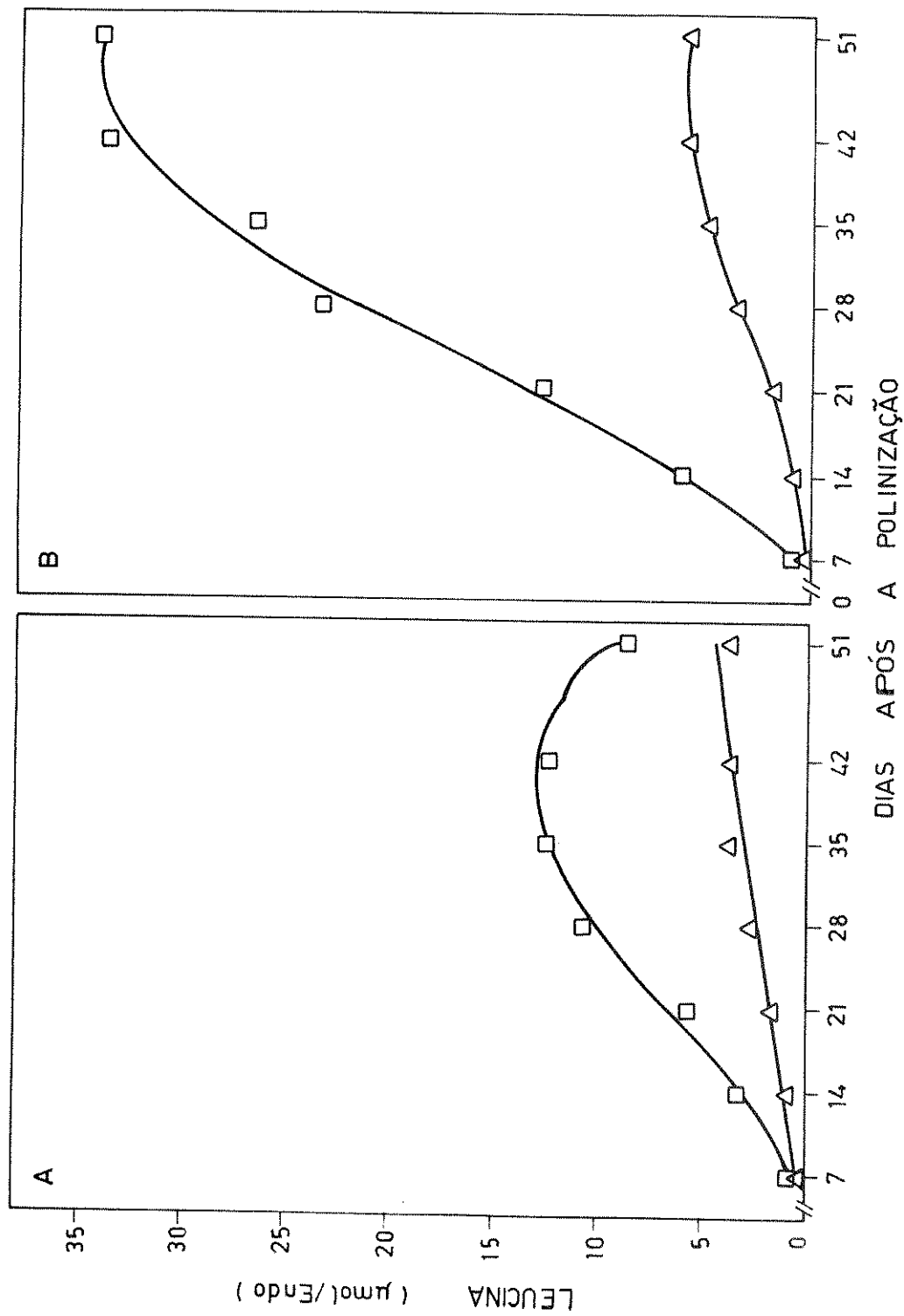


Figura 17 - Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de leucina nos endospermas *sugary opaque-2* (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente.

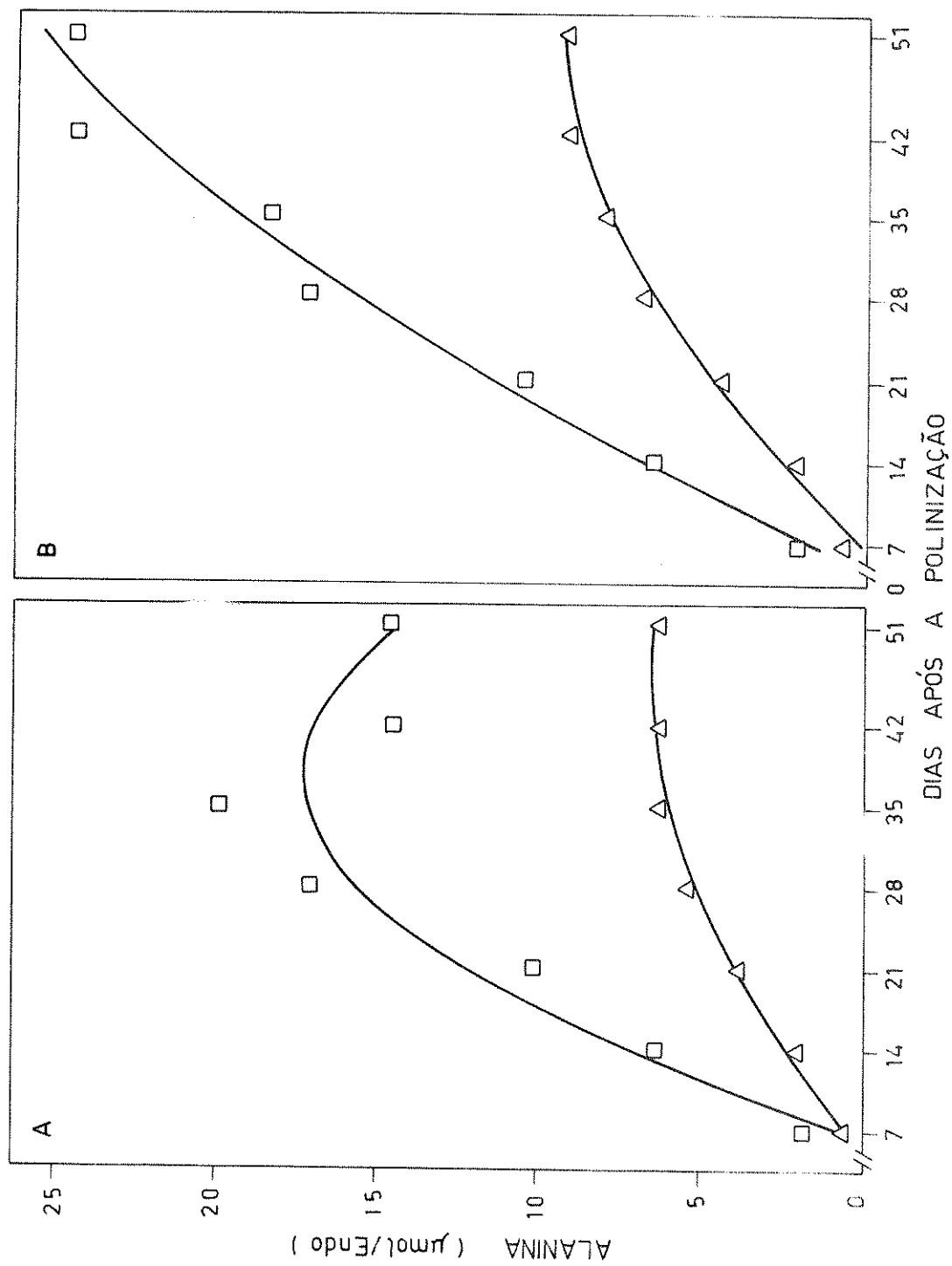


Figura 18 - Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de alanina nos endospermas, *sugary opaque-2* (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente.

dos é 2 a 3 vezes menor no endosperma duplo mutante (Figura 17-A). Essa diferença pode ser atribuída a diferença de zei na entre esses dois tipos de endosperma, tendo em vista que essa proteína é rica em leucina.

4.5.3 - Triptofano

O triptofano, outro aminoácido essencial com baixo teor no milho, tem sido pouco estudado em plantas. Apesar de existir uma certa correlação entre esse aminoácido e a lisina em endosperma de milho, pouco se sabe sobre o controle da sua biossíntese nesse tecido.

Os resultados obtidos neste trabalho dão alguma evidência do controle do conteúdo de triptofano em endosperma de milho. Como pode ser visto através da Figura 19, ocorrem diferenças extremamente grandes entre as quantidades estimadas e observadas desse aminoácido. Tanto para o endosperma normal, como para o duplo mutante, cerca de 75 a a 85% do triptofano translocado, é provavelmente catabolizado dos 14 aos 51 DAP. A exemplo da lisina, esse aminoácido deve ser sintetizado em outras partes da planta, provavelmente nas folhas, e transportado para o endosperma em desenvolvimento. No endosperma uma grande porção desse aminoácido é catabolizada. Porém, ao contrário do que ocorre para lisina esse catabolismo parece não estar sob o controle do endosperma duplo mutante.

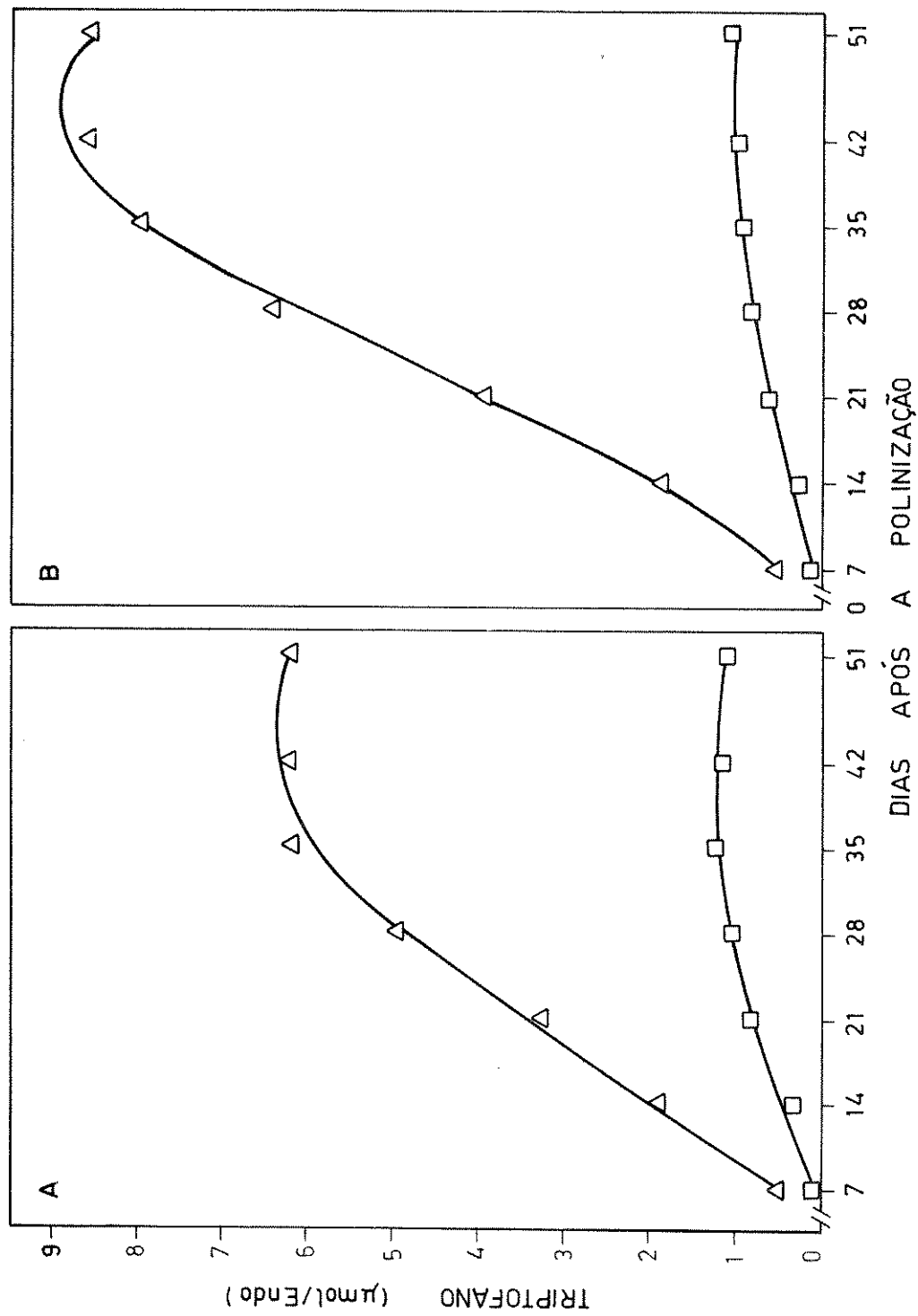


Figura 19 - Quantidades estimadas (triângulos) e observadas (quadrados) de tripofano nos endospermas *sugary opaque - 2* (A) e normal (B), durante o desenvolvimento da semente.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Interrelação entre as características físicas e químicas do endosperma, durante o desenvolvimento da semente.

O estudo dos componentes que constituem o endosperma de milho durante o desenvolvimento da semente, tem se constituído num excelente método de análise para compreensão do metabolismo dinâmico desse tecido, tanto do ponto de vista das interrelações entre esses componentes, como também da ação de alguns genes no metabolismo da semente. Dados obtidos durante o desenvolvimento da semente, dão uma idéia da ação dos genes ao longo da formação do endosperma.

O acúmulo de nitrogênio proteico no endosperma tem merecido considerável atenção, visto que o aumento da proteína nesse tecido pode refletir-se numa elevada valorização dos cereais em geral, utilizados tanto na alimentação humana, como animal.

Em vários países , os programas de melhoramento de plantas tem dado atenção especial para a elevação da qualidade nutritiva dos cereais através do aumento da concentração de proteína e pela alteração da composição de aminoácidos das mesmas, visando elevar o teor de lisina e outros aminoácidos essenciais. O maior problema nesse programa consiste em se conciliar a maior produção de grãos com o aumento ou melhoria da qualidade nutritiva da proteína. Um dos problemas fundamentais, é que a concentração de proteínas encontra-se inversamente correlacionada com a produção de grãos (NARAHARI *et al.*, 1976). Por outro lado o aumento de proteína requer um alto custo energético para alterar o equilíbrio da produção de carboidratos e proteínas do endosperma de cereais (BHATIA e RABSON, 1976). Um outro problema ainda maior é quando se aumenta a proteína do endosperma, eleva-se a concentração de zeína (HANSEN *et al.*, 1946), em detrimento das outras proteínas. Com isso, diminuiu-se o conteúdo de lisina no endosperma, baixando assim a qualidade nutritiva do produto (FLYNN *et al.*, 1954; MALIK, 1973; DECAU e PUJOL, 1974; PERRY e OLSON, 1975; TSAI *et al.*, 1978). Em função disso, a quantidade de lisina no endosperma apresenta-se negativamente correlacionada com a quantidade de proteína (DRAPER, 1975).

Um outro aspecto interessante pode ser inferido quando se estuda o acúmulo de nitrogênio em mutantes que bloqueiam a síntese de amido no endosperma. Quase todos esses genes apresentam uma drástica redução no peso da semente, porém mantendo a concentração de nitrogênio no endos -

perma (MISRA *et al.*, 1972; ARRUDA *et al.*, 1978; SILVA *et al.*, 1978). Além disso, a síntese de zeína é diminuída, a taxa de nitrogênio solúvel e glutelina aumentam, aumentando assim o conteúdo de lisina no endosperma (MISRA *et al.*, 1972; MISRA *et al.*, 1973; DALBY e TSAI, 1975; ARRUDA *et al.*, 1978). Quando consideramos o nitrogênio proteico do endosperma em valores absolutos, notamos que em vista do baixo peso do endosperma, ele é drasticamente menor (DALBY e TSAI, 1975; ARRUDA *et al.*, 1978). Assim, se compararmos os efeitos desses mutantes, com o efeito do aumento de nitrogênio no endosperma normal, veremos que existe uma certa correspondência, porém no sentido inverso. Se de um lado, no endosperma normal o aumento de nitrogênio causa um aumento de zeína e diminuição de lisina, o inverso ocorre nos mutantes de carboidrato. Nestes, uma severa diminuição no conteúdo de nitrogênio deve ser responsável por certa diminuição no conteúdo de zeína. Entretanto, o problema consiste em identificarmos até onde o efeito desses genes se processa a nível fisiológico, indireto, ou se é um efeito direto dos mesmos no metabolismo de nitrogênio da semente.

Os resultados obtidos no presente trabalho envolvendo o efeito do duplo mutante *suo2*, nas características físicas e químicas do endosperma, podem auxiliar o entendimento do controle do metabolismo de N no endosperma. O material analisado é bastante adequado para esse tipo de estudo, pois no duplo mutante, além do efeito de gene *o2*, condicionando a redução da zeína no endosperma, mani-

feita-se também o efeito do gene *su* cuja principal característica é bloquear a síntese de amido no endosperma (CREECH, 1968; TSAI *et al.*, 1970; SHANNON e CREECH, 1973).

O acúmulo de N embora apresentando um mesmo tipo de curva assintótica, é bem menor no duplo mutante do que no tipo normal (Figura 4-D). Essa diminuição se processa à semelhança da diminuição observada para o peso seco (Figura 4-B). A taxa de incorporação de N diminuindo no duplo mutante pode acarretar numa diminuição na síntese de zeína nesse endosperma.

A porcentagem de nitrogênio por matéria seca (N/MS) (Tabela 3) é muito semelhante em ambos os genótipos, durante o desenvolvimento da semente. Como o endosperma de milho, é constituído em quase a sua totalidade por carboidratos e proteínas, a relação N/MS pode ser inferida como relação N/carboidratos. Assim, os dados sugerem que a relação entre esses dois componentes constitui-se em um mecanismo importante para a formação da semente, pois ela não é modificada mesmo no duplo mutante. Em outras palavras, o equilíbrio energético, citado por BHATIA e RABSON (1976), para a produção desses dois componentes deve ser extremamente rígido, pois não é alterado nem pelo mutante que atua na síntese de amido no endosperma.

Se por um lado, a associação entre o nitrogênio e o peso seco apresenta-se bem estreita, com coeficientes de correlação de 0,99 para o endosperma normal, e 0,98 para o duplo mutante (Tabela 4), a associação entre N e peso fresco é menor, principalmente no duplo mutante. Isso pode

ser facilmente entendido, visto que o peso fresco apresenta a componente água/endosperma, a qual está fracamente correlacionada com o conteúdo de nitrogênio (Tabela 4). Por outro lado, o conteúdo de água, sendo muito maior no duplo mutante (Figura 4-C), reforça ainda mais a idéia da associação N/MS, mostrando que o influxo de N no endosperma parece não ser dependente da quantidade de água, pois se assim o fosse, o duplo mutante deveria apresentar maior conteúdo de N que o endosperma normal.

Dessa maneira, com base nos dados obtidos poder-se-ia sugerir que o baixo conteúdo de zeína no endosperma duplo mutante (Tabela 5 e figura 5-B) é resultante de um efeito direto do gene *opaque-2* e de um efeito indireto causado pelo gene *su* que reduz drasticamente a taxa de influxo de N no endosperma.

Outra fração proteica, que apresenta diferenças marcantes entre os dois tipos de endosperma é a fração 1 (Tabela 5 e figura 5-A). Ela é bem maior no duplo mutante, principalmente nos estágios intermediários do desenvolvimento da semente. Essa fração proteica está correlacionada com o conteúdo de água e minerais no endosperma, principalmente no endosperma duplo mutante (Tabela 6). Alguns autores tem sugerido que a fração 1, funciona como precursora da zeína (LANDRY e MOUREAUX, 1972; SODEK e WILSON, 1970). No duplo mutante a síntese de zeína sendo severamente diminuída acarretaria um acúmulo da fração 1 no endosperma. Esse acúmulo da F.1 pode determinar, em associação com outros fatores uma diminuição no potencial osmótico do endos

perma, causando um aumento no conteúdo de água.

As outras frações proteicas apresentam taxas de síntese semelhantes nos dois tipos de endosperma (Figura 5), principalmente a glutelina 3 (Figura 5-E), que corresponde à segunda fração proteica do endosperma em quantidade.

Enquanto o acúmulo de nitrogênio apresenta - se fortemente ligado ao acúmulo de matéria seca no endosperma, o potássio, magnésio e fósforo mostram um padrão de acúmulo bem contrastante em relação ao N, mostrando diferenças extremamente grande nos dois tipos de endosperma (Figura 4). Potássio, magnésio e fósforo (Figuras 4-E, 4-F e 4-G, respectivamente) apresentam-se fortemente correlacionados com o conteúdo de água no endosperma (Tabela 4). Essa associação é bem mais estreita no duplo mutante, em função da sua maior quantidade de água. Alguns autores tem demonstrado que o mutante *opaque-2* também condiciona maior conteúdo de água e minerais no endosperma (ARNOLD *et al.*, 1977a; ARNOLD *et al.*, 1977b; BAUMAN, 1975; GOODSELL, 1968; ELMORE, 1970). Entretanto esses trabalhos deixam dúvidas se essa associação é causada por um efeito direto ou indireto do mutante rico em lisina. Os dados aqui obtidos, embora não tenham permitido uma análise do efeito do gene *opaque-2* isoladamente, sugerem que a ação desse mutante no conteúdo de minerais no endosperma, é provavelmente do tipo indireto. No duplo mutante o acúmulo de polissacarídeos solúveis (CREECH, 1968; SHANNON e CREECH, 1973), e da fração-1, cujo conteúdo é representado em média por 50% de aminoácidos livres (ARRUDA *et al.*, 1978), acarretaria uma maior entrada de á-

gua no endosperma, que assim transportaria uma maior quantidade de minerais para a semente.

5.2 - Biossíntese de aminoácidos

Os aminoácidos da semente podem ser derivados de várias fontes. Em plantas anuais, o desenvolvimento da semente é frequentemente acompanhado pela senescência das folhas, e durante esse processo as proteínas são hidrolizadas e os produtos translocados para a semente em desenvolvimento (BEEVERS, 1976). Entretanto, a composição das proteínas das folhas diferem do *pool* de nitrogênio solúvel da semente, o que revela a necessidade de catabolismo de alguns aminoácidos e síntese de outros para que se atinja um *pool* adequado, para a síntese de proteínas do endosperma. O componente nitrogenado para a síntese de aminoácidos pode ser derivado de grupos amino das amidas que são translocadas para a semente, podendo os esqueletos de carbono serem fornecidos pelos carboidratos translocados (BEEVERS, 1976).

Estudos recentes, tem revelado que as amidas glutamina e asparagina comportam-se como transportadoras de N para o endosperma, doando-o numa reação catabolizada pela glutamato síntase (glutamina oxoglutarato amino transferse ou GOGAT), no caso da glutamina, ou pela asparagina - se, no caso da asparagina (MIFLIN e LEA, 1977; MIFLIN e LEA, 1978; ATKINS *et al*, 1975).

Esses estudos sobre o transporte de N, tem sido

conduzidos através da análise do exudato que é translocado para as sementes em formação (PATE *et al.*, 1964; PATE *et al.*, 1974; PATE *et al.*, 1975; ATKINS *et al.*, 1975; LORENZ, 1976). Com isso tem sido possível demonstrar em várias espécies de plantas, que as formas nitrogenadas Gln e Asn, são as principais fontes de N para as sementes, e são translocadas em concentrações que variam de 35 a 70% do N total. Porém a relação entre essas duas amidas varia de espécie para espécie. Enquanto em leguminosas em geral a Asn é a maior forma nitrogenada translocada para a semente (ATKINS *et al.*, 1975; PATE *et al.*, 1975) em tomate a Gln é o aminoácido mais translocado para o fruto (LORENZ, 1976).

Nesse trabalho procurou-se determinar a composição de aminoácidos que é translocada para a formação das proteínas da semente, e compará-la com os aminoácidos incorporados nas proteínas dos dois tipos de endosperma.

A maioria dos trabalhos sobre o transporte de N para os órgãos reprodutivos em formação, tem sido baseada no exudato do xilema. Entretanto, PATE *et al.* (1975), mostraram que na nutrição da semente de *Lupinus*, o N é translocado via floema em quantidade, 10 a 20 vezes maior que o N carregado no xilema.

Neste trabalho, para testar se o exudato representa o xilema ou o floema, ou ambos, usou-se marcadores que atuam como indicadores de cada um desses sistemas vasculares, segundo PATE *et al.*, (1964) e PATE *et al.*, (1975). Assim do exudato coletado do pedúnculo das espigas, deter

minou-se o conteúdo de sacarose, indicador do exudato do floema, e nitrato que caracteriza o exudato do xilema. Os açúcares redutores e sacarose foram determinados pela diferença na quantidade de açúcares totais antes e depois da hidrólise com HCl 1N, através do ácido 3,5-dinitrossalicílico (McCREADY *et al.*, 1974). O nitrato foi determinado pelo método do ácido fenoldissulfônico (GALLO e LOTT, 1965).

O exudato do pedúnculo das espigas mostrou uma concentração de 120 mg/ml de sacarose, 36 mg/ml de açúcares redutores e 178 mg/ml de nitrato. Isso indica que a amostra é constituída de exudatos tanto do xilema como do floema. A presença de açúcares redutores parece indicar a ocorrência de alguma contaminação que poderia surgir tanto das células da medula, onde os pedúnculos foram seccionados, como também em decorrência da inversão de sacarose durante o processo de extração.

Como tinha sido previamente sugerido por SODEK e SILVA (1977), com base na atividade da GOGAT, em milho, a glutamina é o aminoácido transportado em maior quantidade para o endosperma (Tabela 8). Esses resultados, poderiam explicar o alto nível de glutamina livre encontrada no endosperma (SODEK e WILSON, 1971; ARRUDA *et al.*, 1978) que aparentemente acha-se associado à alta atividade da GOGAT no endosperma (SODEK e SILVA, 1977).

O ácido aspártico demonstra ser também uma importante fonte carregadora de N para o endosperma, ao passo que a asparagina, em contraste com o que tem sido en-

contrado em leguminosas (ATKINS *et al.*, 1975; PATE *et al.*, 1975) tem pouco significado no transporte de N (Tabela 8) em milho.

Quando se compara as formas nitrogenadas translocadas, com aquelas que se encontram incorporadas no endosperma (Figuras 11 a 19) notamos que alguns aminoácidos são sintetizados em grande extensão no endosperma, enquanto outros são catabolizados.

Como pode ser visto na figura 11, a quantidade de Asx translocada para a semente é bem maior que a quantidade encontrada no endosperma, principalmente no endosperma normal (Figura 12-B). Neste tipo a quantidade translocada chega a ser aproximadamente duas vezes maior que a quantidade observada. Fica assim aparentemente demonstrado a utilização do Asx, na síntese de seus aminoácidos derivados em endosperma de milho.

O primeiro aminoácido da via metabólica do aspartato é a lisina (Figura 10). Esse aminoácido tem uma importância fundamental nessa via, pois exerce um controle regulatório na primeira enzima, a aspartokinase, a qual transforma o Asp em aspartato B-semialdeído (PAULUS e GRAY, 1967; BRYAN *et al.*, 1970; BRIGHT *et al.*, 1978; AARNES, 1977; GEGENBACH *et al.*, 1978; DAVIES e MIFLIN, 1978; CHESIRE e MIFLIN, 1975; WONG e DENNIS, 1973; MATHEWS e WIDHOLM, 1978; HENKE e WAHNBAECK, 1977). Comparando-se a quantidade translocada desse aminoácido com o conteúdo encontrado no endosperma (Figura 12), encontra-se uma diferença marcante entre os dois genótipos estudados. Enquanto para o en-

dosperma *suo2*, a quantidade de lisina translocada é bem se semelhante àquela encontrada no endosperma (Figura 12-A), no tipo normal os valores estimados são bem maiores que os valores observados (Figura 12-B). A quantidade de lisina translocada chega a ser 2,5 vezes maior que a quantidade existente nesse endosperma, principalmente após os 21 DAP. Esses dados estão de acordo com os resultados observados em milho (SODEK e WILSON, 1970) e em cevada (BRANDT, 1975), indicando que o catabolismo de lisina é bem maior nos endospermas normais do que nos endospermas ricos em lisina. Desse modo pode-se sugerir que a taxa de conversão de lisina deve ser um mecanismo importante para o controle do nível desse aminoácido no endosperma de milho. Os resultados a-qui obtidos indicam também que a lisina do endosperma, à semelhança do que foi sugerido em trigo (LAWRENCE e GRANT, 1964), é sintetizada em outras partes da planta e translocada para a semente em desenvolvimento, embora o endosperma tenha capacidade para sintetizar a lisina (SODEK, 1976).

O motivo pelo qual a lisina é catabolizada no endosperma de milho permanece desconhecido. Entretanto devemos ressaltar que a zeína encontrada em grande quantidade no endosperma normal (Tabela 5 e Figura 5-B), contém apenas traços desse aminoácido (BAUDET *et al.*, 1966; MOSSÉ *et al.*, 1966; SODEK e WILSON, 1971). Como a lisina é translocada em quantidades superiores àquela necessária para síntese das outras proteínas ocorreria um excesso de lisina na forma livre no endosperma normal, a qual, poderia inibir a atividade da aspartokinase, como tem sido demonstrado em

várias espécies de plantas. Essa inibição poderia interferir na síntese dos outros aminoácidos da família do aspartato (Figuras 13, 14 e 15). Por outro lado, o catabolismo de lisina pode ter sérias implicações no tocante a alguns métodos que tem sido utilizados para a seleção de plantas com endospermas ricos em lisina. Segundo alguns autores a adição de lisina exógena inibe o desenvolvimento de plantulas em meio de cultura (HENKE e WILSON, 1974; HENKE *et al.*, 1974; BRIGHT *et al.*, 1978; DUNHAN e BRYAN, 1971; GREEN e PHILLIPS, 1974). Assim a identificação de plantulas resistentes à altas concentrações exógenas de lisina, tem sido sugerida como um método para a seleção de tipos que produzam endospermas, com alta lisina, devido à presença de aspartokinase insensível a retroinibição por parte desse aminoácido (GREEN e PHILLIPS, 1974). Entretanto, os conhecimentos adquiridos no presente trabalho indicam que a simples seleção de tipos que tenham uma aspartokinase insensível à lisina, não deverá eliminar o processo de catabolismo desse aminoácido no endosperma. Portanto esse método não parece suficientemente seguro, para garantir a seleção de tipos com teores mais elevados de lisina no endosperma.

Um dos aminoácidos mais sintetizados no endosperma é a leucina (Figura 17). Enquanto a quantidade translocada desse aminoácido oscila ao redor de 5 μmol nos estágios mais adiantados do desenvolvimento do endosperma, o conteúdo observado oscila em torno de 13 μmol e 35 μmol para os endospermas *suoz* e normal, respectivamente, (Figuras 17-A e 17-B). Entretanto a quantidade de leucina sinte

tizada chega a ser 2,5 vezes maior no endosperma normal (Figura 17-B) em relação ao duplo mutante (Figura 17-A). Isso indica claramente a presença de certa inibição na síntese desse aminoácido no mutante rico em lisina. Esse fato poderia ser explicado, devido ao baixo conteúdo de zeína no endosperma *suoz* (Tabela 5 e Figura 5-B). Como a zeína é rica em leucina, (MOSSÉ *et al.*, 1966; BAUDET *et al.*, 1966; SODEK e WILSON, 1971), uma diminuição na síntese dessa proteína acarretaria uma diminuição na síntese desse aminoácido. Entretanto, temos que admitir, por razões óbvias, que a síntese de aminoácidos deve vir antes da síntese de proteínas. Assim os dados sugerem que, provavelmente, o mesmo fator que controla a síntese de zeína no endosperma rico em lisina, deve controlar a síntese de leucina.

O segundo aminoácido essencial de maior importância em cereais é o triptofano. A maioria dos trabalhos com mutantes ricos em lisina tem demonstrado, que esses endospermas apresentam também um maior conteúdo de triptofano. GEVERS, (1975), sugere uma correlação positiva entre a lisina e o triptofano em endosperma de milho.

Os resultados obtidos revelam que a semelhança da lisina, o triptofano é translocado em quantidades suficientemente altas para explicar todo o conteúdo desse aminoácido no endosperma. Entretanto, o triptofano parece ser catabolizado no endosperma numa extensão muito maior que a lisina. Os dados sugerem entretanto, que esse catabolismo não está aparentemente sob o controle do duplo mutante, uma vez que a taxa de catabolismo neste endosperma, é tão alta quanto aquela do endosperma normal.

6 - CONCLUSÕES

O estudo das formas nitrogenadas transportadas para a semente em desenvolvimento, permite as seguintes conclusões:

1. A amida glutamina, é a mais importante fonte carreadora de nitrogênio para a síntese de aminoácidos no endosperma de milho.
2. O ácido aspártico é a segunda mais importante fonte de N para o endosperma, devendo desempenhar um papel importante como precursor de seus aminoácidos derivados, com exceção da lisina.
3. No milho, a lisina, é translocada de outras fontes para o endosperma em desenvolvimento. Nesse tecido, uma grande parte dessa lisina é catabolizada, sendo que esse catabolismo é dependente da presença de genes que conferem alta lisina no endosperma. Esse fato é de importância fundamental, e abre novas perspectivas para o estudo de prováveis enzimas que condicionam esse catabolismo.
4. A leucina e a alanina, são os aminoácidos mais sintetizados no endosperma. A síntese de leucina, parece estar sob

o controle dos genes que condicionam alta lisina no endosperma. Assim, esses genes mutantes bloqueiam tanto o catabolismo de lisina como a síntese de leucina.

5. O triptofano à semelhança da lisina, embora translocado em alta quantidade, apresenta uma taxa elevada de catabolismo no endosperma de milho. Contrastando com o que ocorre para a lisina, o endosperma duplo mutante parece não exercer nenhum controle nesse catabolismo.

No estudo da síntese de proteínas, fica confirmado neste trabalho, que o duplo mutante *sugary opaque-2* exerce um controle na síntese de zeína. As outras frações proteicas apresentam um acúmulo semelhante nos dois tipos de endosperma. Por outro lado o conteúdo total de proteínas é diminuído no duplo mutante, sendo a diferença de N total entre os dois genótipos, aparentemente refletida na fração zeína. A fração 1 encontra-se estreitamente correlacionada com o conteúdo de água e minerais no endosperma. Essa correlação é mais evidente no endosperma duplo mutante, tendo em vista o maior conteúdo desses componentes nesse tipo de endosperma.

Algumas características do endosperma, tais como peso fresco, peso seco, água e concentração de K, Mg e P, são alteradas pelos genes *sugary opaque-2*. Entretanto essas alterações parecem ser mais consequências do efeito indireto da ação desses genes no metabolismo do endosperma.

7 - RESUMO

Uma cultivar de milho duplo mutante, denominada Nutrimaiz, homozigota para os genes *sugary opaque-2*, foi utilizada conjuntamente com uma cultivar de milho Maya normal, para o estudo da síntese de proteínas e aminoácidos de certas características físicas e químicas do endosperma, durante o desenvolvimento da semente. Os dois tipos de endosperma, normal e *sugary opaque-2* foram produzidos numa mesma espiga, em plantas *sugary opaque-2* através da utilização de técnicas de polinização dupla e mistura de pólen, visando melhorar a precisão das comparações entre os dois genótipos.

Para o estudo da síntese de aminoácidos nos dois tipos de endosperma, utilizou-se a análise de aminoácidos do exudato do sistema vascular do pedúnculo das espigas, os quais foram comparados com os aminoácidos incorporados no endosperma.

Os resultados obtidos indicaram que a glutamina é o aminoácido translocado em maior quantidade para a se-

mente em formação. O ácido aspártico é a segunda mais importante fonte de N para o endosperma. Os aminoácidos essenciais lisina e triptofano são translocados em quantidades maiores do que aquelas encontradas no endosperma normal. Neste tipo de endosperma a lisina translocada deve ser catabolizada, enquanto que no endosperma *suo2* isso praticamente não ocorre. O triptofano também é catabolizado no endosperma, sendo que esse processo não parece estar sob o controle do duplo mutante. A leucina e a alanina são os aminoácidos sintetizados em maior quantidade em ambos os tipos de endosperma. A síntese de leucina, entretanto, parece estar sob o controle do endosperma duplo mutante, uma vez que este apresentou uma taxa de síntese cerca de 2,5 vezes menor que o tipo normal.

A síntese de zeína é drasticamente reduzida no endosperma *sugary opaque-2*. A diferença no conteúdo de N total entre os dois tipos de endosperma é semelhante à diferença de zeína entre os dois genótipos. A fração 1, é acumulada em quantidades maiores no endosperma duplo mutante, estando estreitamente correlacionada com o conteúdo de água e minerais no endosperma.

O nitrogênio total apresenta um padrão de acúmulo distinto do observado para K, Mg e P. Enquanto o N total está correlacionado com o peso seco do endosperma, K, Mg e P apresentam-se fortemente correlacionados com o conteúdo de água no endosperma. Como o duplo mutante reduz severamente o peso do endosperma, o conteúdo de nitrogênio também é reduzido na mesma extensão. Por outro lado, como o conteúdo

de água no tipo *sugary opaque-2* é bem maior que no endosperma normal, as quantidades de K, Mg e P também são maiores no duplo mutante.

Tenta-se no presente trabalho, estabelecer algumas associações entre as características físicas e químicas dos dois tipos de endosperma, e o controle do duplo mutante na síntese de aminoácidos e proteínas no endosperma de milho.

8 - SUMMARY

A double mutant maize variety designated Nutri-maiz, homozygous for both *sugary* and *opaque-2* genes was used as female parent with a normal maize variety, Maya, to study protein and amino acids synthesis and some physical and chemical endosperm characteristics during ear development. Both normal and *sugary opaque-2* endosperms were produced on the same ear of a double mutant plant, through a split pollination technique, or using a pollen mixture, thereby creating highly comparative conditions for the study of the two contrasting endosperms.

The amino acid composition of the ear peduncle sap was determined and compared with the protein amino acid composition of the two endosperms.

Results indicated that glutamine is the major source of nitrogen for the developing kernel. Aspartic acid is the second most important N source for endosperm growth.

The content of the essential amino acids lysine and tryptophan in the ear peduncle sap can account for all

lysine and tryptophan found in both endosperms. However preformed lysine is highly catabolized in the normal endosperm, but very little in the high lysine *sugary opaque-2* endosperm. Tryptophan is also highly catabolized in the endosperm. This process however does not seem to be under the control of the high lysine double mutant since tryptophan in the double mutant is catabolized as highly as in the normal endosperm. Leucine and alanine are the amino acids most intensely synthesized in both endosperms. Results indicates that leucine synthesis apparently is controlled by the double mutant , since this genotype showed 2.5 times less leucine than the normal endosperm.

Zein synthesis is drastically reduced in the *sugary opaque-2* endosperm. Total N differences between normal and *sugary opaque-2* endosperms seems to be due to in differences in zein found between both genotypes. The high lysine endosperm also showed higher accumulation of fraction-1 than normal endosperm. This fraction was highly correlated with water and mineral content in both endosperms. Nitrogen accumulation showed high correlation with endosperm dry weight accumulation for normal and *sugary opaque-2* endosperm , while K, Mg and P are highly correlated with water content in *sugary opaque-2* and also in normal endosperm.

This work is an attempt to association certain physical and chemical characteristics of the normal and *sugary opaque-2* endosperms as well as establish the control of these genes on amino acid and protein synthesis in maize endosperm.

9. BIBLIOGRAFIA

- AARNES, H. 1977. A lysine-sensitive aspartato kinase and two molecular forms of homoserine dehydrogenase from barley seedlings. *Plant Science Letters*, 9: 137-145.
- ARNOLD, J.M.; BAUMAN, L.F. e AYCOCK, H.S. 1977a. Interrelations among protein lysine, oil, certain mineral element concentrations, and physical kernel characteristics in two maize populations. *Crop Science*, 17: 421-425.
- ARNOLD, J.M.; BAUMAN, L.F. e MAKONNEN, D. 1977b. Physical and chemical kernel characteristics of normal and *opaque-2* endosperm maize hybrids. *Crop Science*, 17: 362-366.
- ARRUDA, P.; SILVA, W.J. e TEIXEIRA, J.P.F. 1978. Protein and free amino acids in a high lysine maize double mutant. *Phytochemistry*, 17: 1217-1218.
- ASHTON, F.M. 1976. Mobilization of storage proteins of seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 95-117.

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. 1970.
Official methods of analysis (11th) AOAC Whashing
ton, D.C. p. 858.
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S. e SHARKEY, P.J. 1975. Aspa-
ragine metabolism. Key to the nitrogen nutrition -
of developing legume seeds. *Plant Physiol.* 56:
807-812.
- AYCOCK, H.S. 1972. Recurrent selection for mutant
kernel weight as a percent of normal in heterozy-
gous *opaque-2* and *floury-2* maize population. Te-
se de Ph.D Purdue University, W. Lafayettr, India
na USA.
- AYERS, J.E. e CREECH, R.G. 1969. Genetic control of
phytoglycogen accumulation in maize. (*Zea mays*) .
Crop. Science, 9: 739-741.
- BAENZIGER, P.S. e GLOVER, D.V. 1977. Protein body si-
ze and distribution and protein matrix morphology
in various endosperm mutant of *Zea mays*. L. *Crop
Science*. 17: 415-420.
- BAUDET, J.; MOSSÉ, J.; LANDRY, J. e MOUREAUX, T. -
1966. Étude sur les protéins du maiz I. Composi-
tion en acides amines des fractions azotées du
grain. *Ann. Physiol. Vég.*, 8: 321-325.
- BAUMAN, L.F. 1975. Germ and endosperm variability, ,
mineral elements, oil content, and modifier genes
in *opaque-2* maize. In High Quality Protein maize .
Pardue Univ. e CIMMYT, editores Halted Press.

- BEEVERS, L. 1976. Nitrogen metabolism in plants. Edward Arnold Hill Street, London.
- BHATIA, C.R. e RABSON, R. 1976. Bioenergetic considerations in cereal breeding for protein improvement. *Science*, 14: 1418-1421. 1
- BRANDT, A.B. 1975. In vivo incorporation of lysine ^{14}C into the endosperm proteins of wild type and high lysine barley. *Febs Letters*, 52: 288-291.
- BRANDT, A.B. e INGVERSEN, J. 1977. In vitro synthesis of barley endosperm proteins on wild type and mutant templates. *Carlsberg Res. Comm.* 41: 311-320.
- BRENNAN, H.; PATE, J.S. e WALLACE, W. 1964. Nitrogen containing compounds in the shoot system of *pisum arvense* L, I. Amino compounds in the bleeding saps from petioles. *Ann. Bot.* 28: 527-540.
- BRESSANI, R. e MERTZ, E.T. 1958. Studies on corn proteins. IV. Protein and amino acid content of different corn varieties. *Cereal Chemistry*, 35: 227-229.
- BRESSANI, R. e CONDE, R. 1961. Changes in the chemical composition and in the distribution of nitrogen of maize at different stages of development. *Cereal Chemistry*, 38: 76-84.
- BRETELER, H. 1976. Nitrogen fertilization, yield and protein quality of a normal and a *high-lysine* maize variety. *J. Sci. Food Agric.*, 27: 978-982.

- BRIGHT, S.W.J.; WOOD, E.A., e MIFLIN, B.J. 1978a. The effect of aspartate-derived amino acids (lysine , threonine, methionine) on the growth of excised embryos of wheat and barley. *Planta*, 139: 113-117.
- BRIGHT, S.W.J.; SHEWRY, P.R. e MIFLIN, B.J. 1978b. Aspartate and the synthesis of aspartate-derived amino acids in wheat. *Planta*, 139: 119-125.
- BRYAN, P.A.; CAWLEY, R.D.; BRUNNER, C.E. e BRYAN, J.K. 1970. Isolation and characterization of a lysine - sensitive asparto kinase from multicellular plant . *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 41: 1211-1217.
- BURR, F.A. e BURR, B. 1975. Localized synthesis of zein in maize endosperm. International maize symposium abstracts. University of Illinois, Urbana Champaign, September 8 - 12.
- BURR, B. e BURR, F.A. 1976. Zein-synthesis in maize endosperm by polyribosomes attached to protein bodies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 73: 515-519.
- BURR, F.A. e BURR, B. 1977. Localized synthesis of zein in maize endosperm. *Cereal Foods World.*, 22: 469-463.
- CHESHIRE, R.M. e MIFLIN, B.J. 1975. The control of lysine biosynthesis in maize. *Phytochemistry*, 14: 695-698.
- CHI, M.S. e SPEERS, G.M. 1973. Comparison of the nutritional value of high lysine *floury-2* and normal -

- corn for the laying hen. *Poultry Science*, 52 : 1138-1144.
- CHIBBER, B.A.K.; VOICU, E.; MERTZ, E.T. and GLOVER, D. V. 1976. Studies on corn proteins. XI. Distribution of lysine during germination of normal and *opaque-2* maize. *Cereal Chem.*, 54 : 558-564.
- CHITTENDEN, R.H. e OSBORNE, T.B. 1891. A study of the proteids of the corn on maize kernel. *American Chemistry Journal*, 13 : 453-529.
- CHRISTIANSON, D.D.; NIELSEN, H.C.; KHOO, V.; WOLF, M. J. e WALL, J.S. 1969. Isolation and chemical composition of protein bodies and matrix proteins in corn endosperm. *Cereal Chemistry*, 46: 372-376.
- CHRISTIANSON, D.D.; KHOO, V.; NIELSEN, H.C. e WALL, J. S. 1974. Influence of *opaque-2* and *floury-2* genes on formation of proteins in particulates of corn endosperm. *Plant Physiol.*, 53: 851-854.
- CONCON, J.M. e SOLTESS, D. 1973. Rapid micro kjeldahl digestion of cereal grains and other biological materials. *Anal. Biochem.*, 53 : 35-41.
- CREECH, R.G. 1968. Carbohydrate synthesis in maize. *Adv. Agron.*, 20: 275-322.
- DALBY, A. 1966. Proceedings of the high lysine corn conference. *Corn Refiners Ass. Inc.*, Washington, D. C. p. 80.

- DALBY, A. e DAVIES, I.I. 1967. Ribonuclease activity in the developing seeds of normal and *opaque-2* maize. *Science*, 155: 1573-1575.
- DALBY, A. e CAGAMPANG, G.B., 1970. Ribonuclease activity in normal, *floury-2* and *opaque-2* maize endosperm, during developing. *Plant Physiol.*, 46: 142-144.
- DALBY, A. e TSAI, C.Y. 1974. Zein accumulation in phenotypically modified lines of *opaque-2* maize. *Cereal Chem.*, 51: 821-825.
- DALBY, A. e TSAI, C.Y. 1975. Comparisons of lysine and zein and nonzein protein contents in immature and mature maize endosperm mutants. *Crop Science*, 15: 513-515.
- DAVIES, H. e MIFLIN, B.J. 1978. Regulatory isoenzymes of aspartate kinase and the control of lysine and threonine biosynthesis in carrot cell suspension culture. *Plant Physiol.*, 62: 536-541.
- DECAU, J. e PUJOL, B. 1974. Effects comparés de l'irrigation et de la fumiere azotée sur les productions qualitative et quantitative de maïs de variétés différents. 3 Qualité protéique et valeur des récoltes. *Annales Agronomiques*, 25: 93-111.
- Di CAMELLI, C.A. e BRYAN, J.K. 1975. Changes in enzyme regulation during growth of maize. *Plant Physiol.*, 55: 999-1005.
- DIMLER, R.J. 1966. Alcohol-insoluble proteins of ce-

- real grains. *Fed. Proc.*, 25: 1670-1673.
- DRAPER, S.R. 1975. A model of lysine deposition in ce real grains. *J. Agric. Sci. Camb.*, 85: 381-383.
- DUNHAN, V.L. e BRYAN, J.K. 1971. Synergistic effects of metabolically related amino acids on the growth of a multicellular plant. *Plant Physiol.*, 47: 91 - 97.
- DURE III, L.S. 1975. Seed formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26: 259-278."
- DUVICK, D.N. 1961. Protein granules of maize endosperm cells. *Cereal Chem.*, 38: 374-
- ELMORE, C.D. 1970. Some effects of *opaque-2* and *floury-2* kernel characteristics and the performance of counterpart maize (*Zea mays L*) hybrids. Tese Ph.D . University of Illinois, USA.
- FLYNN, L.M.; ZUBER, M.S.; LEWEKE, D.H. GRAINGER, R. B. e HOGAN, A.G. 1954. Relation between protein content of corn and concentrations of amino acids and nicotinic acid. *Cereal Chem.*, 31: 217-228.
- GALLO, J.R. e LOTT, W.L. 1965. Método simplificado pa ra determinação de nitrato nas folhas, com o ácido fenoldissulfônico. *Bragantia*, 24: 3-7.
- GENGENBACH, B.G.; WALTER, T.J.; GREEN, C.E. e HIBBERD, K.A. 1978. Feedback regulation of lysine, threonine, and methionine biosynthetic enzymes in corn. *Crop Science*, 18:472-476.

- GERHKE, C.W.; WALL, L.L. e ABSHEER, J.S. 1973. Automated nitrogen method for feeds. *JAOAC*, 56: 1096-1105.
- GEVERS, H.D. 1975. A note on the correlation between lysine and tryptophan content in maize kernel endosperm. *Cereal Chem.*, 52: 115-118.
- GIANAZZA, E.; RICHETTI, P.G.; PIOLI, F.; GALANTE, E. e SOAVE, C. 1976. Size and charge heterogeneity of zein in normal and *opaque-2* maize endosperms. *Maydica*, 21: 1-17.
- GIANAZZA, E.; VIGLIENGHI, V.; RICHETTI, P.G.; SALAMINI, F. e SOAVE, C. 1977. Amino acid composition of zein molecular components. *Phytochemistry*, 16: 315-317.
- GLOVER, D.V.; GRANE, P.L.; MISRA, P.S. e MERTZ, E. T. 1975. Genetics of endosperm mutants in maize as related to protein quality and quantity. In *Proc. High Quality Protein Maize*, Purdue Univ. e CIMMYT.
- GOODSELL, S.F. 1968. Potassium in mature kernels of normal and *opaque-2* maize. *Crop Science*, 8: 281 - 282.
- GREEN, C.E. e PHILLIPS, R.L. 1974. Potential selection for mutants with increased lysine, threonine and methionine in cereal crops. *Crop Science*, 14: 827-830.
- HANSEL, L.W.; TSAI, C.Y. e NELSON, D.E. 1973. The effect of the *fluory-2* gene on the distribution of

- protein fractions and methionine in maize endosperm. *Cereal Chem.*, 50: 383-394.
- HANSEN, D.W.; BRIMHALL, B e SPRAGUE, G.F. 1946. Relationship of zein to the total protein in corn. *Cereal Chem.*, 23: 329-335.
- HENKE, R.R. e WILSON, K.G. 1974. In-vivo evidence for metabolic control of amino acid and protein synthesis by exogenous lysine and threonine in *Mimulus cardinalis*. *Planta*, 121: 155-166.
- HENKE, R.R.; WILSON, K.G.; McCLURE, J.W. e TREICK, R. W. 1974. Lysine-methionine-threonine interactions in growth and development of *mimulus cardinalis* seedlings. *Planta*, 116: 333-345.
- HENKE, R.R. e WAHNBAECK, R. 1977. B-Aspartokinase - from developing endosperm of maize. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 79: 38-45.
- INGLIS, A.S.; ROXBURGH, C.M. e TAKAYANAGI, H. 1974. Analysis for amide nitrogen in plants. *Anal. Biochem.*, 61: 25-31.
- INGVERSEN, J. 1975. Structure and composition of protein bodies from wild type and high lysine barley endosperm. *Hereditas*, 81: 69-76.
- JIMENES, J.R. 1966. Protein fractionation studies of high lysine corn. In *Proc. High Lysine Corn Conference*.

- JIMENES, J.R. 1968. The effect of the *opaque-2* and *floury-2* genes on the production of protein in maize endosperm. Tese de Ph.D. Purdue Univ. W. Lafayette, Indiana, USA.
- JOHNSON, V.A. and LAY, C.L. 1974. Genetic improvement of plant protein. *J. Agric. Food Chem.*, 22: 558-566.
- JONES, R.A. e TSAI, C.Y. 1976. Changes in lysine and tryptophan content during germination of normal and mutant maize seed. *Cereal Chem.*, 54: 565-571.
- JONES, R.A.; LARKINS, B.A. e TSAI, C.Y. 1976. Regulation of zein synthesis in maize endosperm. *Plant Physiol.*, 57: suplemento 5, 36.
- JONES, R.A.; LARKINS, B.A. e TSAI, C.Y. 1977a. Storage protein synthesis in maize, II. Reduced synthesis of a major zein component by the *opaque-2* mutant of maize. *Plant Physiol.*, 59: 525-529.
- JONES, R.A.; LARKINS, B.A. e TSAI, C.Y. 1977b. Storage protein synthesis in maize. III. Developmental changes in membrane bound polyribosome composition and in vitro protein synthesis of normal and *opaque-2* maize. *Plant Physiology*, 59: 733-737.
- KEENY, D.R. 1970. Protein and amino acid composition of maize grain as influenced by variety and fertility. *J. Sci. Food Agric.*, 21: 182-184.
- KENNEDY, J.S. e MITTLER, T.E. 1953. A method for ob

taining phloem sap via the mouth parts of aphids.
Nature, 171: 528-532.

KHOO, V. e WULF, M.J. 1970. Origin and development of protein granules in maize endosperm. *American Journal of Botany*, 57: 1042-1050.

KONZAK, C.F. 1977. Genetic control of the content, amino acid composition and processing properties of proteins in wheat. *Ann. Rev. Genet.* 407-583.

LANDRY, J. e MOUREAUX, T. 1970. Hétérogénéité des glutelines du grain de maïs: extraction sélective - et composition in acides aminés des trois fractions isolées. *Bulletin of Society of Chemistry and Biology*, 52: 1021-1037.

LARKINS, B.A. e DALBY, A. 1975. In vitro synthesis of zein-like protein by maize polyribosomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 66: 1048-1054.

LARKINS, B.A.; BRACKER, C.E. and TSAI, C.Y. 1976. Storage protein synthesis in maize. Isolation of zein-synthesizing polyribosomes. *Plant Physiol.*, 57: 740-745.

LARKINS, B.A. e HURKMAN, W.J. 1976. Synthesis and deposition of zein in protein bodies of maize endosperm. *Plant Physiol.*, 62: 256-263.

LAWRENCE, J.M. e GRANT, D.R. 1964. Incorporation of lysine ^{14}C into the developing grain of wheat. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 104: 73-78.

- LEE, K.H.; JONES, R.A.; DALBY, A. e TSAI, C.Y. 1976. Genetic regulation of storage protein content in maize endosperm. *Biochemical Genetics*, 14: 641-650.
- LLOYD, N.E. e MERTZ, E.T. 1958. Studies on corn proteins, III. The glutelins of corn. *Cereal Chem.*, 35: 156-160.
- LODHA, M.L.; MALI, P.C.; AGARWAL, A.K. e METHA, S.L. 1974. Changes in soluble protein and isoenzymes in normal and *opaque-2*, *Zea mays* endosperm during grain development. *Phytochemistry*, 13: 539-542.
- LODHA, M.L.; RAM, P.C.; GUPTA, H.O.; MEHTA, S.L. e SINGH, J. 1977. Changes in protein, lysine and triptophen in normal and *opaque-2* *Zea mays* kernels during development. *Ind. J. Exp. Biol.* 15: 1080-1082.
- LORENZ, H. 1976. Nitrate, ammonium and amino acids in the bleeding sap of tomato plants in relation to form and concentration of nitrogen in the medium. *Plant Soil*, 45: 169-175.
- LOTT, W.L.; NERY, J.P.; GALLO, J.R. e MEDCALF, J. C. 1956. A técnica de análise foliar aplicada ao cafeeiro. Campinas, Instituto Agrônômico, 29p. Bol. 1979.
- MA, Y. e NELSON, O.E. 1975. Amino acid composition and storage proteins in two new high lysine mutants in maize. *Cereal Chem.*, 52: 412-419.

- MacGREGOR, J.M.; TASKEVITCH, L.T. e MARTIN, W.P. 1961. Effect of nitrogen fertilizer and soil type on the amino acid content of corn grain. *Agron. J.* 53: 211-214.
- MALIK, B.S. 1973. Studies on the effect of levels of irrigation and nitrogen on maize. *Indian J. Agron.* 18: 137-140.
- MATTHEWS, B.F. e WIDHOLM, J.M. 1978. Regulation of lysine and threonine synthesis in carrot cell suspension cultures and whole carrot roots. *Planta*, 141: 315-321.
- McCREADY, R.M.; DUCAY, E.D. e GAUGER, M.A. 1974. Automated analyses of sugar, starch, and amylose in potatoes by measuring sugar-dinitrosalicylate and amylose-iodine color reactions. *JAOAC*, 57: 336-340.
- McWHIRTER, K.S. 1971. A *floury* endosperm, high lysine locus on chromosome 10. *Maize Genet. Coop. Newslet* 45: 184.
- MEHTA, S.L.; LODHA, M.L., MALI, P.C.; JOGINDER, S. e NAIK, M.S. 1973. Characterization of polysomes and incorporation in vitro of leucine and lysine in normal and *opaque-2* *Zea mays* endosperm during development. *Phytochemistry*, 12: 2815-2820.
- MEHTA, S.L.; LODHA, M.L.; NAIK, M.S. e SINGH, J. 1975. RNA polymerase from *opaque-2* and normal *Zea mays* endosperm. *Phytochemistry*, 14: 2145-2146.

- MERTZ, E. T. e BRESSANI, R. 1957. Studies on corn proteins, I. A new method of extraction. *Cereal Chem.* 34 : 63-66.
- MERTZ, E. T.; LLOYD, N. E. e BRESSANI, R. 1958. Studies on corn proteins. II. Electrophoretic analysis of germ and endosperm extracts. *Cereal Chem.*, 35: 146-149.
- MERTZ, E. T. ; BATES, L. S. e NELSON, O. E. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. *Science*, 145: 279 - 284.
- MERTZ, E. T. ; VERON, O. A. ; BATES, L. S. e NELSON, O. E. 1965. Growth of rats fed on opaque-2 maize. *Science* , 148: 1741-1742.
- MIFLIN, B. J. e LEA, P. J. 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, 15: 873-885.
- MIFLIN, B. J. e LEA, P. J. 1977. Amino acid metabolism . *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28: 299-329.
- MIRANDA, L. T. 1972. A característica "latência" de milho (*Zea mays L*) e suas possibilidades no melhoramento. Tese de doutoramento . Esc. Sup. "Luiz de Queiroz". Piracicaba.

- MISRA, P. S.; JANBUNATHAN, R.; MERTZ, E. T.; GLOVER, D. V.; BARBOSA, H. M. e McWHIRTER, K. S. 1972. Endosperm protein synthesis in maize mutants with increased lysine content. *Science*, 176: 1425-1426.
- MISRA, P. S.; MERTZ, E. T. e GLOVER, D. V. 1973. Characteristics of proteins in single and double endosperm mutants of maize. In *High Quality Protein Maize*. Dowden, Hutchinson & Ross.
- MISRA, P. S.; MERTZ, E. T. e GLOVER, D. V. 1975a. Studies on corn proteins. VII. Developmental changes in endosperm proteins of high-lysine mutants. *Cereal Chem.* 52 : 734-739.
- MISRA, P. S. ; MERTZ, E. T. e GLOVER, D. V. 1975b. Studies on corn proteins. VIII. Free amino acid content of *opa-que-2* double mutants. *Cereal Chem.* 52:844-848.
- MORTON, R. K.; PALK, B. A. e RAISON, J. K. 1964. Intracellular components associated with protein synthesis in developing wheat endosperm. *Biochem. J.* , 90: 552-528.
- MOSSÉ, J. 1966. Alcohol soluble proteins of cereal grains. *Fed. Proc.* , 25: 1663-1669.
- MOSSÉ, J. ; BAUDET, J.; LANDRY, J. e MOUREAUX, T. 1966. Étude sur les protéins du maïs , II. Comparaison entre les compositions en acides aminés et les proportions mutuelles des fractions protéiques de grains normaux et mutants *An. Physiol. Vég.*, 8: 331-344.

MOUREAUX, T. e SALLANTIN, M.M. 1967. Fractionnement des albumines du grain de maïs par chromatographie sur carboxymethylcellulose. *C. R. Acad. Paris*, 264: 1619-

MOUREAUX, T. e LANDRY, J. 1968. Extraction sélective des protéines du grain de maïs et en particulier - de la fraction "*glutelines*". *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 226: 2302-

MOUREAUX, T. e LANDRY, J. 1972. La maturation du grain de maïs. Evolution qualitative et quantitative des différents ~~formes~~ azotés. *Physiol. Vég.*, 10: 1-

MUMM, 1935. Citado por R.A. Emerson, G.W. Beadle, A. C. Fraser. Cornell Univ. *Agron. Exp. Sta. Mem.* n° 180.

MURPHY, J.J. e DALBY, A. 1971. Changes in the protein fractions of development normal and opaque - 2 maize endosperm. *Cereal Chem.*, 48: 336-349.

NARAHARI, P.; BHATIA, C.R.; GOPALAKRISHNA, T. e MITRA, K. 1976. In Evaluation of seed protein alterations by mutations breeding. (STI/PUB/426, International Atomic Energy Agency, Vienna) pp. 119-127.

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

NELSON, O.E. 1969. Genetic modification of protein quality in plants. *Advan. Agron.* 21: 171-193.

NELSON, O.E.; MERTZ, E.T. e BATES, L.S. 1965. Second mutant gene affecting amino acid pattern of maize endosperm protein. *Science*, 150: 1469-1470.

NELSON, O.E. e MERTZ, E.T. 1973. Nutritive value of *floury-2* maize. *Bulletin of Dep. Gen. Univ. Wis.*, Madison Wisconsin USA, pp. 321-328.

OSBORNE, T.B. 1897. The amount and properties of the proteins of the maize kernel. *J. Am. Chem. Soc.*, 19: 525.

OSBORNE, T.B. e MENDEL, L.E. 1914. Nutritive properties, of the maize kernel. *J. Biol. Chem.*, 18: 1-6.

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

PATE, J.S.; WALLACE, W. e VANDTE, J. 1964. Petiole bleeding sap in the examination of the circulation of nitrogenous substances in pants. *Nature*. 204 : 1073-1074.

PATE, J.S.; SHARKEY, P.J. e LEWIS, O.A.M. 1974. Phloem bleeding from legume-fruits. A technique for study of fruit nutrition. *Planta*, 120: 229-243.

- PATE, J.S.; SHARKEY, P.J. e LEWIS, D. A.M. 1975. Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes, studied by a phloem bleeding technique. *Planta*, 122: 11-26.
- PAULIS, J.W. e WALL, J.S. 1969a. Albumins and globulins in extracts of corn grain parts. *Cereal Chem.* 263.
- PAULIS, J.W. e WALL, J.S. 1971. Fractionation and properties of alkylated reduced corn glutelin proteins. *Biochem. Biophys. Acta*, 251: 57-69.
- PAULIS, J.W. e WALL, J.S. 1977. Fractionation and characterization of alcohol-soluble reduced corn endosperm glutelin proteins. *Cereal Chem.*, 54: 1223-1228.
- PAULIS, J.W.; JAMES, C. e WALL, J.S. 1969b. Comparison of glutelin proteins in normal and *high-lysine* corn endosperm. *J. Agric. Food Chem.*, 17: 1301 - 1305.
- PAULIS, J.W.; BIETZ, J.A. e WALL, J.S. 1975. Molecular weights determined by sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.*, 23: 197-201.
- PAULUS, H. e GRAY, E. 1967. Multivalent feedback inhibition of aspartokinase in *Bacillus polymyxa*, I. Kinetic studies. *J. Biol. Chem.*, 212: 4980-4986.

- PERKIN-ELMER, 1968. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. *Norwalk*, Connecticut.
- PERKIN-ELMER, 1971. Instruction manual for ligand method by single sequential system model KLA-3. B amino acid, *Norwalk*, Connecticut, USA.
- PERRY, L.J. e OLSON, R.A. 1975. Yield and quality of corn grain and sorghum grain and residues as influenced by N fertilization. *Agron. J.*, 67: 816 - 818.
- RICHETTI, P.G.; GIANAZZA, E.; VIOTTI, A. e SOAVE, C. 1977. Heterogeneity of storage proteins in maize. *Planta*, 136: 115-123.
- SAUBERLICH, H.E.; CHANG, W.Y. e SALMON, W.D. 1953. - The amino acid and protein content of corn as related to variety and nitrogen fertilization. *J. Nutrition*, 61: 241-250.
- SGARBIERI, V.C.; SILVA, W.J.; ANTUNES, P.L. e AMAYA, J.F. 1977. Chemical composition and nutritional properties of a *sugary-1/opaque-2 (suo2)* variety of maize (*Zea mays* L). *J. Agric. Food Chem.*, 25:
- SCHNEIDER, E.; EARLY, B. e De TURK, E.E. 1952. Nitrogen fractions of the component parts of the corn kernel as affected by selection and soil nitrogen. *Agron. J.*, 44: 161-169.
- SHANNON, J.C. e CREECH, R.S. 1973. Genetics of storage polyglucosides in *Zea mays* L. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 210: 279-289.

- SILVA, W.J. e SANTORO, L.G. 1972. Técnica para estudo do efeito de genes que condicionam características do endosperma de milho. *Resumo da XXIV Reunião Anual da SBPC* p. 172.
- SILVA, W.J.; TEIXEIRA, J.P.F.; ARRUDA, P. e LOVATTO, M.B. 1978. Nutrimaiz a tropical sweet maize cultivar of high nutritional value. *Maydica*, 23: 129 - 136.
- SILVERSTEIN, R.M. 1975. Acetic anhydride requirement in the colorimetric determination of tryptophan. *Anal. Biochem.*
- SINGLETON e JONES. 1935. Citado por R.A. Emerson, G. W. Beadle, A.C. Fraser Cornell Univ. *Agr. Exp. Sta* Mem. nº 180.
- SOAVE, C.; PIOLLI, F. VIOTTI, A.; SALAMINI, F. e RICCHETTI, P.G. 1975. Synthesis and heterogeneity of endosperm proteins in normal and *opaque-2* maize. *Maydica*, 20: 83-94.
- SOAVE, C.; SUMAN, N.; VIOTTI, A. e SALAMINI, F. 1978. Linkage relationships between regulatory and structural gene loci involved in zein synthesis in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 52: 263-267.
- SODEK, L. 1973. Corn proteins. Boletim Didático -011. *Centro de Energia Nuclear na Agricultura USP-CNEN*, pp. 78.
- SODEK, L. 1976. Biosynthesis of lysine and other ami-

- no acids in the developing maize endosperm. *Phytochemistry*, 15: 1903-1906.
- SODEK, L. e WILSON, C.M. 1970. Incorporation of Leucine - ^{14}C and lysine - ^{14}C into protein in the developing endosperm of normal and *opaque-2* corn *Arch. Biochem. and Biophys.*, 140: 29-38.
- SODEK, L. e WILSON, C.M. 1971. Amino acid composition of proteins isolated from normal, *opaque-2* and *floury-2* corn endosperm by a modified Osborne procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 19: 1144-1150.
- SODEK, L. e SILVA, W.J. 1977. Glutamate synthase. A possible role in nitrogen metabolism of the developing maize endosperm. *Plant Physiol.*, 50: 602 - 605.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. e MOORE, S. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, 30: 1190.
- SREERAMULU, C. e BAUMAN, L.F. 1970. Yield components and protein quality of *opaque-2* and normal diallels of maize. *Crop. Sci.*, 10: 262-265.
- TSAI, C.Y. e DALBY, A. 1974. Comparison of the effect of *shrunk-4*, *opaque-2*, *opaque-7* and *floury-2* genes on the zein content of maize during endosperm development. *Cereal Chem.*, 51: 825-829.

- TSAI, C.Y.; HUBER, D.M. e WARREN, H.L. 1978. Relationship of the kernel sink for N to maize productivity. *Crop Sci.* 18: 399-404.
- TURNER, J.E.; BOUNDY, J.A. e DINLERZ, R.J. 1966. Zein: a heterogenous protein containing disulfid-linked aggregates. *Cereal Chem.* 42: 452-
- VILLEGAS, E. e MERTZ, E.T. 1971. Chemical screening methods for maize protein quality at CIMMYT, *Res. Bull.*, n° 20.
- VIOTTI, A.; SALA, E.; ALBER, P. e SOAVE, C. 1975. RNA metabolism and polysome profiles during seed development in normal and opaque-2 maize endosperm. *Maydica*, 20: 111-124.
- ZIEGLER, H. 1968. L'abeille et la fleur, II. Le miel, 1. Le séve des tubes criblés. In traité de Biologie de L'abeille, vol. 3: pp. 207-217, Paris Masson e Cie.
- WALK, R.A. e HOCK, B. 1977. Glyoxysomal malate dehydrogenase of water melon cotyledons. The novo synthesis on cytoplasmic ribosomes. *Planta*, 134: 277-285.
- WILSON, C.M. 1967. Purification of a corn ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 242: 2260-2263.
- WILSON, C.M. 1968. Plant nuclease, II. Properties of corn ribonucleases I and II and corn nuclease I. *Plant Physiol.*, 43: 1339-1346.

- WILSON, C.M. 1971. Plant nuclease. Polyacrylamide gel electrophoresis of corn ribonuclease isoenzymes . *Plant Physiol.*, 48: 64-68.
- WILSON, C.M. 1973. Plant nucleases, IV. Genetic control of ribonuclease activity in corn endosperm. *Biochem. Genet.*, 9: 53-
- WILSON, C.M. 1975. Plant nuclease. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26: 187-208.
- WILSON, C.M. e ALEXANDER, D.E. 1967. Ribonuclease activity in normal and *opaque-2* mutant endosperm of maize. *Science*, 155: 1575-1576.
- WOLF, M.J.; KHOO, V. e SECKINGER, H.L. 1969. Distribution and subcelular structure of endosperm protein in varieties of ordinary and *high-lysine* maize. *Cereal Chem.*, 46: 253-263.
- WONG, K.F. e DENNIS, D.T. Aspartokinase from wheat germ. *Plant Physiol.*, 51: 322-326.