**VARIAÇÃO E HERANÇA DOS PADRÕES ELETROFORÉTICOS EM ÓRGÃOS
E ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO EM MILHO (*Zea mays* L.)**

DIRCE MARIA CARRARO

Engenheiro-Agrônomo

Orientador: PROF. DR. FLAVIO C. A. TAVARES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1990

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Carraro, Dirce Maria

C313v Variação e herança dos padrões eletroforéticos em
 órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (Zea
 mays L.). Piracicaba, 1990.
 121p. illus.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Eletroforese aplicada 2. Milho - Desenvolvimento
- Estágio 3. Milho - Genótipo 4. Milho - Padrão eletro-
forético - Hereditariedade 5. Milho - Padrão eletrofo-
rético - Variação genética 6. Proteína de milho - Pa-
drão eletroforético - Comparação I. Escola Superior
de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.15

**VARIAÇÃO E HERANÇA DOS PADRÕES ELETROFORÉTICOS EM ÓRGÃOS
E ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO EM MILHO (*Zea mays* L.)**

Aprovada em: 05.06.1990

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares	ESALQ/USP
Prof. Dr. Eric Derbyshire	CENA/USP
Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna	ESALQ/USP

PROF. DR. FLAVIO CESAR ALMEIDA TAVARES

Orientador

A minha família,

especialmente a minha irmã

Maria Heloisa (in memoriam)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A "Sementes Agrocere" pelos recursos fornecidos, ao Doutor Sérgio Echeverrigaray Laguna, pela participação técnica e dedicação, e a todos que colaboraram para a realização deste trabalho, entre eles

- Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares
- Dr. Joaquim Aparecido Machado
- Professores do Departamento de Genética
- Funcionários da Unidade de Pesquisa da "Sementes Agrocere S.A.", especialmente Vera Lúcia Monelli e Ana Maria Zanatta Moraes
- Colegas e funcionários do Laboratório de Genética de Leveduras
- Funcionários do Departamento de Genética
- Colegas do curso de Pós-Graduação

Agradecimento especial ao Engenheiro Agrônomo

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.

I N D I C E

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii.
LISTA DE TABELAS	x.
RESUMO	xii.
SUMMARY	xv.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Utilização de Técnicas eletroforéticas em estu- dos fisiológicos	4
2.2. Utilização de Técnicas Eletroforéticas Para Fins de Caracterização e Estudos Genéticos	6
2.3. Regulação Genética e Diferenciação em Plantas Superiores	8
2.3.1. Aspectos da regulação do desenvolvi- mento	11
2.3.2. Mecanismos genéticos regulatórios	14
2.4. Mecanismos Moleculares da Heterose	16
2.4.1. Distância genética e heterose	18
2.4.2. Estimativa de distâncias genéticas: as- pectos gerais	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Genótipos Utilizados	27
3.2. Plantio e Colheita	28
3.3. Órgãos Analisados	29
3.4. Número de Plantas por Amostra Protéica	29

	Página
3.5. Estágios Analisados	29
3.6. Soluções, Tampões e Reagentes	30
3.6.1. Tampão de extração	30
3.6.2. Reagente para quantificação de proteí- nas.	31
3.6.3. Solução albumina bovina	31
3.6.4. Solução acrilamida/bis-acrilamida	31
3.6.5. Tampão do gel inferior	31
3.6.6. Tampão do gel superior	32
3.6.7. Solução SDS 10% (sódio duodecil sul- fato)	32
3.6.8. Solução de persulfato de amônio	32
3.6.9. Tampão de corrida (solução estoque) ...	32
3.6.10 Tampão de amostra	32
3.6.11 Tampão de amostra desnaturante	33
3.6.12 Solução corante	33
3.6.13 Solução descolorante	33
3.7. Procedimentos	33
3.7.1. Extração e preparo da proteína solúvel.	33
3.7.2. Quantificação de proteína	34
3.7.3. Preparação da amostra desnaturada	34
3.7.4. Eletroforese SDS-PAGE	35
3.7.5. Comparações dos perfis eletroforéticos entre órgão em um mesmo estágio	36

	Página
3.7.6. Leitura densitométrica dos géis	36
3.7.7. Transformação de dados para avaliação dos perfis eletroforéticos comparados ..	37
3.7.8. Transformação de dados para avaliação das distâncias genéticas e caracterização de órgãos	37
3.7.9. Caracterização dos diferentes órgãos x genótipos	38
3.7.10 Avaliação das alterações ocorridas du- rante o desenvolvimento do milho	38
3.7.11 Avaliação da herança dos perfis eletro- foréticos	38
3.7.12 Estágios para avaliação da herança	40
3.7.13 Estágios para determinação da distância genética	41
3.7.14 Análises estatísticas	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Caracterização de Órgãos nos Diferentes Genóti- pos	43
4.2. Alterações Ocorridas nos Perfis Eletroforéti- cos de Cada Órgão, Durante o Desenvolvimento da Planta	47
4.2.1. 4 ^o par de folhas	47

	Página
4.2.2. Colmo	49
4.2.3. Pendão	51
4.2.4. Espiga	51
4.2.5. Grãos	52
4.3. Herança dos Perfis Eletroforéticos nos Vários Órgãos	54
4.4. Distância Genética Entre os Genótipos	61
5. DISCUSSÃO	68
5.1. Caracterização de Órgãos nos diferentes genó- tipos	68
5.2. Alterações Ocorridas nos Perfis Eletroforéti- cos de Cada Órgão, Durante o Desenvolvimento da Planta	71
5.3. Herança dos Perfis Eletroforéticos nos Vários Órgãos	76
5.4. Distância Genética Entre os Genótipos	81
6. CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÊNDICE 1	104
APÊNDICE 2	112
APÊNDICE 3	118

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Esquema hierárquico das linhagens utilizadas e seus híbridos.	28
2 Representação dos efeitos gênicos observados nas bandas de mesmo peso molecular, nos diferentes cruzamentos: A e B representam os genótipos parentais e AB representa o genótipo híbrido, referente ao cruzamento dos genótipos parentais	40
3 Perfis eletroforéticos dos diferentes órgãos referentes ao genótipo HS2, aos 87 dias pós-plantio: 4F = 4 ^o par de folhas; C = colmo; P = pendão; E = espiga e G = grãos e PM(KD) = peso molecular em kilodaltons.	44
4 Comparação da leitura densitométrica nos vários genótipos, das bandas de alto peso molecular, em colmos com 87 dias pós-plantio ou 15 dias pós-florescimento.	50
5 Perfis eletroforéticos do grão nos dois estágios analisados, G1 e G2 (87 e 122 dias pós-plantio, respectivamente), referente ao genótipo HS2.	53
6 Perfis eletroforéticos correspondentes ao 1 ^o estágio do pendão (P-1) - Cruzamento I (F1xM1)=HS1, Cruzamento II (F2xM2) = HS2 e Cruzamento III (HS1xHS2) = HD.	56
7 Perfis eletroforéticos correspondentes ao 4 ^o estágio do 4 ^o par de folhas (F4) - Cruzamento I (F1xM1) = HS1, Cruzamento II (F2xM2) = HS2 e Cruzamento III (HS1xHS2) = HD.	59

Figura	Página
8 Perfis eletroforéticos correspondentes ao 2 ^o estágio do colmo (C2) - Cruzamento I (F1xM1) = HS1; Cruzamento II (F2xM2) = HS2 e Cruzamento III (HS1xHS2) = HD.	59
9 Gráficos obtidos pelos cálculos de componentes principais, de todos os órgãos com seus estágios correspondentes, apresentando o agrupamento referente ao dendrograma baseado no método vizinho mais próximo.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Órgão e seus respectivos estágios avaliados.	30
2 Guia de preparação de eletroforese SDS-Gel.	35
3 Órgãos e seus respectivos estágios avaliados, caracterizados por número de dias pós-plantio, para comparação dos perfis eletroforéticos envolvidos nos diferentes cruzamentos.	41
4 Órgãos e seus respectivos estágios avaliados, caracterizados por número de dias pós-plantio, para observação das distâncias entre genótipos.	41
5 Bandas referentes a cada órgão no milho, caracterizados por PMA (peso molecular aparente). (as bandas assinaladas "*" não estão presentes em todos os genótipos).	46
6 Órgãos e seus respectivos valores percentuais referentes aos tipos de efeitos gênicos classificados de acordo com o item 3.7.11, avaliados em cada Cruzamento - E.G. tipo de efeito gênico - Cruzamento I: (F1xM1); Cruzamento II: (F2xM2); Cruzamento III: (HS1xHS2) - Número total de Bandas = número total de bandas apresentada por cada órgão no estágio correspondente e Número de Bandas = número de bandas que apresentam o tipo de efeito gênico descrito.	57
7 Somatória dos valores percentuais referentes aos efeitos gênicos (3) e (4).	58

Tabela	Página
8 Diferença das somatórias percentuais dos valores referentes aos efeitos (3) e (4) e efeitos (1), (7) e (9). (* cruzamento envolvido com macho - esterilidade)	60
9 Distâncias entre genótipos, obtidas através de distância euclidiana média: F-4 - folha no estágio F4; C-2 - colmo no estágio C2; C-3 - colmo no estágio C3; P-1 - pendão no estágio P1; E-1 - espiga no estágio E-1 e G-2 - grão no estágio G2. .	62
10 Valores mínimos e máximos de distância entre genótipos, em cada órgão analisado.	63
11 Agrupamentos referente a todos os órgãos apresentado pelo método do VIZINHO MAIS PRÓXIMO.	64

VARIAÇÃO E HERANÇA DOS PADRÕES ELETROFORÉTICOS EM ÓRGÃOS
E ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO EM MILHO (*Zea mays* L.)

Autora: DIRCE MARIA CARRARO

Orientador: PROF. DR. FLAVIO C. A. TAVARES

RESUMO

Com o objetivo de caracterizar os órgãos e detectar variações durante o desenvolvimento, foram comparados os perfis eletroforéticos de proteínas desnaturadas (SDS-PAGE) de folhas, colmo, pendão, espiga e grãos, em sete genótipos de milho.

Cada órgão apresentou um perfil eletroforético característico, exibindo diferenças quanto ao número e concentração protéica das bandas; o mesmo acontecendo em dado órgão, nos diferentes genótipos. As diferenças nos perfis eletroforéticos, foram maiores entre órgãos do mesmo genótipo, que aquelas observadas entre genótipos diferentes considerando o mesmo órgão e estágio de desenvolvimento.

Como o método SDS-PAGE não permite detectar a identidade do polipeptídeo, não foram caracterizados com precisão, a ocorrência de bandas específicas de certo estágio de desenvolvimento, nos órgãos estudados. Ocorrem contu-

do diferenças de concentração das bandas, como mencionado, permitindo-se associá-las à alterações devidas a estágios fisiológicos das amostras protéicas das plantas. A única banda característica de certo estágio do desenvolvimento, foi detectada com peso molecular aparente de 15 kD em amostras de grãos após 122 dias de plantio, em fase correspondente a sua maturação, sendo portanto, a única banda estágio específica presente em todos os genótipos. As folhas, colmos e grãos apresentaram variações nas concentrações de grande número de bandas, com comportamento similar nos vários genótipos, durante o desenvolvimento da planta. Para a espiga e o pendão, a maior parte das alterações de concentração parecem ser relacionadas com o genótipo.

Para vários órgãos, a comparação das bandas de mesmo P.M.A. (peso molecular aparente) do híbrido com as de suas linhas parentais, permitiu identificar e classificar diversos tipos de efeitos gênicos. Os perfis eletroforéticos nos híbridos altamente heteróticos, apresentaram alto valor percentual de bandas com concentração maior ou igual às bandas de maior concentração de suas linhas parentais, especialmente nas folhas e colmo. A presença de bandas no híbrido, não existentes nos parentais; e a ausência de bandas no híbrido, existente em ambas as linhagens parentais, sugerem sistemas regulatórios envolvendo mais de um fator trans, agindo na expressão de alguns polipeptídeos.

Considerando como variáveis, as concentrações das bandas, procedeu-se a estimativa das distâncias genéti-

cas entre linhagens e híbridos, através da análise multivariada em representação tridimensional. Os resultados permitiram concluir que é possível obter valores de distâncias genéticas consistentes com a relação de parentesco das amostras, contudo respeitando-se a influência do tipo de órgão e estágio de desenvolvimento.

VARIATION AND INHERITANCE OF THE ELECTROPHORETIC PATTERNS
IN ORGANS AND DEVELOPMENTAL STAGES OF MAIZE (*Zea mays* L.)

Author: DIRCE MARIA CARRARO

Adviser: PROF. DR. FLAVIO C. A. TAVARES

SUMMARY

Electrophoretic patterns of denatured proteins of leaves, stalks, tassels, ears and grains, were used to characterize and search for protein during the development of strains and hybrids of maize. Each organ showed a characteristic band pattern, in respect to number and concentration as measured by densitometry, the same observed for every genotype which was also possible to characterize this way. However the differences among organs were greater than those observed among genotypes for a specific organ and stage of development.

With the SDS-PAGE method it was difficult to detect stage specific polypeptides. However, changes in the band intensities in the developmental stages of all the organ, permitted in some cases to associate these alterations with specific physiological states. The leaves, stalks and grains showed similar variations in the concentration of the

bands in the genotypes, and for the ears and tassels most of the variations in the concentration of the bands seemed be related to the genotype.

The comparison of bands with same molecular weight for several organs of the hybrids and the their parent lines, permitted to identify and to classify many types of genetic effects. Some of these effects appeared heterotic since in simple crosses most bands presented higher concentration, specially in leaves and stalks, than in respective parental lines. In some cases in the hybrid the bands resembled the parental line with high band concentration. The presence of the bands in the hybrid that are absent in their parent lines; and absence of the bands in the hybrids, although present in both parent lines, suggest regulatory systems involving more than one trans factor acting in some polypeptides expression.

Considering the bands concentrations as variables, it was proceeded the evaluation of genetic distances among lines and hybrids through of the multivariate analyses. The results led to the conclusion that it is possible to obtain genetic distance values consistent with the parental relationships, but influenced by the types and stages of the organs.

1. INTRODUÇÃO

Uma série de alterações na expressão gênica se sucedem durante a diferenciação celular, dando origem as células especializadas, as quais expressam somente uma fração do seu grande potencial de informação genética. Dessa forma, cada célula é caracterizada por um padrão específico de genes ativos, cuja expressão genética diferencial, comandada por uma complexa atuação de genes reguladores, dão origem aos diversos tecidos e órgãos, os quais compõem o indivíduo adulto. Ao longo do desenvolvimento de cada órgão ocorre uma série de alterações à nível de expressão gênica, determinando sua maturação e posterior envelhecimento. Essas alterações podem ser avaliadas pela análise de seus polipeptídeos, que representam o produto final de uma função gênica específica.

Os perfis eletroforéticos de proteínas desnaturadas, exibem grande número de polipeptídeos passíveis de serem analisados. A avaliação desses perfis durante o desenvolvimento torna possível a identificação de grupos de polipeptídeos característicos e suas alterações, as quais permitem estabelecer correlações com envelhecimento e eventos fisiológicos, além de auxiliar na elucidação de mecanismos regulatórios que controlam quantidades de proteínas.

Dessa forma, visando caracterizar cada órgão do milho e estabelecer variações ocorridas durante o desenvolvimento da planta, foi observado o perfil eletroforético em SDS-PAGE. Esse tipo de eletroforese, permite avaliar alterações qualitativas (ausência e presença de bandas) e quantitativas (alterações na intensidade das bandas) de numerosos polipeptídeos.

Para a caracterização dos órgãos do milho foram escolhidos sete genótipos, os quais apresentam envolvimento hierárquico possibilitando determinar o tipo de herança dos polipeptídeos em todos os órgãos, através da comparação das bandas de mesmo P.M.A. (peso molecular aparente) do perfil eletroforético apresentado pelo híbrido com as das linhas parentais; e estimar os valores de distância genética nos diversos órgãos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Eletroforese é uma técnica que permite a separação de macromoléculas eletricamente carregadas, em uma solução, quando a esta é aplicada uma diferença de potencial. Diversos sistemas de eletroforese, como proteína total, gel - SDS, isoenzimas, eletrofocalização e corrida em duas dimensões, foram desenvolvidas e têm contribuído enormemente para estudos de caracterização (FORDE *et alii*, 1980; WEN & LUTHE, 1985; GUPTA & ROBBELEN, 1986), fisiologia (MATSUOKA *et alii*, 1988; NASSER *et alii*, 1988) e genética de organismos (BARHMAN *et alii*, 1985; OTTOBONI & STEFFENSEN, 1987).

Dentre as técnicas mais utilizadas, a SDS-PAGE, na qual as proteínas perdem o efeito de carga específica, separando-se devido às suas diferenças de pesos moleculares (P.M.), está entre as que permitem melhor resolução de bandas, tornando possível a avaliação, a nível qualitativo (ausência/presença) e quantitativo (diferenças de concentração) dos polipeptídeos existentes em uma amostra.

2.1. Utilização de Técnicas Eletroforéticas em Estudos Fisiológicos

As variações ambientais afetam o metabolismo celular de maneiras distintas, e portanto a composição proteica, por indução e/ou repressão de genes específicos. Muitos desses casos são estudados através de alterações em perfis eletroforéticos de proteínas totais. Em especial as eletroforeses SDS-PAGE, ou seja, separação de proteínas desnaturadas, a qual tem se mostrado muito eficiente na detecção destes polipeptídeos variantes, permitindo a identificação de produtos gênicos associados a comportamentos fisiológicos induzidos por condições de estresse salino (ERICSON & ALFINITO, 1984; KING *et alii*, 1986), respostas a patógenos (NASSER *et alii*, 1988), choque térmico (KANABUS *et alii*, 1984), entre outros.

A comparação dos perfis eletroforéticos de células de tabaco adaptadas e normais, em meio com e sem cloreto de sódio, mostraram um aumento significativo na concentração de dois polipeptídeos (20 e 32 kD) e o surgimento de outro de 26 kD nas células adaptadas à condições de estresse. Na ausência de cloreto de sódio, as células apresentam uma redução de concentração das bandas de 20 e 32 kD e a permanência da banda de 26 kD, que começa a diminuir sua concentração depois de sucessivas transferências para o meio sem NaCl. Os diferentes comportamentos dos polipeptídeos, indicaram distintos mecanismos de regulação (ERICSON & ALFI-

NITO, 1984). O polipeptídeo de 26 kD não é correlacionado com tolerância a salinidade, porém estudos nesse sentido auxiliam a elucidação do mecanismos de respostas ao NaCl (KING *et alii*, 1986). Polipeptídeos relacionados com choque térmico, aparecem em resposta a uma termotolerância transitória. A síntese desse grupo de polipeptídeos se dá quando uma suspensão de células é exposta à altas temperaturas, de 34 a 42°C. Tem sido observado que dependendo da temperatura do choque térmico ocorrem alterações nas respostas dessas proteínas (KANABUS *et alii*, 1984). Através de eletroforese bidimensional foram detectados pelo menos 6 polipeptídeos distintos, cuja síntese é induzida em respostas à patógenos e determinados agentes químicos. São as PR proteínas (Pathogen response proteins) (MATSUOKA *et alii*, 1988). Em milho foi detectado, através de gel SDS-PAGE, 8 proteínas relacionadas com as respostas à patógenos (NASSER *et alii*, 1988). As PR proteínas apresentam propriedades comuns no milho e no tabaco, como: solubilidade a baixo valor de pH, resistência para vários tipos de proteases, são predominantemente localizados nos espaços intercelulares, e apresentam baixo peso molecular (MATSUOKA *et alii*, 1988; NASSER *et alii*, 1988).

Em células de elongação de haste de feijão, submetidas a estresse salino, tem sido constatado a presença de um polipeptídeo específico de 28 kD, que pode apresentar um papel na regulação do crescimento e adaptação em ambientes com "deficit" hídrico (MASON *et alii*, 1988).

A aplicação de técnicas eletroforéticas, imuno-eletroforeses e marcação (Western blots) (BROGLIE *et alii*, 1984; GAYLER & SYKES, 1985; KAWATA & YOSHIDA, 1988; DE ROSE, 1989) possibilitam a elucidação de vários sistemas regulatórios e tem auxiliado o desenvolvimento da engenharia genética vegetal com a identificação de produtos gênicos e isolamento de promotores específicos (ABELES *et alii*, 1970; BROGLIE *et alii*, 1989; LAFLAMME & ROXBY, 1989; WETTSTEIN, 1989).

2.2. Utilização de Técnicas Eletroforéticas Para Fins de Caracterização e Estudos Genéticos

As variações genéticas para sistemas regulatórios, os quais controlam quantidades de proteínas, parecem ser maiores que as variações em genes estruturais (KLOSE, 1982; ZIVY *et alii*, 1984; BAHRMAN *et alii*, 1985). Assim, avaliações de perfis eletroforéticos de proteínas desnaturadas, estão sendo utilizadas para caracterização de cultivares e de diferentes órgãos em vários organismos, principalmente eletroforese de proteínas de sementes, utilizadas para resolver problemas taxonômicos e evolucionários de diversas espécies cultivadas (ROBERT *et alii*, 1985; WEN & LUTHE, 1985; GUPTA & ROBBELEN, 1986; GRATAPAGLIA & NASSAR, 1987; SHEWRY *et alii*, 1987). Esses perfis são considerados confiáveis, uma vez que proteínas de reserva sofrem poucas influências de fatores ambientais (GUPTA & ROBBELEN, 1986).

Em milho, perfis eletroforéticos de zeínas, sua maior proteína de reserva, tem sido utilizados na

caracterização de linhagens (OTTOBONI & STEFFENSEN, 1987) e na observação do acúmulo diferencial desses polipeptídeos em culturas de células de endosperma, extraído de sementes tipo opaco e selvagem (MANZOCCHI, L.A. *et alii*, 1989). Da mesma forma, em sementes de plantas leguminosas, os polipeptídeos de proteínas desnaturadas mostram alta variação entre cultivares (CASEY *et alii*, 1986).

CROWE & WALDEN (1988), verificaram que 5% dos polipeptídeos de folhas de milho, apresentaram variações, em vários cultivares. SAWHNEY & BHADULLA (1987) detectaram diferenças qualitativas nas proteínas desnaturadas de plantas normal e macho estéril de tomate. Dos vários órgãos analisados, somente os estames apresentaram alterações nos primeiros estágios de desenvolvimento.

A avaliação eletroforética de proteínas tem auxiliado a detecção de proteínas órgão-específicas (KLOSE, 1982), e também o estudo de genes reguladores que controlam quantidades diferenciais de proteínas (ZIVY *et alii*, 1984). Essa diferença na variação quantitativa e no número de polipeptídeos entre tecidos e órgãos, torna possível caracterizar os diferentes órgãos de um único genótipo e até mesmo diferentes estágios de desenvolvimento de um mesmo órgão (ZIVY *et alii*, 1984). KLOSE (1982) estudando várias linhagens e diferentes órgãos de camundongos observou que os polipeptídeos variantes ocorriam frequentemente em proteínas órgão-específicas, fato também constatado por LEONARDI *et alii* (1988) em milho. Foi verificado que linhagens de

populações com pouca divergência mostraram a maior parte de suas diferenças nas proteínas órgão-específicas, enquanto que populações com alto grau de divergência apresentam maior variação nas outras proteínas (KLOSE, 1982). A proporção de proteínas variantes, as quais ocorrem nos diferentes órgãos, poderia indicar o diferente potencial para ocorrência de alterações nos processos de desenvolvimento filogenético (KLOSE, 1982).

Outras formas de caracterização, utilizando eletroforese de proteínas desnaturadas, são muito encontrados na literatura, como por exemplo, a caracterização de expressão diferencial de dois tecidos distintos no mesmo órgão (HARRISON & BLACK, 1982), e de dois tipos de células no mesmo tecido (BROGLIE *et alii*, 1984).

Essa técnica além da contribuição nos estudos de caracterização genética e de órgãos, auxilia também nos estudos de dosagem gênica (REICHERT, 1986), na localização de genes nos cromossomos (OTTOBONI & STEFFENSEN, 1987; PAYNE *et alii*, 1987) e na detecção de multialelismo de um locus (OSTERMAN, 1988), elucidando mecanismos genéticos.

2.3. Regulação Genética e Diferenciação em Plantas Superiores

Como uma informação linear contida no DNA pode gerar um organismo tridimensional, no curso do desenvolvimento, vindo de um ovo fertilizado, é ainda um dos grandes mistérios da biologia (GEHRING, 1985). Durante o desenvolvi-

mento do embrião, desde as primeiras divisões mitóticas começa o processo de diferenciação celular. Os mecanismos de regulação, pelos quais os genes são "ativados" e "desativados" em uma sequência pré-determinada, controlam a síntese das proteínas nas novas células (HOLLIDAY, 1989), iniciando assim o processo de especialização celular e diferenciação. Cada órgão ou tecido do organismo maduro comporta células especializadas, fornecendo a esses uma incumbência particular (GEHRING, 1985). Os processos que controlam o desenrolar do desenvolvimento são descritos como epigenéticos, que são complexos e estão ainda longe de serem compreendidos (HOLLIDAY, 1989). Porém, a maioria dos investigadores que estão tentando elucidar o controle da atividade gênica no desenvolvimento e herança, concordam que interações entre DNA e proteínas sustentam esse complexo mecanismo (HOLLIDAY, 1989).

Como o DNA, a proteína é um polímero linear: uma cadeia de subunidades ligadas numa sequência contínua (DOOLITTLE, 1985), entretanto, as proteínas apresentam uma infinidade de estruturas terciárias, as quais são consequência de sua cadeia de aminoácidos, isto é, de sua estrutura primária. Essa estrutura terciária confere às proteínas uma variedade de funções, sendo essas, estruturais, enzimáticas e/ou regulatórias. As proteínas regulatórias ligam-se em sequências específicas de bases nucleotídicas no DNA, controlando assim a expressão de genes. Em células eucarióticas, os eventos que controlam a síntese de proteínas estão divididos basicamente em três grupos: transcricionais, tra-

ducionais e pós-traducionais. Dentre esses eventos estão incluídos, a estabilidade da proteína (SCANDALIOS, 1980; BEWLEY & LAURIE-AHLBERG, 1984), nível de transcrição (MANZOCCHI *et alii*, 1989) taxa de tradução do RNA mensageiro, transporte, processamento e estabilidade do produto de transcrição, taxa de tradução, e até mesmo as indicações da participação da estrutura da cromatina regulando a transcrição gênica (SPIKER, 1984).

Na regulação transcrional existem duas classes de elementos atuando em conjunto, os de ação cis e os de ação trans (GUARENTE, 1987). Os elementos de ação cis correspondem à sítios do DNA, onde ocorre a ligação e atuação da RNA polimerase II (GUARENTE, 1987). Em relação à classe de reguladores trans, eles são basicamente proteínas, ou complexo delas, que medeiam a atividade dos elementos cis em vários níveis (STRUHL, 1987). Atualmente, tem surgido um especial interesse na identificação desses elementos genéticos que determinam a expressão relativa de genes estruturais num órgão particular e/ou num estágio de desenvolvimento específico (WOODMAN & FREELING, 1981).

O estudo da variação na atividade ou quantidade de proteínas entre genótipos, estágios de desenvolvimento ou órgãos é comumente usado como primeiro passo para identificação de mecanismos regulatórios (des FRANCS & THIELLEMENT, 1985). Esse aspecto da regulação ao nível de expressão gênica é muito estudado em plantas superiores para compreensão dos fatores envolvidos no desenvolvimento e na herança.

2.3.1. Aspectos da Regulação do desenvolvimento

A crescente importância nos estudos de desenvolvimento e diferenciação em organismos eucarióticos como a identificação e caracterização de genes reguladores, tem sido estudados (SCANDALIOS *et alii*, 1982). Entretanto, frente a complexidade dos processos de desenvolvimento, onde vários eventos ocorrem simultaneamente, obedecendo uma hierarquia nas interações gênicas (SHERIDAN, 1988), poucos genes regulatórios foram identificados e caracterizados, especialmente em plantas (SCANDALIOS *et alii*, 1982).

Em milho, por exemplo, foram identificados, os elementos CAR-1 (SCANDALIOS *et alii*, 1980) e CAR-2 (CHANDLEE & SCANDALIOS, 1984) que controlam as expressões dos genes CAT-2 e CAT-1, respectivamente. LUSIS *et alii* (1983) identificaram em ratos dois loci regulatórios que controlam a expressão de β -glucuronidase. Um deles é o locus Gus-U, o qual age em cis e causa uma redução no nível da enzima em todos os órgãos, e o outro é o locus temporal, Gus-T, que age em trans causando abruptas alterações na taxa de síntese da enzima, em certos órgãos e estágios específicos de desenvolvimento. São especialmente interessantes, nos estudos de desenvolvimento e diferenciação, os fatores genéticos que regulam, entre outros, o nível quantitativo do produto gênico estrutural e a expressão temporal dos genes (SCANDALIOS & BRAUM, 1982). Essa expressão seletiva de genes pode ser considerada no mínimo como parcialmente responsável pela diferenciação (SPIKER, 1984).

Muitos estudos relatam essas alterações qualitativas e quantitativas na composição polipeptídica de extratos proteicos durante o desenvolvimento, esses estudos incluem técnicas eletroforéticas de proteínas desnaturadas e isoenzimas (ZUCKER, 1959; NITSAN *et alii*, 1962; QUAIL & SCANDALIOS, 1971; BRYAN *et alii*, 1977; MALIK *et alii*, 1977; SCANDALIOS *et alii*, 1980; BLERKOM, 1981; ZIVY *et alii*, 1984; FERGUSON *et alii*, 1988; BOOTHE & WALDEN, 1989; REMBUR & NOUGAREDE, 1989).

As proteínas de sementes, podem ser subdivididas em duas categorias: as proteínas de reserva e as proteínas que são essenciais para manutenção do metabolismo normal da célula. As proteínas de reserva contém relativamente poucos tipos de proteínas, enquanto que as proteínas de manutenção exibem um grande número de proteínas em pequenas quantidades (HIGGINS, 1984). Em milho, durante o desenvolvimento da semente, ocorre um aumento pronunciado de proteínas de reserva (JONES *et alii*, 1977a) principalmente durante o período de expansão celular (HIGGINS, 1984), incluindo a α -zeína, a qual inicia sua síntese aos 16 dias pós-polinização (TSAI & DALBY, 1974). Essa síntese está associada à ligações membrana-polissomo, devendo existir uma classe de ribossomos específicos ligados à região do retículo endoplasmático, capazes de reconhecer os RNA mensageiros das zeínas (JONES *et alii*, 1977b). Em mutantes opaco-2 e flou-ry-2, é observado uma drástica redução na taxa de acumulação da α -zeína (di FONZO *et alii*, 1977). No opaco-2, essa

redução no acúmulo tem sido caracterizada, envolvendo genes regulatórios, porém não foi identificado o exato mecanismo que controla a quantidade da zeína (BENNER *et alii*, 1989). Albuminas e globulinas são representadas por poucas bandas na maturação do grão, pois estas são principalmente proteínas catalíticas, e na maturação a atividade enzimática do endosperma é altamente reduzida (FONZO *et alii*, 1977). Em contraste, as glutelinas, as quais devem ser, em parte, proteínas estruturais, não exibem modificações durante o desenvolvimento (FONZO *et alii*, 1977).

Variações nos perfis eletroforéticos ao longo do desenvolvimento das folhas, tem sido constatados em várias culturas (ZUCKER, 1959; CROWE & WALDEN, 1988). Em ervilha, as alterações de proteínas nas folhas de plantas senescentes foram similares às folhas de plantas não senescentes, podendo sugerir que as alterações ocorridas por diferentes idades não são influenciados pela condição de senescência da planta (MALIK, 1977). Em folhas de trigo, foi observado um aumento da maior subunidade da enzima RuDP carboxilase (PMA = 45 kD) na comparação do estágio 1F (7 dias pós emergência) com o estágio 3F (emergência das espiguetas), porém houve uma redução na quantidade da banda num estágio intermediário; verificou-se também que a maior parte das variações foram de intensidade (ZIVY *et alii*, 1984). Em embriões de milho, durante o desenvolvimento, ocorre variação na concentração de numerosos polipeptídeos, essas alterações apresentam um comportamento similar nos

vários genótipos estudados (BOOTHE & WALDEN, 1989). Em meristema apical de *Chrysanthemum segetum*, verificou-se que maiores alterações na expressão gênica ocorreram durante o estágio pré-floral, isto é, um longo período antes da iniciação dos primórdios florais. Essas alterações incluem 2% de mudanças qualitativas (ausência/presença), sendo que o número de bandas aumentam progressivamente do estágio vegetativo, pré-floral até o estágio reprodutivo (REMBUR & NOUGAREDE, 1989).

2.3.2. Mecanismos genéticos regulatórios

Tem se tornado muito claro, que genes estruturais podem ser influenciados por diversos loci regulatórios, localizados próximos ou distantes. Os elementos próximos do gene estrutural, elementos cis, são identificados em organismos superiores (BERNISTINE & KOH, 1980) e parecem exibir herança aditiva (CHANDLEE & SCANDALIOS, 1984). Em todos os casos examinados eles influenciam o nível de síntese (BERNSTINE & KOH, 1980; SHAFER & BEWLEY, 1983; SANO, 1984). Os distantemente localizados, os elementos trans, são verificados em vários organismos superiores, controlando a expressão de genes estruturais (ABRAHAM & DOANE, 1978; McDONALD & AYALA, 1978; SCANDALIOS *et alii*, 1980; des FRANCS & THIELLEMENT, 1985; GIBSON *et alii*, 1986; BENNER *et alii*, 1989).

Através da análise do perfil eletroforético apresentado pelo híbrido em comparação com as respectivas

linhagens parentais é possível supor a existência de diferentes mecanismos de regulação (LEONARDI *et alii*, 1988; CHEN & CHEN, 1989). Os estudos isoenzimáticos levam à descobertas quanto à natureza da enzima (monomérica, dimérica, ...), o número de alelos, e sua localização cromossômica (STUBER & GOODMAN, 1984; WENDEL *et alii*, 1988; BENNER *et alii*, 1989).

Análise de híbridos em trigo, em eletroforeses uni e bidimensionais, tem mostrado que vários componentes de gliadina, são herdados juntos, como blocos, e são provavelmente, codificados por um grupo de genes muito próximos localizados no cromossomo 6A (KUDRYAVTESEV *et alii*, 1988).

Mais recentemente, tem surgido grande interesse, nos efeitos gênicos, que controlam o nível de intensidade da expressão dos genes estruturais no híbrido, o que foi chamado por LEONARDI *et alii* (1987) como "herança da quantidade de proteínas". A maioria desses estudos referem-se a atividade e/ou quantidade de proteínas. Alguns casos de codominância (CHEN & CHEN, 1989), dominância/recessividade (LEONARDI *et alii*, 1987; LEONARDI *et alii*, 1988) tem sido relatados.

Foi verificado em proteínas de semente de arroz, dois grupos de proteínas, os quais apresentam dois polipeptídeos com mobilidade diferencial, apresentando ação codominante. Os dois grupos são herdados independentemente, demonstrando alterações na intensidade relativa nos heterozigotos em ambos os loci, o que foi sugerido como efeito de dosagem gênica dos alelos codominantes no endosperma tri-

plóide (CHEN & CHEN, 1989). Em cruzamentos recíprocos de milho em vários órgãos, foi observado que nenhum dos híbridos apresentou bandas que não estivessem presentes em um dos parentais, e também que nenhuma banda presente em pelo um dos parentais não estivesse no híbrido (LEONARDI *et alii*, 1987; LEONARDI *et alii*, 1988). Nesses mesmos trabalhos a maior parcela de variação foi de herança codominante (ou aditiva) em relação a dominante.

Além dos mecanismos regulatórios, tem sido verificado em endosperma de sementes, que o conteúdo proteico deve ser controlado por vários genes estruturais: poligenes (Kambayashi *et alii*, citado por CHEN & CHEN, 1989). É também verificado que em cruzamentos recíprocos, o nível de proteína é frequentemente variado no endosperma, apontando que diferentes efeitos de dosagem gênica tendem a ocorrer nos diferentes cruzamentos, devido a sua natureza triplóide (CHEN & CHEN, 1989). Essa variação também foi verificada em folhas com diferentes citoplasmas, devido a interação nucleo-citoplasmática controlando a síntese de alguns polipeptídeos (ZIVY *et alii*, 1984).

2.4. Mecanismos Moleculares da Heterose

Foi observado, desde longa data, que o híbrido apresentava, na maioria das vezes, um acréscimo, em relação a uma série de caracteres, em comparação à média dos parentais. Esse fenômeno foi denominado heterose. Heterose foi, e

continua sendo, muito utilizada por melhoristas vegetais como meio de aumentar a produtividade. Shull em 1908, citado por ALLARD (1960), já especulava a respeito, considerando o estado heterozigoto vantajoso para a fisiologia do organismo. Para explicar essa vantagem fisiológica, muitos trabalhos foram desenvolvidos para dar suporte científico a essas especulações, principalmente na década de 70.

Observa-se na literatura, muitos estudos à nível de polimorfismo enzimático tentando elucidar esse mecanismo (SCANDALIOS *et alii*, 1972; SCANDALIOS, 1973; SCHWARTZ, 1973; HEIDRICH-SOBRINHO & CORDEIRO, 1975), as várias suposições de efeitos regulatórios no híbrido apresentadas nesses trabalhos, tentam explicar o mecanismo, demonstrando interações gênicas, aparentemente benéficas a nível de um ou de poucos loci.

Mais recentemente, estudos utilizando eletroforese de poliacrilamida em duas dimensões, buscam esclarecer os eventos regulatórios que comandam quantidades de proteínas no híbrido (KLOSE, 1982; LEONARDI *et alii*, 1987; LEONARDI *et alii*, 1988).

GILYAZETDINOV & ZIMNITSKII (1986), apresentaram dados que propõem um tipo de regulação à nível transcripcional. Esses autores, estudando cinética de hibridação de DNA de embrião de milho com RNA-pol(A)⁺, verificaram um excesso de classes de mRNA transcritos de sequências de DNA raras num híbrido altamente heterótico, comparando com um de baixo nível de heterose. Além disso, os dois híbridos

apresentavam superioridade em relação ao nível de m-RNA de suas linhas puras.

Uma série de mecanismos devem convergir para tornar o híbrido mais eficiente, considerando desde funções básicas da célula: respiração, fotossíntese, metabolismo de nitrogênio, até a interação genética entre as enzimas e o processo regulatório, chamado homeostase (BERVILLE & CARBONNIER, 1982). Nesse processo, inúmeras interações a nível de locus gênico, como dominância, sobredominância, epistasia e até interações núcleo-plasmáticas concorrem para explicar as bases do mecanismo da heterose, porém o mais razoável é crer que as interações responsáveis pelos efeitos heteróticos sejam complexas, envolvendo vários loci gênicos reguladores (MIRANDA & EGGLESTON, 1989) em vários níveis (transcricional, traducional e pós-traducional). Assim as ações gênicas dominantes, sobredominantes e efeitos epistáticos, mostram-se como simplificações grosseiras dos verdadeiros mecanismos regulatórios (ALLARD, 1960).

2.4.1. Distância Genética e Heterose

O grau de heterose parece estar estreitamente relacionado com distância genética em diversas culturas (MOLL *et alii*, 1962). Essa tendência, porém, não é necessariamente proporcional, podendo haver um nível ótimo de divergência, o qual uma vez ultrapassado, determinaria um desbalanceamento regulatório, causando um metabolismo pouco

eficiente no híbrido (MOLL *et alii*, 1985). Essa afirmação contempla de certa forma, o aparecimento de híbrido com baixo grau de heterose, vindos de linhagens extraídas de populações distantes, pois a existência de multialelismo e o efeito de epistasia dos dois parentais no híbrido, podem introduzir fatores negativos na expressão do grau de heterose (LEFORT-BUSON, 1985).

Considerando as evidências, de que a heterose é proporcional a distância genética até um certo nível, muitos esforços são canalizados para se chegar ao conhecimento das bases genéticas de linhagens ou variedades que proporcionem cruzamentos promissores. Para isso, é necessário ter acesso à inúmeras características do genoma, obtendo assim valores de distância entre genótipos. Além disso, descrições exatas de linhagens e variedades cultivadas são necessárias para produção de estoques puros de sementes, variedades comerciais e híbridos (SMITH & SMITH, 1987). Para se medir distância genética, existe uma série de métodos, os quais incluem, entre outros, análise de informação de "pedigree" e análise de grupos de variáveis morfológicas e bioquímicas.

Cálculos baseados em grau de parentesco sob informações de "pedigree" assumem que a herança materna e paterna contribuem no descendente de forma igual, isto é, a participação gênica dos parentais contribuem ao mesmo nível no descendente, não levando em conta eventos de recombinação e interações gênicas, não podendo dessa forma, predizer precisamente o resultado da seleção (SMITH *et alii*, 1987).

Outro problema é que nem sempre se tem acesso a informações exatas da ascendência do genótipo, trazendo dúvidas na confiabilidade dos dados. SMITH *et alii* (1987) apresenta alguns exemplos de não concordância de dados obtidos por informações de "pedigree" com dados bioquímicos.

Numerosos traços morfológicos tem sido usado para descrever linhagens e híbridos de milho, e outras plantas cultivadas. Em diversos países, as características do milho são colhidas em vários estágios de desenvolvimento como plântulas, antese e maturação do grão (SMITH & SMITH, 1989a), porém, já é de conhecimento geral que dados morfológicos pode ter confiabilidade duvidosa, uma vez que sofrem influência ambiental (CAMUSSI *et alii*, 1983). Entretanto, os problemas associados com a interpretação dos dados morfológicos, podem ser minimizados pela repetibilidade em diversos ambientes ou pela comparação limitada de caracteres, os quais devem ser o menos possível influenciados pelo ambiente (GOODMAN & PATERNIANI, 1969). Dessa forma, é fundamental para a realização de tais descrições, a escolha dos descritores ou grupo de descritores, os quais possam adequadamente descrever cada genótipo.

Além dos caracteres morfológicos, atualmente há diversos critérios que são muito usados, para caracterizar linhagens e híbridos de milho, e outras culturas. São os caracteres bioquímicos, nos quais estão incluídos: polimorfismo enzimático (SHECHTER & WET, 1975; DOEBLEY *et alii*, 1983; GOODMAN & STUBER, 1983; SMITH, 1984; SALANOUBAT &

PERNES, 1986; SMITH & SMITH; 1987), perfis eletroforéticos de proteínas de sementes (PANDA *et alii*, 1986), especialmente zeína no caso de milho (NUCCA *et alii*, 1978), perfil eletroforético em duas dimensões de proteínas de embrião de milho (DAMERVAL *et alii*, 1987), análises de cromatografia (SMITH & SMITH, 1987) e polimorfismo de DNA (WALTON & HELENTJARIS, 1987). Dados bioquímicos são menos influenciados por fatores ambientais e dessa forma, são capazes de refletir, com mais confiança, o genótipo (SMITH *et alii*, 1987).

Muitos trabalhos são realizados utilizando técnicas bioquímicas para cálculo de distância genética na tentativa de correlacioná-las com dados agronômicos já conhecidos. Em sorgo, cultivares pertencentes à mesma raça apresentaram idêntico perfil eletroforético de proteínas e isoenzimas de sementes (SHECHTER & WET, 1975). Em milho, a variação isoenzimática entre raças da Bolívia concordaram com prévios estudos raciais e também com estudos citológicos de "knobs" cromossômicos (GOODMAN & STUBER, 1983). DOEBLEY *et alii* (1983), observaram que a frequência alélica revelou boa correspondência entre dados enzimáticos e geográficos, entretanto os dados não permitiram separar em classes distintas quando se referiram a taxonomia. Polimorfismo enzimático dentro e entre populações de milho da Europa apresentaram alta correlação entre populações de distinta procedência geográfica (SALANOUBAT & PERNES, 1986). Estudos de variação genética por análise de dados enzimáticos, demonstraram que 90% dos híbridos apresentaram frequência alélica diferen-

cial. Estas diferenças entre os vários híbridos avaliados foram devidos a poucos loci (SMITH, 1984). SMITH & SMITH (1989b) analisando descritores bioquímicos, morfológicos e genéticos, e correlacionando com produtividade, verificaram que depois de heterose, a segunda maior correlação foi com dados enzimáticos (57%), sugerindo que dados bioquímicos devem proporcionar separação inicial de identidade, porém dados de heterose parecem proporcionar a mais confiável estimativa de parentesco entre genótipos.

Alguns estudos tem mostrado que alelos de loci enzimáticos podem direcionar a seleção, sendo que a mudança na frequência alélica das isoenzimas está associada com alterações na produtividade (STUBER *et alii*, 1980; STUBER *et alii*, 1982; STUBER *et alii*, 1987). Porém, ainda é necessário muitas investigações para determinar se essas associações podem ser explicadas pela pleiotropia ou por grupos gênicos ligados (STUBER *et alii*, 1987).

Para haver maior confiabilidade nos dados apresentados nas interpretações enzimáticas de distância, o perfil isoenzimático deve refletir a composição genética do cultivar. Esse aspecto deve ser um dos pontos responsáveis pela diversidade de resultados citados anteriormente. O número de isoenzimas e loci de zeínas os quais podem ser analisados através de perfis eletroforéticos é muito pequeno comparado com o enorme número de genes estimados no genoma de milho, apesar dessas marcas genéticas estarem situadas nos 17 dos 20 braços cromossômicos do milho (SMITH *et alii*,

1987). Dessa forma, pode ocorrer em casos específicos, dependendo das linhagens envolvidas, resultados com altas ou baixas correlações com os dados agronômicos ou de parentesco. Esse é um dos pontos relevante para a utilização de eletroforese de proteínas desnaturadas, onde o número de polipeptídeos avaliados é relativamente grande, além da vantagem de se poder avaliar a ação de genes reguladores (ZIVY *et alii*, 1984).

A variação genética de proteínas, aparentemente, é melhor caracterizada pelas alterações quantitativas que pelas qualitativas (KLOSE, 1982). DAMERVAL *et alii*, (1987) comparando o perfil protéico de milho, através de eletroforese duas dimensões, verificaram uma alta correlação (75%) dos dados morfológicos com as distâncias calculadas com base nas variações quantitativas; enquanto as distâncias calculadas com base em dados qualitativos (ausência/presença) se mostraram completamente independentes. As alterações a nível de estágio de desenvolvimento e órgão, modificam o perfil eletroforético e dessa forma, a estimativa da divergência genética pode ser influenciada pela escolha do órgão ou estágio de desenvolvimento (LEONARDI *et alii*, 1988).

2.4.2. Estimativas de distâncias genéticas: aspectos gerais

A distância genética calculada a partir das frequências alélicas foi o objetivo de numerosos trabalhos

teóricos no período de 1965-1975. Atualmente o cálculo de distâncias genéticas faz parte da rotina de geneticistas de populações.

Na ausência de variabilidade genética intra taxon, a distância entre dois taxons pode ser definida como o número médio de substituições de aminoácidos entre proteínas homólogas (VIENNE & DAMERVAL, 1985). Ela pode ser apreciada por sequenciamento protéico, técnica que tem permitido colocar em evidência a relação linear entre a distância genética (ou taxa de evolução molecular) e o tempo a partir do qual os taxons tem divergido: é a noção do "relógio molecular" (WILSON *et alii*, 1977).

A estimativa da distância genética, atualmente é baseada em resultados de técnicas eletroforéticas, em substituição à técnicas de sequenciamento de proteínas (NEI, 1971). Com cálculos apropriados se obtém a distância genética, expressa em número médio de substituição de aminoácido por proteína (NEI, 1971).

Esta medida apresenta vários problemas. De início ela supõe que a taxa de substituição por unidade de tempo e o número de aminoácidos da proteína são iguais para todas as proteínas, o que realmente não é (VIENNE & DAMERVAL, 1985). Assim, a distância genética é subestimada. Por outro lado, as técnicas eletroforéticas escondem no mínimo 50% das substituições de aminoácidos (quando essas substituições são em número pequeno não ocorre alteração na mobilidade). Essa distância, como outras, apresentam limita-

ções teóricas ou práticas que obriguem sua utilização com muita prudência (VIENNE & DAMERVAL, 1985).

Para aplicação da "distância de Nei" o número de loci estudados deve ser elevado (maior que 50) para se ter estimativas confiáveis, contudo utiliza-se em geral, um número muito pequeno de loci prejudiciando as estimativas (VIENNE & DAMERVAL, 1985). Outro problema é que as técnicas eletroforéticas isoenzimáticas, não permitem identificar um número indefinido de alelos, resultantes de pequenas substituições na composição de aminoácidos, de forma que os tipos de eletromorfos são em número limitado. As substituições de aminoácidos não fazem mais que deslocar as alozimas de uma classe de Rf (mobilidade eletroforética) à outra, na maior parte dos casos, já ocupada (VIENNE & DAMERVAL, 1985). A consequência deste fenômeno é que ao invés de crescer linearmente com o tempo, a distância genética se estabiliza rapidamente (VIENNE & DAMERVAL, 1985). Dessa forma, um estudo genético da divergência entre populações deve ser mais global e se apoiar sobre análises multidimensionais (VIENNE & DAMERVAL, 1985).

A pesquisa de uma estrutura dentro de um conjunto de indivíduos ou de famílias de natureza genética mais ou menos complexa, pode ser efetuada pela colheita de dados multivariados de tipo quantitativo e qualitativo, seguido de uma síntese desta informação através do cálculo de distâncias ou divergências (HEBERT & VINCOURT, 1985).

Técnicas multivariadas, as quais combinam as múltiplas informações contidas na unidade experimental, tem sido recentemente aplicada para investigações de vários aspectos, como: na investigação de afinidade genética entre variedade de arroz, baseada em traços densitométricos de polipeptídeos separados em gel - SDS (ALIAGA-MORELL *et alii*, 1987), na determinação de relações taxonômicas entre várias linhagens de milho através de frequência de alelos isoenzimáticos (GOODMAN & STUBER, 1983; SMITH & SMITH, 1987), na separação eletroforética (DAMERVAL *et alii*, 1987) e cromatografia de proteínas para estimativa de distância genética, e no estudo do desenvolvimento de embrião de milho (BOOTHE & WALDEN, 1989).

A comparação de perfis eletroforéticos de linhagens e respectivos híbridos permite estimar as distâncias euclidianas que são definidas por uma relação das variáveis com o desvio padrão dos dados (HEBERT & VINCOURT, 1985). Sendo (x_i, y_i) e (x_j, y_j) as coordenadas de dois indivíduos I e J, o valor de distância genético é, segundo HEBERT & VINCOURT (1985):

$$d(I, J) = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2}$$

Um aspecto a ser considerado é o fato da distância euclidiana crescer com o aumento do número de características avaliadas, podendo-se contornar o problema utilizando distância euclidiana média (CRUZ, 1987).

3. MATERIAL E METODOS

A cultura do milho foi estabelecida na Fazenda Agroceres da Empresa "Sementes Agroceres S/A", em Santa Cruz das Palmeiras - São Paulo.

3.1. Genótipos Utilizados

Foram utilizados 7 genótipos, sendo: 4 linhagens, 2 híbridos simples e 1 híbrido duplo.

Características:

Linhagens

Linhagem F1: Linhagem extraída de população de milho "flint" ou duro, originária de Cuba (centro de origem secundário), de colmo braquítico.

Linhagem M1: Linhagem derivada de população Asteca do Instituto Agronômico de Campinas. A linhagem foi braquitizada à partir do Piramex da população da ESALQ/USP.

Linhagem F2: Linhagem derivada de população tuxtenõ, de clima temperado.

Linhagem M2: Linhagem originária de populações do Corn-belt.

Os híbridos utilizados, apresentam a formação apresentada na Figura 1, sendo que os híbridos HS1 e HS2 apresentam alto nível de heterose.

Figura 1 - Esquema hierárquico das linhagens utilizadas e seus híbridos.

3.2. Plantio e Colheita

O plantio se deu em 06/03/89, e a colheita em 03/08/89. Os genótipos foram distribuídos em terreno adubado (400 kg/ha 4:11:18 $\leftrightarrow$ N-P-k), em fileiras de 50 plantas (2 fileiras cada genótipo) com espaçamento de 0,9 m. As plantas tiveram 2 adubações de cobertura (200 kg Nitro-Cálcio/ha) aos 35 e 55 dias.

3.3. Órgãos Analisados

Os órgãos analisados foram: 4^o par de folha, colmo, pendão, espiga e grão.

3.4. Número de Plantas Por Amostra Protéica

Para extração da amostra protéica, nas linhagens (F1, M1, F2 e M2) e nos híbridos simples (HS1 e HS2), foram utilizados 2 plantas retiradas ao acaso. Para o híbrido duplo (HD), foram retiradas 4 plantas por amostra para minimizar os efeitos da segregação genética. Em todos os casos foram feitas 2 repetições.

3.5. Estágios Analisados

Várias amostras foram extraídas dos órgãos já citados, durante o desenvolvimento das plantas de milho. Estes diversos estágios são caracterizados na Tabela 1, com base em dias pós-plantio, dias pós-florescimento e graus dia acumulados (em °C) (OMETTO, 1981).

Tabela 1 - Órgão com seus respectivos estágios avaliados.

ÓRGÃOS	ESTÁGIOS	DIAS PÓS-PLANTIO	DIAS PÓS-FLORESCIMENTOS	GRAUS/DIA ACUMUL.*
4 ^o par de Folhas	F-1	28 dias	-	409,1
	F-2	45 dias	-	662,0
	F-3	73 dias	-	967,7
	F-4	87 dias	14 dias	1080,8

Colmo	C-1	45 dias	-	662,0
	C-2	59 dias	-	833,8
	C-3	73 dias	0	967,7
	C-4	87 dias	14 dias	1080,8

Pendão	P-1	59 dias	-	833,8
	P-2	73 dias	0	967,7
	P-3	87 dias	14 dias	1080,8

Espiga	E-1	73 dias	0	967,7
	E-2	87 dias	14 dias	1080,8

Grãos	G-1	87 dias	14 dias	1080,8
	G-2	122 dias	49 dias	1393,1

* GRAUS/DIA Acumulados → Calculados com base nas temperaturas máximas e mínimas diárias, segundo OMETTO (1981).

3.6. Soluções, Tampões e Reagentes

3.6.1. Tampão de extração

Solução de trisma 10 mM, com valor de pH ajustado para 8.0, com HCl.

3.6.2. Reagente para quantificação de proteínas

100 mg de COOMASSIE-BRILLIANT-BLUE G-250, diluído em 50 ml de etanol 95%, misturar 100 ml de ácido fosfórico 85% e ajustar para 1000 ml com água destilada (BRADFORD, 1976).

3.6.3. Solução albumina bovina

Solução estoque

0,1 g de soro albumina bovina em 100 ml de H_2O . Esta solução é utilizada para construir a curva padrão. Deve ser conservada em congelador.

3.6.4. Solução de acrilamida/bis-acrilamida

Acrilamida	30 g
bis-acrilamida	0,8 g

Completar para 100 ml de água destilada e deionizada.

3.6.5. Tampão do gel inferior

Solução Trisma 1,5 M, ajustado o valor de pH para 8,8 com ácido clorídrico.

3.6.6. Tampão do gel superior

Solução Trisma 0,5 M, ajustado o valor de pH para 6,7 com ácido clorídrico.

3.6.7. Solução SDS 10% (sódio duodecil sulfato)

1 g de Sódio Duodecil Sulfato, ajustar para 10 ml de água.

3.6.8. Solução de persulfato de amônio

Persulfato de amônio (PSA) - 10%. Essa solução não deve ser estocada, devendo renová-la a cada eletroforese.

3.6.9. Tampão de corrida (solução estoque)

Trisma	12 g
Glicina	57,6 g

ajustar para 1 litro de água destilada e deionizada. O valor de pH da solução é próximo 8,3 (não é necessário corrigi-lo).

3.6.10. Tampão de amostra

1,25 ml da solução 3.6.6

2,0 ml de glicerol

completar para 6 ml de H₂O destilada e deionizada.

3.6.11. Tampão amostra desnaturante

500 μ l 2-mercaptoetanol

250 μ l azul de bromofenol 0,1%

4,0 ml sol. 3.6.7

5,3 ml sol. 3.6.10

3.6.12. Solução corante

0,05% de COOMASSIE BRILLIANT BLUE, em solução metanol: ácido acético: água na proporção de 30:7:63 (V:V:V).

3.6.13. Solução descolorante

Metanol : ácido acético : água na proporção 30:7:63 (V:V:V).

3.7. Procedimentos

3.7.1. Extração e preparo da proteína solúvel

Foram homogenizados $\approx$ 5g de tecido em 10 ml de tampão 3.6.1 (2 ml/g de tecido). O macerado foi filtrado e as proteínas precipitadas com 1,5: volumes de acetona -20°C por 2 horas em refrigerador. A suspensão foi centrifugada a 7.000 rpm por 5 minutos, os tubos foram invertidos para haver remoção total da acetona. O pelete foi ressuspendido

em 300 μ l do mesmo tampão de homogenização inicial (3.6.1), em seguida, foi centrifugado a 15.000 rpm por 2 minutos, para utilização do sobrenadante.

3.7.2. Quantificação de proteína

5 ml solução 3.6.2 diluída 1:2 em água, foram distribuídos em tubos de ensaio. Em parte dos tubos foram acrescentados frações da solução 3.6.3 correspondentes a 5, 10, 20, 40, 50, 80, 100 μ g de proteína (soro albumina bovina) para construção da curva padrão. As amostras foram preparadas adicionando 10 μ l de proteína solúvel nos demais tubos. Após homogenização em vortex, os valores de absorção foram obtidos em espectrofotômetro a 595 nm. Com os valores correspondentes à leitura obtida das amostras dos padrões foi construída uma curva, utilizada para o cálculo das concentrações proteicas das demais amostras.

3.7.3. Preparação da amostra desnaturada

As amostras de proteína solúvel são ajustadas com tampão extração (3.6.1) para obtenção da concentração final de 70 μ g/50 μ l de solução protéica. Preparou-se as amostras colocando 50 μ l de amostra proteína solúvel para 50 μ l de tampão amostra desnaturante (3.6.11). As misturas foram submetidas a temperatura de 100°C por 5 minutos, prévio à eletroforese.

3.7.4. Eletroforese SDS-PAGE

Foi utilizado o sistema bifásico de gel de poli-acrilamida, segundo a metodologia de LAEMMLI (1970). Este sistema caracteriza-se pela utilização de um gel superior (espaçador) com baixa concentração de acrilamida (4,5%) e pH 6,7, com função básica de concentrar as proteínas; e um gel inferior (separador) com alta concentração de acrilamida (12%) e pH 8,9, no qual os polipeptídeos são separados de acordo com seu peso molecular.

No presente trabalho, foram utilizados géis com 11,0 x 13,0 cm e 1 mm de espessura, sendo 8,5 cm de gel separador e 2,5 cm de gel espaçador. Para a formação dos géis, as placas foram seladas com solução de ágar 1,0%. Os géis foram preparados a partir de soluções estoques de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - Guia de preparação de eletroforese SDS-gel.

	GEL INFERIOR (12% ACRILAMIDA)	GEL SUPERIOR (4,5% ACRILAMIDA)
Tampão Superior (3.6.6)	-	2,5 ml
Tampão Inferior (3.6.5)	10,0 ml	-
Solução A/B (3.6.4)	16,0 ml	1,5 ml
Água deionizada	12,5 ml	6,5 ml
Solução SDS (3.6.7)	400 µl	50 µl
Solução PSA (3.6.8)	400 µl	50 µl
Temed	10 µl	5 µl

Antes da sua utilização, o tampão de corrida (3.6.9) foi diluído 1:4(V:V) e ajustado para 0,1% de SDS, acrescentando-se 10 ml de SDS 10% por litro. Foram colocados 50 μ l da mistura protéica (3.7.3) em cada canaleta do gel. As corridas foram desenvolvidas a 70 volts até o corante atingir o gel separador, e 150 volts até o fim do gel.

Para estimativa dos pesos moleculares, foi aplicado em cada gel uma amostra padrão de pesos moleculares (pharmacia) com polipeptídeos de: 94,0; 67,0; 43,0; 30,0; 20,1 e 14,4 kD.

Após a corrida os géis foram corados e fixados simultaneamente com a solução 3.6.12, durante 12 horas, e discorados com várias trocas da solução 3.6.13.

3.7.5. Comparações dos perfis eletroforéticos entre órgãos em um mesmo estágio

Na comparação de perfis entre órgãos, as amostras foram coletadas e preparadas no dia anterior à corrida eletroforética. Os géis foram organizados de forma a conterem cada um, o mesmo órgão de todos os genótipos.

3.7.6. Leitura densitométrica dos géis

A leitura densitométrica foi realizada em densitômetro Tecnow. A concentração de cada banda foi obtida considerando-se a altura dos picos.

3.7.7. Transformação de dados para avaliação dos perfis eletroforéticos comparados

Num único gel contendo os diferentes genótipos correspondentes a um único órgão e estágio, foi selecionado uma banda padrão de mesmo peso molecular, a qual apresentou a mesma intensidade em todos os genótipos do gel. Quando não foi possível a banda padrão apresentar o mesmo peso molecular, foram escolhidos outras bandas de diferentes pesos moleculares porém, com igual intensidade. Os valores de concentração das bandas, obtidos pela leitura densitométrica (3.7.6) foram divididos pelo valor de concentração da banda padrão referente a cada perfil eletroforético. Assim, obteve-se uma maior uniformização de concentração entre as amostras no gel, não havendo alteração das diferenças relativas entre as bandas de pesos moleculares correspondentes, nos diferentes genótipos.

3.7.8. Transformação de dados para avaliação das distâncias genéticas e caracterização de órgãos

A fim de minimizar as diferenças de concentração entre as amostras, a concentração de cada banda foi dividida pela média

$$\left\{ \bar{x} = \frac{\Sigma \text{concentração das bandas de uma amostra}}{\text{número de bandas}} \right\}$$

3.7.9. Caracterização dos diferentes órgãos x genótipos

Os vários órgãos foram caracterizados (para cada genótipo) pela avaliação e comparação dos perfis eletroforéticos obtidos no estágio em que se deu a ocorrência de todos os órgãos (87 dias pós-plantio). Para as comparações, os valores densitométricos foram transformados de acordo com o item 3.7.8.

3.7.10. Avaliação das alterações ocorridas durante o desenvolvimento do milho

As alterações no perfil eletroforético dos vários órgãos, durante o desenvolvimento da cultura, foram avaliadas pela leitura visual dos géis correspondentes. As alterações de concentração de bandas detectadas foram confirmadas na repetição.

3.7.11. Avaliação da herança dos perfis eletroforéticos

A avaliação consiste em comparar a ocorrência e respectivas concentrações de bandas do mesmo peso molecular, em cada órgão em um mesmo estágio de desenvolvimento de linhagens e seus híbridos. Quanto a sua ocorrência, foram classificadas com os seguintes tipos.

Perfis eletroforéticos comparados:

- (1) Quando a banda está presente em um só parental e não passa para o híbrido.
- (2) Quando a banda do híbrido apresenta intensidade intermediária em relação as bandas dos parentais.
- (3) Quando a banda apresentada pelo híbrido tem a mesma intensidade da banda mais concentrada de um dos parentais.
- (4) Quando a banda presente no híbrido é mais intensa que as bandas apresentadas pelos parentais.
- (5) Quando ocorre presença de banda no híbrido, não havendo em nenhum dos parentais.
- (6) Quando o híbrido não expressa a banda, sendo que esta está presente nos dois parentais.
- (7) Quando o híbrido apresenta uma banda de menor intensidade comparada com a banda apresentada pelos parentais.
- (8) Quando a banda do híbrido e das linhagens parentais apresentam intensidades semelhantes.
- (9) Quando o híbrido apresenta intensidade da banda semelhante a banda do parental de menor intensidade.
- (10) Outros tipos: As repetições não apresentam concórdância no tipo de efeito gênico.

Os tipos avaliados, podem ser melhor visualizado na Figura 2.

$A \times B = AB$

Figura 2 - Representação dos efeitos gênicos observados nas bandas de mesmo peso molecular, nos diferentes cruzamentos. A e B = representam os genótipo parentais; AB = representa o genótipo híbrido, referente ao cruzamento dos genótipos parentais.

3.7.12. Estágios para avaliação da herança

Cada órgão teve um estágio avaliado para comparação das bandas dos perfis eletroforéticos envolvidos nos diferentes cruzamentos (Tabela 3).

Tabela 3 - Órgãos e seus respectivos estágios, caracterizados por número de dias pós-plantio, para observação da herança dos perfis eletroforéticos envolvidos nos diferentes cruzamentos.

ÓRGÃO	ESTÁGIO AVALIADO	DIAS PÓS PLANTIO
4 ^o par de Folha	F-4	87 dias
Colmo	C-2	59 dias
Pendão	P-1	59 dias
Espiga	E-1	73 dias
Grãos	G-2	122 dias

3.7.13. Estágios para determinação da distância genética

Foi selecionado um estágio para cada órgão. A escolha do estágio baseou-se nos padrões eletroforéticos que apresentaram maior número de polipeptídeos passíveis de serem analisados.

A Tabela 4 apresenta os órgãos com o estágio escolhido para análise.

Tabela 4 - Órgãos e seus respectivos estágios avaliados, caracterizado por número de dias pós-plantio, para observação das distâncias entre genótipos.

ÓRGÃO	ESTÁGIO AVALIADO	DIAS PÓS PLANTIO
4 ^o par de Folha	F-4	87 dias
Colmo	C-2	59 dias
	C-3	73 dias
Pendão	P-1	59 dias
Espiga	E-1	73 dias
Grãos	G-2	122 dias

Foi avaliado 2 estágios de desenvolvimento no colmo (C-2 e C-3), com a finalidade de verificar se a mudança de estágio de desenvolvimento em um mesmo órgão, alteraria os valores de distância genética.

3.7.14. Análises estatísticas

Os dados transformados obtidos da análise densitométrica dos géis (3.7.8) são organizados para execução da análise multivariada, utilizando a técnica de avaliação da interdependência, segundo a classificação de KENDALL (1980). Essa técnica segundo o mesmo autor compreende, entre outras, duas análises utilizadas no trabalho, como análise de agrupamentos e componentes principais.

Na análise de agrupamentos utilizou-se para medida de similaridade, a distância euclidiana. Primeiramente, obteve-se os valores de estimativa da distância referente a euclidiana média, obtendo dessa forma, os acessos mínimos e máximos para cada órgão. Utilizou-se o método do vizinho mais próximo para construção do dendrograma e obtenção do agrupamento referente a esse método.

Os componentes principais foram obtidos para construção do gráfico com a distribuição dos genótipos. Foi utilizado para todos os objetivos citados acima, o programa computacional GENES.

4. RESULTADOS

Para melhor apreciação os resultados foram subdivididos em quatro itens:

- a) caracterização dos órgãos, nos diferentes genótipos;
- b) alterações ocorridas nos perfis eletroforéticos de cada órgão, durante o desenvolvimento da planta;
- c) herança do perfil eletroforético, nos vários órgãos, e
- d) distância genética entre genótipos.

4.1. Caracterização de Órgãos, nos Diferentes Genótipos

Com o objetivo de caracterizar os diferentes órgãos do milho, através do perfil eletroforético, foi avaliado o estágio onde ocorreu o aparecimento de todos os órgãos o qual se deu 87 dias pós-plantio, ou 14 dias pós-florescimento. Neste estágio se inicia o enchimento de grãos, e a correspondente secagem do pendão.

Nos órgãos analisados (folha, colmo, pendão, espiga e grãos) foram observados diferentes números de bandas, a partir de igual concentração protéica das amostras.

Os perfis eletroforéticos de cada órgão referente ao genótipo estão reproduzidos na Figura 3.

Figura 3 - Perfis eletroforéticos dos diferentes órgãos referentes ao genótipo HS2, aos 87 dias pós-plantio. 4F = 4^o par de folhas, C = colmo, P = Pendão, E = espiga e G = grãos - PM (kD) = peso molecular em kilodaltons.

As variações quanto ao número e intensidade das bandas podem caracterizar cada órgão no milho, independente do genótipo, pois as variações entre genótipos no mesmo órgão são menores que as variações entre órgãos do mesmo genótipo. A folha apresentou 28 bandas, dentre as

quais 21,43% não estiveram presentes em todos os genótipos. O colmo, espiga e grãos, apresentaram números aproximados de bandas, 18, 20 e 19, respectivamente, e o valor percentual relativo ao número de bandas que não estavam presentes em todos os genótipos também foram aproximados. Esse valor para o colmo foi de 33,33%, a espiga apresentou o valor de 35,0%, e finalmente o grão com 31,58%. O pendão, neste estágio, apresentou 22 bandas e 31,82% delas não estavam presentes em todos os genótipos. A Tabela 5 apresenta as bandas observadas em cada órgão caracterizadas por peso molecular aparente (PMA). As bandas assinaladas não estiveram presentes em todos os genótipos. As bandas observadas nos cinco órgãos, dentro de cada genótipo estão representadas no Apêndice 1 (Tabelas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7), com seus respectivos pesos moleculares aparentes (PMA) e V.C. (valor de concentração das bandas). Os V.C. são obtidos segundo a metodologia de transformação de dados citada no item 3.7.8.

Tabela 5 - Bandas referentes a cada órgão no milho, caracterizadas por PMA (peso molecular aparente) (as bandas assinaladas "*" não estão presentes em todos os genótipos).

FOLHA PMA (kD)	COLMO PMA (kD)	PENDÃO PMA (kD)	ESPIGA PMA (kD)	GRÃOS PMA (kD)
150,0	120,0	94,0 *	110,0	90,0 *
120,0	100,0	86,0 *	98,0	82,0 *
96,0	80,0	76,0	84,0	75,0
84,0	73,0	63,0	76,0	64,0
75,0	66,0	53,0	67,0 *	62,0
68,0 *	61,0	49,0 *	61,0	56,0
67,0 *	53,0	45,0	57,0	50,0 *
61,0	47,0	42,0	53,0 *	48,0
57,0	45,0	40,0 *	46,0	45,0
53,0 *	43,0 *	38,0 *	43,0 *	42,0 *
45,0	40,0 *	35,0	41,0	38,0
44,0	39,0 *	33,0	39,0	36,0 *
43,0 *	37,0	29,0	36,0	32,0
41,0	34,0 *	28,0 *	35,0	29,0
40,0	31,0	27,0	33,0 *	27,0 *
36,0	30,0 *	26,0	31,0	23,0
35,0	28,0 *	24,0	29,0	21,0
33,0 *	26,0	20,0 *	27,0 *	20,0
32,0		19,0	25,0 *	19,0
30,0		18,0	22,0 *	
28,0		17,0		
25,0		16,0		
24,0				
20,0				
19,0				
17,0				
16,0 *				
15,0				

4.2. Alterações Ocorridas nos Perfis Eletroforéticos de Cada Órgão, Durante o Desenvolvimento da Planta

A análise das alterações nos perfis eletroforéticos de cada órgão num único gel não foi possível de ser feita, pois ocorreu uma degradação preferencial de polipeptídeos nas condições de conservação a -20°C , ocasionando uma má resolução das bandas no gel, e alterações drásticas quando comparado com o padrão eletroforético feito no dia posterior a extração. Desta forma, o seguimento dos polipeptídeos ao longo dos estágios da planta, foram feitos pela observação de géis separados (correspondente à cada estágio), o que dificultou a observação e muitos dados não puderam ser relatados, por falta de exatidão.

4.2.1. 4^o par de folhas

Pela metodologia utilizada de separação de polipeptídeos, não foi possível constatar bandas estágios-específicas no 4^o par de folhas, porém alterações a nível de concentração puderam ser identificadas nos quatro estágios de desenvolvimento analisados, F1, F2, F3, e F4 (28, 45, 73 e 87 dias pós-plantio, respectivamente).

Alterações nas bandas de PMA entre 36,0 kD e 30 kD, as quais aumentam a concentração a partir do estágio F2 (45 dias pós-plantio), mantendo-se alta até o estágio F4, com exceção do genótipo F1 no qual as bandas apresentam alta

concentração nos estágios F2 e F3 (45 dias e 73 dias pós-plantio, respectivamente), ocorrendo uma redução de concentração no estágio F4 (87 dias pós-plantio).

Os polipeptídeos de PMA 53, 57 e 61 kD, apresentam seu pico de concentração no estágio F4 (87 dias pós-plantio), havendo diferenças nas concentrações relativas das 3 bandas, entre os genótipos, exceto o genótipo F1, o qual apresenta o pico de concentração no estágio F3 (73 dias pós-plantio); e o genótipo F2 que parece não apresentar a banda de 53 kD no estágio F4. Um aumento de concentração das bandas de PMA 43,0 e 45,0 kD, é observado no estágio F3 mantendo-se alta até F4, outra vez o genótipo F1 apresenta diferença no seu comportamento, demonstrando um aumento de concentração das bandas no estágio F3, reduzindo drasticamente a concentração, principalmente da banda 43 kD no estágio F4.

A banda de PMA 28 kD, apresenta redução na sua concentração no estágio F3, nos genótipos F1, M1, HS1, HS2 e M2. O genótipo HD, mantém sua concentração relativamente alta em todos os estágios e o genótipo F2 apresenta uma baixa concentração no estágio F1, aumentando nos estágios posteriores.

No estágio F4 ocorre, em alguns genótipos, um pico de concentração da banda de 17 kD, sendo mais pronunciado nos genótipos M1 e HS1, e menos nos genótipos HD e HS2.

4.2.2. Colmo

Foram observados 4 estágios de desenvolvimento C1, C2, C3 e C4 (45, 59, 73 e 87 dias pós-plantio, respectivamente). Como no 4^o par de folhas, não se detectou a presença de bandas estágio-específicas, porém alterações nas concentrações.

A banda de PMA 100 kD apresenta seu pico de concentração no estágio C3 (florescimento - 73 dias pós-plantio), e no estágio posterior C4 (87 dias pós-plantio) ocorre uma redução brusca de concentração (início da fase de enchimento de grãos). No genótipo M2 esse pico de concentração se dá no estágio C2 (59 dias por plantio). As bandas de PMA 80 kD e 73 kD, apresentam um aumento de concentração até o estágio C3 (73 dias pós-plantio) e diminuição no estágio C4 (87 dias pós-plantio). A redução das bandas é menos drástica nos genótipos F1, HS1, HD e M2.

Uma redução de concentração nos estágios C3 e C4 (73 e 87 dias pós-plantio), ocorre nas bandas de PMA 40,0 e 39,0 kD, com exceção dos genótipos M1, o qual apresenta essa redução desde o estágio C2 (59 dias pós-plantio) e M2, o qual só apresenta redução de concentração da banda no estágio C-4 (87 dias pós-plantio). As bandas de PMA 28, 26 e 19 kD, apresenta redução de concentração, a partir do estágio C3; os genótipos HS1 e HD, mantém a concentração alta da banda 26 kD no estágio C3, ocorrendo redução somente no estágio C4. De modo genérico, ocorre uma degradação prefe-

rencial das bandas de alto PMA (entre 60-100kD), no estágio C4 (87 dias pós-plantio - início de enchimento de grãos), a qual se apresenta de forma mais drástica nos genótipos M1, HS2 e F2, quando comparado com os outros genótipos F1, HS1, HD e M2 (Figura 4).

Figura 4 - Comparação da leitura densitométrica nos vários genótipos, das bandas de alto peso molecular, em colmos com 87 dias pós-plantio ou 15 dias pós-florescimento.

4.2.3. Pendão

O pendão não apresenta banda estágio-específica, a qual esteja presente em todos os genótipos, porém ocorre grandes mudanças na concentração das bandas, durante o envelhecimento do órgão. A banda de PMA 35 kD, a qual apresenta alta concentração, é muito larga e pouco definida no estágio P1 (59 dias pós-plantio) reduz a concentração nos estágios posteriores P2 e P3 (73 e 87 dias, respectivamente). Essa banda está presente somente nos genótipos F1, HS1 e HD. No estágio P3 (87 dias pós-plantio), essa aparece com melhor definição nos três genótipos citados. A banda de PMA 24 kD apresenta seu pico de concentração no estágio P3, ocorrendo de forma mais atenuamente no genótipo M2. Outras alterações ocorrem com as bandas de baixo peso molecular 18,0 kD e 19,0 kD, as quais apresentam alta concentração no estágio P1 (59 dias pós-plantio) e uma redução nos estágios posteriores P2 e P3 (73 e 87 dias pós-plantio, respectivamente).

4.2.4. Espiga

Nos perfis eletroforéticos apresentados pela espiga nos 2 estágios observados, E1 e E2 (73 e 87 dias pós-plantio, respectivamente), não se detectou a presença de bandas estágio-específicas. Alterações a nível de concentração foram identificadas. A banda de PMA 110,0 kD, a qual

apresenta alta concentração nos genótipos M1 e F2, diminui a concentração no estágio posterior E2. Um aumento de concentração é observado na banda de PMA 57 kD, nos genótipos HS1, HD, HS2 e M2, a mesma banda sofre redução de concentração nos genótipos F1 e F2. O genótipo M1 praticamente não altera a concentração dessa banda. A banda de PMA 53 kD sofre aumento de concentração no estágio E2 nos genótipos F1, HS1, HD, HS2 e M2 e redução nos genótipos M1 e F2. As bandas de PMA menores que 25,0 kD, as quais aparecem com boa definição no estágio E1, tendem a desaparecer no estágio posterior E2 com exceção do genótipo F2, o qual apresenta uma banda de PMA 22,0 kD de média concentração.

4.2.5. Grãos

No grão, dois estágios de desenvolvimento foram analisados, G1 e G2 (87 e 122 dias pós-plantio, respectivamente). Foi observado, neste órgão, um aumento de concentração, no estágio G2, da maioria das bandas (Figura 5). Essa tendência ocorre em todos os genótipos analisados.

Figura 5 - Perfis eletroforéticos do grão, nos dois estágios analisados, G1 e G2 (87 e 122 dias pós-plantio, respectivamente), referente ao genótipo HS2.

Pela metodologia utilizada, observou-se a presença de uma banda de PMA 15 kD, a qual parece ser estágio-específica, isto é, só aparece no estágio G2 (Figura 5). Essa ocorrência se manifesta em todos os genótipos. Outras alterações a nível de concentração ocorre nas bandas de PMA de 17, 28, 35 e 94 kD, as quais sofrem um aumento pronunciado no estágio G2. A banda de PMA de 38 kD, apresenta um aumento de concentração nos genótipos F2 e M2, no estágio G2. Nos demais genótipos, esta banda já se apresenta alta no estágio G1 e se mantém alta no estágio posterior G2. A banda de PMA 32 kD apresenta concentrações semelhantes nos dois estágios G1 e G2 com exceção do genótipo M2, no qual ocorre uma redução de sua concentração no último estágio.

Além destas, várias alterações específicas de cada genótipo foram observadas nos diferentes estágios dentro do mesmo órgão, tanto ao nível de concentração como de ausência e presença de bandas.

4.3. Herança dos Perfis Eletroforéticos, nos Vários Órgãos

Em cada órgão foi observado um único estágio de desenvolvimento, e nesse estágio verificou-se o tipo de efeito gênico de cada banda, através da avaliação do perfil eletroforético apresentado pelo híbrido comparado com os parentais. Seguiu-se o critério de avaliação descrito no item (3.7.11).

Foi, feita avaliação das bandas nos perfis eletroforéticos de todos os órgãos nos três cruzamentos, de forma independente.

Cruzamento I: F1 x M1

↓

HS1

Cruzamento II: F2 x M2

↓

HS2

Cruzamento III: HS1 x HS2

↓

HD

No pendão, o fato do genótipo F1, o qual participa da formação do genótipo HS1 como fêmea, não ser macho estéril como deveria, ocasionou problemas na avaliação da herança genética. Esse fato se deu pela falta de sementes do genótipo F1 - macho estéril ocasionada por problemas técnicos. Dessa forma, plantou-se o genótipo F1 citoplasma normal (macho fértil) e o genótipo HS1 macho estéril, no qual deve estar comprometida a síntese de vários polipeptídeos e portanto, a comparação do perfil eletroforético dos dois genótipos F1 e HS1, nesse órgão.

No cruzamento I (F1 x M1 = HS1) pode ser notada a presença de uma banda de PMA = 35 kD, a qual está presente na linhagem F1, e nos híbridos HS1 e HD, sendo que neste último apresenta em menor concentração (Figura 6). A ocorrência de segregação genética no híbrido duplo, pode explicar a baixa concentração no genótipo HD. A presença desta banda na linhagem F1 e no híbrido HS1, nos faz concluir, que a banda de PMA = 35 kD não está envolvida no mecanismo de macho esterelidade.

Figura 6 - Perfis eletroforéticos correspondentes ao 1º estágio do pendão (P1). Cruzamento I (F1xM1) = HS1, Cruzamento II (F2xM2) = HS2 e Cruzamento III (HS1xHS2) = HD.

Os efeitos gênicos verificados em cada cruzamento referentes a todos os órgãos estão resumidas na Tabela 6, esta apresenta os vários órgãos com seu número total de bandas, e o número de bandas referentes a cada tipo de efeito gênico com seu correspondente valor percentual. As Tabelas individuais de cada órgão exibindo os efeitos gênicos de cada banda caracterizada por PMA (kD) estão apresentados no Apêndice 2 (Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5).

Tabela 8 - Órgãos e seus respectivos valores percentuais, referentes aos tipos de efeito gênico classificados de acordo com o item 3.7.11, avaliados em cada cruzamento: E.G. = tipo de efeito gênico - Cruzamento I: (F1xM1); Cruzamento II: (F2xM2) e Cruzamento III: (HS1xHS2) - Número total de bandas = Número total de bandas apresentadas por cada órgão no estágio correspondente e Número Bandas = Número de bandas que apresentam o tipo de efeito gênico descrito.

ÓRGÃOS		4 ^o PAR DE FOLHA		COLMO		FENDÃO		ESPIGA		GRÃO	
N. T. DE BANDAS*		28		33		31		34		24	
E.G.	CRUZ.	NÚMERO BANDAS	VALOR %	NÚMERO BANDAS	VALOR %	NÚMERO BANDAS	VALOR %	NÚMERO BANDAS	VALOR %	NÚMERO BANDAS	VALOR %
(1)	I	1	3,57	1	3,03	5	16,13	3	8,82	4	16,67
	II	1	3,57	1	3,03	1	3,23	4	11,76	2	8,33
	III	1	3,57	1	3,03	5	16,13	1	2,94	0	0,0
(2)	I	3	10,71	1	3,03	0	0,0	2	5,88	4	16,67
	II	1	3,57	3	9,09	0	0,0	6	17,65	1	4,17
	III	2	7,14	0	0,0	5	16,13	0	0,0	3	12,50
(3)	I	11	39,29	14	42,42	4	12,90	4	11,76	2	8,33
	II	9	32,14	5	15,15	2	6,45	1	2,94	3	12,50
	III	0	0,0	3	9,09	7	22,58	1	2,94	3	12,50
(4)	I	3	10,71	1	3,03	1	3,23	9	26,47	2	8,33
	II	12	42,86	1	3,03	3	9,67	0	0,0	5	20,83
	III	0	0,0	0	0,0	0	0,0	8	23,53	3	12,50
(5)	I	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	II	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	4,17
	III	0	0,0	1	3,03	0	0,0	0	0,0	0	0,0
(6)	I	0	0,0	0	0,0	2	6,45	1	2,94	0	0,0
	II	0	0,0	0	0,0	0	0,00	0	0,0	0	0,0
	III	0	0,0	2	6,06	0	0,0	0	0,0	0	0,0
(7)	I	2	7,14	0	0,0	14	45,16	3	8,82	6	25,0
	II	0	0,0	1	3,03	1	3,23	1	2,94	1	4,17
	III	0	0,0	8	24,24	0	0,0	1	2,94	2	8,33
(8)	I	4	14,29	11	33,33	0	0,0	3	8,82	4	16,67
	II	2	7,14	16	48,48	7	22,58	3	8,82	4	16,67
	III	3	10,71	2	6,06	3	9,68	9	26,47	6	25,00
(9)	I	0	0,0	1	3,03	1	3,23	0	0,0	0	0,00
	II	0	0,0	1	3,03	2	6,45	5	14,71	3	12,50
	III	4	14,29	1	3,03	0	0,0	0	0,0	4	16,67
(10)	I	4	14,29	4	12,12	4	12,90	9	26,47	2	8,33
	II	3	10,71	5	15,15	15	48,39	14	41,18	4	16,67
	III	18	64,29	15	45,45	11	35,48	14	41,18	3	12,50

* = NÚMERO TOTAL DE BANDAS.

A Tabela 7 sumariza os resultados referentes aos efeitos (3) e (4), os quais representam as bandas com concentração igual ou maior que a banda mais concentrada de seus parentais.

Tabela 7 - Somatória dos valores percentuais referentes aos efeitos gênicos (3) e (4).

ÓRGÃOS	C R U Z A M E N T O S		
	I(F1xM1)	II(F2xM2)	III(HS1xHS2)
4 ^o par de folha	50,00	75,00	0,00
Colmo	45,45	18,18	9,09
Pendão	16,13	16,12	22,58
Espiga	38,23	2,94	26,47
Grão	16,66	33,33	25,00

Pode-se observar, na Tabela 7, que as folhas apresentam o mais alto valor percentual da somatória referente aos efeitos (3) e (4), nos cruzamentos I e II, que participam da formação dos híbridos simples HS1 e HS2, e adicionalmente nenhum valor percentual para o cruzamento III, que se refere ao híbrido duplo HD. O colmo apresenta menor valor percentual no híbrido duplo HD e valores maiores para os híbridos simples HS1 e HS2. O grão, pendão e espiga apresentam valores diferentes nos cruzamentos avaliados, não se observando nenhuma tendência quanto ao acúmulo de efeitos (3) e (4) nos cruzamentos simples, como se observa nas folhas e colmo. Os perfis eletroforéticos dos 2 órgãos estão representados nas Figuras 7 e 8.

Figura 7 - Perfis eletroforéticos correspondente ao 4^o estágio do 4^o para de folhas (F4) - Cruzamento I (F1xM1) = HS1; Cruzamento II (F2xM2) = HS2 e Cruzamento III (HS1xHS2) = HD.

Figura 8 - Perfis eletroforéticos correspondente ao 2^o estágio do colmo (C-2) - Cruzamento I (F1xM1) = HS1; Cruzamento II (F2xM2) = HS2 e Cruzamento III (HS1xHS2) = HD.

A Tabela 6, apresenta os valores percentuais em todos os cruzamentos e órgãos, dos efeitos gênicos (1), (7) e (9), onde o híbrido apresenta banda protéica menos concentrada ou ausência da banda, e a Tabela 8 apresenta o valor da diferença percentual entre valores que correspondem às bandas de maior concentração no híbrido (efeitos 3 e 4), e valores referentes à bandas de menor concentração no híbrido (efeitos 1, 7 e 9).

Tabela 8 - Diferença das somatórias percentuais dos valores referentes aos efeitos (3) e (4) e efeitos (1), (7) e (9).

(* = Cruzamento envolvido com macho esterelidade).

ÓRGÃOS	C R U Z A M E N T O S		
	I(L1xL2)	II(L6xL7)	III(H3xH5)
4 ^o par de folha	+39,29	+71,43	-17,86
Colmo	+39,39	+9,09	-21,21
Pendão	-48,39*	+3,21	-3,23
Espiga	+21,59	-36,47	+14,71
Grão	-25,01	+8,33	0,00

Pela observação dos dados da Tabela 8, verificou-se que o 4^o par de folhas e o colmo, apresentam valores positivos nos cruzamentos I e II os quais correspondem ao maior valor percentual dos efeitos gênicos (3) e (4); e no cruzamento III apresenta valores negativos os quais se referem ao oposto, isto é, ao maior valor percentual dos efeitos gênicos (1), (7) e (9). O grão exibe um valor

negativo muito pronunciado no cruzamento II. Embora o pendão e espiga estejam representados nas tabelas, eles não devem ser considerados por vários motivos como: a ocorrência de níveis de maturação diferentes entre genótipos, e além disso, o problema da macho esterelidade do híbrido HS1, no qual possivelmente está comprometida a síntese de vários polipeptídeos no pendão, prejudicando a avaliação do cruzamento I ($F1 \times M1 = HS1$).

Outra observação da Tabela 6, é que nas folhas e no colmo, o efeito gênico 10, o qual se refere a não concordância do tipo de efeito na repetição, apresenta maior valor percentual no cruzamento III ($HS1 \times HS2$) = HD, onde ocorre segregação genética.

4.4. Distância Genética Entre os Genótipos

Para obtenção das distâncias genéticas nos diferentes órgãos foi utilizado "distância euclidiana" como descrito no item (3.7.14). Em cada órgão foi selecionado um estágio, com exceção do colmo, no qual fez-se análise em 2 estágios de desenvolvimento. Os resultados das estimativas das distâncias, referentes a euclidiana média, estão representados na Tabela 9.

Tabela 9 - Distâncias entre genótipos, obtidas através de distância euclidiana média. F-4 - folha no estágio F-4; C-2 - colmo no estágio C2; C-3 - colmo no estágio C3; P-1 - pendão no estágio P1; E-1 - espiga no estágio E1 e G-2 - grão no estágio G2.

GENÓTIPOS	D I S T A N C I A S					
	F-4	C-2	C-3	P-1	E-1	G-2
F1 e M1	1,391	1,470	1,299	1,332	1,627	1,543
* F1 e HS1	1,882	1,367	1,688	1,769	1,527	1,419
F1 e HD	1,781	1,392	1,479	1,749	1,419	1,779
F1 e HS2	1,575	1,328	1,257	1,721	1,176	1,915
F1 e F2	2,124	1,311	0,987	1,926	1,081	2,112
F1 e M2	1,719	1,701	1,709	1,922	1,538	1,486
* M1 e HS1	0,831	1,618	1,351	1,370	2,165	1,069
M1 e HD	0,982	1,624	1,586	1,131	2,104	1,008
M1 e HS2	0,906	1,677	1,439	1,377	1,888	1,178
M1 e F2	1,660	1,584	1,332	1,506	1,625	1,503
M1 e M2	1,361	1,767	1,891	1,520	2,170	1,567
* HS1 e HD	0,813	1,186	0,983	0,963	0,733	0,951
HS1 e HS2	1,081	1,220	1,560	1,386	0,843	1,256
HS1 e F2	1,548	1,309	1,339	1,611	1,477	1,531
HS1 e M2	1,422	1,601	1,609	1,483	1,012	0,957
* HD e HS2	0,857	1,056	1,094	0,972	0,478	0,764
HD e F2	1,296	1,136	1,254	1,486	1,182	1,165
HD e M2	1,455	1,313	1,288	1,102	0,728	1,492
* HS2 e F2	1,331	1,055	1,076	1,042	1,020	1,049
* HS2 e M2	1,056	1,354	1,565	0,642	0,829	1,603
F2 e M2	1,628	1,309	1,490	0,728	1,311	1,504

Os valores em destaque na Tabela 9, representam os genótipos envolvidos nos diferentes cruzamentos. No cruzamento I (F1xM1 = HS1), o híbrido HS1 apresenta maior

similaridade com a fêmea F1 nos diferentes órgãos: colmo (estágio C2) e espiga; e com macho M1 na folha, colmo (estágio C3), pendão e grão. No cruzamento II ($F2 \times M2 = HS2$), o híbrido HS2 apresenta maior similaridade com a fêmea F2 nos órgãos: colmo (estágio C2 e C3) e grão; e com o macho M2 nos órgãos: folhas, pendão e espiga e finalmente no cruzamento III, o qual se trata do híbrido duplo ($HS1 \times HS2 = HD$), apresenta maior similaridade com a fêmea HS1, o colmo (estágio C3); e com o macho HS2, o colmo (estágio C2), espiga e grão. Na folha e no pendão, praticamente é a mesma contribuição, apresentando valores muito próximos.

Os acessos mínimos e máximos nos diferentes órgãos, os quais se referem às menores distâncias e maiores distâncias entre os genótipos, respectivamente, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores mínimos e máximos de distância entre genótipos, em cada órgão analisado.

ÓRGÃO	MÍNIMO	ACESSOS	MÁXIMO	ACESSOS
Folha	0,813	HS1 e HD	2,124	F1 e F2
Colmo C-2	1,055	HS2 e F2	1,767	M1 e M2
Colmo C-3	0,983	HS1 e HD	1,891	M1 e M2
Pendão	0,642	HS2 e M2	1,926	F1 e F2
Espiga	0,478	HD e HS2	2,170	M1 e M2
Grão	0,764	HD e HS2	2,112	F1 e F2

Pode-se observar na Tabela 10, que os acessos mínimos sempre se referem a um genótipo parental (híbrido ou linhagem) e seu genótipo descendente, e os acessos máximos se referem sempre a duas linhagens independentes.

Os resultados obtidos através da análise de agrupamento pelo método do vizinho mais próximo estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 - Agrupamentos referentes a todos os órgãos apresentado pelo método do Vizinho mais próximo.

AGRUPAMENTO	VIZINHO MAIS PRÓXIMO
ÓRGÃOS	
4 ^o par folhas	(1) HS1, HD, M1, HS2 (2) M2 (3) F2 (4) F1
Colmo (C-2)	(1) HS2, F2, HD (2) HS1 (3) F1 (4) M2 (5) M1
Colmo (C-3)	(1) HS1, HD (2) F1, F2 (3) HS2 (4) M2 (5) M1
Pendão	(1) HS2, M2, F2 (2) HD, HS1 (3) F1 (4) M1
Espiga	(1) HD, HS2 (2) M2, HS1 (3) F2 (4) F1 (5) M1
Grão	(1) HD, HS2 (2) HS1, M2 (3) M1, F2 (4) F1

Com base no cálculo das componentes principais construiu-se os gráficos com as distribuições de genótipos em três dimensões, correspondentes a cada órgão. Nesses gráficos estão demonstrados os agrupamentos obtidos pelo método do VIZINHO MAIS PRÓXIMO.

A Figura 9, representa os gráficos referentes a todos os órgãos avaliados.

Figura 9 - Gráficos obtidos pelos cálculos de componentes principais de todos os órgãos com seus estágios correspondentes, apresentando o agrupamento referente ao dendrograma baseado no método do Vizinho mais próximo.

A aplicação dos dados na análise de componentes principais, em todos os órgãos, revelou que no mínimo 5 componentes são necessários para sumarizar 98% do total da variabilidade do sistema.

Os dendrogramas referentes ao método vizinho mais próximo de todos os órgãos, estão representados no Apêndice 3 - Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

5. DISCUSSÃO

A discussão obedecerá a mesma sequência de apresentação dos resultados, sendo portanto dividida em quatro itens: caracterização dos órgãos nos diferentes genótipos; alterações ocorridas nos perfis eletroforéticos de cada órgão durante o desenvolvimento da planta; herança do perfil eletroforético nos vários órgãos; e distância genética entre os genótipos.

5.1. Caracterização dos Órgãos nos Diferentes Genótipos

Devido a propriedade de demonstrar alterações qualitativas (ausência/presença) e quantitativas (variações na intensidade), a técnica de eletroforese SDS-PAGE, tem sido utilizada para caracterizar diferentes cultivares (GUPTA & ROBBELEN, 1986; GRATAPAGLIA & NASSAR, 1987).

Nesse trabalho foi possível caracterizar os diferentes órgãos do milho e avaliar diferenças entre os genótipos, relativas a um órgão num mesmo estágio de desenvolvimento.

Foi possível caracterizar cada órgão para os diferentes genótipos detectando-se diferenças qualitativas e

quantitativas. Entretanto, verificou-se que as divergências entre órgãos do mesmo genótipo mostraram-se maiores que as diferenças entre genótipos para um mesmo órgão, demonstrando assim, uma tendência clara na expressão de grupos de proteínas características de cada órgão, independente dos genótipos avaliados.

Embora o maior percentual de bandas estejam presentes em cada órgão nos diferentes genótipos, verificou-se que 21,43% das bandas da folha, 31,58% e 31,82% das bandas do grão e pendão, respectivamente, 33,33% do colmo e 35,00% das bandas da espiga, não estavam presentes em todos os genótipos. Essa observação não é representativa da variação total dos órgãos, pelo fato de não ser computado as alterações quantitativas (intensidade das bandas), a qual segundo KLOSE (1982) e DAMERVAL *et alii* (1987), melhor representam a variabilidade genética.

A separação de igual quantidade de proteínas solúveis nos diferentes órgãos do milho revelou considerável diferença entre o número total de bandas passíveis de serem observadas (28 bandas na folha, 18 no colmo, 22 no pendão, 20 na espiga e 19 no grão), indiscutivelmente muitas bandas de baixa concentração foram pouco definidas e outras não foram reveladas. KLOSE (1982) aumentou a quantidade de proteínas solúveis em amostras protéicas de vários órgãos de camundongos e verificou um aumento no número total de bandas no gel de eletroforese duas dimensões, porém a diferença relativa no número total entre órgãos se mativeram

praticamente inalteradas. LEONARDI *et alii* (1988) também observaram diferenças no número de bandas em 3 órgãos de plântulas de milho. Essa diferença no número total de bandas entre órgãos, aparentemente, é em grande parte devido as características inerentes ao órgão de conter diferentes números de polipeptídeos expressos, entretanto, alguns problemas da técnica podem potencializar essas diferenças, como por exemplo, a diminuição da resolução na parte inferior do gel, prejudicando a detecção de bandas de baixo peso molecular, e também o fato que, quanto mais velho o órgão, menos definidas se tornam as bandas, principalmente no caso do colmo e espiga. Essa observação não apresenta nenhum embasamento bioquímico, porém o fato foi observado na realização de diversos experimentos independentes.

O número de bandas detectadas em gel uma dimensão (1D), é relativamente baixo comparado com o número de bandas detectado em eletroforese duas dimensões, como foi observado por KLOSE (1982); ZIVY *et alii* (1984); LEONARDI *et alii* (1987) e LEONARDI *et alii* (1988). Esse fato interfere no valor percentual de variantes qualitativos, pois a presença de vários polipeptídeos distintos de mesmo peso molecular aparente, observados em eletroforese uma dimensão (1D), tanto pode impedir a detecção de polipeptídeos que não são expressos em determinados genótipos, como pode diminuir o número de polipeptídeos que são expressos em todos os genótipos, interferindo no número total de bandas.

Estudos para avaliar se proteínas isoenzimáticas eram passíveis de serem detectadas em gel de proteína total revelados com coomassie blue, foram feitos em eletroforese duas dimensões, sob condições não desnaturantes (KLOSE, 1982). Paralelamente foram revelados para vários isoenzimas. Nesse estudo observou-se a não detecção das bandas isoenzimáticas em gel de revelação para proteína total, devido às enzimas exibirem muito baixa concentração (KLOSE, 1982). Dessa forma, as bandas passíveis de serem detectadas na revelação com coomassie blue, apresentam concentrações relativamente altas, sendo estas em grande parte, possivelmente representadas por proteínas estruturais (KLOSE, 1982).

Assim pode-se sugerir que esta gama de proteínas de alta concentração apresentam similaridades e divergências suficientes para caracterizarem os diferentes órgãos num mesmo genótipo e ao mesmo tempo distinguirem os genótipos entre si, pela comparação em um dado órgão.

5.2. Alterações Ocorridas nos Perfis Eletroforéticos de Cada Órgão, Durante o Desenvolvimento da Planta

A regulação da expressão gênica é uma das mais importantes questões a serem esclarecidas nos estudos de desenvolvimento. Uma forma muito utilizada para elucidar estes mecanismos de regulação genética é estudar a variação da atividade ou quantidade de proteínas (des FRANCS & THIEL-

LEMENT, 1985). O uso de eletroforese de proteínas desnaturadas é um recurso apropriado para descrever as variações regulatórias de numerosos produtos gênicos durante os diferentes estágios de desenvolvimento (di FONZO *et alii*, 1977; ZIVY *et alii*, 1984; BOOTHE & WALDEN, 1989; REMBUR & NOUGARÉDE, 1989).

Os resultados apresentados, permitem observar que as alterações ocorrem em maior parte a nível quantitativo (mudança na intensidade) que a nível qualitativo (ausência/presença). O mesmo foi verificado por ZIVY *et alii* (1984) estudando diversos órgãos de camundongo, e por BOOTHE & WALDEN (1989) estudando desenvolvimento de embrião de milho.

Como a técnica SDS-PAGE separa os polipeptídeos somente por peso molecular, pode haver durante a separação, a ocorrência de bandas que contêm polipeptídeos distintos de pesos moleculares iguais ou muito semelhantes, os quais são considerados como única banda. Essa ocorrência deve ter sido um dos maiores problemas para a identificação de polipeptídeos estágios-específicos. Dessa forma, no grão foi identificado com clareza uma banda de PMA = 15,0 kD, específica do estágio G2 (122 dias pós-plantio), sendo o único órgão onde a ocorrência é distinta em todos os genótipos. Essa banda não está presente no estágio anterior, ou sua concentração é tão baixa a ponto de não poder ser detectada pelos métodos utilizados (análise visual e densitométrica). Os outros órgãos apresentam diversas bandas

possivelmente estágio-específicas, porém pela comparação em eletroforese uma dimensão (1D) não se pode ter completa segurança. Em eletroforese de duas dimensões (2D), onde o número de bandas detectado é muito maior, e pelo fato de separar por duas propriedades, como por exemplo, carga elétrica e peso molecular, não apresenta dúvidas quanto a identidade do polipeptídeo. ZIVY *et alii* (1984), REMBUR & NOUGARÉDE (1989) puderam detectar a presença de polipeptídeos que se expressam somente em um estágio, utilizando esse tipo de eletroforese.

Nas folhas, foi observado uma alteração particular quanto a intensidade das bandas do genótipo F1 durante o desenvolvimento, quando comparado com os outros genótipos. Houve uma drástica redução na maioria de suas bandas (30,0; 35,0; 43,0; 45,0; 53,0; 57,0 e 61,0 kD) no estágio F4 (87 dias pós-plantio ou 14 dias pós-polinização) que corresponde ao início de enchimento do grão. Entre as bandas com menor concentração nesse genótipo, deve estar incluída a maior subunidade da enzima fotossintética, ribulose 1,5 difosfato carboxilase, que apresenta PMA = 45,0 kD (ZIVY *et alii*, 1984; MOSES & CHUA, 1988). Dessa forma, a menor concentração da banda deve comprometer a atividade fotossintética do genótipo, nesse estágio. Essa forma de comportamento diferencial das bandas protéicas no genótipo F1, parece estar associado a um envelhecimento precoce do tecido foliar.

O colmo apresenta algumas bandas (73,0; 80,0 e 100 kD) que aumentam sua concentração do estágio C1 até o

estágio C3 (45 e 73 dias pós-plantio, respectivamente). Essas bandas apresentam uma redução significativa em suas concentrações no estágio C4 (87 dias pós-plantio), o qual corresponde a fase de início de enchimento do grão. Os genótipos F1, HS1, HD, e M2 apresentam uma redução menos drástica do que os genótipos M1, HS2 e F2. Como o colmo parece ter um papel de órgão reserva temporário ou depósito ativo de nutrientes (TOLLENAAR, 1977), essa hidrólise preferencial de polipeptídeos de alto peso molecular (100,0; 80,0 e 73,0 kD) poderia estar de certa forma comprometida com a transferência de aminoácidos para o grão, na fase de enchimento. Verifica-se que essa redução é mais drástica em genótipos com alta incidência de acamamento. Por outro lado os genótipos que demonstraram uma menor redução na concentração das bandas citadas (F1, HS1, HD e M2), no estágio de início de enchimento de grãos, são aqueles que exibem uma excelente qualidade de colmo.

No pendão e espiga as alterações de concentração ocorridas nas diferentes bandas não apresentam um comportamento constante em todos os genótipos, como foi observado em outros órgãos (folha, colmo e grão). Isso pode ser uma consequência do fato destes órgãos exibirem maiores divergências nos níveis de maturação num mesmo estágio de desenvolvimento. Essa divergência foi observada até mesmo entre plantas de um mesmo genótipo, nesses órgãos. Além disso, a espiga apresentou a maior variação (1,692) em relação aos outros órgãos do milho (1,311 - folha; 0,712 -

colmo C2; 0,908 - colmo C3; 1,284 - pendão e 1,348 - grãos). Dessa forma, é de se esperar que as bandas variantes apresentem um comportamento distinto ao longo do desenvolvimento da planta, pois segundo KLOSE (1982), a proporção de proteínas variantes que ocorrem nos diferentes órgãos indica diferença no potencial de alterações, a qual deve incluir a conduta das bandas durante o desenvolvimento.

O desenvolvimento do grão no milho exhibe três fases diferentes: (1) o período lag de acumulação, que começa na emergência do cabelo e estende 15 a 18 dias, (2) o período de acumulação linear, durante o qual mais de 90% das proteínas do grão já foram acumuladas e (3) o período em que declina a taxa de acumulação (TOLLENAAR, 1977), o qual corresponde a maturação. Os estágios os quais foram extraídos amostras protéicas correspondem, ao final da fase (1) e início da fase (3). Dessa forma, durante o intervalo entre os estágios ocorreu todo, ou quase todo o acúmulo de proteínas. Os perfis eletroforéticos dos grãos, em todos os genótipos revelaram um aumento significativo na concentração de uma série de polipeptídeos (17,0; 28,0; 35,0; 38,0 e 94,0 kD), os quais possivelmente são parte dos polipeptídeos de reserva que se acumulam nessa fase (HIGGINS, 1984).

Frente as observações de alterações citadas anteriormente, pode-se verificar que a especificidade protéica de um determinado órgão, deve ser restrita ao estágio de desenvolvimento da planta e ao genótipo avaliado, envolvendo sistemas regulatórios genótipo dependentes, devendo

agir de acordo com o órgão e/ou estágio, em diversos níveis, tanto à nível traducional como a nível de degradação de proteínas.

5.3. Herança dos Perfis Eletroforéticos nos Vários Órgãos

O estudo de herança através do perfil eletroforético de proteínas tem sido recentemente utilizado para avaliação dos efeitos gênicos que ocorrem nos diferentes cruzamentos (LEONARDI *et alii*, 1987; LEONARDI *et alii*, 1988; CHEN & CHEN, 1989). Alguns casos de dominância (LEONARDI *et alii*; LEONARDI *et alii*, 1988) e codominância (CHEN & CHEN, 1989), tem sido mencionados. Na maioria desses estudos são avaliadas as alterações no nível de intensidade ou ausência/presença de bandas, no perfil eletroforético do híbrido em relação a seus parentais. Neste trabalho, através da avaliação de vários cruzamentos, nos quais os híbridos simples HS1 e HS2 apresentam alto nível de heterose, foi possível detectar variados fenótipos protéicos correspondentes a diferentes manifestações na herança de proteínas.

No 4^o par de folhas e no colmo, verificou-se a ocorrência de valores de diferença positiva nos cruzamentos I e II, que correspondem aos híbridos simples HS1 e HS2, e valores negativos no cruzamento III, correspondendo ao híbrido duplo HD. Esse acúmulo de bandas com alta concentração nos híbridos simples, parece estar relacionado com o nível

de heterose, provavelmente contribuindo com o aumento de quantidades de proteínas envolvidas com o processo produtivo, e conseqüentemente, aumentando sua produtividade. GILYAZET-DINOV & ZIMNITSKII (1986) observaram uma maior concentração de m-RNAs transcritos de seqüências de DNAs raras, em um híbrido heterótico quando comparado com um não heterótico, em células de meristema. Provavelmente, esses m-RNAs contribuem para o aumento de síntese protéica, nessas células, acelerando o processo de desenvolvimento. Essa ocorrência sugere a possibilidade do híbrido, conter genes regulatórios complementares aumentando a chance de maior expressão de proteínas para o vigor híbrido, e conseqüentemente o maior potencial produtivo. Parece coerente que essas manifestações ocorram nas folhas, as quais apresentam grande influência na produtividade do milho, devido à suas funções metabólicas; e no colmo, por suas funções de órgão reserva temporário (TOLLENAR, 1977), além da função de translocação de nutrientes. Sendo os dois órgãos primariamente envolvidos com o processo produtivo, é estimulante acreditar que a maioria dos genes heteróticos se manifestem neles.

O pendão e espiga, não apresentaram tendência nos efeitos gênicos, os quais pudessem ser interpretados, sob essas considerações. Uma justificativa para este fato já citado anteriormente, é que os diferentes genótipos não apresentaram uniformidade quanto ao estágio fisiológico, demonstrando variações no nível de maturação entre os genótipos, e até mesmo entre plantas do mesmo genótipo.

O fato do híbrido HS1 ser macho estéril e sua linha materna não apresentar macho esterelidade, justifica a grande proporção de bandas de baixa concentração no pendão, o que pode ser relacionado com o alto valor negativo no cruzamento I (-48,39). Essas bandas devem estar comprometidas com a formação do pólen, no híbrido HS1. As alterações no perfil eletroforético de plantas macho-estéreis, comprometendo a síntese de alguns polipeptídeos, só se manifestou no pendão, como observados por SAWHNEY & BHADULA (1987).

O grão não apresentou os problemas citados anteriormente, entretanto, foi evidenciada uma incoerência nos valores das diferenças percentuais (porcentagem de efeitos 3 e 4 - porcentagem de efeitos 1, 7 e 9). O cruzamento I apresentou valor negativo (-25,01) e o cruzamento II valor positivo baixo (+8,33), sendo que os dois cruzamentos se referem a híbridos simples altamente heteróticos. Assim, parece não haver, sob essas considerações, manifestação de genes heteróticos, nas proteínas de endosperma, as quais contribuem com maior quantidade na amostra protéica do grão.

Com relação ao número total de bandas avaliadas em cada órgão dentro de um cruzamento, o número de variantes encontrados foi muito alto, comparado com variação detectada em eletroforese duas dimensões. A porcentagem de bandas variantes nos três cruzamentos avaliados apresentaram valores entre 51,5% e 93,9%, dependendo do órgão e/ou cruzamento. LEONARDI *et alii* (1987) e LEONARDI *et alii* (1988) analisaram vários órgãos de plântulas de milho e não

obtiveram valores que excedesse 13,2%. Essa discrepância pode ser explicada pela técnica utilizada, como já foi citado anteriormente, onde os polipeptídeos distintos de peso molecular semelhante apresentam mobilidade igual, se posicionando no mesmo ponto do gel. Assim, inúmeros polipeptídeos não variantes presentes nos genótipos, os quais participam dos cruzamentos, são sub-estimados.

Foi verificado que nos diversos órgãos o efeito (2), identificado por LEONARDI *et alii* (1987) como codominância, apresentou valores muito próximos ou menores que os efeitos de maior expressão no híbrido e herança da maior expressão, identificados por LEONARDI *et alii* (1987) como dominância e sobredominância, com exceção da folha no cruzamento III (híbrido duplo), que apresentou maior porcentagem de efeito (2). O mesmo não foi verificado por LEONARDI *et alii* (1987), observando uma maior porcentagem de codominância (10,17%) e menor porcentagem de dominância + sobredominância (1,35%). Igual tendência foi verificada por LEONARDI *et alii* (1988) em vários órgãos de plântulas de milho. Esses trabalhos não fazem nenhuma menção ao nível de heterose nos cruzamentos avaliados.

Como no híbrido duplo ocorre segregação genética, explica-se a grande porcentagem no cruzamento III do tipo de efeito gênico 10, principalmente na folha e colmo (folha=64,29%, colmo=45,45%) quando comparado com os demais cruzamentos, os quais correspondem a formação dos híbridos simples. O grão apresenta valores próximos nos 3 cruzamentos

avaliados, e espiga e pendão apresentam valores altos e divergentes, podendo ser consequência de diferentes níveis de maturação de plantas distintas dentro do mesmo genótipo. Esse fato demonstra que os órgãos mais estáveis, quanto a níveis de maturação, são as folhas, o colmo e o grão.

O pendão apresentou uma banda (PMA = 35,0 kD) de estrutura bem distinta, muito larga e com pouca definição, pertencente a linhagem F1. O híbrido simples HS1, parece herdá-lo de forma total, isto é, obedecendo as regras de uma herança dominante simples. No híbrido duplo HD é evidenciado a presença da banda, porém em concentração mais baixa, possivelmente devido à segregação genética. Entretanto, para maior segurança quanto ao tipo de herança da banda, seria necessário testar a linhagem em vários cruzamentos. Essa banda não está envolvida no mecanismo de macho esterilidade, pois está presente na linhagem F1 (macho fértil) e no descendente HS1 (macho estéril), e o fato de apresentar menor concentração no híbrido duplo HD, sugere que é herança nuclear, pois sendo citoplasmática, deveria apresentar igual concentração, uma vez que não haveria segregação genética.

As bases moleculares da herança de proteínas devem ser múltiplas e complexas, onde o híbrido frequentemente exhibe interações entre dois ou diversos genes (LEONARDI et alii, 1988). Nesta avaliação foi verificado, em frequência muito baixa, presença de banda no híbrido não estando presente nos parentais; e ausência da banda no

híbrido, estando presente nos dois parentais. Essas evidências não foram detectadas por LEONARDI *et alii* (1988). Esses tipos de efeitos gênicos observados são muito complexas não tendo, com esses dados, argumentos para sugerir o tipo de mecanismo regulatório. Entretanto, pode-se sugerir a participação de pelo menos duas moléculas regulatórias, agindo em trans, determinando ou a transcrição do gene no híbrido, pela complementação de reguladores incapazes de transcrever o gene estrutural nas linhas parentais; ou pela complementação de reguladores que impedem a transcrição no híbrido, sendo os genes transcritos quando estes estão isolados em suas linhas parentais.

Dessa forma, devido a complexidade das interações que ocorrem na herança de proteínas, incluindo variações referentes aos estágios de desenvolvimento, estudos genéticos mais precisos são necessários para esclarecer as interpretações destes primeiros resultados.

5.4. Distância Genética Entre os Genótipos

Dados bioquímicos tem sido utilizados para estimar as distâncias genéticas entre linhagens de milho (NUCCA *et alii*, 1988; DOEBLEY *et alii*, 1983; SMITH, 1984; SALANDUBAT & PERNES, 1986; DAMERVAL, 1987; SMITH & SMITH, 1988), uma vez que estes são menos influenciados pelos fatores ambientais (SMITH *et alii*, 1987).

Neste trabalho, as comparações dos agrupamentos baseados em dados bioquímicos, perfis eletroforéticos SDS-PAGE de proteína total, são relacionados com linhagens e seus híbridos, para verificação das distâncias entre descendentes e seus parentais. Os perfis SDS-PAGE incluem variações quantitativas, as quais parecem que melhor caracterizam a variabilidade genética (KLOSE, 1982; DAMERVAL, 1987).

Em posse dos resultados, foi observado que a distância genética ocorre em função do órgão e do estágio de desenvolvimento, apresentado agrupamentos muito divergentes, fato também observado por CROWE & WALDEN (1988) e sugerido por LEONARDI *et alii* (1988). Assim, a contribuição protéica dos parentais em sua descendência é dependente do órgão e/ou estágio de desenvolvimento, sendo que o grupo de genes parentais, paterno ou materno, o qual se expressa em determinado órgão, pode trazer maior ou menor similaridade com um dos parentais envolvidos. As diferenças de similaridade, as quais são verificadas no mesmo órgão em estágios distintos, devem ser consequências de um grupo de genes paterno ou materno que se expressam temporariamente.

Dentre os órgãos analisados, a espiga apresentou maior espectro de variação (1,692). O colmo se comportou de forma contrária, apresentando um menor espectro de variação (0,712 - C2; 0,908 - C3). De certa forma, o problema já citado dos diferentes níveis de maturação no mesmo estágio, nos órgãos: espiga e pendão, o que não ocorreu com folhas, colmo e grãos, pode ser uma das causas

dessa ampla variação observada na espiga. Naturalmente, isso não quer dizer que esta seja representativa do genoma, e sim de uma condição fisiológica temporária. Por outro lado, espiga é um órgão altamente diferenciado no milho, devendo comportar um grande número de polipeptídeos específicos, os quais possivelmente estão mais sujeitos a alterações (KLOSE, 1982). Sob essas considerações, a ocorrência da divergência fisiológica nesses órgãos torna os resultados pouco representativos. A folha, mesmo demonstrando um nível de variação menor (1,311), apresentou um agrupamento bastante coerente com as relações de parentescos.

Seria de se esperar que o perfil eletroforético do grão apresentasse maior semelhança com o parental materno, o qual contribui com uma dosagem gênica dupla na formação do endosperma, e este contribui com a maior parte da proteína do grão; esses efeitos foram sugeridos em polipeptídeos de endosperma de arroz (CHEN & CHEN, 1989). Nessa avaliação não foi observado nenhuma tendência nesse sentido, sugerindo que as proteínas do endosperma, observadas nos géis, devem ser preferencialmente controladas por genes reguladores do que por efeitos de dosagem gênica, sendo assim o híbrido pode apresentar similaridade em relação a qualquer um dos parentais.

No agrupamento apresentado no grão, separou-se a linhagem F1, possivelmente pelo fato dessa ser a única linhagem "flint", o que corresponde a diferenças nas proteínas do endosperma.

Foi verificado que entre vários órgãos de milho, proteína total de grão, zeínas, raiz e parte aérea de plântulas, somente na parte aérea apresentou alta correlação com dados de heterose, os outros se mostraram independentes (dados não publicados).

Os dados de espiga, prejudicados pelo nível de maturação distintos entre genótipos, apresentou uma forma de agrupamento muito incoerente, agrupando o híbrido HS1 com a linhagem F2, a qual não faz parte de sua formação. O pendão mesmo apresentando esse problema, agrupou o híbrido HS1 macho estéril com o híbrido duplo HD, o qual segrega para macho esterelidade.

No colmo, os dois estágios avaliados apresentaram grandes divergências, salvo que seus acessos máximos estão entre as linhas M1 e M2. Este dado sugere que a divergência genética nestes dois genótipos é suficientemente maior que as diferenças nas expressões gênicas temporárias, que ocorrem durante o desenvolvimento do colmo.

O fato dos acessos mínimos sempre se referirem a um parental e seu descendente, e o acesso máximo à duas linhagens independentes, comprova até certo ponto, a confiabilidade na metodologia de avaliação, tanto na técnica que revela o genoma através da expressão protéica, quanto da forma de representá-los através de leitura densitométrica e da sua interpretação.

Apesar do gráfico dos componentes principais representarem os dados baseados em somente três componentes

de variâncias, essas contribuem com parcelas relativamente altas (folha = 86,4%; colmo - C2 = 70,4%; colmo - C3 = 79,1%; pendão = 85,2%; espiga = 86,6% e grão = 86,8%).

Frente a todos os resultados, pode-se confirmar que a estimativa das distâncias genéticas é influenciada pela escolha do órgão ou estágio de desenvolvimento. Dessa forma, dentre os órgãos estudados, aquele cuja variação se mostrou mais representativa do nível de parentesco dos genótipos avaliados, foi o 4^o par de folhas.

6. CONCLUSÕES

A análise dos perfis eletroforéticos SDS-PAGE, de quatro linhagens de milho, e seus respectivos híbridos simples e duplo, em vários órgãos e diversos estágios de desenvolvimento, permitiu obter as seguintes conclusões:

1. Em função dos perfis eletroforéticos foi possível distinguir e caracterizar órgãos e genótipos, independente de sua origem.
2. As variações qualitativas e quantitativas são maiores entre órgãos do mesmo genótipo e estágio de desenvolvimento, do que entre genótipos no mesmo órgão e estágio.
3. Existem polipeptídeos que se expressam, em determinado estágio de desenvolvimento de um órgão, não estando presentes nos demais estágios. Como por exemplo, o polipeptídeo de 15 kD estágio-específico do grão, que aparece em todos os genótipos.

4. Comparando-se os vários estágios de um mesmo órgão, as diferenças de concentração das bandas são maiores que aquelas devidas à ausência e presença de bandas.
5. A comparação de perfis de híbridos e respectivos parentais revela distintos efeitos gênicos, que são dependentes do órgão avaliado.
6. A análise da herança das bandas, permite sugerir a participação de moléculas regulatórias agindo em trans na expressão de alguns polipeptídeos, pelo fato destes estarem presentes no híbrido e ausentes em suas linhas parentais e/ou ausentes no híbrido e presentes em suas linhas parentais.
7. A banda de PMA = 35 kD, observada em pendões, de estrutura muito larga e com pouca definição no gel, não está envolvida no mecanismo de macho esterilidade, pois está presente na linhagem F1 (macho fértil) e no descendente HSl (macho estéril).
8. O genótipo HSl - macho estéril, apresenta grandes alterações no perfil eletroforético do pendão, comprometendo a síntese de uma série de polipeptídeos, quando comparado com os outros genótipos macho - férteis.

9. A estimativa da divergência genética entre genótipos é influenciada pela escolha do órgão e estágio de desenvolvimento.
10. Para avaliações comparativas de perfis eletroforéticos entre genótipos, dentre os órgãos utilizados no presente trabalho, os mais indicados foram folhas, colmo e grão, pelo fato de, aparentemente, não exibirem níveis de maturação distintos entre os genótipos.
11. Dentre os órgãos indicados, as folhas apresentaram resultados mais coerentes, quando comparados com os graus de parentesco e heterose.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F.B.; BOSSHART, R.P.; FORRENCE, L.E.; HABIG, W.H.
Preparation and purification of glucanase and chitinase
from bean leaves. *Plant Physiol.*, 47: 129-134, 1970.
- ABRAHAM, J. & DOANE, W.W. Genetic regulation of tissue-es-
pecific expression of amylase structural genes in (*Droso-*
phila melanogaster). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75: 4446-4450,
1978.
- ALIAGA-MOREL, J.R.; CULIÁNEZ-MACIÁ, F.A.; CLEMENTE-MARIN,
G.; PRIMO-YUFERA, E. Differentiation of rice varieties
by electrophoresis of embryo protein. *Theor Appl. Genet.*
74(2): 224-232, 1987.
- ALLARD, R.W. Base genética da heterose e da depressão cau-
sada pela endogamia. In: ALLARD, R.W. *Princípios de Me-*
lhoramento de plantas, New York, John Willey and Sons,
1960, 19: 182-188.
- BAHRMAN, N.; VIENNE, D.; THIELLEMENT, H.; HOFMANN, J.P.;
Two-dimensional gel electrophoresis of proteins for gene-
tic studies in Douglas Fir (*Pseudotsuga menziesii*).
Bioch. Gen., 23: 247-255, 1985.
- BENNER, M.S.; PHILLIPS, R.L.; KIRIHARA, J.A.; MESSING, J.W.
Genetic analysis of methionine-rich storage protein accu-
mulation in maize. *Theor Appl. Genet.*, 78: 761-767, 1989.

- BERNSTINE, E.G. & KOH, C. A cis-active regulatory gene in the mouse: direct demonstration of cis-active control of the rate of enzyme subunit synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77: 4193-4195, 1980.
- BERVILLE, A. & CHARBONNIER, M. Mitochondria and chloroplasts: Speculations and reflections of the molecular mechanism of heterosis. In: SHERIDAN, W.F. *Maize For Biological Research*, 1, Charlottesville, University Press, 1982, Cap. 42, p. 267-274.
- BEWLEY, G.C. & LAURIE-AHLBERG, C.C. Genetic variation affecting the expression of catalase in *Drosophila melanogaster*: correlation with rates of enzyme synthesis and degradation. *Genetics*, 106: 435-448, 1984.
- BLERKOM, J.V. Structural relationship and posttranslational modification of stage-specific proteins synthesized during early preimplantation development in the mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 78: 7629-7633, 1981.
- BOOTHE, J.G. & WALDEN, D.B. Multivariate analysis of polypeptide synthesis in developing maize embryos. *Theor Appl. Genet.*, 77: 495-500, 1989.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
- BROGLIE, K.E.; BIDDLE, P.; CRESSMAN, R.; BROGLIE, R. Functional analysis of DNA sequences responsible for ethylene regulation of a bean chitinase gene in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, 1: 599-607, 1989.

BROGLIE, K.E.; CORUZZI, G.; KEITH, B.; CHUA, N.H. Molecular biology of C4 photosynthesis in *Zea mays*: differential localization of proteins and mRNAs in the two leaf cell types. *Plant Mol. Biol.*, 3: 431-444, 1984.

BRYAN, J.K.; LISSIK, E.A.; MATTHEWS, B.F. Change in enzyme regulation during growth of maize. *Plant Physiol.*, 59: 673-679, 1977.

CAMUSSI, A.; ZEULI, P.L.S.; MELCHIORRE, P. Numerical taxonomy of Italian maize population: genetic distances on the basis of heterotic effects. *Maydica*, 28: 411-424, 1983.

CASEY, R.; DOMONEY, C.; ELLIS, N. Legume storage proteins and their genes. MIFLIN, B.J. In: *Plant Molecular and Cell Biology*, 1, New York, Oxford University Press, 1986. 3: 1-95.

CHANDLEE, J.M. & SCANDALIOS, J.G. Regulation of Cat-1 gene expression in the scutellum of maize during early sporophytic development. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 81: 4903-4907, 1984.

CHEN, L.F.O. & CHEN, L.C. Inheritance of two endosperm loci in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl. Genet.*, 78: 788-792, 1989.

CROWE, T.G. & WALDEN, D.B. Variation in leaf polypeptide synthesis for several cultivars. *Maize Genetics Cooperation, News letters*, 62: 86-87, 1988.

CRUZ, C.D. Algumas técnicas de análise multivariada no melhoramento de plantas. Piracicaba, 1987. 75p. (ESALQ/USP).

- DAMERVAL, C.; HEBERT, Y.; de VIENNE, D. Is the polymorphism of protein amounts related to phenotypic variability? A comparison of two-dimensional electrophoresis data with morphological traits in maize. *Theor Appl. Genet.*, 74: 194-202, 1987.
- DE ROSE, R.T.; MA, D.P.; KWON, I.S.; HASNAIN, S.E.; KLASSY, R.C.; HALL, T.C. Characterization of the kafirin gene family from sorghum leaves reveals extensive homology with zein from maize. *Plant Mol. Biol.*, 12: 245-256, 1989.
- DOEBLEY, J.F.; GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W. Isozyme variation in maize from the southwestern United States: Taxonomic and anthropological implications. *Maydica*, 28: 97-120, 1983.
- DOOLITTLE, R.F. Proteins. *Scientific American*, 253: 74-83, 1985.
- ERICSON, M.C. & ALFINITO, S.H. Proteins produced during salt stress in Tobacco cell culture. *Plant Physiol.*, 74: 506-509, 1984.
- FERGUSON, M.M.; KNUDSEN, K.L.; DANZMANN, R.G. Developmental rate and viability of rainbow trout with a Null Allele at a lactate dehydrogenase locus. *Bioch. Genetic*, 26: 177-189, 1988.
- di FONZO, N.; FORNASARI, E.; SALAMINI, F.; SOAVE, C. SDS-protein subunits in normal, opaque-2 and Floury-2 maize endosperms, *Maydica*, 22: 77-88, 1977.
- FORDE, B.G.; OLIVER, R.J.C.; LEAVER, C.J.; GUNN, R.E.; KEMBLE, R.J. Classification of normal and male-sterile cytoplasms in maize. I. Electrophoretic analysis of variation in mitochondrially synthesized proteins. *Genetics*, 95: 443-450, 1980.

- des FRANCS, C.C. & THIELLEMENT, H. Chromosomal localization of structural genes and regulations in wheat by 2D electrophoresis of ditelosomic lines. *Theor Appl. Genet.*, 71: 31-38, 1985.
- GAYLER, K.R. & SYKES, G.E. Effects of nutritional stress on the storage proteins of soybeans. *Plant Physiol.*, 78: 582-585, 1985.
- GEHRING, W.J. The molecular basis of development. *Scientific American*, 253: 137-146, 1985.
- GIBSON, J.B.; WILKS, A.V.; CAO, A.; FREETH, A.L. Dominance for sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity in *Drosophila melanogaster*. Evidence for differential allelic expression mediated via a trans - acting effect. *Genetics*, 56: 227-235, 1986.
- GILYAZETIDINOV, S.Y.; ZIMNITSKII, A.N. Composition of poly (AD)⁺ RNA populations in roots of corn heterotic hybrids and their starting lines. *Acad. Sci.*, 33: 590-598, 1986.
- GOODMAN, M.M.; PATERNIANI, E. The races of maize III. Choices of appropriate characters for racial classification. *Econ. Bot.*, 23: 59-68, 1969.
- GOODMAN, M.M. & STUBER, C.W. Races of maize VI. Isozyme variation among races of maize in Bolivia. *Maydica*, 28: 169-187, 1983.
- GRATTAPAGLIA, D. & NASSAR, N.M.A. Biossintética de espécies brasileiras do gênero *Manihot* baseada em padrões de proteína de semente. *Ciência e Cultura*, 39: 294-300, 1987.
- GUARENTE, L. Regulatory proteins in yeast. *Ann. Rev. Genet.* 21: 425-452, 1987.

- GUPTA, S.K. & RÖBBELEN, G. Identification of rapessed (*Brassica napus*) cultivars by electrophoresis. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 96: 363-370, 1986.
- HARRISON, P.A. & BLACK, C.C. Two-dimensional electrophoretic mapping of proteins of bundle sheath and mesophyll cells of the C4 grass *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. (Crabgrass). *Plant Physiol.*, 70: 1359-1366, 1982.
- HEBERT, Y. & VINCOURT, P. Mesures de la divergence génétique 2. Distances calculées sur des critères biométriques. In: LEFORT-BUSSON & VIENNE. *Les distances génétiques*, 1, Paris. INRA Publications, 1985, I-2: 23-37.
- HEIDRICH-SOBRINHO, E.; CORDEIRO, A.R. Codominant isoenzymic alleles as markers of genetic diversity correlated with heterosis in maize (*Zea mays*). *Theor Appl. Genet.*, 46: 197-199, 1975.
- HIGGINS, T.J.V. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Ann. Rev. Physiol.*, 35: 191-192, 1984.
- HOLLIDAY, R. A different kind of inheritance. *Scientific American*, 261(2): 40-48, 1989.
- JONES, R.A.; LARKINS, B.A.; TSAI, C.Y. 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 Physiol.*, 59: 733-737, 1977a.
- JONES, R.A.; LARKINS, B.A.; TSAI, C.Y. 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, 1977b.

- KANABUS, J.; PIKAARD, C.S.; CHERRY, J.H. Heat shock proteins in tobacco cell suspension during growth cycle. *Plant Physiol.*, 75: 639-644, 1984.
- KAWATA, T. & YOSHIDA, S. Alterations in protein synthesis in vitro in chilling sensitive mung bean hypocotyls caused by chilling stress, *Plant Cell Physiol.*, 29(8): 1423-1427, 1988.
- KENDAL, M. Multivariate analysis. Charles griffin and co. LTD, 210p. 1980.
- KING, G.J.; HUSSEY, C.E.; TURNER, V.A. A protein induced by NaCl in suspension cultures of *Nicotiana tabaccum* accumulates in whole plant roots. *Plant Mol. Biolo.*, 7: 441-449, 1986.
- KLOSE, J. Genetic variability of soluble proteins studied by two-dimensional electrophoresis on different inbred mouse strains and on different mouse organs. *Jour. Mol. Evol.*, 18: 315-328, 1982.
- KUDRYAVTSEV, A.M.; METAKOUSKY, E.V.; SOZINOV, A.A. Polymorphism and inheritance of gliadin components controlled by chromosome 6A of spring durum wheat. *Bioch. Genet.*, 26: 693-703, 1988.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- LAFLAMME, D. & ROXBY, R. Isolation and nucleotide sequence of cDNA clones encoding potato chitinase genes. *Plant Mol., Biol.*, 13: 249-250, 1989.

- LEFORT-BUSON, M. Distance génétique et hétérosis 2. Aspects théoriques. In: LEFORT-BUSON, M. & VIENNE, D. Les Distances génétiques 1 Paris INRA Publications, 1985, III - 2: 119-130.
- LEONARDI, A.; DAMERVAL, C.; VIENNE, D. Inheritance of protein amounts: comparison of two-dimensional electrophoresis patterns of leaf sheaths of two maize lines (*Zea mays* L.) and their hybrids. *Genet. Res. Camb*, 50: 1-5, 1987.
- LEONARDI, A.; DAMERVAL, C.; VIENNE, D. Organ-specific variability and their inheritance of maize proteins revealed by two-dimensional electrophoresis. *Genet. Res. Camb*, 52: 97-103, 1988.
- LUSIS, A.J.; CHAPMAN, V.M.; WANGENSTEIN, R.W.; PAIGEN, K. Trans-acting temporal locus within the β -glucuronidase gene complex. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 80: 4398-4402, 1983.
- MALIK, N.S.A. & BERRIE, A.M.M. Changes in leaf proteins of peas, *Pisum sativum* L., during development on deflorated plants. *Plant Physiol.*, 59: 331-334, 1977.
- MASON, H.S.; GUERRERO, F.D.; BOYER, J.S.; MULLET, J.E. Proteins homologous to leaf glycoproteins are abundant in stems of dark-grown soybean seedlings. Analysis of proteins and cDNAs. *Plant Mol. Biol.*, 11: 845-856, 1988.
- MATSUOKA, M.; ASOU, S.; OHASHI, Y. Regulation mechanisms of the synthesis of pathogenesis - related proteins in tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.*, 29: 1185-1192, 1988.
- MANZOCCHI, L.A.; BIANCHI, M.W.; VIOTTI, A. Expression of zein in long term cultures of wildtype and opaque-2 maize endosperms. *Plant Cell Reports*, 7: 639-643, 1989.

- MCDONALD, J.F. & AYALA, F.J. Genetic and biochemical basis of enzyme activity variation in natural populations. I. Alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 89: 371-388, 1978.
- MIRANDA, J.R. & EGGLESTON, P. Analysis of dominance for competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 63: 221-229, 1989.
- MOLL, R.H.; LONQUIST, L.H.; FORTUNO, V.; JOHSON, E.G. The relationship of heterosis and genetic divergence in maize. *Genetics*, 52: 139-144, 1965.
- MOLL, R.H.; SALHUANA, W.S.; ROBINSE, H.F. Heterosis and genetic diversity in variety crosses of maize. *Crop Science*, 2: 197-198, 1962.
- MOSES, P.B. & CHUA, N.H. Light switches for plants genes. *Scientifican American*, 258(4): 64-69, 1988.
- NASSER, W.; TAPIA, M.; KAUFFMANN, S.; MONTASSER-KOUHSARI, S.; BURKARD, G. Identification and characterization of maize pathogenesis-related proteins. Four maize PR proteins are chitinases. *Plant Mol. Biol.*, 11: 529-538, 1988.
- NEI, M. Interspecific gene differences and evolutionary time estimated from electrophoretic data on protein identity. *Am. Nat.*, 105: 385-398, 1971.
- NITSAN, J. Electrophoretic patterns of xanthium leaf extracts as affected by physiological age of leaf, photoperiod & age of plant. *Plant Physiol.*, 37: 291-295, 1962.
- NUCCA, R.; SOAVE, C.; MOTTO, M.; SALAMINI, F. Taxonomic significance of the zein isoelectric focusing pattern. *Maydica*, 23: 239-249, 1978.

OMETTO, J.C. Fluxo de calor sensível ou o calor destinado a aquecer o ar atmosférico. In: OMETTO, J.C. Bioclimatologia Vegetal 1 São Paulo. Editora Agronômica Ceres Ltda. 1981, 129-155.

OSTERMAN, J.C. An allele of *prot* locus in maize is a variant for the site of protein processing. *Bioch Genetics*, 26: 463-474, 1988.

OTTOBONI, L.M.M.; STEFFENSEN, D.M. Localization of zein genes in maize. *Bioch Genetics*, 25: 123-142, 1987.

PAYNE, P.I.; HOLT, L.M.; READER, S.M.; MILLER, T.E. Chromosomal location of genes coding for endosperm proteins of *Hordium chilense* determined by two-dimensional electrophoresis of wheat - *H. chilense* chromosomes addition lines. *Bioch. Genet.*, 25: 53-65, 1987.

QUAIL, P.H. & SCANDALIOS, J.G. Turnover of genetically defined catalase isozymes in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68: 1402-1406, 1971.

REICHERT, G.H. Two-dimensional gel analysis of proteins from mouse fetuses with trisomy 19 afther DEAE - Sepharose chromatography. *Gennet. Res. Camb.*, 47: 193-197, 1986.

REMBUR, J.; NOUGAREDE, A. Changes in the polypeptide composition during the ontogenetic development of the shoot apex of *Chrysanthemum segetum* L. analysed by two-dimensional mini-gel electrophoresis. *Plant Cell Physiol*, 30: 359-363, 1989.

ROBERT, L.S.; ADELI, K.; ALTOSAAR, I. Homology among 3S and 7S globulins from cereals and pea. *Plant Physiol.*, 78: 812-816, 1985.

- SALANOUBAT, M. & PERNES, J. Enzyme polymorphisms within and between European maize populations. *Maydica*, 31: 269-278, 1986.
- SANO, Y. Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm. *Theor Appl. Genet.*, 68: 467-473, 1984.
- SAWHNEY, V.K. & BHADULA, S.K. Characterization and temperature regulation of soluble proteins of a male sterile tomato mutant. *Bioch Genet*, 25: 717-728, 1987.
- SCANDALIOS, J.G. Alcohol dehydrogenase in maize: Genetic basis for isozymes, *Science*, 166: 623-624, 1973.
- SCANDALIOS, J.G. & BAUM, J.A. Regulatory gene variation in higher plants. *Advances in genetics*, 21: 347-370, 1982.
- SCANDALIOS, J.G.; CHANG, D.Y.; McMILLIN, D.E.; TSAFTARIS, A. and MOLL, R.H. Genetic regulation of catalase developmental program in maize scutellum: Identification of a temporal regulatory gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77: 5360-5364, 1980.
- SCANDALIOS, J.G.; LIU, E.H.; CAMPEAU, M.A. The effects of intragenic and intergenic complementation on catalase structure and function in maize. A molecular approach to heterosis. *Arcn. Biochem. Biophys*, 153: 695-705, 1972.
- SCHWARTZ, D. & LAUGHNER, W.J. A molecular basis for heterosis, *Science*, 166: 626-627, 1973.
- SHAFER, J.B. & BEWLEY, G.C. Genetic determination of sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Jour. of Biol. Chem.*, 258: 10027-10033, 1983.

- SCHECHTER, Y.; WET, J.M.J. Comparative electrophoresis and isozyme analysis of seed proteins from cultivated races of sorghum. *Amer. J. Bot.* 62(3): 254-261, 1975.
- SHERIDAN, W.F. Maize developmental genetics: genes of morphogenesis. *Annu. Rev. Genet.* 22: 353-385, 1988.
- SHEWRY, P.R.; PARMAR, S.; PAPPIN, D.J.C. Characterization and genetic control of the prolamins of *Haynaldia villosa*: Relationship to cultivated species of the triticeae (Rye, Wheat and Barley). *Bioch Genet.*, 25: 309-325, 1987.
- SMITH, J.S.C. Genetic variability within U.S. hybrid maize: multivariate analysis of isozyme data. *Crop Science*, 24: 1041-1046, 1984.
- SMITH, J.S.C.; PASZKIEWICZ, S.; SMITH, O.S.; SCHAFFER, J. Electrophoretic, chromatographic, and genetics techniques for identifying associations and measuring genetic diversity among corn hybrids. In: *Proc 42nd Ann Corn and Sorghum*, Washington, ASTA, 1987, 187-203.
- SMITH, J.S.C. & SMITH, O.S. Associations among inbred lines of maize using electrophoretic, chromatographic, and pedigree data. *Theor Appl. Genet.*, 73: 654-664, 1987.
- SMITH, J.S.C. & SMITH, O.S. The description and assessment of distance between inbred lines of maize: I. The use of morphological traits as descriptors. *Maydica*, 34: 141-150, 1989a.
- SMITH, J.S.C. & SMITH, O.S. The description and assessment of distance between inbred lines of maize: II. The utility of morphological biochemical and genetic descriptors and a scheme for the testing of distinctiveness between inbred lines. *Maydica*, 34: 151-161, 1989b.

- SPIKER, S. Chromatin structure and gene regulation in higher plants. *Advances Gent.*, 22: 145-208, 1984.
- STRUHL, K. Promoters, activator proteins, and the mechanisms of transcriptional initiation in yeast. *Cell*, 49: 295-297, 1987.
- STUBER, C.W.; EDWARDS, M.D.; WENDEL, J.F. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. *Crop Science*, 27: 639-648, 1987.
- STUBER, C.W.; GOODMAN, M.M. Inheritance, intracellular localization and genetic variation of 6-phosphogluconate dehydrogenase isozymes in maize. *Maydica*, 29: 453-471, 1984.
- STUBER, C.W.; GOODMAN, M.M.; MOLL, R.H. Improvement of yield and ear number resulting from selection at allozyme loci in maize population *Crop Science*, 22: 737-740, 1982.
- STUBER, C.W.; MOLL, R.H.; GOODMAN, M.M.; SCHAFFER, H.E.; WEIR, B.S. Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize (*Zea mays* L.). *Genetics*, 95: 225-236, 1980.
- TOLLENAAR, M. Sink-source relationships during reproductive development in maize. A review *Maydica*, 22: 49-75, 1977.
- TSAI, C.Y. & DALBY, A. Comparison of the effect of shrunken-4, opaque-2 and floury-2 genes on the zein content of maize during endosperm development. *Cereal Chem*, 51: 825-829, 1974.
- VIENNE, D. & DAMERVAL, C. Mesures de la divergence génétique 3. Distances calculées à partir de marqueurs moléculaires. In: LEFORT-BUSON & VIENNE. *Les distances génétiques 1* Paris INRA Publications, 1985, I - 3: 39-57.

- WALTON, M. & HELENTJARIS, T. Application of restriction fragment length polymorphism (RFLP) technology to maize breeding. In: Proc. 42nd Ann. Corn and Sorghum, Washington, ASTA, 1987, 48-75.
- WEN, T.N. & LUTHE, D.S. Biochemical characterization of rice glutelin. *Plant Physiol.*, 78: 172-177, 1985.
- WENDEL, J.F.; GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W.; BECKETT, J.B. New isozyme for maize (*Zea mays* L.): Aconitate hydratase, adenylate kinase, NADH dehydrogenase, and shikimate dehydrogenase. *Bioch Genetics*, 26: 421-445, 1988.
- WETTSTEIN, D. Perspectives for the genetic engineering of plants for agriculture, horticulture and industry. *Plant Molecular Biol.* 13: 313-317, 1989.
- WILSON, A.C.; CARLSON, S.S.; WHITE, T.J. Biochemical evolution. *Ann. Rev. Bioch.*, 46: 573-639, 1977.
- WILSON, J.M.; TARR, G.E.; KELLEY, W.N. Human hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase. An amino acid substitution in a mutant form of the enzyme isolated from a patient with gout. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 80: 870-873, 1983.
- WOODMAN, J.C. & FREELING, M. Identification of a genetic element that controls the organ-specific expression of *Adh 1* in maize. *Genetics*, 98: 357-378, 1981.
- ZIVY, M.; THIELLEMENT, H.; VIENNE, D.; HOFMANN, J.P. Study on nuclear and cytoplasmic genome expression in wheat by two-dimensional gel electrophoresis. *Theor Appl. Genet.*, 68: 335-345, 1984.

ZUCKER, M. Alteration of the protein components and other constituents in Tobacco leaf by shading. *Plant Physiol.*, 34: 563-569, 1959.

A P E N D I C E 1

Tabela 1 - Perfis eletroforéticos dos vários órgãos do genótipo = F1, com os seus respectivos PMA (kD) e V.C. (valor de concentração).

GENÓTIPO F1									
FOLHA		COLMO		PENDÃO		ESPIGA		GRÃOS	
PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.
150,0	0,16	120,0	0,50	94,0	0,09	110,0	0,48	90,0	0,65
120,0	0,47	100,0	0,42	86,0	0,61	98,0	0,38	82,0	0,94
96,0	0,59	80,0	0,76	76,0	0,52	84,0	1,11	75,0	1,06
84,0	0,55	73,0	1,64	63,0	1,31	76,0	0,72	64,0	1,48
75,0	1,10	66,0	0,97	53,0	1,70	67,0	0,63	62,0	1,18
68,0	0,00	61,0	1,05	49,0	0,96	61,0	1,15	56,0	1,71
67,0	0,79	53,0	2,10	45,0	1,22	57,0	1,44	50,0	1,42
61,0	1,26	47,0	1,09	42,0	1,22	53,0	1,97	48,0	1,42
57,0	1,18	45,0	1,09	40,0	1,31	46,0	1,25	45,0	1,24
53,0	1,18	43,0	1,01	38,0	0,00	43,0	1,63	42,0	1,48
45,0	1,30	40,0	1,09	35,0	2,09	41,0	1,06	38,0	1,48
44,0	1,30	39,0	1,39	33,0	2,09	39,0	1,06	36,0	1,00
43,0	0,00	37,0	1,05	29,0	1,22	36,0	1,15	32,0	1,36
41,0	1,18	34,0	1,09	28,0	0,00	35,0	1,20	29,0	1,06
40,0	1,18	31,0	1,01	27,0	0,74	33,0	0,77	27,0	0,53
36,0	1,42	30,0	0,67	26,0	1,00	31,0	1,15	23,0	0,06
35,0	1,42	28,0	0,50	24,0	2,18	29,0	1,06	21,0	0,18
33,0	1,65	26,0	0,55	20,0	0,00	27,0	0,91	20,0	0,41
32,0	1,65			19,0	0,96	25,0	0,87	19,0	0,35
30,0	1,42			18,0	1,05	22,0	0,00		
28,0	1,81			17,0	1,13				
25,0	0,79			16,0	0,87				
24,0	0,95								
20,0	0,63								
19,0	1,26								
17,0	1,50								
16,0	0,00								
15,0	1,20								

Tabela 2 - Perfis eletroforéticos dos vários órgãos do genótipo = M1, com os seus respectivos PMA (kD) e V.C. (valor de concentração).

GENÓTIPO M1									
FOLHA		COLMO		PENDÃO		ESPIGA		GRÃOS	
PMA (kD)	V.C.	PMA (kD)	V.C.	PMA (kD)	V.C.	PMA (kD)	V.C.	PMA (kD)	V.C.
150,0	0,21	120,0	0,63	94,0	0,31	110,0	0,20	90,0	0,91
120,0	0,26	100,0	0,63	86,0	0,93	98,0	0,20	82,0	0,71
96,0	0,31	80,0	1,05	76,0	0,62	84,0	0,40	75,0	1,17
84,0	0,42	73,0	1,05	63,0	1,62	76,0	0,79	64,0	1,23
75,0	0,68	66,0	0,42	53,0	1,75	67,0	0,79	62,0	1,36
68,0	0,00	61,0	0,63	49,0	0,00	61,0	2,23	56,0	2,37
67,0	0,00	53,0	3,58	45,0	1,12	57,0	1,29	50,0	1,43
61,0	1,10	47,0	1,05	42,0	1,18	53,0	0,00	48,0	1,43
57,0	1,51	45,0	0,95	40,0	1,37	46,0	2,08	45,0	2,01
53,0	1,51	43,0	0,53	38,0	0,93	43,0	0,00	42,0	0,00
45,0	1,62	40,0	1,68	35,0	1,62	41,0	1,99	38,0	1,49
44,0	1,62	39,0	0,00	33,0	1,62	39,0	1,99	36,0	0,00
43,0	1,41	37,0	1,05	29,0	1,34	36,0	1,49	32,0	1,88
41,0	0,99	34,0	1,16	28,0	0,00	35,0	1,54	29,0	1,30
40,0	0,99	31,0	1,47	27,0	1,09	33,0	1,49	27,0	0,52
36,0	1,77	30,0	1,05	26,0	1,43	31,0	2,13	23,0	0,19
35,0	1,77	28,0	0,42	24,0	1,93	29,0	1,39	21,0	0,26
33,0	1,72	26,0	0,63	20,0	0,00	27,0	0,00	20,0	0,39
32,0	1,72			19,0	1,06	25,0	0,00	19,0	0,32
30,0	1,41			18,0	0,87	22,0	0,00		0
28,0	1,04			17,0	0,93				
25,0	0,60			16,0	1,25				
24,0	0,65								
20,0	0,60								
19,0	0,78								
17,0	1,62								
16,0	1,04								
15,0	0,63								

Tabela 3 - Perfis eletroforéticos dos vários órgãos do genótipo = HS1, com os seus respectivos PMA (kD) e V.C. (valor de concentração).

GENÓTIPO HS1									
FOLHA		COLMO		PENDÃO		ESPIGA		GRÃOS	
PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.
150,0	0,28	120,0	0,45	94,0	0,00	110,0	0,54	90,0	0,44
120,0	0,49	100,0	0,45	86,0	0,00	98,0	0,18	82,0	0,44
96,0	0,21	80,0	1,44	76,0	0,74	84,0	0,90	75,0	1,02
84,0	0,35	73,0	1,53	63,0	0,95	76,0	0,67	64,0	0,71
75,0	0,49	66,0	0,72	53,0	1,36	67,0	0,58	62,0	0,80
68,0	0,00	61,0	1,04	49,0	0,00	61,0	1,26	56,0	3,01
67,0	0,00	53,0	2,26	45,0	1,65	57,0	2,20	50,0	1,86
61,0	1,25	47,0	1,17	42,0	1,57	53,0	1,89	48,0	1,86
57,0	1,70	45,0	1,08	40,0	0,00	46,0	1,30	45,0	2,04
53,0	1,70	43,0	0,99	38,0	0,00	43,0	1,48	42,0	0,00
45,0	1,53	40,0	1,13	35,0	2,73	41,0	1,17	38,0	1,59
44,0	1,53	39,0	1,17	33,0	2,65	39,0	0,99	36,0	1,06
43,0	1,25	37,0	0,90	29,0	1,74	36,0	0,99	32,0	1,68
41,0	0,97	34,0	0,90	28,0	1,78	35,0	1,35	29,0	1,33
40,0	0,97	31,0	0,95	27,0	1,65	33,0	0,00	27,0	0,00
36,0	2,29	30,0	0,72	26,0	1,03	31,0	1,53	23,0	0,18
35,0	2,29	28,0	0,45	24,0	1,24	29,0	1,17	21,0	0,18
33,0	1,88	26,0	0,63	20,0	0,74	27,0	0,81	20,0	0,44
32,0	1,88			19,0	0,62	25,0	0,99	19,0	0,35
30,0	1,18			18,0	0,91	22,0	0,00		
28,0	1,18			17,0	0,25				
25,0	0,49			16,0	0,37				
24,0	0,49								
20,0	0,35								
19,0	0,42								
17,0	1,74								
16,0	1,04								
15,0	0,42								

Tabela 4 - Perfis eletroforéticos dos vários órgãos do genótipo = HD, com os seus respectivos PMA (kD) e V.C. (valor de concentração).

GENÓTIPO HD									
FOLHA		COLMO		PENDÃO		ESPIGA		GRÃOS	
PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.
150,0	0,32	120,0	0,21	94,0	0,61	110,0	0,26	90,0	0,49
120,0	0,59	100,0	0,14	86,0	0,72	98,0	0,26	82,0	0,00
96,0	0,32	80,0	1,27	76,0	0,94	84,0	0,83	75,0	1,23
84,0	0,21	73,0	1,55	63,0	1,16	76,0	1,09	64,0	1,15
75,0	0,86	66,0	0,70	53,0	1,46	67,0	0,96	62,0	1,15
68,0	0,00	61,0	1,83	49,0	0,00	61,0	2,43	56,0	2,71
67,0	0,00	53,0	2,39	45,0	1,32	57,0	3,32	50,0	1,77
61,0	1,51	47,0	1,41	42,0	1,21	53,0	0,00	48,0	1,77
57,0	1,73	45,0	1,27	40,0	1,21	46,0	2,30	45,0	1,89
53,0	1,73	43,0	0,00	38,0	1,27	43,0	0,00	42,0	0,00
45,0	1,83	40,0	1,83	35,0	1,60	41,0	1,15	38,0	1,56
44,0	1,83	39,0	0,00	33,0	1,57	39,0	1,02	36,0	1,58
43,0	1,56	37,0	1,20	29,0	1,18	36,0	1,15	32,0	1,65
41,0	1,40	34,0	1,13	28,0	1,21	35,0	1,41	29,0	1,23
40,0	1,40	31,0	1,69	27,0	1,16	33,0	0,00	27,0	0,00
36,0	2,00	30,0	0,98	26,0	1,05	31,0	2,04	23,0	0,41
35,0	2,00	28,0	0,00	24,0	1,54	29,0	1,89	21,0	0,41
33,0	1,94	26,0	0,42	20,0	0,55	27,0	0,38	20,0	0,49
32,0	1,94			19,0	0,61	25,0	0,51	19,0	0,49
30,0	1,35			18,0	0,66	22,0	0,00		
28,0	1,21			17,0	0,55				
25,0	0,54			16,0	0,44				
24,0	0,49								
20,0	0,38								
19,0	0,46								
17,0	1,27								
16,0	0,73								
15,0	0,43								

Tabela 5 - Perfis eletroforéticos dos vários órgãos do genótipo = HS2, com os seus respectivos PMA (kD) e V.C. (valor de concentração).

GENÓTIPO HS2									
FOLHA		COLMO		PENDÃO		ESPIGA		GRÃOS	
PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.
150,0	0,44	120,0	0,44	94,0	0,25	110,0	0,22	90,0	0,53
120,0	0,67	100,0	0,44	86,0	1,13	98,0	0,22	82,0	0,00
96,0	0,57	80,0	1,18	76,0	0,82	84,0	1,04	75,0	1,40
84,0	0,52	73,0	1,47	63,0	1,57	76,0	0,71	64,0	0,79
75,0	0,72	66,0	1,03	53,0	1,82	67,0	0,77	62,0	1,05
68,0	0,00	61,0	1,47	49,0	1,32	61,0	1,75	56,0	2,89
67,0	0,62	53,0	2,79	45,0	1,38	57,0	2,40	50,0	0,00
61,0	1,47	47,0	1,54	42,0	1,32	53,0	1,97	48,0	1,93
57,0	1,71	45,0	1,47	40,0	1,41	46,0	1,42	45,0	1,93
53,0	1,71	43,0	0,00	38,0	1,19	43,0	1,26	42,0	0,00
45,0	1,60	40,0	1,76	35,0	0,88	41,0	0,93	38,0	1,84
44,0	1,60	39,0	0,00	33,0	1,19	39,0	0,87	36,0	0,96
43,0	1,29	37,0	1,69	29,0	0,94	36,0	1,09	32,0	1,75
41,0	1,19	34,0	0,00	28,0	0,00	35,0	1,20	29,0	0,96
40,0	1,19	31,0	1,40	27,0	0,88	33,0	0,87	27,0	0,00
36,0	1,78	30,0	0,44	26,0	0,88	31,0	1,31	23,0	0,53
35,0	1,78	28,0	0,44	24,0	1,51	29,0	0,77	21,0	0,53
33,0	1,76	26,0	0,44	20,0	0,00	27,0	0,66	20,0	0,96
32,0	1,76			19,0	0,75	25,0	0,55	19,0	0,96
30,0	1,34			18,0	0,82	22,0	0,00		
28,0	1,14			17,0	0,91				
25,0	0,57			16,0	1,01				
24,0	0,57								
20,0	0,44								
19,0	0,62								
17,0	1,09								
16,0	0,88								
15,0	0,57								

Tabela 6 - Perfis eletroforéticos dos vários órgãos do genótipo = F2, com os seus respectivos PMA (kD) e V.C. (valor de concentração).

GENÓTIPO F2									
FOLHA		COLMO		PENDÃO		ESPIGA		GRÃOS	
PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.
150,0	0,35	120,0	0,54	94,0	0,27	110,0	0,19	90,0	0,46
120,0	0,75	100,0	0,54	86,0	0,73	98,0	0,19	82,0	0,64
96,0	0,27	80,0	1,09	76,0	2,15	84,0	0,93	75,0	1,29
84,0	0,44	73,0	1,09	63,0	2,06	76,0	0,93	64,0	1,01
75,0	0,89	66,0	1,09	53,0	1,28	67,0	0,89	62,0	1,01
68,0	0,00	61,0	1,09	49,0	1,10	61,0	1,31	56,0	3,03
67,0	0,00	53,0	1,99	45,0	1,05	57,0	1,68	50,0	1,56
61,0	1,77	47,0	1,63	42,0	1,05	53,0	0,00	48,0	1,56
57,0	2,13	45,0	1,27	40,0	1,23	46,0	1,68	45,0	0,64
53,0	0,00	43,0	1,27	38,0	0,91	43,0	0,93	42,0	0,00
45,0	1,86	40,0	0,00	35,0	0,46	41,0	1,12	38,0	1,38
44,0	1,86	39,0	0,00	33,0	1,28	39,0	0,93	36,0	1,01
43,0	1,33	37,0	1,45	29,0	0,46	36,0	1,26	32,0	1,29
41,0	1,69	34,0	1,27	28,0	0,00	35,0	1,49	29,0	0,83
40,0	1,69	31,0	1,18	27,0	0,91	33,0	1,12	27,0	0,00
36,0	2,17	30,0	0,00	26,0	0,55	31,0	1,31	23,0	0,55
35,0	2,17	28,0	1,45	24,0	1,65	29,0	1,40	21,0	0,55
33,0	0,00	26,0	1,09	20,0	0,00	27,0	1,21	20,0	1,10
32,0	2,13			19,0	1,01	25,0	0,75	19,0	1,10
30,0	1,24			18,0	0,91	22,0	0,70		
28,0	1,51			17,0	1,10				
25,0	0,58			16,0	1,83				
24,0	0,44								
20,0	0,44								
19,0	0,53								
17,0	0,67								
16,0	0,71								
15,0	0,35								

Tabela 7 - Perfis eletroforéticos dos vários órgãos do genótipo = M2, com os seus respectivos PMA (kD) e V.C. (valor de concentração).

GENÓTIPO M2									
FOLHA		COLMO		PENDÃO		ESPIGA		GRÃOS	
PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.	PMA (kD)	V. C.
150,0	0,38	120,0	0,69	94,0	0,32	110,0	0,16	90,0	0,00
120,0	0,60	100,0	0,69	86,0	1,20	98,0	0,16	82,0	1,28
96,0	0,43	80,0	0,86	76,0	1,28	84,0	1,30	75,0	1,28
84,0	0,60	73,0	1,29	63,0	1,84	76,0	1,22	64,0	2,04
75,0	0,87	66,0	0,78	53,0	2,00	67,0	0,16	62,0	2,04
68,0	1,36	61,0	1,29	49,0	1,28	61,0	2,44	56,0	2,13
67,0	1,36	53,0	1,72	45,0	1,52	57,0	2,69	50,0	1,36
61,0	1,58	47,0	1,03	42,0	1,40	53,0	0,00	48,0	1,36
57,0	1,77	45,0	0,95	40,0	1,28	46,0	1,30	45,0	0,85
53,0	1,77	43,0	0,95	38,0	0,92	43,0	0,73	42,0	1,36
45,0	1,28	40,0	1,12	35,0	0,72	41,0	1,22	38,0	1,36
44,0	1,28	39,0	1,21	33,0	1,28	39,0	1,87	36,0	0,68
43,0	1,19	37,0	1,29	29,0	0,88	36,0	1,63	32,0	1,36
41,0	1,14	34,0	1,12	28,0	0,00	35,0	1,43	29,0	0,85
40,0	1,14	31,0	1,21	27,0	0,64	33,0	0,98	27,0	0,00
36,0	1,47	30,0	0,78	26,0	0,80	31,0	1,14	23,0	0,26
35,0	1,47	28,0	0,52	24,0	1,36	29,0	0,65	21,0	0,26
33,0	1,36	26,0	0,52	20,0	0,00	27,0	0,57	20,0	0,26
32,0	1,36			19,0	0,72	25,0	0,49	19,0	0,26
30,0	0,81			18,0	0,64	22,0	0,00		
28,0	1,22			17,0	0,88				
25,0	0,60			16,0	1,04				
24,0	0,54								
20,0	0,49								
19,0	0,49								
17,0	0,60								
16,0	0,60								
15,0	0,38								

A P E N D I C E 2

Tabela 1 - Herança avaliada nos cruzamentos I: (F1xM1), II: (F2xM2) e III: (HS1xHS2) referente ao 4^o estágio do 4^o par de folhas (F-4) - E.G. = tipo de efeito gênico observado (3.7.11) - PMA = peso molecular aparente.

CRUZAMENTOS	I	II	III
PMA (kD)	E. G.	E. G.	E. G.
15,0	10	4	9
16,0	3	4	8
17,0	3	4	2
19,0	10	4	10
20,0	10	4	10
24,0	8	3	9
25,0	8	3	9
28,0	8	8	8
30,0	2	4	2
32,0	3	4	10
33,0	3	4	10
35,0	4	3	10
36,0	4	3	10
40,0	2	3	10
41,0	2	3	10
43,0	3	4	10
44,0	3	4	10
45,0	3	4	10
53,0	3	10	10
57,0	3	3	10
61,0	3	3	10
67,0	1	10	1
68,0	8	1	8
75,0	7	8	10
84,0	10	10	9
96,0	7	3	10
120,0	4	2	10
150,0	3	4	10

Tabela 2 - Herança avaliada nos cruzamentos I: (F1xM1), II: (F2xM2) e III: (HS1xHS2) referente ao 2º estágio do colmo (C-2) - E.G. = tipo de efeito gênico observado (3.7.11) - PMA = peso molecular aparente.

CRUZAMENTOS	I	II	III
PMA (kD)	E. G.	E. G.	E. G.
16,0	8	8	3
17,0	8	9	10
19,0	9	10	10
24,0	4	8	3
25,0	3	10	10
27,0	8	8	5
28,0	8	8	10
29,0	3	8	10
30,0	3	7	10
32,0	8	8	10
34,0	1	3	3
35,0	3	8	10
35,5	8	8	10
36,0	10	8	10
38,0	3	8	10
40,0	3	8	10
41,0	8	1	8
42,0	3	8	10
43,0	3	8	7
46,0	8	3	7
47,0	8	3	7
50,0	3	2	7
53,0	3	2	7
57,0	8	8	8
61,0	3	10	9
65,0	3	8	7
67,0	3	8	7
75,0	10	3	10
88,0	3	4	7
94,0	8	2	1
100,0	2	10	6
120,0	10	10	10
150,0	10	3	6

Tabela 3 - Herança avaliada nos cruzamentos I: (F1xM1), II: (F2xM2) e III: (HS1xHS2) referente ao 1^o estágio do pendão (P-1) - E.G. = tipo de efeito gênico observado (3.7.11) - PMA = peso molecular aparente.

CRUZAMENTOS	I	II	III
PMA (kD)	E.G.	E.G.	E.G.
14,0	7	10	3
15,0	7	10	3
16,0	7	10	10
17,0	7	10	3
18,0	7	3	3
19,0	3	4	2
20,0	7	4	10
20,5	1	4	1
21,5	7	8	3
22,5	1	10	1
24,0	7	10	10
24,5	1	8	8
26,5	7	10	10
28,5	3	8	10
31,0	10	8	10
32,5	10	8	2
35,0	3	10	2
39,0	4	10	2
43,0	7	10	10
46,5	7	10	10
49,0	7	10	10
55,0	3	10	3
57,0	10	1	1
61,0	7	3	3
65,0	6	9	1
66,0	6	9	1
74,0	7	10	2
84,0	9	10	10
87,0	1	8	8
96,0	10	7	10
98,0	1	8	8

Tabela 4 - Herança avaliada nos cruzamentos I: (F1xM1), II: (F2xM2) e III: (HS1xHS2) referente ao 1^o estágio da espiga (E-1) - E.G. = tipo de efeito gênico observado (3.7.11) - PMA = peso molecular aparente.

CRUZAMENTOS	I	II	III
PMA (kD)	E. G.	E. G.	E. G.
15.0	8	1	8
17.0	4	2	10
18.0	4	2	8
20.0	4	10	4
21.0	4	10	4
22.0	4	10	4
24.0	4	2	4
26.0	4	2	4
27.0	4	9	4
28.0	4	10	10
30.0	8	8	8
30.5	3	10	10
31.0	3	10	4
31.5	3	10	4
32.0	2	10	8
33.0	10	3	10
34.0	10	10	8
36.0	10	1	1
37.0	7	8	7
43.0	6	1	8
43.5	1	8	8
45.5	8	1	8
46.0	2	10	8
53.0	1	10	10
57.0	7	10	10
61.0	1	2	3
63.0	10	2	10
67.0	3	9	10
68.0	10	9	10
75.0	7	9	10
78.0	10	9	10
82.0	10	10	10
89.0	10	10	10
100.0	10	7	10

Tabela 5 - Herança avaliada nos cruzamentos I: (F1xM1), II: (F2xM2) e III: (HS1xHS2) referente ao 2^o estágio do grão (G-2) - E. G. = tipo de efeito gênico observado (3.7.11) - PMA = peso molecular aparente.

CRUZAMENTOS	I	II	III
PMA (kD)	E. G.	E. G.	E. G.
14.5	8	8	8
15.0	8	4	10
17.0	2	8	7
20.0	1	10	10
22.0	7	5	9
23.5	1	10	10
24.0	1	8	8
25.0	1	1	8
27.0	7	8	3
28.0	8	4	8
30.0	2	3	4
32.0	10	4	4
34.0	7	4	4
35.0	4	3	3
37.0	10	3	8
42.0	3	1	2
46.0	3	10	3
53.0	2	9	9
57.0	8	10	8
61.0	7	4	7
67.0	7	7	9
65.0	7	9	9
82.0	4	2	2
97.0	2	9	2

APENDICE 3

Formação dos Grupos	
Grupos	Genótipos
(1)	HS1, HD, M1, HS2
(2)	M2
(3)	F2
(4)	F1

Figura 1 - Dendrograma referente ao 4^o par de folhas, estágio 4 (F-4) obtido pelos valores de distâncias do agrupamento do método do vizinho mais próximo e a formação dos grupos correspondentes a análise do dendrograma.

Formação dos Grupos	
Grupos	Genótipos
(1)	HS2, F2, HD
(2)	HS1
(3)	F1
(4)	M2
(5)	M1

Figura 2 - Dendrograma referente ao colmo, estágio 2 (C-2), obtidos pelos valores de distâncias do agrupamento do método do vizinho mais próximo e a formação dos grupos correspondentes a análise do dendrograma.

Formação dos Grupos	
Grupos	Genótipos
(1)	HS1, HD
(2)	F1, F2
(3)	HS2
(4)	M2
(5)	M1

Figura 3 - Dendrograma referente ao colmo, estágio 3 (C-3), obtidos pelos valores de distâncias dos agrupamento do método do vizinho mais próximo e a formação dos grupos correspondentes a análise do dendrograma.

Formação dos Grupos	
Grupos	Genótipos
(1)	HS2, M2, F2
(2)	HD, HS1
(3)	F1
(4)	M1

Figura 4 - Dendrograma referente ao pendão, estágio 1 (P-1), obtidos pelos valores de distâncias do agrupamento do método do vizinho mais próximo e a formação dos grupos correspondentes a análise do dendrograma.

Figura 5 - Dendrograma referente a espiga, estágio 1 (E-1), obtidos pelos valores de distâncias do agrupamento do método do vizinho mais próximo e a formação dos grupos correspondentes a análise do dendrograma.

Figura 6 - Dendrograma referente ao grão, no estágio 2 (G-2), obtidos pelos valores de distâncias do agrupamento do método do vizinho mais próximo e a formação dos grupos correspondentes a análise do dendrograma.