PLEIOTROPIA DO GENE NUCLEAR RF1 NO SISTEMA DE ESTERILIDADE
CITOPLASMÁTICA TEXAS EM MILHO (*zea mays* L.)
NA SÍNTESE DE ANTOCIANINAS

JOAQUIM A. MACHADO
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. JOÃO R. ZINSLY

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz" da
Universidade de São Paulo, para ob-
tenção do título de Doutor em Agrô-
nomia. Área de Concentração: Gené-
tica e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro/1988

Machado, Joaquim Aparecido

Pleiotropia do gene nuclear Rf1 no sistema de esterilidade citoplasmática Texas em milho (*Zea mays* L.) na síntese de antocianinas. Piracicaba, 1988.

176p. ilus.

Tese - ESALQ

Bibliografia

1. Milho - Genética 2. Milho - Esterilidade de citoplasmática. I. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

PLEIOTROPIA DO GENE NUCLEAR Rf_1 NO SISTEMA DE ESTERILIDADE
CITOPLASMÁTICA TEXAS EM MILHO (*Zea mays* L.) NA SÍNTESE
DE ANTOCIANINAS

Joaquim A. Machado

Aprovada em: 19/10/88

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. JOÃO RUBENS ZINSLY

ESALQ/USP

Prof. Dr. ERNESTO PATERNIANI

ESALQ/USP

Prof. Dr. DARCY M. DA SILVA

ESALQ/USP

Dr. LUIZ TORRES DE MIRANDA

IAC-Campinas

Prof. Dr. PAULO ARRUDA

UNICAMP

Prof. Dr. JOÃO R. ZINSLY
Orientador

*Dedico este trabalho à memória
de MÁRIO ZANON PENNA DA ROCHA
aluno desta Escola.*

AGRADECIMENTOS

O autor deseja agradecer a:

- * Dr. João Rubens Zinsly, orientador e formador de uma escola em Melhoramento de Plantas no Brasil;
- * Dr. Ernesto Paterniani, pelo que representou e sempre representará no nome Departamento de Genética da ESALQ;
- * Dr. Sérgio Echeverrigaray, colega pesquisador e compa-
nheiro constante neste trabalho;
- * Dr. Flávio C.A. Tavares, por compartilhar o sonho de
uma **Universidade**;
- * Dr. Urbano C. Ribeiral, Vice-Presidente de Pesquisa da
Agroceres, pelo incentivo à pesquisa científica;
- * Dr. Dêcio Zylberstajn, pela límpida visão da grandeza do
ser humano;
- * Dr. Gladstone Drummond e Dr. José A. de Mattos, pionei-
ros no estudo do sistema de Esterilidade Charrua.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	xvi
SUMMARY	xix
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1. Esterilidade citoplasmática em vegetais ...	06
2.2. Esterilidade citoplasmática em milho	09
2.2.1. Classificação e características dos sistemas CMS em milho	10
2.2.2. O sistema Texas de esterilidade cito plasmática	13
2.2.3. O sistema USDA de esterilidade cito- plasmática	27
2.2.4. O sistema Charrua de esterilidade ci toplasmática	34
2.3. Metabolismo mitocondrial associado a CMS ..	41
2.3.1. A cadeia respiratória e a fosforila ção oxidativa	41
2.3.2. Inibidores clássicos da conversão de energia nas mitocôndrias	44
2.4. Biossíntese de flavonóides	51
2.4.1. Integração na via do ácido shiquími co	51
2.4.2. Síntese de flavonóides em plantas .	54
2.4.3. Regulação da expressão gênica de fla vonóides em milho	56
2.5. Metabolismo da polifenol oxidase (PPO) em plantas	60
2.5.1. Aspectos gerais sobre a PPO	61
2.5.2. Caracterização molecular das PPO ...	62
2.5.3. Funções fisiológicas das PPO	63

	Página
3. MATERIAIS E MÉTODOS	66
3.1. Material	66
3.1.1. Descrição do material genético	66
3.1.1.1. Linhagem PF 23	66
3.1.1.2. Linhagem T ₁	67
3.1.1.3. Nomenclatura de trabalho ..	67
3.1.1.4. Obtenção da linhagem PF 23 cms T rfrf	67
3.2. Métodos	70
3.2.1. Metodologia inicial	70
3.2.1.1. Objetivos	70
3.2.1.2. Métodos de laboratório	71
3.2.1.2.1. Germinação das sementes	71
3.2.1.2.2. Extração da pro- teína total	71
3.2.2. Metodologia de casa-de-vegetação ...	73
3.2.2.1. Objetivos	73
3.2.2.2. Equipamento	73
3.2.2.3. Plano experimental	74
3.2.2.4. Experimentação	75
3.2.2.5. Coleta dos dados	76
3.2.2.6. Análise estatística dos da- dos	77
3.2.3. Metodologia de campo	78
3.2.3.1. Plano de cruzamentos	78
3.2.3.2. Execução dos cruzamentos ..	78
3.2.4. Metodologia de laboratório	79
3.2.4.1. Flavonóides	79
3.2.4.1.1. Extração de fla- vonóides	79
3.2.4.1.2. Análise de fla- vonóides	80

3.2.4.1.3. Análise estatística dos dados .	80
3.2.4.2. Polifenol oxidase	81
3.2.4.2.1. Análise de polifenol oxidase ..	81
3.2.4.2.2. Preparação das amostras	81
3.2.4.2.3. Eletroforese ...	82
3.2.4.3.4. Interpretação gráfica	85
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1. Estudo da sensibilidade das linhagens PF 23 e T ₁ ao inibidor Methomyl	87
4.1.1. Testes de germinação	87
4.2. Estudo do efeito dos inibidores Methomyl e DNP sobre linhagens de milho	94
4.2.1. Aspectos gerais	94
4.2.2. Análise do efeito dos inibidores sobre o desenvolvimento das linhagens.	102
4.2.2.1. Peso de plântulas	102
4.2.2.2. Peso de raízes seminais ...	105
4.2.3. Estudo da inibição da expressão de antocianinas pelo Methomyl	114
4.2.3.1. Aspectos gerais	114
4.2.3.2. Análise das concentrações de antocianinas nas linhagens do grupo PF 23 e do grupo T ₁	121
4.3. Estudo da atividade de polifenol oxidases em linhagens de milho, sob efeito dos inibidores Methomyl e DNP	132

4.4. Uma generalização sobre a integração metabólica em plantas de milho CMS, restauradas e de citoplasma normal, com relação a síntese de flavonóides e atividade de polifenol oxidases	143
4.5. Análise dos cruzamentos realizados entre linhagens do grupo T ₁ com linhagens do grupo PF 23	149
5. CONCLUSÕES	153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
APÊNDICE	168
APÊNDICE I - Análise dos cruzamentos realizados entre linhagens do grupo T ₁ com linhagens do grupo PF 23	169
APÊNDICE II - Apresentação geral dos dados	172

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
01	Taxas de consumo de O_2 /min.mg de prote <u>i</u> na e valores de transmitância de luz em espectrofotômetro	16
02	Frequência de revertentes férteis na <u>li</u> nhagem original dos retrocruzamentos <u>en</u> volvendo a linhagem M825 como paternal recorrente	30
03	Origem dos revertentes férteis apresentados na Tabela 2	31
04	Reação de linhagens de milho nos citoplasmas T, C, S e N, quanto a infecção por <i>H. maydis</i> raça C	39
05	Reação de linhagens de milho nos citoplasmas T, C, S e N quanto a infecção por <i>H. maydis</i> raça T	40
06	Resultados do teste de germinação das linhagens PF 23 e T_1 , na presença de H_2O destilada e Methomyl ($10^{-3}M$)	88
07	Resultados da avaliação do <u>comprimento mē</u> dio de plúmula e de raiz seminal (cm), com base em 5 plântulas	89
08	Valores de absorbância (A_{420}) do sobrenadante oxidado das linhagens PF 23 cms T rfrf, PF 23 cit N rfrf e PF 23 cms T RfRf	92

TABELA Nº

Página

09	Peso de plântulas e peso médio/concentração, das linhagens PF 23 e T ₁ sob efeito de inibidores, em comparação com o desenvolvimento em H ₂ O destilada ...	103
10	Quadro geral da análise da variância para a característica peso de plântulas(g).	104
11	Peso de raízes seminais e peso médio/concentração das linhagens PF 23 e T ₁ , sob efeito de inibidores, em comparação com o desenvolvimento em H ₂ O destilada	106
12	Quadro geral da análise da variância para a característica peso de raízes seminais (g)	107
13	Quadro geral de médias de peso de plântulas, valores de DMS e índices de significância para as linhagens estudadas	110
14	Quadro geral de médias de peso de raiz seminal, valores de DMS e índices de significância para as linhagens estudadas	112
15	Valores médios de absorbância relativos ao teor de antocianinas de raízes seminais	122

TABELA Nº

Página

16	Quadro geral da análise da variância, para os valores de absorbância (A) e absorbância relativa (A/g de raízes) .	123
17	Quadro geral de concentrações de antocianinas (A/g), valores de DMS e índices de significância para as linhagens em estudo (A ₅₂₀ nm)	124
18	Quadro geral de concentrações de antocianinas (A/g), valores de DMS e índices de significância para as linhagens em estudo (A ₅₃₅ nm)	126
19	Quadro geral de concentrações de antocianinas (A/g), valores de DMS e índices de significância para as linhagens em estudo (A ₅₄₅ nm)	128
20	Quadro geral da análise da variância , com estudo completo das interações ...	130
21	Valores do pH do sobrenadante após extração de proteína total de linhagens CMS T e de citoplasma normal	147

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
01	Efeito da toxina de <i>H. maydis</i> raça T sobre o "swelling" e o acoplamento <u>mi</u> tocondrial em linhagens CMS T e citoplasma normal	15
02	Efeito de concentrações de Methomyl <u>so</u> bre a respiração, "swelling" <u>mitocon</u> drial e oxidação de NADH em linhagens de milho CMS T e normal	19
03	Diagrama dos estágios da respiração <u>ce</u> lular	42
04	Esquema representativo das principais funções mitocondriais	43
05	O ciclo do ácido cítrico, com desta- que para a oxidação do succinato a fu- marato	45
06	Cadeia respiratória mitocondrial em <u>mi</u> tocondrias de plantas, indicando o sítio de ligação de inibidores	46
07	Estimulação da respiração por um desa- coplador clássico, na presença de glu- tamato	47
08	Efeito do DCCD em mitocôndrias de mi- lho CMS T e citoplasma normal	50

FIGURA Nº

Página

09	Biossíntese de compostos fenólicos e sua integração na via do ácido shiquímico	52
10	Oxidação do sobrenadante, após a recuperação do precipitado protéico, na presença de Methomyl (M) e H ₂ O (A) ...	91
11	Detalhe dos sobrenadantes oxidados, na presença de Methomyl 10 ⁻³ M	93
12	Vista geral do sistema experimental instalado em casa-de-vegetação	95
13	Linhagens de milho, distribuídas segundo o delineamento experimental adotado, submetidas à concentração 5x10 ⁻⁴ M de Methomyl	97
14	Linhagens de milho, distribuídas segundo o delineamento experimental adotado, submetidas à concentração 10 ⁻³ M de Methomyl	98
15	Linhagens de milho, distribuídas segundo o delineamento experimental adotado, submetidas à concentração 2x10 ⁻³ M de Methomyl	98
16	Montagem demonstrativa dos danos causados à linhagem T ₁ cms T rfrf (à esquerda) e PF 23 cms T rfrf, em comparação às contrapartes citoplasma normal, na presença de Methomyl 10 ⁻³ M	99

FIGURA Nº

Página

17	Bloqueio da expressão de antocianinas em raízes da linhagem PF 23 cms T rfrf e T ₁ cms T rfrf, em comparação com as contrapartes citoplasma normal	100
18	Vista geral da síntese de mucopolissacarídeos, na presença de Methomyl 10 ⁻³ M	100
19	Detalhe do efeito do Methomyl 10 ⁻³ M sobre as linhagens PF 23	101
20	Detalhe do efeito de Methomyl 10 ⁻³ M sobre a linhagem T ₁ cms T rfrf, em comparação com H ₂ O destilada	101
21	Síntese de antocianinas em raízes <u>se</u> minais de plântulas cultivadas em H ₂ O destilada	115
22	Síntese de antocianinas em raízes <u>se</u> minais de plântulas cultivadas em 5x 10 ⁻⁴ M de Methomyl	115
23	Síntese de antocianinas em raízes <u>se</u> minais de plântulas cultivadas em 10 ⁻³ M de Methomyl	116
24	Síntese de antocianinas em raízes <u>se</u> minais de plântulas cultivadas em 2x 10 ⁻³ M de Methomyl	116

FIGURA Nº		Página
25	Síntese de antocianinas em raízes se- minais de plântulas cultivadas em $5 \times 10^{-3} \text{M}$ de Methomyl	117
26	Síntese de antocianinas em raízes se- minais de plântulas cultivadas em 10^{-5} M de DNP	117
27	Síntese de antocianinas em raízes se- minais de plântulas cultivadas em 10^{-4} M de DNP	118
28	Eletroforese de PPO em gel de polia- crilamida	134
29	Eletroforese de PPO em gel de polia- crilamida	135
30	Eletroforese de PPO em gel de polia- crilamida	136
31	Eletroforese de PPO em gel de polia- crilamida	137
32	Eletroforese de PPO em gel de polia- crilamida	138
33	Aspecto das lesões provocadas pelo patógeno em colmos de linhagens de <u>mi</u> lho CMS T	151

FIGURA Nº

Página

34	Aspecto das lesões provocadas pelo patógeno em folhas e bainhas foliares de milho CMS T	151
35	Aspecto das lesões provocadas pelo patógeno em espigas de milho CMS T	152

PLEIOTROPIA DO GENE NUCLEAR Rf_1 NO SISTEMA DE ESTERILIDADE
CITOPLASMÁTICA TEXAS EM MILHO (*Zea mays* L.)
NA SÍNTESE DE ANTOCIANINAS

Autor: JOAQUIM A. MACHADO

Orientador: Prof. Dr. JOÃO R. ZINSKY

RESUMO

Os sistemas de esterilidade citoplasmática em milho (Texas, USDA e Charrua) apresentam, além de sua utilidade em métodos de produção de sementes híbridas, a oportunidade de um estudo de caráter fisiológico e molecular não muito frequente em plantas superiores.

Com o objetivo de realizar um estudo integrado do sistema Texas, envolvendo: o comportamento de linhagens de milho estéreis, restauradas e de citoplasma normal frente a um análogo da toxina de *Drechslera maydis* (Nisikado) Subram. e Jain *Helminthosporium maydis* (Nisikado), raça T e a um desacoplador da ATPase mitocondrial; o efeito regulatório da expressão de flavonóides em sistemas de esterilidade citoplasmática exercido pelo gene nuclear Rf_1 , restaurador da fertilidade; e a ativação de polifenol oxidases (PPO) em plantas do sistema Texas em interação com um patógeno específico, dois grupos de linhagens foram submetidos a ação do carbamato Methomyl (análogo da toxina de *Helminthosporium maydis*, raça T) e ao 2,4-dinitrofenol (desacoplador clássico

da ATPase), num ensaio com delineamento estatístico, avaliando-se o crescimento de plântulas, a síntese de antocianinas e a atividade de polifenol oxidases.

O crescimento de plântulas foi avaliado como peso fresco de plântulas e peso fresco de raízes seminais. A concentração de antocianinas foi avaliada como absorbância/g de tecido radicular, após extração com solvente apropriado, com leitura espectrofotométrica em três comprimentos de onda (520, 535 e 545 nm), correspondentes a três tipos de antocianinas. A análise de polifenol oxidases foi realizada em eletroforese de gel de poliacrilamida, revelada por oxidação de DOPA.

Os resultados obtidos indicaram existir um efeito pleiotrópico do gene nuclear Rf_1 , expresso pela presença de antocianinas em plântulas cms T (Rf_1) sob efeito do Methomyl, em comparação com a ausência de antocianinas observada em plantas cms T (rf_1). Este fenômeno pode ser atribuído a: (1) desvio da síntese de antocianinas, mediado pela PPO, originando fenóis ativos contra a agressão ao metabolismo celular; (2) bloqueio (pelo Methomyl) da síntese de antocianinas, por inibição de passo metabólico da cadeia respiratória, com ativação de metabolismo alternativo mediado pela PPO e (3) alteração estrutural das antocianinas (com descoloração), devido a elevação do pH do meio celular, por interferência no equilíbrio protônico provocado pelo Methomyl.

As conclusões apresentadas contribuíram para a compreensão sobre alguns sítios de atuação do produto gênico de Rf_1 .

PLEIOTROPY OF Rf_1 NUCLEAR GENE IN THE TEXAS MALE-STERILITY
SYSTEM ON MAIZE (*Zea mays* L.) ON ANTHOCYANIN SYNTHESIS

Author: JOAQUIM A. MACHADO

Adviser: Prof. Dr. JOÃO R. ZINSLY

SUMMARY

The cytoplasmic male-sterility systems in maize (Texas, USDA and Charrua) show, besides its utility on hybrid seed production techniques, an opportunity to examine physiological and molecular aspects, occasional in higher plants.

With the aim to realize an integrated study about the Texas system, involving: comportment of sterile, restored and normal cytoplasm maize lines under a T toxin analogous and an ATPase uncoupler; regulatory effect of flavonoid expression in male-sterility systems by the Rf_1 nuclear gene, a restorer one; and the polyphenol oxidases (PPO) activation in T system-plants with specific - pathogen interaction, two sets of maize lines were submitted to the action of Methomyl (T toxin analagous) and 2,4-dinitrophenol (classic ATPase uncoupler), in statistical experimental procedures, to evaluate seedling growing, anthocyanin synthesis and PPO activity.

The seedling growth was evaluated as total and seminal root fresh weight. The anthocyanin titres were

evaluated as absorbancy/g.FW, after solvent extraction, by spectrophotometric analysis at three wave lengths (520, 535, 545 nm) corresponding to three anthocyanin types. The PPO analysis procedure involved polyacrilamide gel electrophoresis, developed by DOPA oxidation.

The results allow a pleiotropic effect from Rf_1 nuclear gene, registered by anthocyanin pigmentation in cms T (Rf_1) seedlings under Methomyl effect, in comparison with the anthocyanin less aspect in cms T (rf_1) seedlings. The phenomenon can be assignable to: (1) deviate anthocyanin synthesis, mediated by PPO, generating active phenols against the aggression to celular metabolism; (2) blocking of anthocyanin synthesis by Methomyl, through a metabolic step inhibition in the respiratory chain, with alternative activation mediated by PPO, and (3) structural changes in anthocyanin molecules (with bleaching), assignable to pH increase in the cytoplasm, due to a proton balance intervention, stimulated by Methomyl.

The conclusions presented contribute to understanding some Rf_1 gene product site action.

1. INTRODUÇÃO

As razões exatas pelas quais o fenômeno da macho-esterilidade citoplasmática (CMS) distribui-se amplamente no reino vegetal são desconhecidas. Embora de indiscutível importância na produção de cultivares híbridas, os geneticistas muito mais utilizaram de forma lógica o fenômeno, do que induziram sua generalidade. Entretanto, ao contrário de outros fenótipos controlados pelo citoplasma, quase sempre não tão amplamente distribuídos, a compreensão dos sistemas CMS proporciona informações fundamentais sobre o papel dos genomas citoplasmáticos no desenvolvimento, uma vez que espécies vegetais parecem utilizar o fenômeno de forma a interferir no processo evolutivo.

A recente viabilização de estudos bioquímicos e moleculares permitiu a compreensão detalhada sobre a fisiologia e a genética dos sistemas CMS, principalmente em milho (*Zea mays* L.), dado o amplo conhecimento acumulado sobre a genética da espécie. O fenômeno é, caracteristicamente, um caso de interação nucleoplasmática, desde que a organela envolvida é a mitocôndria.

A função mitocondrial na fosforilação oxidativa é comum a todos os sistemas eucarióticos. É grande, entretanto, a diversidade do genoma mitocondrial de plantas, animais, fungos e protozoários. Nesses sistemas, as funções mitocondriais básicas são conservadas, variando o tamanho e a estrutura dos genes mitocondriais nos diferentes sistemas.

De acordo com a moderna abordagem em pesquisa biológica, caracterizar parte da complexidade envolvida nessa interação núcleo-citoplasmática implica a compreensão sobre como acontece o trânsito de mensagens informacionais moleculares entre núcleo e citoplasma, ou seja, sobre como o núcleo produz informações para o citoplasma, monitorando eventos localizados em pontos próximos ou remotos do sistema celular, além de realizar um sensoramento dos eventos em todo o sistema. Dessa forma são definidos no trânsito de informações biológicas.

A função dos genomas nucleares restauradores da microsporogênese íntegra (Rf) é compreendida apenas superficialmente. Dela conhece-se mais a classificação em grupos de restauração, os quais caracterizam os sistemas de esterilidade atualmente conhecidos, dada a especificidade citoplasmática com que atuam; estima-se a importância de genes modificadores na eficiência da restauração o que, associado a observação da influência ambiental no fenômeno, leva a uma classificação empírica em "classes" de restauração da ferti-

lidade; recentemente, surgem os primeiros indícios sobre o produto gênico de Rf e sua atuação no metabolismo celular.

Ao sistema Texas (T) de esterilidade citoplasmática em milho coube exercer importante papel no estudo desse ramo da Biologia Vegetal, dada sua inicialmente ampla utilização agrônômica, depois a especificidade patogênica da raça T de *Drechslera maydis* (Nisikado) Subram. e Jain (*Helminthosporium maydis* (Nisikado)). A epidemia originou grande volume de estudos sobre a especificidade da pato-toxina à fisiologia mitocondrial, no que tange ao comportamento inibidor e desacoplador da mesma na cadeia respiratória e fosforilação oxidativa. Em 1975, a descoberta de que o inseticida Methomyl apresentava comportamento análogo a toxina fúngica permitiu ampliar os estudos sobre a interação toxina-organela.

Embora bastante estudada geneticamente, a biossíntese de fenóis em milho raramente tem sido associada com uma interação núcleo-citoplasmática específica. Assim, é interessante analisar o comportamento de linhagens de milho no sistema Texas, envolvendo: a síntese de compostos fenólicos, especialmente antocianinas; um efeito pleiotrópico de Rf₁, o principal gene regulador da restauração da fertilidade nesse sistema; e a função das polifenol-oxidases em um caso clássico de relações patógeno-hospedeiro com interação núcleo-citoplasmática.

São Objetivos deste trabalho:

- Verificar a interferência de um análogo da toxina T na síntese de antocianinas em raízes seminais de linhagens de milho, no sistema de esterilidade citoplasmática Texas.

- Verificar o efeito pleiotrópico do gene nuclear Rf_1 , expresso pela regulação da expressão de antocianinas, propondo hipóteses sobre o mecanismo dessa regulação.

- Estabelecer parâmetros de comparação entre o efeito do Methomyl e de um desacoplador clássico da fosforilação oxidativa (2,4-Dinitrofenol) na expressão de antocianina.

- Verificar o comportamento de poli-fenol oxidase (PPO) em sistemas de esterilidade citoplasmática com interação patógeno-hospedeiro.

- Verificar a diversidade de expressão fenotípica de PPO em diferentes genótipos.

- Propor uma generalização sobre as relações patógeno-hospedeiro envolvendo a síntese de compostos fenólicos e a atuação da PPO, num caso de interação núcleo-citoplasmática em milho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A interação entre o núcleo e a organela citoplasmática certamente ocorre em vários níveis. Em sua expressão máxima, o controle nuclear da atividade da organela é efetuado por genes nucleares que codificam para componentes estruturais das mesmas. Essa organização segmentada também estende-se a moléculas especiais. Como exemplo, a citocromo C oxidase, composta por uma combinação de proteínas codificadas pelo núcleo e pela mitocôndria.

DICKINSON (1987) afirma que a evolução desses sistemas genéticos híbridos é dificilmente explicável, formando um dos principais argumentos contra a teoria endosimbionte da evolução organelar. Entretanto, demonstra-se que a troca e transferência de seqüências de DNA ocorre entre o núcleo, as mitocôndrias e os cloroplastos. FARRELLY & BUTOW (1983), entre outros, demonstraram que seqüências nucleares aparentemente homólogas ao DNA mitocondrial epissômico podem ser identificadas em milho. O mesmo ocorre entre seqüências nucleares e de plastídeos (SCOTT & TIMMIS, 1984), em fungos (WRIGHT & CUMMINGS, 1983) e animais (HADLER, DIMITRIJEVIC &

MAHALINGHAM, 1983). Assim, a teoria endosimbionte de GRAY & DOOLITTLE (1982) acumula evidências, embora restem dúvidas sobre os mecanismos moleculares pelos quais essas sequências são realocadas.

2.1. ESTERILIDADE CITOPLASMÁTICA EM VEGETAIS

As teorias sobre a herança citoplasmática são praticamente contemporâneas ao surgimento da genética. Assim, Correns em 1904 e Bateson e Gardner em 1921 descreveram fenômenos depois atribuídos a esterilidade citoplasmática.

A primeira manipulação de genes e citoplasma com o objetivo de obter um método de cruzamento em plantas foi desenvolvido por Jones, trabalhando em esterilidade citoplasmática em *Allium*. O autor demonstrou que um gene recessivo (ms), quando homozigoto e combinado com um determinado tipo de citoplasma (S) gerava planta macho-estéreis. O mesmo gene em citoplasma normal (N) não provocava nenhum bloqueio na liberação de pólen. Foi então possível obter linhagens férteis, mantidas em homozigose por autofecundação, utilizadas como polinizadoras das linhagens estéreis. Na dependência do genótipo do polinizador, o híbrido poderia ser fértil ou estéril.

A interação núcleo-citoplasmática que caracteriza o fenômeno, quando descrita em detalhes, como os de

sub-grupos de citoplasmas estéreis, número de genes restauradores da fertilidade necessários em cada caso, resposta a variações ambientais e influência de genes modificadores, permite a proposição de se atribuir o termo "sistema" a esse tipo de fenômeno biológico. Assim é que sistemas de esterilidade citoplasmática tem sido detectados em muitas espécies vegetais. PEARSON (1981) em revisão objetiva, comenta as características dos principais sistemas existentes, com ênfase para o milho, arroz, beterraba e brássicas. HANSON & CONDE (1985) apresentam extensa revisão sobre sistemas de esterilidade citoplasmática em *Petunia*, *Zea*, *Sorghum*, *Nicotiana*, *Vicia*, *Helianthus* e *Beta*. Os autores comentam que até que se compreenda as bases moleculares da interação núcleo-citoplasmática que rege o fenômeno não se poderá saber por que a macho-esterilidade é um fenômeno comum de incompatibilidade núcleo-citoplasmática. Como hipóteses, propõem que a microsporogênese pode representar um caso particularmente delicado de desenvolvimento, facilmente perturbado; o desenvolvimento floral poderia ser um raro caso de função dispensável, ao passo que outros tipos de interação núcleo-organelas são letais ou muito sutis para serem detectadas fenotipicamente.

FRANKELL & GALUN (1977) discorrem sobre a descoberta de sistemas de esterilidade citoplasmática, que surgem de cruzamentos interespecíficos. Este fenômeno pode levar a hipótese de que CMS resulta da incompatibilidade entre

o genoma nuclear de uma espécie e o citoplasma de outra. O fenômeno aparece quando uma espécie selvagem é utilizada como parental feminino em cruzamento com uma espécie cultivada. O híbrido oriundo desse cruzamento pode ou não ser completamente fértil; no último caso, a esterilidade resulta de aberrações cromossômicas e meióticas não relacionadas a CMS. Se o híbrido F1 não é completamente estéril, a cultivar pode ser utilizada como parental masculino em gerações sucessivas. Como genes nucleares da parental selvagem são eliminados em gerações avançadas, surgem plantas CMS na população. Entretanto, o fenômeno da esterilidade citoplasmática tem sido detectado também em sistemas autoplasmáticos, por mudanças no genoma de uma espécie ou cultivar.

HANSON & CONDE (1985) comentam que na maioria dos casos classificados de CMS são encontrados genes nucleares restauradores. Tais genes podem ser encontrados na espécie ou população originalmente doadora do citoplasma ou então em populações ou espécies relacionadas. Tem sido encontrados sistemas restauradores nucleares monogênicos e poligênicos, além de recessivos ou dominantes. GRUN, 1976, citado pelos autores, realizou um interessante levantamento mostrando que 80% dos sistemas CMS derivados de cruzamentos intra-específicos possuem restauradores recessivos enquanto apenas 40% dos sistemas CMS inter-específicos ou inter-genéricos possuem o mesmo tipo de restauradores.

Os genes restauradores são utilizados por ge-

neticistas para distinguir citoplasmas, utilizando cruzamentos com linhagens específicas. Assim, dois citoplasmas são considerados idênticos se um mesmo restaurador afeta o fenótipo do híbrido da mesma maneira. Recentemente, as pesquisas realizadas por Levings e colaboradores, na Carolina do Norte (EUA) e Leaver, em Edinburgo (Escócia), na análise molecular da esterilidade citoplasmática, trazem maiores esclarecimentos sobre o papel dos genes restauradores na interação núcleo-citoplasmática ligada a CMS em milho.

2.2. ESTERILIDADE CITOPLASMÁTICA EM MILHO

A medida em que os estudos de biologia molecular da esterilidade citoplasmática avançam, mais interessante se torna examinar as nuances de cada sistema CMS em milho. Esta espécie não foi a primeira na qual CMS foi descrito; entretanto, a utilidade do fenômeno na produção de sementes de milho híbrido, o grau de conhecimento da genética da espécie e o número de pesquisadores envolvidos no assunto fazem de *Zea mays* L. a espécie com maior volume de estudos em CMS. Dessa forma, serão comentadas as características principais dos sistemas CMS em milho, segundo uma abordagem clássica; posteriormente, cada sistema será apresentado segundo as recentes descobertas da biologia molecular.

2.2.1. Classificação e características dos sistemas CMS em milho

Existem quarenta ou mais fontes de esterilidade de citoplasmática em milho, classificadas em três sistemas principais por meio de reações diferenciais à restauração da fertilidade. DUVICK (1965), BECKETT (1971) e GRACEN et alii (1974) apresentam excelentes revisões sobre o assunto.

GRACEN (1982) sumariza os principais sistemas CMS em milho:

* O sistema T (Texas) inclui os citoplasmas T, P, Q, HA, RS e SC. Todos representam fontes relativamente estáveis de CMS. A restauração da fertilidade nesse sistema foi bastante estudada, sendo designados dois genes Rf_1 e Rf_2 os quais devem estar presentes para a restauração completa da fertilidade no citoplasma T. Há relatos sobre a necessidade de um ou mais genes modificadores para assegurar a fertilidade completa. DUVICK et alii (1961) realizaram o mapeamento do gene Rf_1 , locando-o no cromossomo 3, segundo o esquema:

$$d_1 - 27 - Rf_1 - II - ta_4 - 24 - lg_2$$

O gene Rf_2 foi locado no cromossomo 9 por SNYDER & DUVICK (1969). Conquanto seja afirmado que Rf_2 está presente na forma homozigota dominante na maioria das linhagens de milho nos EUA, ao passo que Rf_1 é recessivo homozigoto, pouco se

sabe sobre a forma de ocorrência de Rf_2 em milhos tropicais. DRUMMOND (1988, Informação Pessoal), em seus trabalhos de incorporação do sistema T de esterilidade (CMS T) em diversas linhagens de milho, admitiu como válida a assertiva de DUVICK et alii (1961) sobre o gene Rf_2 . Todos os subgrupos citoplasmáticos no sistema Texas são susceptíveis à raça T de *Drechslera maydis* (*Helminthosporium maydis*).

WARMKE & LEE (1977, 1978) e LEE et alii (1980) apresentam estudos histológicos e citoplasmáticos detalhados sobre o aborto de grãos de pólen em linhagens de milho CMS T.

* O sistema S (USDA) de esterilidade citoplasmática contém a maioria das fontes CMS. Parece ser também o sistema que apresenta maior variação na expressão da fertilidade/esterilidade, em relação a presença de gene restaurador, em função de variações ambientais. Durante muito tempo, essa característica representou uma limitação no uso em produção de sementes, sem que se soubesse as causas reais da instabilidade do sistema. Tais causas serão comentadas no detalhamento molecular.

A restauração da fertilidade no sistema S é fundamentalmente diferente do sistema T. Nesse último, a restauração é determinada pelo genótipo restaurador da planta feminina. Plantas heterozigotas para genes Rf no citoplasma T produzem todas as pólen normal devido ao fato de que o genótipo do tecido esporofítico (Rf/rf) é que determina a restauração. Grãos de pólen portadores de Rf ou rf são igualmente

te férteis. Ao contrário, no sistema S, plantas heterozigotas para Rf no citoplasma S produzem grãos de pólen viáveis (aqueles com Rf) e abortados (aqueles com rf) na proporção 1:1.

* O sistema C de esterilidade citoplasmática foi descoberto e estudado por Gladstone A. Drummond e José A. de Mattos, geneticistas da empresa Sementes Agrocere S.A., numa variedade de milho denominada Charrua. Originalmente, o sistema C continha apenas as fontes C e RB. Mais tarde foram classificados no sistema C as fontes ES (El Salvador), Bb e PR (Paraná). Outras fontes, Cuarenteros, Italy IB, IR-1, IR-2, IR-3 e Pl necessitam ainda de uma melhor classificação para que se afirme pertencentes ao sistema C. Todas essas fontes são relativamente estáveis; entretanto algumas combinações exibem restauração tardia, em torno de 5-10 dias pós-florescimento feminino.

O mecanismo de restauração é similar ao do sistema T. Embora haja relatos sobre o envolvimento de três ou mais genes Rf (Rf4, Rf5 e Rf6) na restauração da fertilidade, assume-se que a restauração é controlada por um único gene dominante (Rf4).

A eficiência da classificação dos sistemas CMS em milho "via" reações diferenciais aos genes restauradores da fertilidade pode ser comprovada verificando-se o estudo realizado por KONCZ et alii (1980). Os autores classificaram diversos citoplasmas estéreis utilizando análise de fragmen-

tos de restrição do DNA mitocondrial, utilizando também técnicas citológicas de análise da microsporogênese. A classificação obtida pelos dois procedimentos foi idêntica à obtida por BECKETT (1971).

2.2.2. O sistema Texas de esterilidade citoplasmática

O uso do sistema Texas de esterilidade citoplasmática na produção de sementes de milho híbrido estendeu-se a 90% nos EUA (ULLSTRUP, 1972) e a 50% no Brasil (DRUMMOND, Informação Pessoal) por volta de 1970. Nesse ano, nos EUA, a raça T do ascomiceto *Helminthosporium maydis* provocou uma epidemia de requeima do milho (Southern Corn Leaf Blight). Uma excelente análise agronômica e fitopatológica dessa epidemia pode ser encontrada nos trabalhos de ULLSTRUP, 1972; MOORE, 1972; CAMPBELL, 1972; HYRE, 1972 e MILLER, 1972.

LAUGHNAN *et alii* (1982) mencionam que vários estudos realizados na época logo comprovaram a especificidade do patógeno a plantas estéreis do sistema Texas. WHEELER *et alii* (1971) demonstraram que a toxina isolada do *H. maydis* raça T inibia o crescimento de raízes primárias de plantas de milho portadoras de citoplasma macho-estéril Texas. LAUGHNAN *et alii* (1982) relatam também, fato interessante na época e desafiador de novos estudos hoje, que a toxina inibia a germinação e o crescimento do tubo polínico de plan-

tas CMS em concentrações que não provocavam o mesmo efeito em plantas estéreis do sistema, Ce S. Obviamente o trabalho citado incorre em falha de redação, desde que plantas portadoras de citoplasma estéril, por princípio, não produzem pólen. Os autores referem-se, portanto, a planta CMS T portadora do gene nuclear Rf. Essa observação, associada a lesões verificadas nas folhas, bainha de folhas e nas espigas de tais plantas implicam, atualmente, algumas inferências sobre o mecanismo molecular da restauração da fertilidade e sobre o produto gênico de Rf.

MILLER & KOEPPE (1971), num estudo decisivo para o rumo que o estudo da interação nucleo-citoplasmática em vegetais tomou hoje, demonstraram que mitocôndrias isoladas de plântulas de milho CMS T e mantidas acopladas "in vitro" (com cadeia respiratória e fosforilação oxidativa íntegras), mostraram, na presença da toxina patogênica, alterações drásticas nas taxas respiratórias e de fosforilação oxidativa, além de exibir, em preparações microscópicas, um aspecto expandido ("swelling"). A Figura 1 mostra a curva típica de consumo de O_2 por mitocôndrias e o efeito da toxina.

É interessante observar a mudança na inflexão da curva de transmitância, na linhagem susceptível, indicando o "swelling" mitocondrial. Os autores comentam também a mudança nas taxas de respiração após a adição da toxina, na linhagem susceptível, dependendo do substrato fornecido para a oxidação. Assim, a taxa de oxidação de malato-piruvato é

Figura 1. Efeito da toxina de *H. maydis* raça T sobre o "swelling" e o acoplamento mitocondrial em linhagens QMS T e citoplasma normal. Linha tracejada (consumo de O₂ em nM O₂.min⁻¹) e linha cheia (%T). MILLER & KOEPPE, 1971.

reduzida e a de succinato aumentada. Nota-se também que a mitocôndria não responde ao ADP incorporado após a adição da toxina. Embora os autores não façam conjecturas sobre as consequências desse decréscimo na oxidação de malato-piruvato, o fenômeno é digno de atenção para embasar conclusões no presente trabalho. A Tabela 1 demonstra as taxas de consumo de O_2 por minuto por miligrama de proteína, medidas com eletrodo de Clark, sendo a transmitância de luz registrada em espectrofotômetro.

Tabela 1. Taxas de O_2 consumido .

Patotoxina (ml)	Taxa de Consumo de O_2 ($mM.m^{-1}.mg^{-1}$)		Inibição %	AT (%)
	antes	depois		
0	53	52	0	0,2
0,001	43	43	0	0,6
0,005	46	21	54	6,3
0,01	43	11	75	7,4
0,05	53	11	80	9,2
0,10	50	18	64	10,1
0,20	39	11	73	-

BOUTHYETTE *et alii* (1985) realizaram um importante estudo sobre a interação mitocondrial com a toxina pa-

togênica, estudando o bloqueio por dicyclohexylcarbodiimide, (DCCD) um inibidor da ATPase mitocondrial em animais e plantas. Os autores mencionam a caracterização da toxina patogênica como constituindo uma série de C35 a C45 moléculas "polyketol". A fórmula empírica do componente principal é $C_{41}H_{68}O_{13}$ (768D). Os efeitos da toxina incluem o desacoplamento da fosforilação oxidativa, o estímulo da respiração de NADH e succinato, inibição da respiração do malato e o estímulo do "swelling" mitocondrial. Esses efeitos múltiplos podem ser explicados com base na permeabilidade alterada da membrana mitocondrial a pequenas moléculas e íons, provocada por uma toxina muito ativa (tóxica a 10^{-8} - 10^{-9} M) num sítio único. A sensibilidade do controle respiratório sobre os substratos mencionados indica que o sítio primário de acoplamento da toxina pode ser o mecanismo de fosforilação oxidativa (complexo da ATPase mitocondrial), fato evidenciado pela competição do DCCD pelo mesmo sítio, resultando em redução do "swelling" mitocondrial induzido pela toxina T, o que será detalhado em outro item.

WATRUD et alii (1975) relatam os efeitos dos genes nucleares Rf₁ e Rf₂ na resposta de linhagens CMS T ao patógeno, mencionando que a restauração da fertilidade "modifica a intensidade dos efeitos da toxina em folhas, raízes ou mitocôndrias isoladas, não detalhando os possíveis mecanismos bioquímicos pelos quais isso aconteça. KIMBER & SZE (1984) demonstram a redução no transporte de cálcio em mito-

côndrias isoladas de linhagens CMS T, na presença da toxina. Sugerem que a toxina inibe a formação ou então dissipa o gradiente eletroquímico gerado pelo transporte de eletrons (cadeia respiratória) ou pela ATPase mitocondrial. KLEIN & KOEPPE (1985) sugerem que a toxina desacopla as mitocôndrias isoladas de plantas CMS T pela diminuição da resistência da membrana mitocondrial interna a extrusão de prótons. Ao contrário, entretanto, de agentes protonóforos e ionóforos clássicos, a toxina T induz "swelling" irreversível. Através da ligação específica da toxina com um determinado sítio na membrana, a estrutura ou a distribuição topográfica protéica pode ser alterada de modo a originar poros hidrofílicos que contribuem para a redução da resistência a extrusão de prótons e para a perda da regulação osmótica.

Em 1974 e 1975, foi verificado, nos EUA, que plantas de milho CMS T eram sensíveis ao inseticida carbamato Methomyl (S-methyl-N- (methyl carbamoyl)oxy thyoacetimidate). As lesões provocadas eram similares aquelas devidas a raça T. HUMAYDAN & SCOTT (1977) realizaram vários testes demonstrando a eficiência do carbamato em provocar lesões. KOEPPE et alii (1978), trabalhando com mitocôndrias isoladas de plantas CMS T demonstraram a similaridade da ação do inseticida com a toxina T, conforme se observa na Figura 2. Os autores sugerem então a utilização desse análogo da toxina T em estudos sobre CMS T, dada a facilidade de obtenção do produto e a relativa simplicidade estrutural do mesmo, o que

Figura 2. Efeito de concentrações de Methomyl sobre a respiração, "swelling" mitocondrial e oxidação de NADH em linhagens de milho CMST e normal. Linha cheia: consumo de O₂ em nm O₂.mm⁻¹ e linha pontilhada, %T.

facilita eventual marcação radioativa. Ensaios subsequentes determinaram como sendo 10^{-3} M a dose eficaz em provocar lesões na membrana mitocondrial. Fica evidente que a toxina T é atuante em doses muito mais reduzidas. A pesquisa que detectou a dose eficaz do carbamato não menciona o efeito de doses abaixo ou acima da mesma sobre as mitocôndrias, efeito interessante detectado por este estudo. Entretanto, analisando o efeito de doses de Methomyl (0,3 μ M, 1 μ M e 3 μ M) sobre cultura de tecidos de híbridos de milho com citoplasma T, TORNE & BERVILLE (1985) registram que:

"El momento de la diferenciación de los callos (em DM-1 y DM-2) fué un período crítico, pues pocas plántulas formaron un buen sistema radicular. Hemos observado que las ramas em antocianos no llegaron a desarrollarse totalmente (43%)".

Embora os autores não tenham registrado nenhuma inferência sobre a relação entre plantas estéreis no sistema T, a síntese de compostos fenólicos e a ação do análogo da Toxina T, trata-se do primeiro relato em literatura científica. O texto transcrito mereceu atenção na fase experimental deste trabalho, quando, devido a inadequação do aparato experimental inicialmente desenvolvido, modificou-se a metodologia, fato que gerou observações inéditas do comportamento do material biológico, gerando uma das hipóteses ensaiadas.

No estudo dos efeitos da toxina T sobre mitocôndrias de milhos estéreis T, merece atenção a revisão realizada por EARLE (1982). Nela são relatados estudos mostrando que o "swelling", a disrupção das cristas mitocondriais e a lixiviação da matriz podem ser detectados apenas cinco minutos após a aplicação da toxina; em torno de sessenta minutos, todas as mitocôndrias mostram-se severamente lesadas. O autor comenta ainda que efeitos comparáveis são observados nas primeiras fases do aborto dos grãos de pólen em plantas estéreis T, o que não ocorre nos sistemas C e S, reportando-se a FLAVELL (1974) que lançou a hipótese de que durante a microsporogênese em plantas do sistema T, uma substância análoga a toxina T ("anther toxin") é produzida, sendo responsável pelo aborto dos grãos de pólen.

A virulência e a especificidade da raça T de *Helminthosporium maydis* sobre o sistema CMS T despertaram uma intensa atividade de pesquisa em fisiologia e genética da esterilidade citoplasmática. Simultaneamente a detecção da mitocôndria como organela-alvo para a toxina patogênica, desenvolvia-se a genética molecular aplicada ao DNA de cloroplastos e mitocôndrias, em associação com a análise do DNA nuclear. SHAH & LEVINGS (1973) procuraram caracterizar o DNA nuclear e de cloroplastos de um híbrido de milho com citoplasma normal e um outro com CMS T. A análise limitou-se a determinar a temperatura de denaturação (T_m), a densidade (ρ) e o conteúdo G+C dos dois tipos de DNA. Evidenciando a

"velocidade" das descobertas na área de genética molecular, desde que o co-autor do estudo (C.S. LEVINGS III) é, atualmente um dos principais pesquisadores em genética molecular da esterilidade citoplasmática, os autores concluíram que "os valores densitométricos do DNA dos cloroplastos não diferem conforme o tipo de citoplasma analisado (normal e Texas), não explicando portanto as diferenças citoplasmáticas. O estudo caracteriza os recursos para análise molecular do genoma na quela época.

Com o impulso verificado na aplicação da técnica de cultura de embriões imaturos na espécie *Zea mays* L., GENGENBACH & GREEN (1975) estudaram o efeito da toxina T sobre calli de milhos estéreis T, obtendo clones tolerantes a até 4% de toxina T. A análise das funções mitocondriais básicas mostrou que as organelas dos clones celulares tolerantes eram mantidas em níveis semelhantes aquelas de mitocôndrias de clones citoplasma-normal. Os autores não relatam a obtenção de plantas regeneradas.

LEVINGS (1976) estudou o padrão de restrição do DNA, mitocondrial (mtDNA) de linhagens de milho estéreis T e com citoplasma normal, utilizando Hind III (enzima de restrição dIII de *Hemophilus influenzae*), encontrando padrões eletroforéticos distintos. O autor sugere que tais diferenças são responsáveis pelo fenômeno CMS, evidenciando sua localização no DNA mitocondrial.

GENGENBACH et alii (1977) conseguiram obter

plantas regeneradas a partir de clones celulares tolerantes a toxina T de *H. maydis*. Tais plantas mostraram-se também tolerantes aos efeitos da inoculação pelo fungo patogênico, e, no florescimento, apresentaram microsporogênese normal. A importância desse estudo reside na evidência da ligação estreita entre os dois fenótipos.

A evolução da análise molecular permitiu a FORDE et alii (1978) estudar a síntese protéica mitocondrial "in vitro", na presença de ADP e um substrato oxidável (succinato). Foi possível detectar, por análise eletroforética SDS em gel de acrilamida, a presença de vinte polipeptídeos. As mitocôndrias de plantas CMS T e CMS C caracterizam-se pela síntese de um polipeptídeo adicional ou "variante", quando comparadas com mitocôndrias de plantas CMS S ou de citoplasma normal. O polipeptídeo característico de CMS T apresentava PM = 13.000 e o de CMS C, PM = 16.000. A síntese desses polipeptídeos não foi influenciada pelo genoma nuclear das três linhagens mantenedoras (cit N rfrf) testadas. Os autores mencionam, pela primeira vez, a possibilidade de que a proteína 13.000 seja alvo de ligação ("binding site") para a toxina T.

Num estudo bastante elucidativo, pela elegância da hipótese apresentada, FORDE et alii (1980) utilizaram linhagens CMS T diferindo apenas pela presença ou ausência do gene nuclear Rf₁ (restaurador) responsável pela recuperação da fertilidade masculina. A análise da síntese protéica

mitocondrial "in vitro" sugeriu que o alelo restaurador suprime a síntese do polipeptídeo adicional 13.000. Por seu turno, a proteína 21.000, sintetizada por mitocôndrias de linhagens cit N não foi detectada entre os produtos de síntese de mitocôndrias CMS T, tanto em linhas restauradas como não-restauradas. Os autores afirmam ser o gene Rf_1 o responsável pela regulação da síntese da proteína 13.000. A análise eletroforética mostra, entretanto, que o gene Rf_1 suprime apenas parcialmente a síntese da proteína 13.000, o que é mais claramente afirmado no trabalho de GENGENBACH et alii (1981). O estudo em discussão mostra também que os autores verificaram o efeito da restauração sobre a síntese da proteína 17.500, característica de CMS C. Em contraste com o observado em CMS T, não se notou nenhum efeito aparente do alelo restaurador na síntese do polipeptídeo variante. Sugere-se possíveis mecanismos para a regulação da síntese do polipeptídeo 13.000:

- a) Interação direta entre o produto gênico de Rf_1 e o sistema de síntese protéica mitocondrial;
- b) Efeito indireto, operando "via" mudanças na concentração de uma molécula efetora.

A evidência da "regulação" da síntese da proteína 13.000 por Rf_1 levou ECHEVERRIGARAY (1985, Informação pessoal) a propor o mecanismo de supressão gênica por tRNA para explicar o fenômeno. Tal hipótese deve assumir que um

tRNA nuclear possa ser admitido no sistema de síntese proteica mitocondrial, suprimindo uma mutação do tipo ponto final de leitura, fenômeno sugerido quando se compara a proteína 21.000 (citoplasma normal) com a 13.000 (CMS T). Tal hipótese é adequada à observação sobre a supressão parcial da síntese do polipeptídeo variante, embora deva admitir restrições atribuíveis a extrema complexidade da replicação do genoma mitocondrial (SEDEROFF, 1984). Excelentes revisões sobre a organização e a expressão do genoma mitocondrial em plantas são apresentadas por LEAVER (1982), HANSON & CONDE (1985) e principalmente a de PRING & LONSDALE (1985), excelente no detalhamento da análise molecular do mtDNA de CMS S.

A evidência de que tanto a toxina T quanto seu análogo Methomyl atuam também como desacopladores da fosforilação oxidativa, bem como indicações de que a proteína 13.000 pertence ao complexo da ATPase mitocondrial (BOUTHYETTE et alii, 1985), geraram vários estudos de sequenciamento de genes que codificam subunidades da enzima, mormente os de BRAUN & LEVINGS (1985) e DEWEY et alii (1985), analisando, respectivamente, o gene da F_1 -ATPase α (atp α , segundo a recente nomenclatura genômica mitocondrial proposta por LEAVER, 1987) e o gene da ATPase - subunidade 6 (atp 6). Tais estudos restringiram-se a aspectos básicos sobre a origem, recombinação e homologia dos genes.

Entretanto, DEWEY et alii (1986) conseguiram isolar e caracterizar um fragmento de CMST-mtDNA, denomina-

do TURF-2H3, presumivelmente originário de uma série de recombinações dentro e entre os genomas da mitocôndria e do cloroplasto. A organização do DNA em TURF 2H3 é específica de CMS T, sendo parte de um fragmento transcrito unicamente em sistemas T. A sequência contém dois ORF (Open Reading Frames) que codificariam proteínas 12961 e 24675 (portanto, a 13.000 e a 25.000 discutidas anteriormente). As evidências indicam que TURF 2H3 é parte de um fragmento de 6,6 Kb (1 kilobase = 1000 pares de bases) cuja alteração está associada com a reversão à fertilidade. Além disso, o processamento de TURF 2H3 parece modificar-se quando na presença do gene nuclear restaurador da fertilidade. Os autores sugerem que o produto gênico de Rf pode estar envolvido no processamento do RNA, a exemplo do que ocorre em leveduras, podendo mesmo ser uma enzima de processamento de RNA. DEWEY et alii (1987) propõem a sigla urf 13-T para a designação do gene mitocondrial. WALKER et alii (1987) corroboram as análises realizadas por DEWEY et alii (1986).

WISE et alii (1987) analisaram revertentes férteis e tolerantes a toxina T, obtidos a partir de clones celulares inicialmente susceptíveis. Num mutante, denominado T₄, o fragmento de 6,6 Kb apresenta uma transição G - A adjacente a uma inserção de 5 bp (pares de bases) não encontrada em CMS T. Tal inserção, interna a ORF de 345 bp (T ORF 13) gera uma mutação que resulta num codon "stop" (ponto final) prematuro que bloqueia a ORF em 222 bp. Embora a trans

crição de T ORF 13 não pareça alterada no mutante T₄, a inserção indica que um produto gênico biologicamente inativo poderia estar associado com o evento mutacional.

Essas evidências, associadas a indicação de que o polipetídeo 13.000 pertence a subunidade 9 da ATPase (codificada pelo gene *atp 9*), levaram MULLIGAN et alii (1988) a realizar uma análise molecular fina, detectando que esse gene tem sítios múltiplos de início de transcrição. Como os estudos se detêm agora, em nível básico, no processamento do mt RNA, o estudo citado é importante pois também indica que os genes que codificam rRNA mitocondriais são transcritos e depois processados até a forma final (formamaturada, a exemplo do que acontece com os RNA nucleares.

Numa comunicação recente, CEBALLOS & GRACEN (1988) relatam que foi encontrada uma progênie resistente a *H. maydis* raça T nas gerações segregantes de RD4515 com CM 174 (altamente susceptível). A análise genética quantitativa demonstrou que a resistência é controlada por não mais que dois genes, complementares e altamente dominantes. Evidentemente, essa fonte de resistência será fundamental para a análise molecular do produto gênico de Rf.

2.2.3. O sistema USDA de esterilidade citoplasmática

O sistema USDA (S) contém a maioria dos subgrupos de esterilidade citoplasmática. É também o sistema

que maior diversidade apresenta em termos de estabilidade por ambientes e de resposta aos genes restauradores da fertilidade.

Num estudo detalhado, SINGH & LAUGHNAN (1972) cruzaram algumas plantas CMS S de linhagens endogâmicas ~~SHUN~~ ~~KEN-2~~ com a linhagem R 138-TR, mantenedora (rf3 rf3) no sistema S. Um dos cruzamentos, envolvendo como receptora de pólen a linhagem M825 produziu, de forma inesperada, algumas plantas férteis. O estudo das gerações F₂, F₃ e F₄ não evidenciou nenhuma ação de genes restauradores dominantes ou recessivos. Essa observação é consistente com a hipótese de que as plantas férteis originadas de progênies CMS S eram produto de uma modificação "no citoplasma" da linhagem M825. Os autores sugerem um evento mutacional precoce em nível citoplasmático resultando numa espiga-quimera onde alguns grãos passaram a condição de citoplasma fértil. Observaram ainda que a linhagem M825 apresenta taxas elevadas dessa reversão e levantam a hipótese de que as células germinativas masculinas tenham ocasionalmente transferido algum citoplasma normal ao híbrido. O mesmo fenômeno foi observado por LAUGHNAN & GABAY (1973) em outras linhagens CMS S. Pela primeira vez, os autores sugerem a possibilidade de que uma sequência epissômica de DNA (nuclear ou citoplasmática) possa estar envolvida no fenômeno sem, obviamente, apresentar uma explicação detalhada do fenômeno.

PRING et alii (1977) encontraram, ao analisar

o padrão eletroforético de mtDNA de linhagens CMS S, a presença de duas pequenas sequências de DNA ($3,42$ a $3,48 \times 10^6$ bp e $4,01$ a $4,10 \times 10^6$ bp) lineares. Nada semelhante foi observado em linhagens CMS T e CMS C. Os autores sugerem que tais sequências podem estar relacionadas com a natureza instável de CMS S, podendo representar os elementos episômicos propostos por LAUGHNAN & GABAY (1973). Essa proposta requer que os elementos citoplasmáticos sejam capazes de transposição e estabilização num sítio cromossômico. Uma vez estabelecida a relação causal, o estudo de PRING et alii (1977), tornou-se em primeira evidência física de epissomos em plantas superiores.

Um estudo instigante e que merece ser mais explorado é o de LAUGHNAN & GABAY-LAUGHNAN (1982) demonstrando existir um controle nuclear sobre a reversão à fertilidade em certas linhagens CMS S, dependendo da linhagem polinizadora. Os eventos envolvem tanto uma modificação citoplasmática quanto uma reversão nuclear, de herança mendeliana, não associada a Rf_3 , já que mapeia em diferentes sítios cromossômicos. Os autores descrevem tal elemento como um epissomo. Através de vários ciclos de retrocruzamentos, os autores determinaram as taxas de reversão à fertilidade induzidas pela linhagem M825, utilizada como polinizadora, conforme a Tabela 2. Nota-se que a frequência de reversão aumenta quatro vezes em apenas três gerações de retrocruzamento. A influência nuclear fica evidente quando se registra que a taxa de reversão citoplas-

mática de M825 é elevada (10%) enquanto a taxa de reversão nuclear é baixa. As linhagens CMS S utilizadas como receptoras do pólen da M825 mantenedora apresentavam estabilidade, com taxas de reversão citoplasmática variando de 0,0 a 1,9%. Após seis gerações de retrocruzamento, WF 9-RD e NG-VF passaram a apresentar taxas de reversão superiores a de M825. A Tabela 3 evidencia o controle nuclear sobre um evento de reversão citoplasmática. Os autores sugerem então que genes nucleares governam o comportamento dos episômos citoplasmáticos.

Tabela 2. Frequência de revertentes férteis na linhagem original e nos retrocruzamentos envolvendo a linhagem M825 como paternal recorrente. LAUGHNAN & GABAY-LAUGHNAN (1982).

Geração	Nº de plantas	Nº de revertentes	Frequência de reversão (%)
Linhagem ♀	5355	24	0,45
2 RC	2286	48	2,10
6 RC	2044	169	8,30

Tabela 3. Origem dos revertentes férteis apresentados na Tabela 2. LAUGHNAN & GABAY-LAUGHNAN (1982).

Geração	Nº de revertentes analisados	Nº de revertentes citoplasmáticos	Nº de revertentes nucleares	f de revertentes citoplasmáticos
Linhagem ♀	19	6	13	31,6
2 RC	33	25	8	75,8
6 RC	129	125	4	96,9

LEVINGS *et alii* (1980) e LEVINGS & SEDEROFF (1983) caracterizaram tais epissomos ("plasmid-like sequences"), denominando-os S_1 e S_2 . A determinação da sequência de nucleotídeos de S_2 mostrou que esse DNA é composto por 5452 bp, estando presente a sequência de terminação invertida de 208 bp. Foram ainda identificados duas ORF ("Open Reading Frames"), sugerindo a possibilidade de que a sequência contenha genes codificadores. Os autores, com base em estudos realizados em raças de milho indígena da América Latina, os quais detectaram epissomos denominados R_1 e R_2 (em mitocôndrias oriundas de citoplasma normal), relatam que tais sequências, a exemplo de S_1 e S_2 , são lineares e de cadeia dupla. Epissomos R e S mostram homologia substancial, embora R contenha uma sequência de 2 kb não encontrada em S. Pro-

põem-se que S_1 pode ter surgido por um evento de recombinação entre R_1 e R_2 .

MANS (1982) comenta a presença das duas moléculas lineares apenas em plantas CMS e ressalta que o gene Rf_3 , restaurador da fertilidade nesse sistema, não altera o padrão eletroforético, isto é, as sequências S_1 e S_2 são mantidas. O autor menciona também a correlação entre a aparente integração das sequências no mtDNA de alto peso molecular e a habilidade das plantas quanto à liberação de pólen. Num estudo muito elucidativo, THOMPSON et alii (1980) havia demonstrado a presença de sequências homólogas a S_1 e S_2 no mtDNA de milho de citoplasma normal. MANS (1982) conclui então, com base em análises de mapas de restrição das regiões terminais das sequências, que estas são muito similares a elementos de transposição, sugerindo sua importância em estudos de regulação da expressão gênica e na compreensão acerca do produto gênico de Rf .

A elegância do sistema de esterilidade citoplasmática S pode ser comprovada pelo trabalho de KEMBLE et alii (1983), o que mostra a importância desse fenômeno biológico para a abordagem molecular de plantas superiores. Os autores comentam que a hipótese endosimbionte implica uma troca de informações genéticas entre núcleo, mitocôndrias e, no caso de vegetais, cloroplastos, e demonstram existir homologia entre a sequência S_1 e certas regiões do DNA nuclear. A hipótese explicativa afirma que uma transferência de DNA te-

ria ocorrido, com a sequência S_1 sendo excisada do genoma mitocondrial de uma planta fértil, mantida e amplificada. Seguiu-se, por períodos evolutivos, a transferência da sequência para o DNA nuclear. Com base nessa descoberta, os autores sugerem o uso potencial dessas sequências como vetores de transformação de milho. SCHARDL et alii (1984) demonstraram que as sequências S_1 e S_2 podem recombinar-se com regiões homólogas do mtDNA circular, convertendo-o, com elevada eficiência, em moléculas linearizadas, com as sequências S_1 e S_2 ligadas a uma das extremidades. A viabilidade da transferência de DNA entre organela e núcleo é demonstrada em outros organismos, um caso clássico sendo o da integração nuclear de sequências mitocondriais durante o processo de senescência em *Podospora anserina*, conforme demonstrado por KOLL (1986).

Uma descoberta recente e de grande importância é a de que linhagens de milho CMS S sintetizam algumas moléculas específicas de RNA, independentemente do DNA. Esses RNAs podem representar um sistema genético baseado em RNA endógeno à mitocôndria. FINNEGAN & BROWN (1986) mencionam que nunca antes um sistema similar a esse foi observado em uma organela. Devido à replicação autônoma independente, os autores denominaram as sequências de plasmídeos de RNA.

EARLE et alii (1987) obtiveram plantas férteis regeneradas a partir de linhagens CMS S, observando que tais plantas representam um caso de reversão citoplasmática,

desde que foi notada a ausência das sequências S_1 e S_2 características do genoma mitocondrial de plantas CMS S. Alguns clones celulares perderam as sequências após treze a vinte meses de cultura "in vitro". A natureza potencialmente replicativa das sequências foi sugerida por BASZCZYNSKI & KEMBLE (1987), dada a associação de proteínas no terminal 5' das sequências, de forma similar ao que acontece na replicação viral, onde tais proteínas terminais estão muito envolvidas.

A análise molecular da sequência S_1 , realizada por ZABALA & WALBOT (1988), demonstrou que S_1 contém três ORF (URF 2 de 1017 bp, URF3 de 2782 bp e UFR 4 de 768 bp) e que a expressão "in vivo" do produto gênico de UFR 3 apenas, não é suficiente para determinar o fenótipo CMS S.

2.2.4. O sistema CHARRUA de esterilidade citoplasmática

O sistema C de esterilidade mostra certa similaridade com o sistema T, no que se refere a expressão esporofítica e à especificidade de um polipeptídeo de PM = 17500, presente entre os produtos gênicos das mitocôndrias de plantas estéreis. Mais ainda, nos dois sistemas ocorre um aumento na síntese do citocromo b563, reduzido a níveis normais em citoplasmas restaurados.

PRING et alii (1980) analisaram fragmentos de restrição de mtDNA de plantas de milho pertencentes a cinco

sub-grupos do sistema C, a saber: C, E, RB, BB e ES. O estudo revelou a existência de três tipos de DNA mitocondrial, enquanto não foi observada nenhuma variação no DNA de cloroplastos, propondo-se que sejam designados três sub-grupos no sistema C: CI (citoplasma C); CII (citoplasma RB, BB e E) e CIII (citoplasma ES). Essa heterogeneidade detectada no sistema permitiria uma ampliação da base genética citoplasmática na produção de sementes híbridas. Relatam ainda os autores que dentre os três sistemas conhecidos em milho, T, S e C, este último é o que maior similaridade mostra com o citoplasma normal, quando se analisa o mtDNA.

O estudo de sub-grupos do sistema C levou WEIS SINGER (1984) a discorrer sobre os riscos do retorno a uniformidade citoplasmática verificada nos últimos anos da década de setenta, agora utilizando o sistema C. O autor sugere que se estude as maneiras pelas quais o uso de esterilidade citoplasmática possa ser monitorado, mantendo o mais possível a diversidade genética citoplasmática. Uma diversidade "forçada" seria obtida utilizando-se uma mesma linhagem com citoplasma C ou citoplasma S, restaurada por uma linhagem portadora dos genes Rf_3 e Rf_4 (Rf_5). Obviamente, a linhagem mantenedora deveria ser homozigota recessiva para ambos os genes restauradores. A implantação do uso de uma única linhagem com os dois sistemas (citoplasma C e citoplasma S) ficaria restrita aquela (ou aquelas) de uso mais amplo num programa de híbridos.

Tal sugestão é criticável, uma vez que o sistema S difere do sistema C não somente quanto à expressão fenotípica da restauração, como também pela instabilidade do primeiro frente a modificações ambientais. Além disso, conforme o autor mesmo ressalta, seria preciso analisar possíveis interações nucleo-citoplasmáticas incomuns e a questão da heterozigosidade residual oriunda do programa de retrocruzamentos.

Com relação a caracterização molecular do sistema C, STERN & LONSDALE (1982), estudando possíveis modificações no mt DNA associadas a esterilidade citoplasmática, demonstraram que o arranjo de algumas sequências do mesmo (homólogas a sequências do cpDNA) estava alterado nos citoplasmas CMS quando comparado com o mtDNA de plantas de citoplasma normal. Mais especificamente, uma região codificadora do rRNA 16S do cloroplasto não foi observada no mtDNA de plantas CMS C.

São poucos os estudos relacionados com a caracterização molecular do sistema C. PRING et alii (1987) estudaram eventos de duplicação e deleção e sua relação com o polimorfismo do mtDNA nos sub-grupos de CMS C. Utilizando a classificação proposta por PRING et alii (1980), os autores analisaram as linhagens A619 e a A632 convertidas a cinco sub-grupos de CMS C (BB, C, ES, PR e RB). É mencionada a observação de que uma das fontes (RB) apresenta "restauração tardia", fato observado em uma das linhagens do banco

de germoplasma da *Agrocere*s. Os estudos de hibridação DNA-DNA permitiram obter uma "chave molecular" para a identificação de sub-grupos dentro do sistema C. Como exemplo, os citoplasmas RB e BB podem ser distinguidos de todos os outros pelo padrão de restrição obtido com a enzima Hind III; o citoplasma RB pode ser separado de BB e de todos os outros pela ausência de um minicírculo de DNA de 1445 bp; o citoplasma C é caracterizado pelo padrão de restrição oferecido pelas enzimas Hind III ou Xho I. O estudo torna evidente que cada sub-grupo evoluiu através de eventos de recombinação a partir de sequências repetidas encontradas no mtDNA de citoplasma normal e também através de duplicação e recombinação de cópias únicas. Por outro lado, sequências repetidas no citoplasma normal podem estar presentes como cópias únicas em outros citoplasmas. Assim, a evolução dos genomas pode envolver a duplicação de uma sequência seguida de recombinação, ou então a seleção de uma cópia com subsequente "fixação" da configuração genômica.

A possibilidade de se distinguir os sub-grupos de um sistema CMS, conforme assinala WEISSINGER (1984), viabiliza o aumento da diversidade genética citoplasmática, minimizando os riscos da ocorrência de uma raça patogênica específica a um determinado citoplasma. No caso de CMS C, utilizada em grande escala na produção de sementes de milho híbrido no Brasil, esse é um importante recurso, frente à ocorrência de uma nova raça de *Drechslera maydis* (*Helminthosporium maydis* Nisikado), denominada raça C.

A Conferência Anual da "American Seed Trade Association", realizada em Washington (EUA) em 1986, recebeu uma comunicação de pesquisadores da "Hebei Academy of Agriculture and Forestry Science (China)", relatando a ocorrência da raça C de *H. maydis* em plantas de milho no sistema C. A comunicação incluía as Tabelas 4 e 5, onde os dados sobre a susceptibilidade/tolerância de várias linhagens são sumarizados.

WEI et alii (1988), relatam que de 116 isolados de *H. maydis* coletados de lesões foliares em doze províncias da China, cinco deles provocaram lesões maiores em milhos CMS C do que em milhos dos sistemas T, S ou milhos de citoplasma normal. A virulência foi observada em plântulas em casa-de-vegetação e em plantas inoculadas no campo. A toxina C da raça patogênica foi isolada e mostrou-se eficiente em provocar lesões em plantas CMS C, além de intensificar a atividade da enzima "Phenylalanine Ammonia-Lyase" (PAL). A mesma toxina não apresenta esse efeito em plantas do sistema T. Os autores citam o estudo de WANG & XUE (1982), que caracteriza o efeito intensificador da atividade da PAL, provocado pela toxina T especificamente em plantas CMS T. A enzima citada é considerada ponto-chave na regulação da síntese de fenóis em plantas.

Tabela 4. Reação de linhagens de milho nos citoplasmas T, C, S e N, quanto a infecção por *H. maydis* raça C. Os valores indicados por (**) são significativos a $p = 0,01$, quando comparados com os valores no citoplasma normal (+++ = comprimento médio da lesão maior que seu diâmetro; ++ = comprimento da lesão intermediária entre seu raio e diâmetro). WEI, 1986 (não publicado).

Linhagens	Sistemas							
	T		C		S		N	
	Extensão (cm)	Grau	Extensão (cm)	Grau	Extensão (cm)	Grau	Extensão (cm)	Grau
CL03	6,2 ± 2,7	0	9,8 ± 1,4**	+++	4,8 ± 1,7	0	4,0 ± 1,6	0
B73	5,7 ± 2,1	0	13,5 ± 3,5**	++	6,0 ± 2,7	0	7,3 ± 2,4	0
B37	8,4 ± 3,2	0	11,8 ± 5,7**	++	5,7 ± 1,7	0	6,2 ± 2,1	0
WF9	6,9 ± 2,2	0	13,2 ± 3,4**	++	7,4 ± 2,3	0	7,0 ± 2,1	0

Tabela 5. Reação de linhagens de milho nos citoplasmas T, C, S e N, quanto a infecção por *H. maydis* raça T. WEI, 1986 (não publicado).

Linhagens	Sistemas							
	T		C		S		N	
	Extensão (cm)	Grau	Extensão (cm)	Grau	Extensão (cm)	Grau	Extensão (cm)	Grau
CL03	13,2 ± 4,9**	++	6,2 ± 2,3	0	4,8 ± 1,7	0	4,9 ± 2,0	0
B73	19,5 ± 7,4**	++	7,5 ± 2,1	0	8,6 ± 2,7	0	5,9 ± 2,4	0
B37	12,1 ± 4,6**	++	6,5 ± 2,3	0	8,7 ± 2,6	0	7,5 ± 2,8	0
WF9	14,2 ± 3,1**	++	8,1 ± 3,3	0	7,6 ± 1,9	0	6,9 ± 2,3	0

2.3. METABOLISMO MITOCONDRIAL ASSOCIADO A CMS

2.3.1. A cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa

A glicólise é a via central do catabolismo da glicose. A sequência de reações da glicólise difere de uma espécie para outra apenas na forma em que sua velocidade é regulada e no destino metabólico do piruvato formado. Em condições aeróbicas, o piruvato é oxidado originando o grupo acetil da acetil-coenzima A. Passando ao ciclo do ácido cítrico, o acetil é completamente oxidado a CO_2 e H_2O pelo oxigênio molecular, num processo chamado respiração. LEHNINGER (1984) sumariza os principais estágios dessa via metabólica na Figura 3.

Em células eucarióticas, o ciclo do ácido cítrico tem lugar na matriz mitocondrial. Nela ocorrem também as reações do metabolismo dos ácidos graxos; enquanto a membrana mitocondrial externa é permeável à maioria das moléculas pequenas e íons, a membrana interna contém a cadeia de transporte de elétrons e a ATPsintetase, além de vários sistemas de transporte de membrana. Em condições fisiológicas normais, a membrana interna é impermeável à maioria dos íons pequenos. Da Figura 3 fica evidente a necessidade de um estreito acoplamento do ciclo do ácido cítrico com a cadeia de transporte de elétrons e desta com a fosforilação oxidativa.

Figura 3. Diagrama dos estágios da respiração celular. 1. Mobilização da acetil-CoA. 2. Via do ácido cítrico. 3. Transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. LEHNINGER, 1984.

DARNELL et alii (1986) apresentam um diagrama abrangendo as principais funções mitocondriais incluindo o acoplamento citado, segundo a hipótese quimiosmótica de Mitchell, na Figura 4.

Figura 4. Esquema representativo das principais funções mitocondriais. DARNELL et alii, 1986.

Do metabolismo geral situado nas mitocôndrias, interessa a este trabalho destacar um detalhe da via do ácido cítrico, segundo o mesmo autor (Figura 5); e a cadeia respiratória mitocondrial de plantas, segundo GOODWIN & MERCER (1987) (Figura 6).

2.3.2. Inibidores clássicos da conversão de energia nas mitocôndrias

TZAGOLOFF (1982) relata que existem substâncias capazes de inibir o transporte de elétrons em sítios específicos da cadeia respiratória. Tais substâncias são muito úteis na atribuição de funções as enzimas da cadeia respiratória e no estudo da sequência funcional-estrutural dos transportadores de elétrons. Os principais inibidores são o Cianeto e o Monóxido de Carbono, os quais reagem com o citocromo a_3 e inibem a citocromo-oxidase; antimicina A, inibidor da coenzima QH_2 -citocromo c redutase; Rotenona, Piericidina e Amobarbital, inibidores da NADH-coenzima Q redutase.

Dois outros grupos de reagentes podem ser classificados em desacopladores e ionóforos. Estes são compostos que facilitam a absorção de íons, por aumentarem a permeabilidade da membrana. Não se conhece ao certo se os ionóforos exercem seu efeito atuando como poros na membrana ou como carregadores de íons, transportando-as por difusão através da membrana. Dentre os ionóforos, podem ser citados a Valinomicina, a Gramicidina e a Nigericina.

Figura 5. O ciclo do ácido cítrico, com destaque para o oxidação do succinato e fumarato. DARNELL et alii, 1986.

Figura 6. Cadeia respiratória mitocondrial em mitocôndrias de plantas, indicando o sítio de ligação de inibidores. GOODWIN & MERCER (1987).

Praticamente todos os desacopladores da fosforilação oxidativa podem transportar prótons através da membrana. Nesse sentido, podem também ser considerados como ionóforos (protonóforos). Entretanto, os desacopladores são compostos lipofílicos com propriedades de ácidos fracos, capazes de estimular a respiração na ausência de acceptor fosfato, conforme pode ser observado na Figura 7.

Figura 7. Estimulação da respiração por um desacoplador clássico. TZAGOLOFF, 1982.

Assim, os desacopladores estimulam a respiração estado quatro, a exemplo do que faz o ADP. Entretanto, inibem a síntese protéica promovendo a dissipação da energia produzida pelo transporte de elétrons.

Inibidores da fosforilação oxidativa também bloqueiam a síntese de ATP, agindo entretanto de modo diverso dos desacopladores. Uma vez estimulada a respiração estado quatro com ADP, estabelecendo-se a respiração estado três, os inibidores provocam o retorno ao nível estado quatro. Como o estado quatro é definido como sendo aquele no qual as mitocôndrias oxidam um substrato na ausência de um acceptor de eletrons, presume-se que os inibidores bloqueiam o uso da energia oxidativa para a síntese de ATP em algum passo terminal da fosforilação. Dentre os inibidores, destacam-se a Oligomicina e a Aurovertina.

Conforme LEHNINGER (1984), o 2,4-Dinitrofenol (DNP), um desacoplador clássico, permite que o transporte de elétrons na mitocôndria ocorra, impedindo a fosforilação do ADP a ATP, desacoplando a ligação essencial entre o transporte de elétrons e a síntese de ATP. Essa classe de reagentes aumenta muito a permeabilidade da membrana mitocondrial interna aos íons H^+ . São substâncias lipofílicas capazes de captar íons H^+ de um lado da membrana e transportá-los ao outro lado, aumentando a concentração protônica. DARNELL (1986) também afirma que o DNP atua como transportador de protons na membrana, realizando um "bypass" na síntese de ATP, que em condições normais está sempre associada com o movimento protônico, conforme a Figura 4.

BOUTHYETTE et alii (1985) estudaram o efeito da Antimicina A, Rotenona, N-etilmaleimida, Valinomicina, Oli

gomicina e Di-ciclo-hexil-carbodiimida (DCCD) sobre uma linhagem de milho CMS T e sua versão citoplasma normal, em comparação com a toxina T. Os autores observaram que o complexo da ATPase mitocondrial de CMS T mostrou menor sensibilidade a baixas concentrações de DCCD que mitocôndrias de plantas citoplasma normal, embora concentrações mais elevadas tenham igualmente inibido a fosforilação oxidativa em ambos os citoplasmas. O DCCD inibe a translocação de prótons pela citocromo C-oxidase e pelo complexo citocromo b-C₁. Assim, as mitocôndrias tratadas com DCCD respiram a altas taxas para manter o gradiente eletroquímico de prótons.

Uma observação importante é a de que o DCCD inibe a ação da toxina T como ionóforo nas mitocôndrias CMS T. A ação da toxina T é similar a dos ionóforos clássicos, exceto por sua extrema especificidade. O DCCD não inibiu a ação dos desacopladores, ionóforos e quasi-ionóforos testados no sistema T. Uma vez que a ação primária do DCCD é sobre as proteínas translocadoras de prótons da membrana mitocondrial, admite-se a sua não interferência. Assim, a inibição da toxina T pelo DCCD pode ser atribuída a interação do mesmo com um sítio de ligação protéico da membrana, já que o [¹⁴C]-DCCD não se liga aos fosfolipídeos da mesma; liga-se entretanto, ao complexo da ATPase de mitocôndrias no sistema T. Esse fato é uma indicação consistente da interação da toxina T com o complexo da ATPase.

O fato de que a atividade específica da ATP-

ase em mitocôndrias CMS T é de $50 \text{ nmoles Pi.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína, contra $68 \text{ nmoles Pi.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína em mitocôndrias citoplasma normal, associado a síntese de um polipeptídeo específico do sistema T (polipeptídeo 13.000) indica claramente o envolvimento da ATPase como portadora de um sítio de ligação para a toxina, conforme pode ser observado na Figura 8.

Figura 8. Efeito do DCCD em mitocôndrias de milho CMS T e citoplasma normal. BOUTHYETTE et alii (1985).

Com relação aos efeitos da toxina C sobre mitocôndrias do sistema C, WEI et alii (1988) nada mencionam, indicando apenas a ação específica da toxina em induzir o fluxo eletrolítico (lixiviação eletrolítica) das folhas de plantas CMS T, além do já comentado efeito estimulador da fenilalanina amônia-liase.

2.4. BIOSÍNTESE DE FLAVONÓIDES

Algumas características fenotípicas do material genético utilizado neste trabalho permitiram detectar fenômenos ligados a regulação da síntese de compostos fenólicos em milho, em associação com o sistema de esterilidade T. O que segue consiste de uma visão sumária e integrada do metabolismo fenólico.

2.4.1. Integração na via do ácido shiquímico

As plantas produzem milhares de compostos contendo um ou mais resíduos fenólicos. Estes compostos podem ser classificados em grupos, de acordo com o número de átomos de carbono presentes na molécula. Os compostos fenólicos, com exceção dos flavonóides, são sintetizados a partir de um intermediário biossintético comum, seja a fenilalanina, seja seu precursor imediato, o ácido shiquímico. No caso

Das vias bioquímicas, pode-se destacar o papel do Ácido Coumárico, como precursor de flavonóides, diretamente ou tendo como intermediário o Ácido Hidroxibenzóico, "via" β -oxidação. O mesmo Ácido Coumárico é também precursor das ubiquinonas e das ligninas. A Figura 9 mostra também a via mediada pela fenilalanina amônia-liase (PAL), que produz Ácido Cinâmico, também precursor de ligninas e alguns alcalóides. A PAL não parece ser uma enzima limitante para a biossíntese fenólica, por estar presente em concentrações muito superiores que as requeridas e porque as variações observadas na atividade da enzima não encontram correspondência na acumulação fenólica. Assim, o controle deve estar situado um passo antes, no controle do direcionamento da fenilalanina para a síntese protéica ou para a síntese fenólica, de acordo com os requerimentos fisiológicos da planta.

As funções dos fenóis podem ser classificadas em bioquímicas e ecológicas. Existe pouca evidência de que os fenóis exerçam um papel bioquímico preponderante no desenvolvimento vegetal. Não exercem uma função hormonal primária, a não ser o caso do Ácido Lunulárico, que substitui o Ácido Abscísico (ABA) como fito-hormônio. Em culturas "in vitro", entretanto, exercem efeito comprovado sobre hormônios e enzimas. "In vivo", a função similar evidenciada reside na produção de etileno a partir da metionina, na qual o ester do Ácido Coumárico é necessário como co-fator. As funções ecológicas são muito mais evidentes, uma vez que os

flavonóides coloridos em flores e frutos exercem papel preponderante, respectivamente na polinização e na dispersão de sementes. Mesmo flavonas e flavonóis, compostos não-coloridos, são de dispersão geral em flores, uma vez que, devido ao seu espectro de absorção próximo do ultravioleta, participam da atração de insetos. Outras funções incluem efeitos alelopáticos, adstringentes alimentares (taninos), agentes antimicrobianos e fitoalexinas.

VAUGHN et alii (1988), relatam que em células vegetais danificadas, pode ocorrer oxidação de compostos fenólicos resultando na produção de quinonas reativas, capazes de promover polimerização e síntese de ligninas. Danos, celulares provocados por fitopatógenos provocam também a liberação de substratos fenólicos os quais, por ação enzimática, passam a hidróxi-fenóis e quinonas, que polimerizam e selam as lesões.

2.4.2. Síntese de flavonóides em plantas

Flavonóides são glicosídeos com estrutura baseada na flavana, que consiste em dois anéis aromáticos ligados por três unidades de carbono ($C_6-C_3-C_6$). A classificação é dada pelo estado de oxidação da unidade C_3 , obtendo-se as flavonas, flavonóis, catequinas, flavanonas, di-hidroflavonóis, flavana-3,4-dióis (pro-antocianidinas e leucoantocianidinas), antocianidinas, isoflavonas, neoflavonas, chalconas, di-hidrochalconas e auronas.

As principais classes que contribuem para a coloração em plantas são as antocianidinas, os flavonóis, as chalconas e as auronas.

GOODWIN & MERCER (1987) comentam que embora existam em torno de vinte e duas antocianidinas, as três mais comuns são a pelargonidina, a delfinidina e a cianidina, as quais diferem somente pelo número de grupos hidroxila no anel B. Devido a sua expressão iônica, tanto a intensidade quanto o tom das cores das antocianidinas variam com o pH. Em solução ácida (metanol + HCl) as cores variam da pelargonidina ($\lambda_m = 520$ nm), para a cianidina ($\lambda_m = 535$ nm) para a delfinidina ($\lambda_m = 545$ nm). Se o pH de uma solução de cianidina é aumentado, a solução começa a perder a cor num pH próximo a sete; acima disso formam-se anidrobases azuladas. Em valores muito elevados de pH, ocorrem mudanças irreversíveis iniciadas pela ionização das hidroxilas. A glicosilação das antocianidinas em C_3 para a produção de antocianinas resulta em um acentuado efeito hipsocrômico (~ 15 nm), sem nenhum efeito marcante na coloração das plantas pois virtualmente todas as antocianinas são glicosiladas em C_3 . A glicosilação em outras posições, o que ocorre muito esporadicamente, produz apenas efeitos mínimos na coloração. Entretanto, a concentração de antocianinas presente num tecido pode variar de 0,01% a 15% da matéria seca e tem um efeito acentuado na coloração da planta.

2.4.3. Regulação da expressão gênica da flavonóides em milho

Conforme COE & NEUFFER (1977), a genética da antocianina e pigmentos relacionados desenvolveu-se em milho primeiramente por ser uma característica não-vital e facilmente observável. Além disso, a genética do controle do pigmento é a mais completamente elaborada, entre todas as características e virtualmente todos os tecidos, sob determinados controles gênicos, podem sintetizar antocianina. O autor menciona ainda a característica "Brown-Midrib" (ligada ao menor teor de lignina nas plantas) como pertencente a vias bioquímicas muito semelhantes as da antocianina, o que é facilmente verificado examinando-se o metabolismo apresentado na Figura 9.

Ao menos quatorze locos distintos controlam a elaboração qualitativa, quantitativa e tecido-específica das antocianinas e pigmentos relacionados (A, A2, a3, B, Bp, Bz, Bz2, C, C2, In, P, Pl, Pr e R). Alguns, como A, são essenciais em virtualmente todos os tecidos, enquanto outros, como C e Pl, são essenciais somente em um ou poucos tecidos.

Com relação ao coleoptilo e a raiz seminal, os genes que controlam a expressão das antocianinas são: A, A2, B, Bz, Bz2, C2, Pl (em coleoptilos e raízes não expostos a luz, o gene Pl promove a síntese) e R-r. O mesmo ocorre com relação a expressão da cor nas palhas das espigas.

Testes de complementação permitiram estabelecer uma sequência de ação dos genes. Como exemplo, na camada de aleurona, a formação de pigmentação púrpura depende de nove genes: A, A2, Bz, Bz2, C, C2, In, Pr e ou o gene R ou alelos raros do loco B. O teste de complementação caracterizou a interação de sete dos nove fatores: se bz ou bz2 é homozigoto, o tecido desenvolve pigmentação muito reduzida; se bz e bz2 são homozigotos nenhuma pigmentação ocorre.

REDDY (1964), estudando as leucoantocianidinas características de um tecido de aleurona a₂, determinou que a concentração de antocianina é influenciada por in e o padrão de hidroxilação por pr. O mesmo autor sugerira anteriormente uma possível sequência de genes controlando a síntese: (C-I), C, (C2), R (In), A, A2, Bz, Bz2. Mais tarde, determinou que a formação da leucoantocianidina requeria apenas C, C2, R e A. Assim, a ação de In e Pr poderia preceder a ação de A2.

A evolução da metodologia de análise bioquímica permitiu estudar em detalhes o controle da expressão gênica das antocianinas. DOONER & NELSON (1979) relatam que a enzima UDPglucose: flavonóide 3-O-glicosiltransferase (UGT), que cataliza um dos passos terminais da síntese de antocianinas (glicosilação da antocianidina e de flavonóis relacionados), é controlada ao menos por quatro genes (Bz, C, R e Vp), no endosperma do milho. Bz é o gene estrutural para a enzima, presente em nível reduzido e não-induzido, no início do

desenvolvimento do endosperma. Em torno da quarta semana pós-fecundação, C, R e Vp interagem entre si para induzir altos níveis de UFGT.

Fato muito interessante é o de que vp é o único mutante para aleurona sem cor, dos citados acima, que possui um efeito pleiotrópico (germinação prematura). Argumentou-se então que Vp poderia preceder C e R na biossíntese da antocianina. Se a UFGT é precursor-induzível e a ação de Vp precede a de C e R, endospermas vp deveriam ter baixas concentrações de UFGT, quando comparados com endospermas c e r. No entanto, foi demonstrado que aleuronas vp não somente são deficientes em UFGT mas também com relação a PAL, a primeira enzima na via biossintética dos amino-ácidos aromáticos até antocianinas. Assim, o efeito de Vp na biossíntese poderia se dar ou através do controle direto de vários genes, inclusive Bz ou, por afetar a PAL, através do controle indireto da concentração do Ácido Cinâmico, o flavonóide precursor produzido pela ação da PAL.

DOONER (1983), determinou que além da UFGT, especificada pelo loco Bz, que mapeia no cromossomo 9, a chalcona sintase (CHS) parece ser codificada pelo loco C2, mapeando no cromossomo 4. Mutações que ocorram nesses locos eliminam a UFGT ou a CHS, exclusivamente. Mutações em locos como C, R, Vp, Clf, afetam ambas as enzimas simultaneamente. Um alelo funcional em cada um dos locos citados é requisito para a expressão coordenada de CHS, UFGT e certamente outras

vias biossintéticas de flavonóides. Os passos controlados pelas duas enzimas são indicados a seguir:

Mais recentemente, determinou-se que o produto gênico de *pr* é a enzima 3'-hidroxilase e *a₁* codifica para NADPH-dependente redutase. PAZ-ARES et alii (1987) determinaram a estrutura do loco *C₁*, que é requisito para a pigmentação na aleurona e escutelo das sementes de milho, não afetando a síntese de antocianina em outras partes da planta. Esse gene foi recentemente clonado, tornando-se o primeiro loco regulatório acessível à análise molecular. A proteína codificada por *a₁* mostra 40% de homologia de sequência com proteínas animais codificadas por proto-oncogenes.

MEYER et alii (1987) relatam a transferência do gene *Al*, que codifica para a dihidroquercetin 4- redutase (esta enzima reduz dihidrokaempferol fornecendo um intermediário para a biossíntese da pelargonidina), para um mutante de *Petunia hybrida* que acumula o substrato, não mostrando coloração floral. A transformação, utilizando o vetor p35 contendo o cDNA de *Al* e o promotor 35S, produziu flores vermelhas do tipo pelargonidina.

Numa outra abordagem da biossíntese de antocianinas KORDAN & RENGEL (1988) relatam o bloqueio da síntese

se de antocianinas em coleóptilos e raízes de plântulas de milho por quatro barbituratos (Barbital, Fenobarbital, Pentobarbital e Amobarbital ou Amytal). Os autores mencionam que a síntese de antocianinas em plantas é associada com membranas. Por seu turno, os barbituratos são conhecidos agentes ativos em membranas de animais. Os resultados mostram que a síntese de antocianinas foi mais afetada nas raízes que nos coleóptilos na concentração 2 mM de Barbital e em todas as concentrações dos demais barbituratos testados. A severidade do bloqueio de síntese obedece a seguinte ordem: Pentobarbital $\geq$ Amobarbital $\geq$ Fenobarbital $\geq$ Barbital. Para a discussão dos resultados do presente trabalho são interessantes as dosagens de Amobarbital utilizadas (10^{-3} M e 2×10^{-3} M) e os valores de absorbância a 540 nm, indicando as concentrações de antocianina (40 ± 2 e 38 ± 2 , respectivamente).

2.5. METABOLISMO DA POLI-FENOL OXIDASE (PPO) EM PLANTAS

No decorrer do presente trabalho, algumas reações de oxidação citoplasma-específicas foram observadas, quando se procedia o ajuste de alguns protocolos de extração de proteínas totais para caracterização eletroforética. A leitura ocasional do trabalho de VAUGHN et alii (1988) induziu o autor a realizar uma série de análises não anteriormente planejadas, cujos resultados justificam a revisão que segue.

2.5.1. Aspectos gerais sobre a PPO

A polifenol oxidase (PPO) é uma enzima localizada nos tilacóides dos cloroplastos e em outros plastídeos e vesículas não-fotossintetizadores. Apesar de sua ocorrência virtualmente universal, não se estabeleceram ainda funções exatas para essa enzima, conforme VAUGHN *et alii* (1988).

Numa ampla revisão sobre o assunto, MAYER & HAREL (1979) discutem a nomenclatura ainda indefinida que confunde os termos catecol oxidase, fenolase, tirosinase, catecolase, cresolase ou polifenol oxidase com as funções da lacase. A especificidade pelo substrato é a chave para o esclarecimento do problema.

Os autores comentam que as peroxidases podem ser facilmente distinguíveis das polifenol oxidases em caracterizações eletroforéticas uma vez que estas oxidam a dihidroxifenilalanina (DOPA), embora VAUGHN *et alii* (1988) alertem para o fato de que algumas outras enzimas podem também oxidar a DOPA.

Além de localizada nos cloroplastos, a PPO pode também ser encontrada nas mitocôndrias e nos peroxissomos. Assim, fica evidente a compartimentalização da enzima, que pode ser liberada frente a fenômenos por ora classificados como "injúrias" a planta.

A ligação da enzima com membranas dificulta seu

isolamento e caracterização, uma vez que a solubilização frequentemente resulta em modificação da estrutura e das propriedades da enzima. Um obstáculo adicional é a multiplicidade da enzima bem como as inter-conversões entre as formas durante a purificação.

2.5.2. Caracterização molecular das PPO

O estudo da catecol oxidase demonstra multiplicidade, parte da qual pode ser atribuída a formas poliméricas. O peso molecular da forma predominante situa-se entre 116.000 a 128.000 daltons. Supõe-se que a enzima compreenda quatro unidades idênticas ($P_m = 30.000$) cada uma contendo um átomo de cobre. Esta suposição baseia-se na observação do equilíbrio de associação-dissociação entre as várias formas, o qual é dependente da concentração. Alguns autores mostram que o equilíbrio pode ser alterado rumo a associação aumentando a concentração da proteína e pela presença de Ca^{2+} . Por seu turno, a dissociação é facilitada por temperaturas elevadas, aumento da força iônica, pH ácido (4,4) e por SDS ou EDTA. A uréia pode causar dissociação completa do tetrâmero.

Uma caracterização eletroforética em gel de acrilamida-SDS demonstrou que a enzima contém dois tipos de cadeias polipeptídicas, uma pesada (H, de peso molecular 43.000) e uma leve (L, de peso molecular 13.400). Assim, a

forma predominante ($P_m = 120.000$) seria um tetrâmero de estrutura quaternária L_2H_2 . Assim, a forma de peso molecular 26-34.500 seria um dímero LL e a enzima ativa ($P_m = 69.000$) um trímero L_2H . O estudo foi realizado utilizando-se cogumelos.

Em plantas, o caso do algodão onde, a forma 11.700 poderia representar um monômero L e a forma 23.500 um dímero, é considerado com reservas pelos autores (MAYER & HAREL, 1979), devido a possibilidade de que estejam sendo analisados artefatos.

VAUGHN *et alii* (1988) relatam que a PPO é codificada pelo núcleo e ao contrário da maioria das proteínas do cloroplasto, não é sintetizada a partir de uma molécula precursora maior. A falta de uma sequência peptídica transitória ou intermediária pode estar ligada a um mecanismo especial de absorção, envolvendo vesículas da membrana interna.

2.5.3. Funções fisiológicas das PPO

Um sumário das funções e propriedades atribuíveis a PPO por MAYER & HAREL (1979) e VAUGHN *et alii* (1988) é apresentado a seguir:

- Várias polifenoloxidasas podem oxidar uma ampla gama de compostos fenólicos. Enzimas individuais tendem a preferir um substrato particular ou um certo tipo de composto fe-

nólico. Em certos casos, o substrato preferido é também o mais abundante num tecido em particular.

- Existem duas classes de inibidores das PPO: aqueles que interagem com o átomo de cobre da enzima e aqueles que afetam o sítio de ligação da enzima com o substrato fenólico. Dentre os primeiros encontram-se os carbamatos.
- As diversas formas apresentadas pelas PPO mostram diferenças quanto à significação "fisiológica", incluindo especificidade a substratos fenólicos, sensibilidade a inibidores, pH e inativação por temperatura. Tem sido notadas diferenças quanto ao "padrão de isozimas" em conexão com ataque de patógenos. Um estudo realizado por ELSTNER et alii (1976) sugere que a catecol oxidase e a dopamina participam na formação de etileno em folhas de beterraba, após ferimentos.
- Um importante papel das PPO estaria relacionado com o transporte de eletrons, "via" redução não-enzimática, de quinonas. É sugerido que a respiração insensível ao cianeto em tecidos vegetais pode ser mediada pelas PPO. Uma restrição é a sensibilidade das

PPO ao cianeto, embora menor que a da citocromo oxidase.

- Compostos fenólicos que atuam como substratos para as PPO estão sempre compartimentalizados. Assim, não ocorre o envolvimento das PPO com os compostos fenólicos em tecidos intactos.
- Em tecidos sujeitos a lesões, os compostos fenólicos, antes compartimentalizados, tornam-se acessíveis. As PPO produziriam quinonas, altamente reativas e tóxicas às enzimas extra-celulares produzidas por patógenos. Assim, as PPO teriam função preponderante na síntese de compostos bactericidas e fungicidas.
- Observou-se correlação estreita entre as concentrações da enzima antes de infecções patogênicas e resistência a doenças, conforme MAXEMIUC-NACACHE & DIETRICH (1985).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Descrição do material genético

3.1.1.1. Linhagem PF 23

Em julho de 1984 foram recebidas do Dr. Gladstone Drummond, geneticista da AGROCERES, amostras da linhagem PF 23 RA IV, portadoras de citoplasma Texas e restauradas na forma homozigota (Rf_1Rf_1) bem como a linhagem PF 23 cit N rfrf originalmente mantenedora da linhagem PF 23 cms Trfrf. Embora não tenha realizado testes para verificar a configuração genética de Rf_2 , DRUMMOND (1988, informação pessoal) considerou as informações de DUVICK *et alii* (1961) a respeito de que a grande maioria dos materiais estudados com relação à restauração da fertilidade no sistema Texas apresentava-se na forma homozigota dominante (Rf_2Rf_2). A linhagem PF 23 é originária de cultivar de milho adaptada a região sul do Brasil.

3.1.1.2. Linhagem T_1

Na mesma época, foram recebidas do Dr. José A. de Mattos, geneticista da AGROCERES, amostras das linhagem T_1 citoplasma Texas e sua mantenedora $T_1 \otimes$, citoplasma normal, recessiva para o gene Rf_1 , bem como amostras de outras linhagens no sistema S e C, relacionadas com o grupo T_1 . A linhagem T_1 foi sintetizada a partir de uma cultivar de milho adaptada a região sul do Brasil.

3.1.1.3. Nomenclatura de trabalho

O material genético recebido, para maior facilidade de registro e identificação, passou a obedecer à seguinte nomenclatura:

1. PF 23 RA IV cit. Texas, homozigota para Rf_1 = PF 23 cms T RfRf
2. PF 23 $\otimes$ cit. normal, homozigota para rf_1 = PF 23 cit N rfrf
3. T_1 citoplasma Texas, homozigota para rf_1 = T_1 cms rfrf
4. $T_1 \otimes$ citoplasma normal, homozigota para rf_1 = T_1 cit N rfrf.

3.1.1.4. Obtenção da linhagem PF 23 cms T rfrf

No verão 84/85, foram semeadas, no campo ex

perimental do Depto. de Genética da ESALQ/USP, 400 sementes de cada uma das quatro linhagens em estudo, com os objetivos de:

- A. Linhagem T_1 - Observar a expressão da esterilidade em T_1 cms T rfrf e estimar uma eventual taxa de reversão a fertilidade; multiplicar sementes das linhagens estéril e mantenedora;
- B. Linhagem PF 23 - Iniciar o processo de obtenção da linhagem PF 23 cms T rfrf.

Procedimentos adotados:

O material genético foi semeado em covas espaçadas de 20 cm, com a instalação de 2 sementes por cova. O espaçamento entre as fileiras foi estabelecido em 100 cm. Assim, obteve-se 4 fileiras de 40 metros de comprimento, ocupando área total de 160 m². A adubação no sulco foi realizada utilizando a fórmula 4-14-8 (150 kg/ha). Vinte dias após a semeadura foi realizado o desbaste de uma planta por cova, aproximando o número de plantas a uma população ideal de 5 plantas/m. Foram realizadas as demais práticas agrícolas normais da cultura do milho.

No florescimento, as plantas da linhagem T_1 cms T rfrf receberam pólen de plantas da linhagem T_1 cit N rfrf. As plantas da linhagem PF 23 cms T RfRf receberam pólen de plantas da linhagem PF 23 cit N rfrf. Uma vez colhidas as espigas, obteve-se:

1. T_1 cms T rfrf (RC)
2. T_1 cit N rfrf (Ø)
3. PF 23 cms T Rfrf (RC)
4. PF 23 cit N rfrf (Ø)

onde RC indica retrocruzamento e Ø indica autofecundação da linhagem mantenedora. A taxa de recuperação da fertilidade na linhagem T_1 cms T rfrf foi de 0,01%.

No verão 85/86, foram semeadas 600 sementes das linhagens PF 23 cms T Rfrf, no campo experimental da Estação de Pesquisa de Santa Cruz das Palmeiras, SP, da AGROCERES, obedecidos os procedimentos experimentais e agrícolas já citados. No florescimento, foram autofecundadas 225 plantas. Colhidas 196 espigas originárias de autofecundação, foram debulhadas em "bulk" e separadas em duas amostras.

No inverno/86, 2000 sementes de uma das amostras foram semeadas em Santa Cruz das Palmeiras, SP. Após desbaste, obteve-se, no florescimento, 864 plantas das quais 226 eram estéreis, recebendo pólen da linhagem PF 23 cit N rfrf, simultaneamente semeada. A outra amostra foi enviada a Estação de Pesquisa da AGROCERES em Capinópolis, MG, para execução do mesmo procedimento. Tal precaução deveu-se a observação, já no verão 85/86, de uma incidência moderada (pequeno número de lesões) de *Helminthosporium maydis* raça T, em Santa Cruz das Palmeiras. No entanto, no inverno/86, não ocorreu aumento do número de lesões ou mesmo da extensão das

lesões; em Capinópolis não se observou o aparecimento dos si nais da doença. Obteve-se, na colheita, espigas da linhagem PF 23 cms T rfrf (RC) e PF 23 cit N rfrf $\otimes$ mantenedora.

No verão 86/87, foi instalado um campo de mul tiplicação da linhagem PF 23 cms T rfrf pela sua mantenedora, em Santa Cruz das Palmeiras, SP, quando se observou a ocor rência da doença em níveis epidêmicos. Foi possível reali- zar a colheita de espigas, embora o rendimento de grãos te- nha sido seriamente prejudicado. Semeadas simultaneamente as linhagens PF 23 cms T RfRf e PF 23 cms T Rfrf, observou-se a ocorrência de lesões nas mesmas, com igual intensidade.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Metodologia inicial

3.2.1.1. Objetivos

Dentre os objetivos iniciais deste trabalho, a análise de proteína total extraída de plântulas cms T e ci toplasma normal, submetidas a ação do carbamato Methomyl, era necessária para uma determinação prévia de alterações na sin tese protéica. Além disso, era necessário a calibração de concentrações do inibidor, ajustando-as as linhagens em estudo, verificando, dessa forma, a eficiência das concentrações citadas na literatura.

3.2.1.2. Métodos de laboratório

3.2.1.2.1. Germinação das sementes

Foram instaladas em papel de germinação, 200 sementes de cada uma das seguintes linhagens:

- PF 23 cms T rfrf
- PF 23 cms T RfRf
- PF 23 cms T Rfrf
- PF 23 cit N rfrf
- T₁ cms T
- T₁ cit N

Cada amostra de sementes foi dividida em duas, instalando-se 100 sementes em papel umedecido com água destilada e outras 100 sementes em uma solução 10^{-1} M de Methomyl (PM 162, 21,5% p/v do inseticida Lannate). Os rolos de papel foram mantidos em câmara BOD, marca FANEN por 96 horas a 29°C e 100% de umidade relativa. Em seguida, os rolos de papel foram abertos, realizadas as avaliações de número de sementes mortas, número de plântulas normais, comprimento da plântula (cm) e comprimento da raiz seminal (cm).

3.2.1.2.2. Extração de proteína total

O protocolo de extração de proteína total por SDS - eletroforese em gel de poliacrilamida é listado a seguir:

- a. Trituração das amostras de plúmulas em almo fariz, a 5-10°C, na presença de tampão Tris-HCl 10 mM, pH = 8,0.

- b. Pré-precipitação protéica com acetona a 2°C, na proporção de 20% do volume inicial.
- c. Descanso das amostras por 10 minutos em refrigerador.
- d. Centrifugação das amostras em centrífuga refrigerada Hitachi, em temperatura de 5°C, por um período de 10 minutos, a 7000 rpm.
- e. Recuperação do sobrenadante.
- f. Precipitação protéica com acetona a 2°C, na proporção de duas vezes o volume inicial.
- g. Descanso pelo período de 1 hora em refrigerador.
- h. Centrifugação das amostras a 13.000 rpm por 10 minutos a 5°C.
- i. Eletroforese das amostras.

Nesta fase do trabalho, o protocolo de execução de eletroforeses não estava ainda completamente estabelecido, principalmente quanto a concentração ideal de acrilamida no gel e de proteínas nas amostras em estudo. As avaliações de comprimento da raiz seminal e comprimento da plúmula foram prejudicadas pela conformação das mesmas, com grande distorção, atribuída ao tipo de crescimento em rolos de papel de germinação. Assim, decidiu-se transferir os ensaios para casa-de-vegetação.

3.2.2. Metodologia de casa-de-vegetação

3.2.2.1. Objetivos

O objetivo inicial da transferência dos ensaios para casa-de-vegetação foi o de permitir um crescimento uniforme de raízes e plúmulas. Uma observação realizada nesse período, sobre a síntese de antocianina em raízes das linhagens, em função da exposição à luz solar, demonstrou a necessidade de um delineamento experimental que possibilitasse maior precisão na coleta e análise dos dados. Os ensaios realizados em casa-de-vegetação permitiram também o prolongamento do período de observação, quando comparados com os ensaios de germinação.

3.2.2.2. Equipamento

Para a realização dos ensaios foram utilizadas cubas plásticas de 3 litros de volume, contendo 2,5 litros de água destilada ou da solução contendo os inibidores em concentrações diversas. As sementes eram sustentadas por placas de isopor contendo receptáculos para as mesmas. O meio líquido era oxigenado borbulhando-se ar atmosférico por meio de bomba de ar comumente utilizada em aquários. A temperatura noturna, quando necessário, foi elevada utilizando-se aquecedor Lorenzetti. A Figura 12 mostra uma vista geral do equipamento utilizado.

3.2.3.3. Plano experimental

O ensaio experimental foi realizado segundo o delineamento de parcelas subdivididas onde:

Tratamentos A (concentrações de inibidores):

- 1 - Methomyl 5×10^{-4} M
- 2 - Methomyl 10^{-3} M
- 3 - Methomyl 2×10^{-3} M
- 4 - Methomyl 5×10^{-3} M
- 5 - DNP 10^{-5} M
- 6 - DNP 10^{-4} M
- 7 - H₂O destilada

Tratamentos B (linhagens):

- 1 - PF23 cms T rfrf
- 2 - PF 23 cms T RfRf
- 3 - PF 23 cms T Rfrf
- 4 - PF 23 cit N rfrf
- 5 - T₁ cms T
- 6 - T₁ cit N

Foram utilizadas parcelas contendo 5 sementes, com 3 repetições. As parcelas dos tratamentos B foram sorteadas em cada repetição, determinando a seguinte disposição para os tratamentos:

1	PF23 cmST rfrf	4	PF23 cit N rfrf
2	PF23 cmST Rfrf	5	T ₁ cmST rfrf
3	PF23 cmST Rfrf	6	T ₁ cit N rfrf
7	T ₁ cit N rfrf	10	PF23 cmST Rfrf
8	T ₁ cms T rfrf	11	PF23 cmST Rfrf
9	PF23 citN rfrf	12	PF23 cmST rfrf
13	T ₁ cit N rfrf	16	PF23 cit N rfrf
14	PF23 cmST Rfrf	17	PF23 cmST Rfrf
15	T ₁ cmST rfrf	18	PF23 cmST rfrf

Essa mesma disposição foi utilizada em todas as 7 cubas, totalizando 126 entradas a serem analisadas.

3.2.2.4. Experimentação

Duzentas sementes de cada uma das linhagens foram instaladas em papel de germinação Germitest, umedecidas em água destilada e colocadas em câmaras BOD, marca FANEN, a 29°C e 100% de umidade relativa, por um período de 72 horas. A seguir, foram escolhidas 105 plântulas em início de emissão de plúmulas e radículas, de cada linhagem, as quais foram instaladas nos receptáculos das placas de isopor das cubas, cada uma contendo 2,5 litros de água destilada, obedecendo à disposição apresentada anteriormente.

Uma vez instaladas as sementes, foi acionado o mecanismo de bombeamento de ar atmosférico e acrescentadas, nas cubas 1 a 6, as concentrações de inibidores mencionada anteriormente, de acordo com o seguinte:

Doses/2,5 l	Concentrações dos inibidores					
	$5 \times 10^{-4} M$	$10^{-3} M$	$2 \times 10^{-3} M$	$5 \times 10^{-3} M$	$10^{-5} M$	$10^{-4} M$
Methomyl	940 μ l	1,9ml	3,8ml	9,4ml	-	-
DNP					0,5ml	5,0ml

Os volumes de DNP indicados referem-se a utilização de uma solução concentrada do inibidor, à base de 90 mg/100 ml de H₂O destilada (2,4-dinitrofenol, PM 184,1).

3.2.2.5. Coleta dos dados

As plântulas permaneceram em meio líquido por um período de 96 horas. Em seguida, foram retiradas e submetidas as seguintes avaliações iniciais:

1. Peso total de plântulas (incluindo as sementes) (g);
2. Peso de raízes seminais (g).

Para tanto, as raízes e plúmulas foram seccionadas junto a semente. As pesagens foram realizadas em ba-

lança Marte Mod. Al000, com a precisão de duas casas decimais. As plúmulas foram armazenadas em "freezer", sem pesagem prévia.

3.2.2.6. Análise estatística dos dados

Os dados coletados foram analisados no programa MSTAT, da Universidade de Michigan, utilizando um computador Microtec XT, pertencente a Estação de Pesquisa de Santa Cruz das Palmeiras, da AGROCERES. Foram analisados os dados referentes a peso de plântulas e peso de raízes, conforme a tabela de análise de variância:

FV	GL
Repetições	2
Tratamento A	6
Erro (a)	12
Tratamento B	5
Interação A x B	30
Erro (b)	70

3.2.3. Metodologia de campo

3.2.3.1. Plano de cruzamentos

Com o intuito de realizar uma análise genética de características associadas ao fenômeno CMS, no inverno de 1988 foi instalado, no campo experimental da Estação de Pesquisa de Capinópolis, da AGROCERES, o seguinte grupo de cruzamentos:

Linha ♀				Linha ♂			
1.	T ₁	cms T rfrf	x	T ₁	cit N rfrf		
2.	T ₁	cms T rfrf	x	PF 23	cit N rfrf		
3.	T ₁	cms T rfrf	x	PF 23	cms T RfRf		
4.	T ₁	cms T rfrf	x	PF 23	cms T Rfrf		
5.	PF 23	cms T rfrf	x	PF 23	cit N rfrf		
6.	PF 23	cms rfrf	x	PF 23	cms T RfRf		
7.	PF 23	cms T rfrf	x	PF 23	cms T Rfrf		

3.2.3.2. Execução dos cruzamentos

As linhagens foram semeadas em fileiras de 20m, espaçadas de 0,90m, com espaçamento entre plantas de 0,20m, sendo polinizadas manualmente. Uma vez colhidas, as sementes foram enviadas a Estação de Pesquisa de Santa Cruz das Palmeiras onde foram realizadas as análises relacionadas

nos itens 3.2.2.5, 3.2.4.2, e 3.2.4.3. Uma amostra dos cruzamentos citados foi instalada em campo experimental, para verificar a manutenção da esterilidade ou a restauração da fertilidade e obter descendentes para a continuidade dos estudos.

3.2.4. Metodologia de laboratório

Como a instalação das linhagens em casa-de-vegetação permitiu a observação de comportamento diferencial da expressão de antocianinas sob efeito da ação dos inibidores, foi necessária uma avaliação quantitativa da concentração de flavonóides em raízes das linhagens em estudo. Os trabalhos a seguir relatados foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular da Agroceres, em Santa Cruz das Palmeiras, SP.

3.2.4.1. Flavonóides

3.2.4.1.1. Extração de flavonóides

Para a extração de flavonóides das raízes seminais das linhagens em estudo, foi adotada a metodologia descrita por RENGEL & KORDAN (1987), com algumas modificações. Imediatamente após a pesagem das raízes, estas foram armazenadas em "freezer" por 1 hora. A seguir, cada grupo de cinco raízes, representando uma parcela, foi triturado em almofariz, utilizando 15 ml do extrator HCl-Metanol (1:99 v/v),

a 10°C. Após a extração, as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada Hitachi, a 5000 rpm por 10 minutos a 5°C, recuperando-se o sobrenadante.

3.2.4.1.2. Análise de flavonóides

RENGEL & KORDAN (1987) sugerem que a quantificação de antocianinas em raízes de milho seja realizada avaliando-se a absorbância (A) em espectrofotômetro, no comprimento da onda 530 nm. Para a mesma avaliação em plúmulas, os autores sugerem a fórmula $A_{530} - A_{657}$, que leva em conta a interferência, na leitura da concentração de antocianinas, dos produtos de degradação da clorofila. Entretanto, foram consideradas as informações relatadas por GOODWIN & MERCER (1987) sobre as faixas de absorbância da pelargonidina (A = 520nm), cianidina (A = 535 nm) e delfinidina (A = 545 nm) como importantes para uma análise fina da expressão de flavonóides na interação citoplasma estéril x ação gênica de Rf_1 x ação do inibidor.

Devido a elevada concentração de antocianinas na maioria das amostras, as soluções sofreram uma diluição fator 5, utilizando o extrator HCl-Metanol. Em seguida, foi realizada a leitura de absorbância a 520, 535 e 545 nm, em espectrofotômetro Incibrás, Mod. MF-190.

3.2.4.1.3. Análise estatística dos dados

Os valores de absorbância nos 3 comprimentos

de onda foram ajustados para A/g de raízes (peso fresco), conforme HALL & YEOMAN (1986) e analisados no programa MSTAT, citado no item 3.2.2.6. Da mesma forma foram analisados os valores absolutos de absorbância, para efeito de comparação.

3.2.4.2. Polifenol oxidase

3.2.4.2.1. Análise de polifenol oxidases

VAN LOON (1971) relata os procedimentos para análise eletroforética de polifenol oxidases, mencionando as maneiras pelas quais é possível distinguí-las das peroxidases. Rotineiramente 3,4-diidroxil-L-fenilalanina (DOPA, PM 197, 19), tem sido utilizada na revelação de eletroforeses de PPO, embora VAUGHN (1988) mencione a possibilidade de que a DOPA possa detectar a atividade de peroxidases.

3.2.4.2.2. Preparação das amostras

Após a pesagem, as plúmulas foram armazenadas em "freezer" por um período de 2 horas. A seguir, cada amostra contendo 5 plúmulas foi triturada em almofariz, a 5°C, sendo o extrato colocado em tubos Eppendorf e imediatamente congelados. Inicialmente foi utilizado para a extração, um volume de 100 µl de tampão fosfato 10 mM pH 8,0. Dada a pouca nitidez observada nas bandas do gel, adotou-se o critério de utilizar o extrato não diluído originário da trituração das plúmulas.

Uma vez preparadas, as amostras foram centrifugadas em centrífuga Incibrás Spin 1 a 7000 rpm por um período de 3 minutos. A seguir, 20 μ l de cada amostra foi adicionada a 20 μ l de glicerina-água (1:1 v/v) e aplicada às canaletas do gel de poliacrilamida.

3.2.4.2.3. Eletroforese

A citação de MAYER & HAREL (1979), de que SDS (Sódio - Dodecil Sulfato) altera a estrutura inicial da enzima PPO, podendo simular um processo de ativação da mesma, também determinou a utilização de extratos brutos de células para a corrida eletroforética. O protocolo de eletroforese utilizado está relacionado a seguir:

a. Soluções utilizadas para a preparação do gel de poliacrilamida

Solução A -- Tris-HCl 3M

HCl 1N - 4,8 ml

Trisma - 36,6 g

Temed - 0,23 ml

pH = 8,9

Volume final - 100 ml

Solução B - Tris-HCl 0,5M

HCl 1N - 48 ml

Trisma - 5,98 g

Temed - 0,46 ml

pH = 6,7

Volume final - 100 ml

Solução C - Acrilamida - 28 g

Bis-acrilamida - 0,74 g

Volume final - 100 ml

Solução D - Acrilamina - 10 g

Bis-acrilamida - 2,5 g

Volume final - 100 ml

Solução E - Riboflavina - 4 mg

Volume final - 100 ml

Solução F - Sacarose - 40 g

Volume final - 100 ml

Solução G - Perssulfato de amônio - 0,07 g

Volume final - 50 ml

Solução H - Tampão glicina (10 x concentrado)

Trisma - 6 g

Glicina - 28,8 g

pH = 8,3

Volume final - 1000 ml.

b. Preparação do gel separador (pH = 8,9)

Para um volume de 24 ml, suficiente para elaborar uma placa padrão de 15 canaletas, foram utilizadas:

Solução A - 6 ml

Solução C - 6 ml

Solução G - 12 ml

Temed - 14 μ l

A solução G e o Temed somente foram acrescentadas as soluções A e B logo antes de se verter a preparação na placa de eletroforese.

c. Preparação do gel espaçador (pH = 6,7)

Para um volume de 16 ml, foram utilizadas:

Solução B - 2 ml

Solução D - 4 ml

Solução E - 2 ml

Solução F - 8 ml

Temed - 14 μ l

O período médio de solidificação do gel separador foi de 20 minutos, após o que foi acrescentada a solução do gel espaçador. As placas de eletroforese foram levadas a presença de luz difusa. Após um período médio de 25 minutos, foi retirado o molde das canaletas. Um volume de 40 μ l de cada amostra + glicerina (1:1, glicerina - H₂O) foi

acrescentado a cada canaleta, sendo então as cubas inferior e superior completadas com volume suficiente de tampão glicina (solução H). As cubas foram levadas ao refrigerador e conectadas a uma fonte de corrente elétrica marca Permatron. A temperatura da corrida foi mantida em torno de 8°C. A fonte de corrente elétrica foi estabilizada em 100 Volts, até a passagem completa das amostras pelo gel espaçador, após o que passou-se a operar em 200 Volts até o final da corrida. Não foram utilizados padrões de peso molecular comparativos nas eletroforeses, em função da coloração diferencial dos padrões a disposição (BSA, corada por Coomassie Blue), e da enzima PPO, cuja revelação ocorreu após um período médio de 100 minutos de corrida, quando as placas de poliacrilamida foram retiradas, eliminando o gel espaçador, e colocadas em recipientes plásticos na presença de uma solução de 100 mg de DOPA em 50 ml de tampão fosfato 0,1M a pH 6,8. Os recipientes foram levados à câmara BOD, a 31°C com ventilação contínua. Após um período médio de 15 minutos, as placas de poliacrilamida foram analisadas visualmente e fotografadas.

3.2.4.3.4. Interpretação gráfica

Em função da ausência de padrões de peso molecular associados a eletroforese de PPO, a análise assumiu um caráter estritamente qualitativo. As alíquotas de 20 µl (tomadas de cada amostra macerada de 5 plântulas), apresentavam variações na concentração das proteínas, em função das va-

riações no peso fresco das plântulas, associadas aos tratamentos com concentrações diversas dos inibidores. Não foi possível ajustar o peso inicial das parcelas de plântulas em função de reduções drásticas no desenvolvimento das plântulas nas concentrações mais elevadas dos inibidores.

Tais razões concorreram para um aspecto muitas vezes tênue da coloração da PPO, indicadora de sua atividade, aspecto possivelmente agravado por alterações não controláveis como técnica de extração da enzima e temperatura ambiente. Assim, foi realizada uma interpretação gráfica recobrando-se as placas de poliacrilamida com um filme de acetato e anotando-se as bandas indicativas da atividade de PPO.

Uma vez registradas, as placas foram imersas em uma solução fixadora de Metanol - Ácido Acético - H_2O (30:7:63), plastificadas e armazenadas em refrigerador.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDO DA SENSIBILIDADE DAS LINHAGENS PF 23 E T₁ AO INIBIDOR METHOMYL

4.1.1. Testes de germinação

Os testes iniciais de sensibilidade das linhagens PF 23 e T₁ a Methomyl foram realizados de maneira semelhante aos testes padrão de germinação de sementes. Os resultados podem ser observados nas Tabelas 6 e 7. As linhagens PF 23 cms T RfRf e PF 23 cms T Rfrf demonstram, na concentração 10^{-3} M de Methomyl, uma capacidade de germinação superior a da linhagem PF 23 cms T rfrf, o que pode ser verificado pela percentagem de plântulas anormais (respectivamente 11% e 8%). Entretanto, a restauração da fertilidade não foi capaz de promover o desenvolvimento de plântulas normais.

Em relação as linhagens PF 23 cit N rfrf e T₁ cit N rfrf, a Tabela 6 não permite nenhuma conclusão sobre diferenças na sensibilidade ao Methomyl, independente da característica esterilidade citoplasmática. No entanto, a Tabe

Tabela 6. Resultados do teste de germinação das linhagens PF 23 e T₁ na presença de H₂O destilada e Methomyl (10⁻³M). Avaliação realizada de acordo com as Regras para Análise de Sementes.

Linhagem	Total de sementes	Nº de sementes mortas		Nº de plântulas anormais		Nº de plântulas normais	
		H ₂ O	Methomyl	H ₂ O	Methomyl	H ₂ O	Methomyl
PF 23 cms T rfrf	100	2	96	0	4	98	0
PF 23 cms T Rfrf	100	1	89	1	11	98	0
PF 23 cms T Rfrf	100	1	92	2	8	97	0
PF 23 cit N rfrf	100	2	1	0	2	98	97
T ₁ cms T rfrf	100	0	97	1	3	99	0
T ₁ cit N rfrf	100	0	0	0	1	100	99

Tabela 7. Resultados da avaliação do comprimento médio de plúmula e de raiz seminal (cm), com base em 5 plântulas, com exceção de *(4 plântulas) e *(3 plântulas).

Linhagens	Comprimento da plúmula (cm)		Comprimento da raiz seminal (cm)	
	H ₂ O	Methomyl	H ₂ O	Methomyl
PF 23 cms T rfrf	8,1	0,2*	18,39	-
PF 23 cms T Rfrf	7,9	3,6	16,21	3,1
PF 23 cms Rfrf	8,9	2,9	18,01	2,8
PF 23 cit N rfrf	7,1	7,3	11,60	10,6
T ₁ cms T rfrf	5,8	1,4**	15,70	0,6
T ₁ cit N rfrf	6,1	5,9	13,30	6,1

la 7 indica maior sensibilidade da linhagem T_1 cit N, quando se compara a diferença no crescimento da raiz seminal em relação a água (7,2 cm) com a linhagem PF 23 cit N (1,0 cm).

Embora oriundas de elevado número de gerações de reprodução endogâmica, é possível admitir que pequenas diferenças no crescimento de plúmulas e raízes seminais sejam devidas a autofecundações (caso da linhagem PF 23 cms T RfRf, PF 23 cit N rfrf e T_1 cit N rfrf) em relação a retro cruzamentos (PF 23 cms T rfrf, PF 23 cms T RfRf e T_1 cms T rfrf).

Nessa fase das análises, o percentual de redução no crescimento da plúmula e da raiz seminal da linhagem PF 23 cms T RfRf quando submetida a ação do Methomyl (54% e 81% respectivamente) comparado com os valores de redução da linhagem PF 23 cms T RfRf (67% e 84%) não permitiu nenhuma inferência sobre um eventual efeito de dosagem gênica.

Os testes de germinação e as avaliações citadas foram repetidos diversas vezes, sempre com resultados similares. Uma dificuldade inerente aos testes em papel de germinação foi o da distorção no crescimento de plúmulas e raízes seminais, dificultando uma mensuração precisa. Decidiu-se portanto, conduzir os ensaios em casa-de-vegetação.

4.2.1. Análise dos resultados obtidos com a extração de proteína total

No processo de extração da proteína total, uti

lizando-se as plúmulas das linhagens em estudo, o sobrenadante descartado na etapa final do processo foi deixado em repouso à temperatura ambiente do laboratório. Após 3 horas, uma observação casual dos tubos contendo o sobrenadante deixou evidente um processo diferencial de oxidação, conforme a linhagem considerada. Uma vista geral do fenômeno é apresentada na Figura 10, onde os números de 1 a 4 identificam, respectivamente, as linhagens PF 23 cms T rfrf, PF 23 cit N rfrf, PF 23 cms T RfRf e PF 23 cms T Rfrf, na presença do Methomyl (M) 10^{-3} M ou de água destilada (A), acrescidos de acetona, utilizada para a precipitação protéica.

Figura 10. Oxidação do sobrenadante após a recuperação do precipitado protéico, na presença de Methomyl (M) e H_2O (A).

1 - PF 23 cms T rfrf
3 - PF 23 cms T RfRf

2 - PF 23 cit N rfrf
4 - PF 23 cms T Rfrf

A Figura 10 mostra a oxidação mais intensa do extrato da linhagem PF 23 cms T rfrf mesmo na ausência de Methomyl. É evidente, neste caso, que a restauração da fertilidade possibilitou às linhagens PF 23 cms T RfRf e PF 23 cms T Rfrf obter um nível de oxidação muito próximo do apresentado pela linhagem PF 23 cit N rfrf.

Na presença do inibidor, os valores de oxidação do sobrenadante da linhagem PF 23 cms T RfRf medidos em valores absolutos de absorbância, são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de absorbância (A_{420}) do sobrenadante oxidado das linhagens PF 23 cms T rfrf, PF 23 cit N rfrf e PF 23 cms T RfRf.

Meio	Linhagens		
	PF 23 cms T rfrf	PF 23 cit N rfrf	PF 23 cms T RfRf
H ₂ O	0,281	0,172	0,261
Methomyl (10^{-3} M)	0,502	0,277	0,424
Acréscimo %	78,6	61,0	62,5

Os dados mostram que embora em valores absolutos de absorbância a linhagem PF 23 cms T RfRf se mostre semelhante a PF 23 cms T rfrf, em termos de acréscimo percentual em oxidação a linhagem restaurada e similar à de citoplasma normal.

A Figura 11 mostra um detalhe dos sobrenadantes em Methomyl, onde fica evidente a diferença entre as linhagens PF 23 cms T RfRf e PF 23 cms T Rfrf. Essa observação, quando associada a hipótese de um efeito de dosagem gênica, suscitou inicialmente uma conclusão contraditória, porque baseada numa interpretação infundada, qual seja: um dos efeitos do gene Rf_1 seria o de diminuir o nível de oxidação do sobrenadante. Assim, admitindo o efeito de dosagem gênica, a linhagem PF 23 cms T RfRf deveria apresentar oxidação menos intensa, na presença do inibidor, o que não ocorre, observando-se a Figura 11. Como a precisão experimental das observações não era adequada, não foi possível admitir inferências seguras. Entretanto, as análises de PPO permitiram uma interpretação correta da diferença observada.

Figura 11. Detalhe dos sobrenadantes oxidados, na presença de Methomyl $10^{-3}M$.

Conforme mencionado no item 3.2.1.2.1., o pro tocolo de eletroforese de proteína total não estava completamente estabelecido. Assim, a análise dos efeitos do Methomyl sobre a síntese proteica não foi completada.

4.2. ESTUDO DO EFEITO DOS INIBIDORES METHOMYL E DNP SOBRE LINHAGENS DE MILHO

4.2.1. Aspectos gerais

A limitação apresentada pelos testes de germinação, quanto à precisão das mensurações realizadas, motivou o desenvolvimento de um sistema experimental simples, em casa-de-vegetação. Uma vista geral do sistema é apresentada na Figura 12.

Com a transferência das linhagens para a presença de luz (na câmara BOD as plântulas permaneciam em ausência de luz), observou-se que tanto a linhagem PF 23 quanto a linhagem T₁ eram capazes de sintetizar antocianinas nas raízes e no coleoptilo. Nas primeiras tentativas realizadas para ajuste das condições de desenvolvimento das plântulas em cultura líquida, ficou evidente que embora a síntese de antocianinas fosse detectada em torno de 6 a 10 horas após a exposição ao Methomyl a síntese era imediatamente bloqueada nas linhagens PF 23 cms T rfrf e T₁ cms T rfrf, na concentração

10^{-3} M. Notou-se também que as linhagens PF 23 restauradas eram capazes de síntese, embora, aparentemente, com menor intensidade que as linhagens citoplasma normal.

Figura 12. Vista geral do sistema experimental instalado em casa-de-vegetação.

A primeira hipótese construída para a explicação do fenômeno admitia que um bloqueio geral do metabolismo estivesse provocando a morte das plantas. Nesse caso, obviamente a síntese de antocianinas estaria também bloqueada. Entretanto, quando se instalava plântulas das linhagens CMS

T não restauradas na presença de Methomyl 10^{-3} M por um período de 12 horas, suficiente para observar o bloqueio da síntese de antocianinas, sendo as mesmas retiradas e imediatamente lavadas com água destilada em abundância, havia recuperação da capacidade de síntese.

Essa observação sugeria um bloqueio em algum ponto do metabolismo de flavonóides. Pelas informações fornecidas pela literatura até 1987 (DOONER, 1983; PAZ-ARES et alii, 1987; MEYER et alii, 1987), não foi possível detectar um sítio passível de bloqueio pelo carbamato. A única observação correlata é a de TORNÉ & BERVILLE (1985), mencionada no item 2.2.2.

Os testes foram repetidos, com o intuito de quantificar o bloqueio de síntese. Notou-se, entretanto, que a repetibilidade das observações era influenciada pela posição relativa das plântulas no recipiente onde se desenvolviam, devido à exposição diferencial a luz solar. Assim, decidiu-se instalar um ensaio com parcelas sub-divididas, com 3 repetições, onde os tratamentos A seriam representados pelas concentrações do inibidor e testemunha, e os tratamentos B representados pelas linhagens.

A Figura 12 mostra uma vista geral do sistema experimental utilizado.

Conforme mencionado no item 3.2.3.3., as concentrações de Methomyl utilizadas nos ensaios foram as seguintes: 5×10^{-4} M, 10^{-3} M, 2×10^{-3} M e 5×10^{-3} M. As Figuras 13,

14 e 15 mostram o efeito do inibidor, 72 horas após a instalação do ensaio. Além do Methomyl, foi utilizado também o desacoplador clássico 2,4-dinitrofenol. Como o sítio de atuação dessa substância é bem definido, ocorrendo o bloqueio da síntese de antocianinas pela mesma, seria possível dada a similaridade de ação com o Methomyl (BOUTHYETTE et alii, 1985), definir o sítio de bloqueio da síntese das antocianinas.

Figura 13. Linhagens de milho, distribuídas segundo o delineamento experimental adotado, submetida à concentração $5 \times 10^{-4}M$ de Methomyl.

Figura 14. Linhagens de milho, distribuídas segundo o delineamento experimental adotado, submetidas à concentração $10^{-3}M$ de Methomyl.

Figura 15. Linhagens de milho, distribuídas segundo o delineamento experimental adotado, submetidas à concentração $2 \times 10^{-3}M$ de Methomyl.

As Figuras 16, 17 e 18 mostram, respectivamente, os danos causados às plântulas pela ação do Methomyl, o bloqueio da síntese de antocianinas em raízes de plântulas CMS T e a abundante síntese de mucopolissacarídeos nas mesmas. As Figuras 19 e 20 mostram uma visão comparativa da ação do Methomyl 10^{-3} M sobre as linhagens PF 23 cit N rfrf, PF 23 cms T rfrf e T₁ cms T rfrf.

Figura 16. Montagem demonstrativa dos danos causados à linhagem T₁ cms T rfrf (à esquerda) e PF cms T rfrf, em comparação às contrapartes citoplasma normal, na presença de Methomyl 10^{-3} M.

Figura 17. Bloqueio da síntese de antocianinas em raízes da linhagem PF-23 cms T rfrf (à esquerda) e T₁ cms T rfrf (à direita) em comparação com as contrapartes citoplasma normal.

Figura 18. Vista geral da síntese de mucopolissacarídeos nas raízes das linhagens PF 23 cms T rfrf (à esquerda) e T₁ cms T rfrf (à direita), 96 horas após a instalação do teste, comparadas a linhagem PF 23 de citoplasma normal, na presença de Methomyl $10^{-3}M$.

Figura 19. Detalhe do efeito de Methomyl $10^{-3}M$ sobre as linhagens PF 23 cit N rfrf e PF 23 cms T rfrf, 96 horas após a instalação do teste.

Figura 20. Detalhe do efeito de Methomyl $10^{-3}M$ sobre a linhagem T_1 cms T rfrf, em comparação com o desenvolvimento em H_2O destilada.

4.2.2. Análise do efeito dos inibidores sobre o desenvolvimento das linhagens

4.2.2.1. Peso de plântulas

Os resultados obtidos com a pesagem das plântulas (peso fresco em gramas) é apresentado na Tabela 9 e a análise da variância desses dados e o respectivo coeficiente de variação podem ser observados na Tabela 10. (*)

Os dados evidenciam um efeito inibitório do crescimento das plântulas a medida que as concentrações do Methomyl se elevam, o mesmo ocorrendo com o DNP. Nota-se um efeito estimulatório geral da concentração 5×10^{-4} M de Methomyl sobre o desenvolvimento das plântulas, quando em comparação com água destilada apenas. Essa observação é influenciada pela interferência da degeneração das raízes seminais das linhagens CMS T, associada ao acúmulo de mucopolissacarídeos que, impregnados de H_2O , contribuem para a elevação do peso das plântulas. Isso fiva evidente no caso das linhagens PF 23 cms T rfrf e T_1 cms T rfrf cujo peso na concentração 5×10^{-3} M é maior que na concentração 2×10^{-3} M. Uma vez que a partir de 2×10^{-3} M ocorre morte das plântulas, esses dados tendem a se tornar aleatórios. Outro fator que influencia os valores tomados é o do peso das sementes. Embora oriundas de linhagens quase isogênicas, o fator embebição e mesmo

(*) Os dados completos são apresentados no Apêndice II.

Tabela 9. Peso de plântulas e peso médio/concentração das linhagens PF 23 e T₁ sob efeito de inibidores, em comparação com o desenvolvimento em H₂O destilada.

Linhagens	Methamyl				DNP		H ₂ O
	5x10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M	2x10 ⁻³ M	5x10 ⁻³ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	
1. PF 23 cms T rfrf	5,43	3,76	2,89	3,02	4,15	3,35	4,36
2. PF 23 cms T Rfrf	5,07	4,25	3,36	3,21	4,12	3,50	3,84
3. PF 23 cms Rfrf	5,59	4,61	2,99	3,22	4,51	3,66	4,59
4. PF 23 cit N rfrf	5,01	5,14	4,08	4,00	3,97	3,41	4,09
5. T ₁ cms T rfrf	4,27	3,30	2,44	2,53	4,11	3,20	4,60
6. R ₁ cit N rfrf	4,96	4,91	4,11	3,62	3,93	3,09	4,14
Peso médio/conc.	5,06	4,33	3,31	3,27	4,13	3,37	4,27

Tabela 10. Quadro geral da análise da variância para a característica peso de plântulas (g).

FV	GL	SQ	QM	F	Prob.
(1) Repetições	2	1,38	0,691	0,97	
(2) Trat. A	6	48,87	8,146	11,44	0,000
Erro (a)	12	8,55	0,712		
(4) Trat. B	5	7,95	1,591	8,64	0,000
(6) A x B	30	15,88	0,529	2,88	0,000
Erro (b)	70	12,89	0,184		
CV = 10,83%					
Sy (1)	0,130				
Sy (2)	0,199				
Sy (4)	0,094				
Sy (6)	0,248				

a taxa de translocação de nutrientes das plântulas, se controlados pelo modo de propagação (autofecundação ou retrocruzamento), podem exercer influência sobre o peso de plântulas.

Observando a linhagem PF 23 cms T RfRf nas concentrações 5×10^{-4} M, 10^{-3} M e 2×10^{-3} M nota-se que sua taxa de decréscimo de peso é pouco inferior a da linhagem PF 23 cms T RfRf, embora superior se comparada com a linhagem PF 23 cms T rfrf, entre as concentrações 5×10^{-4} M e 10^{-3} M.

4.2.2.2. Peso de raízes seminais

As Tabelas 11 e 12 apresentam os resultados obtidos com a avaliação de peso de raízes seminais (*). Os dados evidenciam o efeito bloqueador do desenvolvimento das raízes seminais. Os efeitos mostraram-se mais intensos na linhagem PF 23 cms T rfrf, quando se compara seu comportamento nas concentrações 5×10^{-4} e 10^{-3} M de Methomyl. O grupo PF 23, a partir da concentração 2×10^{-3} M mostrou um relativo ganho em peso (PF 23 cms T rfrf e PF 23 cit N rfrf) ou manutenção do peso (PF 23 cms T RfRf). A linhagem PF 23 cms T RfRf apresentou o menor peso na concentração 5×10^{-3} de Methomyl e 10^{-4} M de DNP.

É possível observar um efeito estimulatório geral da concentração 5×10^{-4} M de Methomyl, com exceção da linha

(*) Os dados completos são apresentados no Apêndice II.

Tabela 11. Peso de raízes seminais e peso médio/concentração das linhagens PF 23 e T₁ sob efeito de inibidores, em comparação com o desenvolvimento em H₂O destilada.

Linhagens	Methomyl				DNP			H ₂ O
	5x10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M	2x10 ⁻³ M	5x10 ⁻³ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M		
1. PF 23 cms T rfrf	0,87	0,56	0,53	0,57	0,62	0,45		0,57
2. PF 23 cms Rfrf	0,75	0,49	0,59	0,59	0,61	0,51		0,56
3. PF 23 cms T Rfrf	0,78	0,56	0,62	0,51	0,69	0,51		0,65
4. PF 23 cit N rfrf	0,83	0,85	0,60	0,61	0,64	0,44		0,71
5. T ₁ cms T rfrf	0,69	0,54	0,51	0,48	0,74	0,54		0,97
6. T ₁ cit N rfrf	1,07	0,91	0,83	0,62	0,78	0,50		0,93
Peso médio/conc.	0,83	0,65	0,61	0,56	0,68	0,49		0,73

Tabela 12. Quadro geral da análise da variância para a característica peso de raízes
seminais (g).

FV	GL	SQ	QM	F	Prob.
(1) Repetições	2	0,11	0,057	3,66	0,057
(2) Trat. A	6	1,34	0,223	14,45	0,000
Erro (a)	12	0,19	0,015		
(4) Trat. B	5	0,69	0,138	14,19	0,000
(6) A x B	30	0,86	0,029	2,94	0,000
Erro (b)	70	0,68	0,010		
CV = 15,15%					
Sy (1)	0,019				
Sy (2)	0,293				
Sy (4)	0,021				
Sy (6)	0,057				

gem T_1 cms T rfrf. A linhagem PF 23 cit N rfrf apresentou um peso superior ao do desenvolvimento em H_2O destilada, mesmo na concentração $10^{-3}M$ de Methomyl.

A exemplo do que foi discutido no item 4.2.2.1, nas doses mais elevadas dos inibidores, houve um ganho aparente em peso em algumas linhagens, o que pode ser atribuído a intensa secreção de mucopolissacarídeos com adsorção de água. Por outro lado, dos resultados obtidos na concentração $10^{-4}M$ de DNP (desacoplamento total da ATPase), o reduzido peso de raízes seminais indica morte das plântulas.

A Tabela 11 demonstra a maior sensibilidade da linhagem T_1 ao DNP ($10^{-5}M$, concentração de acoplamento fraco da ATPase), independente do citoplasma. Essa observação tem grande importância aplicada, uma vez associada a características tais como susceptibilidade a doenças ou menor absorção de nutrientes. Estabelecidas as características correlacionadas, o teste de sensibilidade ao DNP pode assumir valor agrônômico.

Os valores de coeficiente de variação obtidos na avaliação das duas características foram considerados aceitáveis para esse tipo de experimentação.

4.2.2.3. Análise do quadro geral de significâncias estatísticas

Os efeitos das diversas concentrações de ini-

bidores sobre as linhagens podem ser melhor avaliados observando-se os dados das Tabelas 13 e 14. A Tabela 10 demonstra que as linhagens PF 23 cit N rfrf, PF 23 cms T Rfrf e T_1 cit N rfrf foram as que maior peso de plântulas apresentaram, na média dos tratamentos A (concentrações de inibidores e H_2O destilada). O efeito estimulatório geral da concentração $5 \times 10^{-4} M$ de Methomyl é estatisticamente significativo, suscitando hipóteses explicativas do fenômeno, as quais serão discutidas em outro item. As concentrações $10^{-3} M$ de Methomyl e $10^{-5} M$ de DNP não mostram diferença significativa em relação a H_2O destilada, quando se compara médias das diversas linhagens. Entretanto, na concentração $10^{-3} M$ fica evidente que as linhagens mais sensíveis são a PF 23 cms T rfrf e a T_1 cms T rfrf. O mesmo acontece para as concentrações mais elevadas.

Os valores da Tabela 14 estão expurgados dos pesos de sementes e plúmulas, mostrando boa concordância com os dados da Tabela 13. As linhagens PF 23 cit N rfrf e T_1 cit N rfrf estão entre as que maior peso de raiz seminal mostraram, nas concentrações 5×10^{-4} , $10^{-3} M$, $2 \times 10^{-3} M$ e $5 \times 10^{-3} M$ de Methomyl. A linhagem T_1 cms T rfrf mostrou-se mais sensível ao Methomyl que a linhagem PF 23 cms T rfrf embora nem sempre com significância estatística. A concentração mais elevada de Methomyl inibiu igualmente o desenvolvimento de raízes em todas as linhagens.

Tabela 13. Quadro geral de médias de peso de plântulas, valores de diferença mínima significativa (LSD) e índices de significância para as linhagens (PF 23 cms T rfrf, PF 23 cms T RFRf, PF 23 T Rf rf, PF 23 cit N rfrf, T₁ cms T rfrf e T₁ cit N rfrf, itens 1 a 6 em diversas concentrações de inibidores e H₂O destilada.

Concentrações	Methomyl				DNP		
	5x10 ⁻⁴ M(1)	10 ⁻³ M(2)	2x10 ⁻³ M(3)	5x10 ⁻³ M(4)	10 ⁻⁵ M(5)	10 ⁻⁴ M(6)	H ₂ O(7)
1. 5,06 A	3.5,59 A	4.5,14 A	6.4,11 A	4.4,00 A	3.4,51 A	3.3,66 A	5.4,60 A
2. 4,33 B	1.5,43 A	6.4,91 AB	4.4,08 A	6.3,62 AB	1.4,15 A	2.3,50 A	3.4,59 A
7. 4,27 B	2.5,07 A	3.4,61 AB	2.3,36 B	3.3,22 BC	2.4,12 A	4.3,41 A	1.4,37 A
5. 4,13 B	4.5,01 A	2.4,26 BC	3.2,99 BC	2.3,21 BC	5.4,11 A	1.3,35 A	6.4,14 A
6. 3,37 C	6.4,96 AB	1.3,76 CD	1.2,89 BC	1.3,02 BC	4.3,97 A	5.3,20 A	4.4,09 A
3. 3,31 C	5.4,27 B	5.3,30 D	5.2,44 C	5.2,53 C	6.3,93 A	6.3,09 A	2.3,84 A
4. 3,27 C							
DMS 0,61	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70

Continua

Tabela 13. Continuação.

Linhagens	Linhagens					
	1	2	3	4	5	6
4. 4,24 A	1. 5,43 A	1. 5,07 A	1. 5,59 A	2. 5,14 A	7. 4,60 A	1. 4,96 A
3. 4,17 AB	7. 4,36 B	2. 4,26 B	2. 4,61 B	1. 5,01 A	1. 4,27 A	2. 4,91 A
6. 4,11 ABC	5. 4,15 B	5. 4,12 BC	7. 4,59 B	7. 4,09 B	5. 4,11 A	7. 4,14 B
2. 2,91 BC	2. 3,76 BC	7. 3,84 BC	5. 4,51 B	3. 4,08 B	2. 3,30 B	3. 4,11 B
1. 3,85 C	6. 3,35 CD	6. 3,50 CD	6. 3,66 C	4. 4,00 B	6. 3,20 BC	5. 3,93 B
5. 3,49 D	4. 3,02 D	3. 3,36 D	4. 3,22 C	5. 3,97 B	4. 2,53 CD	4. 3,62 BC
	3. 3,89 D	4. 3,21 D	3. 2,99 C	6. 3,41 B	3. 2,44 D	6. 3,09 C
DE50,26	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69

Tabela 14. Quadro geral de médias de peso de raiz seminal, valores de diferença mínima significativa (LSD) e índices de significância para as linhagens citadas na Tabela 10, em diversas concentrações de inibidores e H₂O destilada.

Concentrações	Methomyl				DNP			H ₂ O
	5x10 ⁻⁴ M(1)	10 ⁻³ M(2)	2x10 ⁻³ M(3)	5x10 ⁻³ M(4)	10 ⁻⁵ M(6)	10 ⁻⁴ M(7)		
1.0,83 A	6.1,07 A	6.0,91 A	6.0,83 A	6.0,78 A	5.0,54 A	5.0,97 A		6.0,81 A
7.0,73 B	1.0,87 B	4.0,85 A	3.0,62 B	4.0,61 A	5.0,74 AB	3.0,51 A		6.0,93 A
5.0,68 BC	4.0,83 BC	1.0,56 B	4.0,60 B	2.0,59 A	3.0,69 AB	2.0,51 A		4.0,71 B
2.0,65 BC	3.0,78 BC	3.0,56 B	2.0,59 B	1.0,57 A	4.0,64 AB	6.0,50 A		3.0,65 B
3.0,61 CD	2.0,75 BC	5.0,54 B	1.0,53 B	3.0,51 A	1.0,62 AB	1.0,45 A		1.0,57 B
4.0,56 DE	5.0,69 C	2.0,49 B	5.0,51 B	5.0,48 A	2.0,61 B	4.0,44 A		2.0,56 B
6.0,49 E								
DM 8,89	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16		0,16
Continua								

Tabela 14. Continuação.

Linhas	Linhas					
	1	2	3	4	5	6
6.0,81 A	1. 0,87 A	1. 0,75 A	1. 0,78 A	2. 0,85 A	7. 0,97 A	1. 1,07 A
4.0,67 B	5. 0,62 B	5. 0,61 AB	5. 0,69 AB	1. 0,83 A	5. 0,74 B	7. 0,93 AB
5.0,64 BC	7. 0,57 BC	3. 0,59 AB	7. 0,75 ABC	7. 0,71 AB	1. 0,69 BC	2. 0,91 AB
3.0,62 BC	4. 0,57 BC	4. 0,59 AB	3. 0,62 ABC	5. 0,64 B	6. 0,54 CD	3. 0,83 B
1.0,59 C	2. 0,56 BC	7. 0,56 B	2. 0,56 BC	4. 0,61 B	2. 0,54 CD	5. 0,78 BC
2.0,59 C	3. 0,53 BC	6. 0,51 B	6. 0,51 C	3. 0,60 BC	3. 0,51 D	4. 0,62 CD
	6. 0,45 C	2. 0,49 B	4. 0,51 C	6. 0,44 C	4. 0,48 D	6. 0,50 D
D56,15	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16

De um modo geral, a concentração de Methomyl que melhor discriminou entre citoplasmas, quanto ao peso de plântulas, foi a de $5 \times 10^{-3} \text{M}$, enquanto que para o peso de raízes seminais, a melhor discriminadora foi a concentração $2 \times 10^{-3} \text{M}$. Observando-se os valores referentes a linhagem T₁ cit N rfrf nas diversas concentrações de inibidores, confirma-se a maior sensibilidade ao DNP.

4.2.3. Estudo da inibição da síntese de antocianinas pelo Methomyl

4.2.3.1. Aspectos gerais

O efeito das diversas concentrações de inibidores sobre a síntese de antocianinas pode ser observado nas Figuras 22 a 27, em comparação com a síntese em H₂O destilada, demonstrada na Figura 21. Da esquerda para a direita, estão as linhagens PF 23 cms T rfrf, PF 23 cms T Rfrf, PF 23 cms T Rfrf, PF 23 cit N rfrf, T₁ cms T rfrf e T₁ cit N rfrf. O conteúdo dos tubos representa uma solução de antocianinas de 5 raízes seminais em extrator HCl-Metanol. A variação de volumes apresentada nas figuras deve-se, no caso da Figura 21, ao registro fotográfico pré-diluição. Nas demais figuras, que representam registro fotográfico pós-diluição, as variações de volume devem-se a perdas durante o processo de leitura de absorbância.

Figura 21. Síntese de antocianinas das raízes seminais de plântulas cultivadas em H_2O destilada.

Figura 22. Síntese de antocianinas em raízes seminais de plântulas cultivadas em $5 \times 10^{-4} M$ de Methomyl.

Figura 23. Efeito do bloqueio de síntese de antocianinas em linhagens PF 23 cms T rfrf e T₁ cms T rfrf, cultivadas em $10^{-3} M$ de Methomyl.

Figura 24. Efeito do bloqueio de síntese de antocianinas em linhagens cms T (estêreis e restauradas), cultivadas em $2 \times 10^{-3} M$ de Methomyl.

Figura 25. Efeito do bloqueio de síntese de antocianinas em linhagens cms T (estéreis e restauradas), cultivadas em $5 \times 10^{-3} M$ de Methomyl.

Figura 26. Síntese de antocianinas em raízes seminais de plantas cultivadas em $10^{-5} M$ de DNP.

Figura 27. Bloqueio da síntese de antocianina em raízes seminais de plântulas cultivadas em $10^{-4}M$ de DNP.

Observando-se a Figura 21, fica evidente a capacidade de síntese de antocianinas por todas as linhagens em estudo, embora T_1 cms T rfrf e T_1 cit N rfrf apresentem menor teor dos flavonóides nas raízes seminais. Na concentração 5×10^{-4} de Methomyl, é evidente que a capacidade de síntese da linhagem PF 23 cms T rfrf permaneceu virtualmente inalterada. O mesmo não aconteceu com a linhagem T_1 cms T rfrf.

O efeito do gene nuclear Rf_1 sobre a síntese de antocianinas em linhagens CMS T é evidenciado quando se observa a Figura 23, que mostra o comportamento das linhagens na concentração $2 \times 10^{-3}M$ de Methomyl. Enquanto nas linhagens

PF 23 cit N rfrf e T_1 cit N rfrf a síntese permaneceu inalterada, a linhagem T_1 cms T rfrf sofreu bloqueio "completo" da síntese e a linhagem PF 23 cms T rfrf apresentou nítida redução de síntese. No entanto, as linhagens PF 23 cms T rfrf e PF 23 cms T Rfrf mantiveram a síntese em teores próximos aos das linhagens de citoplasma normal. Esse fenômeno configura um efeito pleiotrópico do gene nuclear Rf_1 no sistema de esterilidade citoplasmática Texas.

Duplicando-se a concentração do análogo da toxina de *H. maydis* raça T (Figura 24), observou-se que o gene Rf_1 tem seu efeito suprimido; permanecem sintetizando apenas as linhagens de citoplasma normal, embora também com redução. A concentração $5 \times 10^{-3} M$ apenas confirmou o fenômeno e evidenciou a capacidade de síntese das linhagens de citoplasma normal.

A utilização de um desacoplador da fosforilação oxidativa como o 2,4-dinitrofenol, cujo sítio de inibição é perfeitamente conhecido, foi importante neste trabalho. A Figura 26 demonstra que na concentração $10^{-5} M$ (acoplamento fraco) todas as linhagens do grupo PF 23 são capazes de síntese. Quando se compara esse fato com aquele mostrado pela Figura 27 ($10^{-4} M$ de DNP, desacoplamento total) pode-se afirmar que o sítio principal de bloqueio da síntese de antocianinas não está no acoplamento da cadeia respiratória com a fosforilação oxidativa (síntese de ATP). A concentração $10^{-4} M$ de DNP não configurou apenas um bloqueio de sín

tese de antocianinas, mas um colapso metabólico geral que provocou a morte das plântulas.

É importante notar que a síntese de antocianinas evidenciou maior sensibilidade das linhagens do grupo T_1 em relação ao grupo PF 23, frente a substâncias ionóforas e desacopladoras. Mesmo na concentração $10^{-4}M$ de DNP, as linhagens do grupo 23 são capazes de alguma síntese o que não ocorre com o grupo T_1 . A coloração de tom dourado observada nas Figuras 26 e 27 deve-se ao 2,4-dinitrofenol.

O efeito do gene Rf_1 com relação à síntese de antocianinas demonstra um comportamento similar ao de seu efeito em plantas de milho CMS T, com relação ao ataque de *H. maydis* raça T, conforme relatam WATRUD et alii (1975), sugerindo que:

"A restauração da fertilidade modifica a intensidade do efeito da toxina em folhas, raízes ou mitocôndrias isoladas".

Os dados corroboram o modelo proposto por ECHEVERRIGARAY (1985, comunicação pessoal) e MACHADO et alii (1986), que admite a coexistência de moléculas da proteína mutada (PM 13.000, FORDE et alii, 1980), que simultaneamente promove a esterilidade e atua como sítio de acoplamento da toxina T, com moléculas corretas da proteína, sintetizadas "via" intermediação de tRNAs supressores de ponto final de leitura.

4.2.3.2. Análise das concentrações de antocianinas nas linhagens do grupo PF 23 e grupo T₁

Foi realizada uma análise quantitativa dos teores de antocianinas, tomando os valores de absorbância, em termos absolutos e corrigidos para absorbância/g de raízes (peso fresco); adotando-se a informação de GOODWIN & MERCER (1987), foram avaliados os valores de absorbância em 520 nm (pelargonidina), 535 nm (cianidina) e 545 nm (delfinidina).

A Tabela 15 mostra um quadro geral dos valores médios de absorbância para os 3 comprimentos de onda citados, em números absolutos e após correção para A/g de raízes (peso fresco), enquanto a Tabela 16 apresenta o quadro geral de análise da variância, para os 3 comprimentos de onda, com os dados de absorbância em valores absolutos e após correção. Embora os coeficientes de variação tenham sido elevados, optou-se pela não transformação dos dados, devido a coerência satisfatória dos resultados, quando comparados com os efeitos discutidos nos itens 4.2.2.1 e 4.2.2.2. Os dados completos são apresentados nos Apêndices III e IV.

As Tabelas 17, 18 e 19 apresentam os valores médios de concentração de antocianinas (A/g) nas linhagens submetidas às diversas concentrações dos inibidores, em comparação com os valores de síntese em H₂O destilada, bem como os índices de significância e as diferenças mínimas significativas.

Tabela 15. Valores médios de absorbância relativos ao teor de antocianinas de raízes seminais. Médias de 126 observações (6 linhagens em 6 concentrações de inibidores + H₂O destilada; 3 repetições).

	Absorbâncias		
	A ₅₂₀	A ₅₃₅	A ₅₄₅
A	0,128	0,133	0,121
A/g raízes	0,190	0,197	0,180

A Tabela 20 mostra o quadro geral da análise da variância de um fatorial com estudo completo das interações, evidenciando a alta significância estatística dos valores do teste F para linhagens, inibidores e interação linhagens x inibidores. O mesmo teste mostra alguma significância estatística para faixas de leitura de absorbância, o que, verificados os valores médios da coluna "concentrações" nas Tabelas 17 a 19, demonstra uma tendência de síntese preferencial de delfinidina (A₅₄₅), quando sob efeito de inibidores. Esse fato poderia estar relacionado com uma mudança (ainda que pequena) no pH do meio celular, por influência direta dos inibidores nos caminhos alternativos de síntese.

Tabela 16. Quadro geral da análise da variância, para os valores de absorvância (A) e absorvância relativa (A/g raízes).

FV	GL	Quadrados médios						Teste F					
		A ₅₂₀			A ₅₃₅			A ₅₄₅			A ₅₂₀		
		A	A/g	A	A/g	A	A/g	A	A/g	A	A/g	A	A/g
(1) Rep.	2	0,000	0,003	0,001	0,001	0,000	0,001	0,04	0,25	0,54	0,05	0,23	0,09
(2) Trat. A	6	0,129	0,200	0,146	0,223	0,112	0,171	48,39	15,38	85,24	20,33	95,70	20,44
Erro (a)	12	0,003	0,013	0,002	0,011	0,001	0,008						
(4) Trat. B	5	0,088	0,200	0,104	0,234	0,080	0,180	77,62	53,45	112,34	67,94	105,97	62,74
(6) AB	30	0,017	0,039	0,019	0,043	0,014	0,033	14,58	10,31	20,09	13,28	18,92	11,64
Erro (b)	70	0,001	0,004	0,001	0,003	0,001	0,003						
CV (%)								23,64	32,15	22,92	29,78	22,79	29,80
Sy (1)		0,007	0,018	0,006	0,016	0,015	0,014						
Sy (2)		0,012	0,027	0,009	0,025	0,008	0,022						
Sy (4)		0,007	0,013	0,006	0,013	0,006	0,012						
Sy (6)		0,019	0,035	0,018	0,034	0,016	0,031						

Tabela 17. Quadro geral de concentrações de antocianinas (A/g), valores de diferença mínima significativa (LSD) e índices de significância para as linhagens em estudo, em diversas concentrações de inibidores e H₂O destilada ($A_{520\text{nm}}$).

Concentra- ções	Methomyl				DNP			H ₂ O(7)
	5x10 ⁻⁴ M(1)	10 ⁻³ M(2)	2x10 ⁻³ M(3)	5x10 ⁻³ M(4)	10 ⁻⁵ M(5)	10 ⁻⁴ M(6)		
(1) 0,26	1 0,58 A	2 0,37 A	4 0,43 A	4 0,33 A	1 0,28 A	3 0,11 A	1 0,58 A	
(7) 0,21	4 0,47 B	3 0,36 A	6 0,13 B	6 0,12 B	4 0,28 A	1 0,11 A	4 0,48 A	
(2) 0,15	3 0,39 BC	4 0,34 A	2 0,02 C	5 0,02 BC	2 0,20 A	4 0,10 A	2 0,30 B	
(5) 0,11	2 0,33 C	6 0,16 B	5 0,02 C	3 0,01 C	3 0,18 A	2 0,10 A	3 0,29 B	
(3) 0,07	5 0,12 D	1 0,08 B	3 0,02 C	2 0,01 C	6 0,06 B	6 0,07 A	5 0,14 C	
(4) 0,05	6 0,11 D	5 0,06 B	1 0,01 C	1 0,01 C	5 0,06 B	5 0,06 A	6 0,12 C	
(6) 0,04								
DMS	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	

Continua

Tabela 17. Continuação.

Linhagens	Linhagens					
	1	2	3	4	5	6
(4) 0,24	1. 0,58 A	2. 0,37 A	1. 0,39 A	7. 0,48 A	7. 0,14 A	2. 0,16 A
(1) 0,15	7. 0,58 A	1. 0,33 A	2. 0,35 A	1. 0,47 A	1. 0,12 AB	3. 0,13 A
(3) 0,13	5. 0,28 B	7. 0,30 AB	7. 0,29 A	3. 0,43 AB	2. 0,06 AB	4. 0,12 A
(2) 0,11	6. 0,11 C	5. 0,20 B	5. 0,18 B	2. 0,34 BC	6. 0,06 AB	7. 0,12 A
(6) 0,09	2. 0,08 C	6. 0,10 C	6. 0,11 BC	4. 0,33 BC	5. 0,06 AB	1. 0,11 A
(5) 0,05	3. 0,01 C	3. 0,02 C	3. 0,03 C	5. 0,28 C	3. 0,02 B	6. 0,07 A
	4. 0,01 C	4. 0,01 C	4. 0,01 C	6. 0,10 D	4. 0,02 B	5. 0,06 A
DMS	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

Tabela 18. Quadro geral de concentrações médias de antocianinas (A/g), valores de diferença mínima significativa (DMS) e índices de significância para as linhagens em estudo, em diversas concentrações de inibidores e H₂O destilada (A₅₃₅ nm).

Concentra- ções	Methomyl				DNP		H ₂ O(7)
	5x10 ⁻⁴ M(1)	10 ⁻³ M(2)	2x10 ⁻³ M(3)	5x10 ⁻³ M(4)	10 ⁻⁵ M(5)	10 ⁻⁴ M(6)	
(1) 0,28	1.0,61 A	2.0,39 A	4.0,46 A	4.0,35 A	1.0,29 A	1.0,11 A	1.0,60 A
(7) 0,21	4.0,53 A	3.0,36 A	6.0,14 B	6.0,12 B	4.0,28 A	3.0,10 A	4.0,50 B
(2) 0,15	3.0,40 B	4.0,35 A	5.0,03 C	5.0,02 C	2.0,21 AB	4.0,10 A	2.0,31 C
(5) 0,11	2.0,34 B	6.0,16 B	2.0,02 C	1.0,01 C	3.0,18 B	2.0,10 A	3.0,30 C
(3) 0,07	5.0,11 C	1.0,08 B	3.0,02 C	3.0,01 C	5.0,05 C	5.0,06 A	5.0,14 D
(4) 0,05	6.0,11 C	5.0,06 C	1.0,01 C	2.0,01 C	6.0,05 C	6.0,06 A	6.0,12 D
(6) 0,04							
DMS	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Continua							

Tabela 18. Continuação.

Linhagens	Linhagens					
	1	2	3	4	5	6
(4) 0,26	1. 0,61 A	2. 0,39 A	1. 0,40 A	1. 0,53 A	7. 0,14 A	2. 0,16 A
(1) 0,16	7. 0,60 A	1. 0,34 A	2. 0,36 AB	7. 0,50 A	1. 0,11 AB	3. 0,14 AB
(3) 0,13	5. 0,29 B	7. 0,31 A	7. 0,30 B	3. 0,46 A	2. 0,06 ABC	7. 0,12 AB
(2) 0,11	6. 0,11 C	5. 0,21 B	5. 0,18 C	2. 0,35 B	6. 0,06 ABC	4. 0,12 AB
(6) 0,09	2. 0,08 CD	6. 0,10 C	6. 0,10 CD	4. 0,35 B	5. 0,05 BC	1. 0,11 AB
(5) 0,05	3. 0,01 D	3. 0,02 CD	3. 0,02 DE	5. 0,28 B	3. 0,03 BC	6. 0,06 B
	4. 0,01 D	4. 0,01 D	4. 0,01 E	6. 0,10 C	4. 0,02 C	5. 0,05 B
DMS	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09

Tabela 19. Quadro geral de concentrações médias de antocianinas (A/g), valores de diferença mínima significativa (DMS) e índices de significância para as linhagens em estudo, em diversas concentrações de inibidores e H₂O destilada (A_{545} nm).

Concentra- ções	Methomyl				DNP			H ₂ O (7)
	5x10 ⁻⁴ M(1)	10 ⁻³ M(2)	2x10 ⁻³ M(3)	5x10 ⁻³ M(4)	10 ⁻⁵ M(5)	10 ⁻⁴ M(6)		
(1) 0,31	1.0,53 A	2.0,35 A	4.0,41 A	4.0,31 A	1.0,28 A	3.0,10 A		1.0,54 A
(7) 0,30	4.0,46 A	3.0,33 A	6.0,12 B	6.0,11 B	4.0,27 A	1.0,10 A		4.0,44 B
(2) 0,21	3.0,36 B	4.0,32 A	5.0,03 C	5.0,02 C	2.0,19 AB	2.0,09 A		2.0,28 C
(5) 0,17	2.0,30 B	6.0,15 B	2.0,02 C	3.0,01 C	3.0,18 B	4.0,09 A		3.0,27 C
(3) 0,10	5.0,11 C	1.0,08 B	3.0,02 C	1.0,01 C	5.0,06 C	6.0,06 A		5.0,13 D
(6) 0,09	6.0,10 C	5.0,06 C	1.0,01 C	2.0,01 C	6.0,06 C	5.0,06 A		6.0,11 D
(4) 0,08								
DMT	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09		0,09

Continua

Tabela 19. Continuação.

Linhagens	Linhagens					
	1	2	3	4	5	6
(4) 0,33	7. 0,54 A	2. 0,35 A	1. 0,36 A	1. 0,46 A	7. 0,13 A	2. 0,15 A
(1) 0,22	1. 0,53 A	1. 0,30 A	2. 0,33 AB	7. 0,44 A	1. 0,11 AB	3. 0,12 AB
(3) 0,18	5. 0,28 B	7. 0,28 AB	7. 0,27 B	3. 0,41 B	6. 0,06 ABC	4. 0,11 AB
(2) 0,18	6. 0,10 C	5. 0,19 B	5. 0,18 C	2. 0,32 BC	2. 0,06 ABC	7. 0,11 AB
(6) 0,10	2. 0,08 CD	6. 0,09 C	6. 0,10 CD	4. 0,31 C	5. 0,06 ABC	1. 0,10 AB
(5) 0,07	3. 0,01 D	3. 0,02 C	3. 0,02 DE	5. 0,27 C	3. 0,03 BC	6. 0,06 AB
	4. 0,01 D	4. 0,01 C	4. 0,01 E	6. 0,09 D	4. 0,02 C	5. 0,06 B
DMS	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09

Tabela 20. Quadro geral da análise da variância, com estudo completo das interações.

FV	GL	QM	F	Prob.
(2) Trat. A	6	0,592	135,46	0,000
(4) Trat. B	5	0,612	140,08	0,000
(6) A x B	30	0,115	26,21	0,000
(8) Trat. C	2	0,009	2,14	0,120
(10) A x C	12	0,001	0,24	
(12) B x C	10	0,001	0,21	
(14) A x B x C	60	0,000	0,05	
Erro	252	0,004		
CV = 34,97%				
Sy (2)	0,008	-	Nº de observações = 54	
Sy (4)	0,008	-	Nº de observações = 53	
Sy (6)	0,022	-	Nº de observações = 9	
Sy (8)	0,006	-	Nº de observações = 126	
Sy (10)	0,016	-	Nº de observações = 18	
Sy (12)	0,014	-	Nº de observações = 21	
Sy (14)	0,038	-	Nº de observações = 3	

Uma análise espectrofotométrica geral como a realizada neste trabalho, não permite obter conclusões definitivas sobre a síntese preferencial de uma das antocianinas, o que é observado obtendo-se as médias da coluna H_2O nas Tabelas 17 a 19 e verificando os valores não-significativos do teste F para as interações linhagens x faixas de leitura e concentrações x faixas de leitura.

Os índices de significância anotados ao lado dos valores médios de absorbância para cada linhagem e concentração de inibidores, qualquer que seja a faixa de leitura, confirmam os resultados mostrados nas Figuras 21 a 27. De fato, a concentração $10^{-4}M$ de DNP atua, "in vivo" no caso do milho, de maneira similar ao desacoplamento completo da fosforilação oxidativa observado em mitocôndrias isoladas, não apresentando capacidade discriminatória.

A concentração $10^{-5}M$ de DNP (acoplamento fraco) provoca uma inibição da síntese de antocianinas intermediária entre as concentrações $10^{-3}M$ e $2 \times 10^{-3}M$ de Methomyl. Entretanto, como será discutido mais a frente, essa inibição deve ocorrer por um efeito menos específico que o do Methomyl.

É interessante reafirmar a capacidade estimulatória geral da dose $5 \times 10^{-4}M$ de Methomyl, principalmente sobre as linhagens PF 23 cms T rfrf e PF 23 cit N rfrf, o que se observa comparando os valores, em alguns casos idênticos e em outros um pouco superiores (embora não significativos) lis

tados nas colunas $5 \times 10^{-4} \text{M}$ e H_2O , nas 3 faixas de leitura. Serão feitas algumas conjecturas a respeito das causas do fenômeno. Entretanto, o fenômeno merece uma análise bioquímica profunda, identificando os sítios metabólicos sob influência desse carbamato.

Uma vez comprovado o efeito pleiotrópico do gene Rf_1 , no sentido da manutenção da expressão de antocianinas até uma concentração-umbral do carbamato e a evidente capacidade das linhagens de citoplasma normal em manter a expressão mesmo em concentrações muito elevadas do inibidor, o conhecimento do sítio de atuação do Methomyl na biossíntese do milho poderá promover um considerável avanço na compreensão da natureza bioquímica do produto gênico de Rf_1 e de resto, de todos os genes restauradores da fertilidade em vegetais.

4.3. ESTUDO DA ATIVIDADE DE POLIFENOL OXIDASES EM LINHAGENS DE MILHO SOB EFEITO DOS INIBIDORES METHOMYL E DNP

A constatação dos fenômenos de oxidação do sobrenadante pós-recuperação do precipitado protéico, o bloqueio da expressão de antocianinas e a síntese de mucopolissacarídeos em raízes de plantas cms T sob efeito dos inibidores, associada ao relato de VAUGHN et alii (1988) sobre a oxidação de compostos fenólicos pelas polifenol oxidases (resultan

do na produção de quinonas reativas, capazes de promover polimerização em plantas submetidas ao ataque de patógenos), apontaram a necessidade de uma análise da atividade de PPO nas linhagens constantes da experimentação em casa-de-vegetação.

Conforme mencionado anteriormente, optou-se por uma análise qualitativa, uma vez que o padrão de peso molecular disponível no laboratório (BSA) não tem compatibilidade com o processo de revelação das eletroforeses pela atividade enzimática na oxidação da DOPA.

Os resultados podem ser observados nas Figuras 28 a 32, que mostram as eletroforeses de gel de poliacrilamida, reveladas por oxidação de DOPA juntamente com as respectivas interpretações gráficas. Nem todas as análises foram incluídas neste trabalho, uma vez que algumas delas, em função de dificuldades na extração e padronização das amostras, não apresentaram definição visual satisfatória.

Admitidas as limitações relatadas por VAN LOON (1971) e MAYER & HAREL (1971), com relação a alguns estudos onde peroxidases apresentaram atividade oxidativa de DOPA, confundindo-se portanto com polifenol oxidases, alguns fenômenos importantes foram detectados neste trabalho, indicando que é possível aplicar a análise eletroforética de PPO a estudos de Genética Básica e Aplicada, principalmente na identificação de germoplasmas tolerantes a infecção por organismos fitopatogênicos.

Figura 28. Eletroforese de PPO em gel de poliacrilamida.

Número da canaleta	Linhagem	Tratamento
01	PF 23 cms T rfrf	H ₂ O
02	PF 23 cms T rfrf	10 ⁻³ M (Methomyl)
03	PF 23 cms T RfRf	H ₂ O
04	PF 23 cms T RfRf	10 ⁻³ M (Methomyl)
05	PF 23 cms T RfRf	H ₂ O
06	PF 23 cms T RfRf	10 ⁻³ M (Methomyl)
07	PF 23 cit N rfrf	H ₂ O
08	PF 23 cit N rfrf	10 ⁻³ M (Methomyl)
09	T ₁ cms T rfrf	H ₂ O
10	T ₁ cms T rfrf	10 ⁻³ M (Methomyl)
11	T ₁ cit N rfrf	H ₂ O
12	T ₁ cit N rfrf	10 ⁻³ M (Methomyl)
13	PF 23 cms T rfrf	10 ⁻³ M (Methomyl)
14	PF 23 cms T rfrf	H ₂ O

Interpretação gráfica:

Figura 29. Eletroforese de PPO em geral de poliacrilamida.

Número da canaleta	Linhagem	Tratamento
01	PF 23 cms T rfrf	H ₂ O
02	PF 23 cms T rfrf	5x10 ⁻³ M (Methomyl)
03	PF 23 cms T rfrf	10 ⁻⁴ M (DNP)
04	PF 23 cms T RfRf	H ₂ O
05	PF 23 cms T RfRf	5x10 ⁻³ M (Methomyl)
06	PF 23 cms T RfRf	10 ⁻⁴ M (DNP)
07	PF 23 cms T RfRf	5x10 ⁻³ M (Methomyl)
08	PF 23 cms T RfRf	10 ⁻⁴ M (DNP)
09	PF 23 cit N rfrf	H ₂ O
10	PF 23 cit N rfrf	5x10 ⁻³ M (Methomyl)
11	PF 23 cit N rfrf	10 ⁻⁴ M (DNP)
12	T ₁ cms T rfrf	5x10 ⁻³ M (Methomyl)
13	T ₁ cms T rfrf	10 ⁻⁴ M (DNP)
14	T ₁ cit N rfrf	5x10 ⁻³ M (Methomyl)
15	T ₁ cit N rfrf	10 ⁻⁴ M (DNP)

Interpretação gráfica:

Figura 31. Eletroforese de PPO em gel de poliacrilamida.

Número da canaleta	Linhagem	Tratamento
01	G cms C rfrf	H ₂ O
02	G cms C rfrf	5x10 ⁻³ M (Methomyl)
03	G cms C rfrf	10 ⁻⁵ M (DNP)
04	G cit N rfrf	H ₂ O
05	G cit N rfrf	5x10 ⁻³ M (Methomyl)
06	G cit N rfrf	10 ⁻⁵ M (DNP)
07	Ga cms S rfrf	H ₂ O
08	Ga cms S rfrf	5x10 ⁻³ M (Methomyl)
09	Ga cms S rfrf	10 ⁻⁵ M (DNP)
10	Ga cit N rfrf	H ₂ O
11	Ga cit N rfrf	5x10 ⁻³ M (Methomyl)
12	Ga cit N rfrf	10 ⁻⁵ M (DNP)
13	PF 23 cms T rfrf	H ₂ O
14	PF 23 cms T rfrf	5x10 ⁻³ M (Methomyl)
15	PF 23 cms T rfrf	10 ⁻⁵ M (DNP)

Interpretação gráfica:

Figura 32. Eletroforese de PPO em gel de poliacrilamida.

Número da canaleta	Linhagem	Tratamento
01	G cit N rfrf	H ₂ O
02	G cit N rfrf	10 ⁻³ M (Methomyl)
03	G cit N rfrf	10 ⁻⁵ M (DNP)
04	Jm 172 B cms C rfrf	H ₂ O
05	Jm 172 B cms C rfrf	10 ⁻³ M (Methomyl)
06	Jm 172 B cms C rfrf	10 ⁻⁵ M (DNP)
07	Jm 172 B cit N rfrf	H ₂ O
08	Jm 172 B cit N rfrf	10 ⁻³ M (Methomyl)
09	Jm 172 B cit N rfrf	10 ⁻⁵ M (DNP)
10	PF 23 cms T rfrf	H ₂ O
11	PF 23 cms T rfrf	10 ⁻³ M (Methomyl)
12	PF 23 cms T rfrf	10 ⁻⁵ M (DNP)
13	PF 23 cit N rfrf	H ₂ O
14	PF 23 cit N rfrf	10 ⁻³ M (Methomyl)
15	PF 23 cit N rfrf	10 ⁻⁵ M (DNP)

Interpretação gráfica:

A Figura 28 caracteriza a reação das linhagens do grupo PF 23 e T₁ aos inibidores em estudo, comparada com H₂O destilada, em relação a atividade de PPO. Neste caso, a definição das bandas inferiores, características da liberação de formas monoméricas ou combinações do tipo L₁H e L₂H, por exemplo (MAYER & HAREL, 1979), não foi suficiente para se obter conclusões. Entretanto, ficou evidente que, no caso da forma tetramérica (bandas superiores) existe uma diferença geneticamente controlada entre as linhagens PF 23 e T₁, caracterizada pela banda em posição superior (canaletas 9 a 12) com relação as bandas apresentadas pelas canaletas 1 a 8 e 13-14. Esse fenômeno pode indicar a existência de alelos dos genes que controlam a síntese das polifenol oxidases.

Um outro aspecto importante pode ser observado na canaleta 10 (T₁ cms T rfrf em 10⁻³M de Methomyl). Além da detecção de bandas inferiores (as quais caracterizam a reação aos inibidores) é possível notar a existência de uma segunda banda superior, inexistente nas demais canaletas.

A despeito da definição não satisfatória, observou-se que a linhagem PF 23 cms T rfrf apresenta, sob efeito do Methomyl, uma ativação intensa das formas de menor peso molecular, a ponto de não se detectar a banda superior. Esse fato pode ser comprovado com a Figura 29. Nesta, o desaparecimento da banda superior, na canaleta 2, é evidente. Notou-se a intensa atividade de PPO (3 isoformas), embora mesmo em H₂O as mesmas estejam presentes, ainda que com ati-

vidade mínima (o que pode ser atribuído ao processo de rompimento do tecido foliar). Um importante aspecto, relacionado com a linhagem PF 23 cms T rfrf é que, em H_2O e DNP (10^{-4} M) a banda superior não desapareceu, dando lugar as bandas inferiores. O fenômeno é, assim, restrito a linhagem PF 23 cms T rfrf, quando na presença do Methomyl.

Um aspecto relevante a ser considerado é o de que as linhagens PF 23 cms T RfRf e PF 23 cms T Rfrf comportam-se de forma similar a linhagem PF 23 cit N rfrf quanto a reação ao Methomyl. Também na Figura 29, a segunda banda superior, típica do grupo T_1 , pode ser observada (canaletas 12 a 15). Esse fato, associado a uma pequena distorção no gel, não permitiu observar a diferença entre o grupo PF 23 e o grupo T_1 , quanto à forma tetramérica, o que, entretanto, foi confirmado por outras eletroforeses. É importante ressaltar que, na Figura 29, pode-se notar a maior sensibilidade do grupo T_1 ao DNP, quando comparada com o grupo PF 23, sensibilidade que parece ser independente da configuração citoplasmática das linhagens T_1 .

A Figura 30 procura mostrar as formas ativas da PPO surgindo a medida que a injúria causada pelo inibidor aumentou. Vale repetir, de conformidade com VAUGHN et alii (1988), que essa configuração pode eventualmente ser um artefato, dada a dificuldade de caracterização de PPO. Não se notou, nessa eletroforese, a ativação das formas de menor peso molecular do grupo T_1 , na presença de DNP. Entretanto,

ficou evidente a diferenciação do grupo T_1 quanto a forma tetramérica da PPO, em comparação com o grupo PF 23, bem como a dissociação virtualmente total da mesma, na linhagem PF 23 cms T rfrf, na presença do Methomyl, com a ativação de 3 formas de menor peso molecular (bandas inferiores de canalética 15). É possível observar também a presença de bandas intermediárias as superiores e inferiores, embora sem definição satisfatória. Tais bandas poderiam representar combinações alternativas dos monômeros da PPO.

A Figura 31 demonstra a ativação da PPO por linhagens cms C e cms S, em comparação com PF 23 cms T rfrf, sob efeito de Methomyl ($5 \times 10^{-3} M$) e DNP ($10^{-5} M$). Notou-se intensa atividade das formas de baixo peso molecular nas linhagens G cit N rfrf frente aos dois inibidores, o mesmo ocorrendo com a linhagem Ga cit N rfrf. Essa eletroforese evidenciou também que, com relação a forma tetramérica da PPO, as linhagens G e Ga são idênticas ao grupo T_1 , diferindo do grupo PF 23.

Inicialmente foi levantada a hipótese de que a atividade de PPO pudesse diferenciar linhagens cms T de sua mantenedora de citoplasma normal e de outras linhagens pertencentes a outros sistemas cms. Entretanto, a Figura 31 demonstrou que a atividade de PPO frente a injúrias independe do citoplasma. Mesmo assim, foi observa

do que nas linhagens PF 23 cms T rfrf e T₁ cms T rfrf a ativação ocorre frente a concentrações menores dos inibidores que aquelas necessárias para a ativação em linhagens restauradas ou de citoplasma normal. Uma compreensão mais detalhada da influência do "deficit" energético (ATP), típico das linhagens cms sobre a ativação da PPO é de grande importância por sua relação com tolerância a fitopatógenos.

Um exemplo das dificuldades de se estabelecer um protocolo preciso, para a análise da PPO, é demonstrado na Figura 32. Linhagens de citoplasma normal e cms C foram comparadas com PF 23 cms T rfrf e PF 23 cit N rfrf. Neste caso, não se nota a presença típica das bandas inferiores da linhagem PF 23 cms T rfrf na presença do Methomyl, o que poderia ser atribuído a concentração intermediária testada ($10^{-3}M$). Entretanto, todas as linhagens apresentaram ativação de PPO mesmo na presença de H₂O, com ênfase para o grupo Jm 172B, com atividade intensa em qualquer dos tratamentos.

Embora seja um fator de confundimento na diferenciação de linhagens cms T de suas contrapartes de citoplasma normal, a detecção de alta atividade "constitutiva" em linhagens de milho é de grande importância aplicada. Na Figura 32, fica evidente que, com relação a PPO (bandas superiores), as linhagens Jm 172 B são similares as do grupo PF-23, diferindo do grupo G/T₁.

4.4. UMA GENERALIZAÇÃO SOBRE A INTEGRAÇÃO METABÓLICA EM PLANTAS DE MILHO CMS, RESTAURADAS E DE CITOPLASMA NORMAL, COM RELAÇÃO À EXPRESSÃO DE FLAVONÓIDES E ATIVIDADE DE POLIFENOL OXIDASES

Os fenômenos detectados por este trabalho, quais sejam: a inibição da expressão de antocianinas pelo Methomyl, em plantas cms T; a manutenção da expressão em plantas cms T restauradas, até uma concentração do carbamato duas vezes superior aquela inibitória em plantas estéreis; a manutenção da expressão em plantas de citoplasma normal mesmo em concentrações muito elevadas de Methomyl; a intensa síntese de mucopolissacarídeos em raízes de plantas cms, na presença dos inibidores testados, principalmente o carbamato; a inibição parcial da expressão de antocianinas pelo DNP, um desacoplador clássico da fosforilação oxidativa; e a ativação diferencial de PPO nas linhagens em estudo, permitem a proposição de um modelo de integração metabólica envolvendo (a) plantas cms T e o gene restaurador da fertilidade (Rf_1), quanto a síntese de flavonóides, e (b) a ativação de PPO como reação a injúrias por fitopatógenos.

Os relatos de MILLER & KOEPPE (1971) e BOUTHYETTE et alii (1985) sobre o estímulo à oxidação de succinato pela toxina de *H. maydis*, adquirem grande importância quando se observa a Figura 5, que demonstra a relação das quinonas com o succinato. Da mesma forma, é evidente que a oxi-

dação de succinato é passo fundamental para a estimulação da "respiração resistente a cianeto", uma alternativa para bloqueios da cadeia respiratória em plantas, conforme se observa na Figura 6. O esquema demonstra que, bloqueada a cadeia respiratória por inibidores tais como Amytal, Rotenona e Picricidina A, ocorre estímulo da via metabólica alternativa, a qual, pela oxidação de succinato, permite que a ubiquinona dê continuidade ao processo da transferência de eletrons na cadeia respiratória.

O relato de KORDAN & RENGEL (1988) evidencia que os barbituratos são capazes de reduzir a síntese de antocianinas em até 67% em plantas de milho; no caso do amorbitol, em concentrações similares às de Methomyl, utilizadas neste trabalho (10^{-3} M e 2×10^{-3} M), as quais são capazes de inibição da síntese, respectivamente, em plantas cms T e restauradas. É interessante, entretanto, observar que a inibição de síntese relatada pelos autores ocorreu em plantas de citoplasma normal (cultivar Golden Bantam, mutante su_1 , milho doce). Ainda assim, é possível admitir que o Methomyl pode bloquear a síntese de antocianinas no mesmo sítio que os barbituratos, embora com "menor eficiência", por exercer efeito drástico apenas em plantas deficitárias energeticamente. Por seu turno, plantas submetidas a acoplamento fraco da ATPase por DNP (10^{-5} M) também apresentaram uma redução de síntese de antocianinas similar aquela obtida por uma concentração de Methomyl intermediária a 10^{-3} M e 2×10^{-3} M.

BOUTHYETTE *et alii* (1985) demonstraram que a toxina de *H. maydis* liga-se à ATPase, atuando como desacoplador da fosforilação oxidativa. O presente trabalho contém evidência indireta desse fenômeno, uma vez que plantas de citoplasma normal, mesmo na presença de concentrações elevadas do análogo da toxina T não apresentam bloqueio completo da síntese de antocianinas. Plantas restauradas a fertilidade, por sintetizarem subunidades da ATPase mutadas e também as corrigidas por efeito do gene Rf_1 , sustêm a síntese até certo ponto, bloqueando-a totalmente em concentrações elevadas do inibidor.

É importante considerar o fato de que o DNP não induziu a síntese de mucopolissacarídeos em níveis tão elevados quanto o Methomyl. Assim, admitida como real a interferência do carbamato também em nível de cadeia respiratória, de forma similar aos barbituratos, é possível que exista um efeito metabólico generalizado, envolvendo o estímulo à oxidação de succinato, a ativação da PAL (KUN WEI *et alii*, 1988) e da PPO (Figura 9). Esse fenômeno pode explicar o bloqueio da síntese de antocianinas como um desvio metabólico que, pela oxidação de flavonóides (no caso, as antocianinas), produziria quinonas reativas e eventualmente, mucopolissacarídeos, como reação à toxina.

A ativação da PPO ocorre, conforme se pode inferir das análises eletroforéticas, em concentrações mais baixas de Methomyl, nas linhagens PF 23 cms T rfrf e T_1 cms T

rfrf. Assim, é possível propor que nessas linhagens, esteja ocorrendo uma ativação precoce de PPO, estimulada também pela deficiência metabólica ligada a ATPase. O efeito pleiotrópico de Rf_1 permite, então, inferências sobre os sítios de ação de seu produto gênico. Por outro lado, pode-se admitir uma capacidade superior da linhagem PF 23 cms T RfRf sobre sua versão heterozigota (Rfrf), em termos de ativação da PPO, uma vez que essa hipótese encontra respaldo no maior valor de oxidação do sobrenadante apresentado pela versão RfRf. Entretanto, o teste desta hipótese depende de uma análise bioquímica de maior precisão.

Resultados interessantes, os quais podem fornecer explicações alternativas foram obtidos ao se avaliar o pH do sobrenadante após precipitação protéica. Como citado, a extração de proteína total foi feita com acetona. Os valores de pH das linhagens PF 23 cms T rfrf, PF 23 cit N rfrf, T_1 cms T rfrf e T_1 cit N rfrf são apresentados na Tabela 21, medidos em pHmetro Incibrás.

Os resultados mostram que, com exceção da linhagem T_1 cit N rfrf, houve uma elevação do pH na presença do Methomyl. Tal elevação não pode ser atribuída ao carbamato, uma vez que não se observou alteração do pH apenas pela adição do produto ativo e solvente (Metanol). A diferença de pH entre linhagens cms T e de citoplasma normal também aumentou na presença do inibidor, passando do valor 0,04 para 0,48. Assim, pode-se observar que houve um efeito do

Methomyl sobre o metabolismo celular expresso também como diminuição da acidificação do meio.

Tabela 21. Valores de pH do sobrenadante após extração de proteína total de linhagens cms T e de citoplasma normal.

Linhagem	pH (H ₂ O)		pH (Meth.)		pHmetro/pH H ₂ O
	Valor	Dif.	Valor	Dif.	
PF 23 cms T rfrf	6,51		7,10		+ 0,59
PF 23 cit N rfrf	6,47	(0,04)	6,75	(0,35)	+ 0,28
T ₁ cms T rfrf	6,36		6,85		+ 0,49
T ₁ cit N rfrf	6,32	(0,04)	6,25	(0,60)	- 0,07
Médias	6,42	(0,04)	6,74	(0,48)	+ 0,33

BOWN & CRAWFORD (1988) relatam que a absorção de íons, açúcares e aminoácidos por células vegetais é coordenada por um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana, favorecendo a entrada de prótons na célula. Tal gradiente é coordenado pela ATPase. Os autores mencionam que o inibidor DCCD pode ter sua ação avaliada pela taxa de acidificação do meio celular considerando-se como inibição completa um valor zero de acidificação. Entretanto é possível ocorrer um bloqueio do fluxo de prótons sem que haja bloqueio

da ATPase, o que se verificou em alguns ensaios onde a adição posterior de ferrocianeto reativou o fluxo de prótons.

Conforme GOODWIN & MERCER (1987) a elevação do pH para valores em torno de pH 7,0 ou mais, provoca a descoloração das antocianinas. Assim, a hipótese de que a basificação do meio celular tenha provocado esse fenômeno, é bastante plausível, respaldando a função do gene nuclear Rf_1 sobre a atividade da ATPase, uma vez verificada a manutenção da síntese até uma concentração "umbral" de Methomyl.

Um excelente estudo sobre o efeito de inibidores associados às reações de oxidação - redução em membranas sobre a extrusão de prótons, foi realizado por BARR (1988), confirmando os resultados deste trabalho, uma vez que a perda da atividade de oxidação-redução de células de *Daucus carota*, quando incubadas com inibidores do transporte de elétrons, provoca alteração na taxa de nucleotídeos de pirimidina no citoplasma, inibindo as reações necessárias ao crescimento.

Essas considerações permitem a afirmação de que não ocorreu um bloqueio de síntese de antocianinas em suas reações enzimáticas terminais, a exemplo do que ocorre em mutantes de milho relacionados com o bloqueio de síntese dos pigmentos (DOONER, 1983 ; PAZ-ARES et alii, 1987; MEYER et alii, 1987); assim, o bloqueio da síntese em seus passos iniciais, o desvio de síntese e as mudanças irreversíveis das antocianinas em valores elevados de pH, iniciadas

pela ionização das hidroxilas fenólicas (GOODWIN & MERCER, 1987), são as hipóteses propostas por este trabalho. O efeito pleiotrópico detectado, relacionado com o gene nuclear Rf_1 , demonstra sua atividade regulatória em vias metabólicas fundamentais na planta de milho.

4.5. ANÁLISE DOS CRUZAMENTOS REALIZADOS ENTRE LINHAGENS DO GRUPO T_1 COM LINHAGENS DO GRUPO PF 23

Conforme mencionado no item 3.2.3.1, os cruzamentos foram realizados na Estação Experimental de Capinópolis, MG, da AGROCERES. Dos sete cruzamentos planejados, todos foram executados, sendo que para um estudo de complementação genética, três são os mais importantes, quais sejam:

* T_1 cms T rfrf x PF 23 cit N rfrf, que mantém a esterilidade citoplasmática e permite verificar eventual complementação genética quanto a PPO.

* T_1 cms T rfrf x PF 23 cms T Rfrf, que restaura a fertilidade da linhagem T_1 cms T e permite estudar um eventual efeito da restauração sobre uma complementação genética entre as duas linhagens, quando as características em estudo.

* T_1 cms T rfrf x PF 23 cms T Rfrf, que segrega plantas restauradas e não-restauradas e permite verificar a acurácia dos métodos utilizados na identificação precoce de plantas cms.

Embora realizados os cruzamentos, as linhagens haviam sido semeadas em pleno inverno, o que provocou atraso no ciclo de maturação. Assim, não houve tempo hábil para a realização dos testes completos. Parte dos resultados são apresentados no Apêndice I.

A necessidade de se utilizar a área experimental da Estação de Pesquisa de Capinópolis (MG), deveu-se, conforme mencionado, a elevada infestação por *H. maydis*, raça T, na área experimental de Santa Cruz das Palmeiras, SP, após 1 ciclo de cultivo de plantas cms T. As lesões provocadas pelo patógeno em colmos, folhas, bainhas foliares e espigas podem ser observadas nas Figuras 33 a 35.

Embora sem nenhuma avaliação sistemática, observou-se que as linhagens de citoplasma normal (PF 23 cit N rfrf e T₁ cit N rfrf) apresentam um número insignificante de lesões. Entretanto, as linhagens cms T restauradas apresentaram lesões visualmente similares as da linhagem PF 23 cms T rfrf em tamanho e número.

Figura 33. Aspecto das lesões provocadas pelo patógeno em colmos de linhagens de milho cms T.

Figura 34. Aspecto as lesões provocadas pelo patógeno em folhas e bainhas foliares de milho cms T.

Figura 35. Aspecto das lesões provocadas pelo patógeno em espigas de milho cms T.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram obter as seguintes conclusões:

- O efeito pleiotrópico do gene nuclear Rf_1 , expresso pela manutenção das antocianinas em plantas de milho cms T contribui para a compreensão sobre os sítios de atuação do análogo da toxina T.

- Da mesma forma, é fator importante no estudo da regulação do metabolismo mitocondrial associado a esterilidade citoplasmática, uma vez que houve indicações substanciais sobre os possíveis sítios de atuação do produto gênico de Rf_1 .

- As evidências de que existe uma concentração "umbral" de Methomyl, necessária e suficiente para bloquear a expressão de antocianinas em linhagens cms T (Rf_1), indicam que uma análise bioquímica quantitativa contribuirá para maior compreensão do metabolismo energético em sistemas cms.

- O desacoplador da fosforilação oxidativa 2,4-dinitrofenol pode ser utilizado para a discriminação precoce de linhagens ou progênies de milho quanto a atividade da ATPase mitocondrial.

- A análise de PPO (em sua forma tetramérica) pode ser utilizada em programas de melhoramento, como marcador genético, dada a existência de alelos.

- Os resultados obtidos pela análise de PPO indicam a possibilidade de usá-la como recurso na diferenciação precoce entre plantas cms, cms restauradas e normais, no sistema T.

- A comprovação da existência de formas ativas "constitutivas" da PPO, independentes do tipo de citoplasma, indica a possibilidade de se utilizar a análise em estudos de identificação de plantas tolerantes a agressões por toxinas, patogênicas ou não.

- Os resultados obtidos permitem inferências sobre um esquema metabólico integrado, a partir dos efeitos comparados de Methomyl, DNP e barbituratos, abrangendo a interferência na ATPase (desacoplamento), o bloqueio do passo metabólico $\text{Fe-Ps} \rightarrow \text{UQ}$, o consequente estímulo à oxidação do succinato e da via respiratória "resistente ao cianeto" e a ativação de PPO.

- Uma vez que PPO estão relacionadas com a oxidação de flavonóides e a síntese de quinonas reativas, é possível que PPO estejam também atuando sobre a síntese de antocianinas, desviando-a e permitindo a formação de polissacarídeos na superfície das raízes, como reação às lesões provocadas por toxinas.

- Os resultados obtidos com a análise da extrusão de prótons, medida por valores de pH permitem admitir a possibilidade de que a basificação do meio celular, provocada por bloqueadores da respiração, tenha provocado a descaracterização da cor das antocianinas. Nesse caso, os bloqueadores não estariam interferindo com a síntese propriamente dita; porém, alterando o equilíbrio protônico, estariam desestabilizando o produto final da síntese.

- As hipóteses apresentadas são uma clara indicação de que a interação do gene nuclear Rf_1 com o metabolismo citoplasmático ocorre em nível básico (cadeia respiratória e fosforilação oxidativa).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARR, R. The effect of inhibitors of plasma membrane redox reactions on proton excretion by plant cells. Phys. Plantarum, 73: 194-199. 1988.
- BASZCZYNSKI, C.L. & KEMBLE, R.J. Terminal protein association and sequence homology in linear mitochondrial plasmid-like DNAs of sorghum and maize. Plant Cell Reports, 6: 127-130. 1987.
- BECKETT, J.B. Classification of male-sterile cytoplasms in maize (*Zea mays* L.). Crop Science, 11: 724-726, 1971.
- BOUTHYETTE, P.Y.; SPITSBERG, V.; GREGORY, P. Mitochondrial interaction with *Helminthosporium maydis* race C toxin: blocking by dicyclo-hexylcarbodiimide. Journal of Exp. Botany, 36(164): 511-528. 1985.
- BOWN, A.W. & CRAWFORD, L.A. Evidence that H^+ efflux stimulated by redox activity is independent of plasma membrane ATPase activity. Phys. Plantarum, 73: 170-174. 1988.
- BRAUN, C.J. & LEVINGS, C.S. Nucleotide sequence of the F_1 - ATPase α subunit gene from maize mitochondria. Plant Physiol., 79: 571-577. 1985.

- CAMPBELL, F. Corn seed production methods as related to T-race of *Helminthosporium maydis* and future seed prospects. Plant Disease Reporter, 54(12): 1118-1121. 1970.
- CEBALLOS, H. & GRACEN, V.E. Inheritance of a new source of resistance to *Bipolaris maydis* race T. Crop Science Divisions, p.89. 1988.
- COE, E.H. & NEUFFER, M.G. The genetics of corn. In: Corn and Corn Improvement. Edited by G.F. Sprague. American Society of Agronomy, Inc., Publisher. 774p. 1977.
- DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. Molecular cell biology. Scientific American Books, USA. 1192p. 1986.
- DEWEY, R.E.; LEVINGS, C.S.; TIMOTHY, D.H. Nucleotide sequence of ATPase subunit 6 gene of maize mitochondria. Plant Physiol., 79: 914-919. 1985.
- DEWEY, R.E.; LEVINGS, C.S.; TIMOTHY, D.H. Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. Cell., 44: 439-449. 1986.
- DEWEY, R.E.; TIMOTHY, D.H.; LEVINGS, C.S. A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. Proc. Natl. Acad. Sci., 84: 5374-5378. 1987.
- DICKINSON, H.G. Nucleocytoplasmic interaction. Annals of Botany, 60(4): 61-73. 1987.
- DOONER, H.K. Coordinate genetic regulation of flavonoid biosynthetic enzymes in maize. Mol. Gen. Genetics, 189: 136-141. 1983.

- DOONER, H.K. & NELSON, O.E. Interaction among C, R and Vp in the control of the Bz glucosyltransferase during endosperm development in maize. Genetics, 91: 309-315. 1979.
- DUVICK, D.N.; SNYDER, R.J.; ANDERSON, E.G. The chromosomal location of Rf₁, a restorer gene for cytoplasmic pollen sterile maize. Genetics, 46: 1245-1252. 1961.
- DUVICK, D.N. Cytoplasmic pollen sterility in corn. Advances in Genetics, 13: 1-56. 1965.
- EARLE, E.D. Effects of *Helminthosporium maydis* race T toxin on mitochondria and protoplasts from T cytoplasm maize. In: Maize for Biological Research. Ed. by W.F. Sheridan. PMB Association. p.251-255. 1982.
- EARLE, E.D.; GRACEN, V.E.; BEST, V.M.; BATTS, L.A.; SMITH, M.E. Fertile revertants from S-type male-sterile maize grown in vitro. Theor. Appl. Genet., 74: 601-609. 1987.
- FARRELLY, F. & BUTOW, R.A. Rearranged mitochondrial genes in the yeast nuclear genome. Nature, 301: 296-301. 1980.
- FINNEGAN, P.M. & BROWN, G.G. Autonomously replicating RNA in mitochondria of maize plants with S-type cytoplasms. Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 5176-5179. 1986.
- FLAVELL, R. A model for the mechanism of cytoplasmic male sterility in plants, with special reference to maize. Plant Sci. Letters, 3: 259-263. 1974.
- FORDE, B.G.; OLIVER, R.J.; LEAVER, C.J. Variation in mitochondrial translation products associated with male - sterile cytoplasms in maize. Proc. Natl. Acad. Sci., 75(8): 3841-3845. 1978.

- FORDE, B.G.; OLIVER, R.J.C.; LEAVER, C.J. Classification of normal and male-sterile cytoplasms in maize. I. Electrophoretic analysis of variation in mitochondrially synthesized proteins. Genetics, 95: 443-450. 1980.
- FORDE, B.G. & LEAVER, C.J. Nuclear and cytoplasmic genes controlling synthesis of variant mitochondrial polypeptides in male-sterile maize. Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 418-422, 1980.
- FRANKELL, R. & GALUN, E. Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding. Springer-Verlag, New York. 276p. 1977.
- GENGENBACH, B.G. & GREEN, C.E. Selection of T-cytoplasm maize callus cultures resistant to *Helminthosporium maydis* race T pathotoxin. Crop Science, 15: 645-649. 1975.
- GENGENBACH, B.G.; GREEN, C.E.; DONOVAN, C.M. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 5113 - 5117. 1977.
- GENGENBACH, B.G.; CONNELLY, J.A.; PRING, D.R.; CONDE, M. F. Mitochondrial DNA variation in maize plants regenerated during tissue culture selection. Theor. Appl. Genet. 59: 161-167. 1981.
- GOODWIN & MERCER. Introduction to plant biochemistry. 2nd Edition. Pergamon Press. 576p. 1987.
- GRACEN, V.E. & C.O. GROGAN. Diversity and suitability for hybrid production of different sources of cytoplasmic male sterility in maize. Agron. J., 66: 654-657. 1974.

- GRACEN, V.E. Types and availability of male - sterile cytoplasms. In: Maize for Biological Research. Ed. by W. Sheridan. PMB Association. p.221-224. 1982.
- GRAY, M.W. & DOOLITTLE, W.F. Has the endosymbiont hypothesis been proven? Microb. Review, 46: 1-42. 1982.
- GRUN, P. Cytoplasmic Genetics and Evolution. Columbia University Press, New York. 278p. 1976.
- HADLER, H.I.; DIMITRIJEVIC, V.; MAHALINGHAN, R. Mitochondrial DNA and nuclear DNA from normal rat liver have a common-sequence. Proc. Natl. Acad. Science, 80: 6945-6499. 1983.
- HALL, R.D. & M.M. YEOMAN. Factors determining anthocyanin yield in cell cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G.Don. New Phytol., 103: 33-43. 1986.
- HANSON, M.R. & CONDE, M.F. Functioning and variation of cytoplasmic genomes: lessons from cytoplasmic-nuclear interactions affecting male fertility in plants. International Review of Cytology, 94: 213-267. 1985.
- HYRE, R.A. Epidemiology of southern corn leaf blight - exploratory experiments. Plant Disease Reporter, 54 (12): 1131. 1970.
- HUMAYDAN, H.S. & SCOTT, E.W. Methomyl insecticide selective phytotoxicity on sweet corn hybrids and inbreds having the Texas male sterile cytoplasm. Hort Science, 12(4): 312-313. 1977.
- KEMBLE, R.J.; MANS, R.J.; GABAY-LAUGHNAN, S.; LAUGHNAN, J.R. Sequences homologous to episomal mitochondrial DNAs in the maize nuclear genome. Nature, 304: 744-747. 1983.
- KIMBER, A. & SZE, H. *Helminthosporium maydis* T toxin decreased calcium transport into mitochondria of susceptible corn. Plant Physiol., 74: 804-809. 1984.

- KLEIN, R.R. & KOEPPE, D.E. Mode of Methomyl and *Bipolaris maydis* (race T0 toxin in uncoupling Texas male -sterile cytoplasm corn mitochondria. Plant Physiol., 77: 912-916. 1985.
- KOEPPE, D.E.; COX, J.K.; MALONE, C.P. Mitochondrial heredity: a determinant in the toxic response of maize to the insecticide Methomyl. Science, 201: 1227-1229. 1978.
- KOLL, F. Does nuclear integration of mitochondrial sequences occur during senescence in *Podospora*? Nature, 324: 597-599. 1986.
- KONCZ, C.S.; KÁLMÁN, L.; VARGHA, J. Key for classification of cytoplasmic male sterile types in maize. Plant Science Letters, 17: 317-326. 1980.
- KORDAN, H.A. & RENGEL, Z. Impaired antocyanin production in barbiturate-treated *Zea mays* seedlings. Annals of Botany, 61: 221-223. 1988.
- LAUGHNAN, J.R. & GABAY, S.J. Mutations leading to nuclear restoration of fertility in S male-sterile cytoplasm in maize. Theor. Appl. Genetics, 43: 109-116. 1973.
- LAUGHNAN, J.R.; GABAY-LAUGHNAN, S.; CARLSSON, J.E. Cytoplasmic male-sterile systems in maize and recent approaches to their molecular interpretation. In: Maize for Biological Research. Ed. by W.F. Sheridan. PMB Association. p.225-237. 1982.
- LAUGHNAN, J.R. & GABAY-LAUGHNAN. Nuclear control over reversions to male fertility in S male -sterile maize. In: Maize for Biological Research. Ed. by W.F. Sheridan. PMB Association. p.239-242. 1982.
- LEAVER, C.J. & GRAY, M.W. Mitochondrial genome organization and expression in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 33: 373-402. 1982.

- LEAVER, C.J. Mitochondrial gene nomenclature. Maize Genetic Coop. Newsletter, 62: 35-36. 1987.
- LEE, S.L.J.; EARLE, E.D.; GRACEN, V.E. The cytology of pollen abortion in S-cytoplasmic male-sterile corn anthers. Amer. J. Botany, 67(2): 237-245. 1980.
- LEHNINGER, A.L. Princípios de Bioquímica. Sarvier, São Paulo. 532p. 1984.
- LEVINGS, C.S. & PRING, D.R. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic male-sterile maize. Science, 193: 158-160. 1976.
- LEVINGS, C.S.; KIM, B.D.; PRING, D.R.; CONDE, M.F.; MANS, R.J.; LAUGHNAN, J.R.; GABAY-LAUGHNAN, S.J. Science, 209: 1021-1023. 1980.
- LEVINGS, C.S. & SEDEROFF, R.R. Nucleotide sequence of the S-2 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize. Proc. Natl. Acad. Sci., 80: 4055-4059. 1983.
- MACHADO, J.A.; ECHEVERRIGARAY, S.; TAVARES, F.C.A. Supressão gênica da esterilidade citoplasmática T em milho (*Zea mays* L.). Anais da Reunião Anual da SBPC. p.376. 1986.
- MANS, R.J. Episomal DNA as a molecular probe of cytoplasmic male sterility in S *Zea mays*. In: Maize for Biological Research. Ed. by W.F. Sheridan. PMB Association. p.263-266. 1982.
- MAXIMIUC-NACACHE, V. & DIETRICH, S.M.C. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust). Revta. Bras. Bot., 8: 185-190. 1985.

- MAYER, A.M. & HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. Phytochemistry, England, 18: 193-215. 1979.
- MEYER, P.; HEIDMANN, I.; FORKMANN, G.; SAEDLER, H. A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. Nature, 330: 677-678. 1987.
- MILLER, P.R. Introduction to the papers on epidemiology and forecasting of southern corn leaf blight. Plant Disease Reporter, 54(12): 1122. 1970.
- MILLER, R.J. & KOEPPE, D.E. Southern leaf blight: susceptible and resistant mitochondria. Science, 173: 67-69, 1971.
- MOORE, W.F. Origin and spread of southern corn leaf blight in 1970. Plant Disease Reporter, 54(12): 1104-1108. 1970.
- MULLIGAN, R.M.; MALONEY, A.P.; WALBOT, V. RNA processing and multiple transcription initiation sites result in transcript size heterogeneity in maize mitochondria. Mol. Gen. Genetics, 211: 373-380. 1988.
- PAZ-ARES, J.; GHOSAL, D.; WIENAND, U.; PETERSON, P.; SAEDLER, H. The regulatory c_1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. The EMBO Journal, 6(12): 3553-3558. 1987.
- PEARSON, O.H. Nature and mechanisms of cytoplasmic male sterility in plants: a review. Hort Science, 16(4): 483-483. 1981.

- PRING, D.R.; CONDE, M.F.; LEVINGS, C.S. DNA heterogeneity within the C group of maize male-sterile cytoplasms. Crop Science, 20: 159-162. 1980.
- PRING, D.R. & LONSDALE, D.M. Molecular biology of higher plant mitochondrial DNA. International Review of Cytology, 97: 1-46. 1985.
- PRING, D.R.; LONSDALE, D.M.; GRACEN, V.E.; SMITH, A.G. Mitochondrial DNA duplication/deletion events and polymorphism of the C group of male sterile maize cytoplasms. Theor. Appl. Genetics, 73: 646-653. 1987.
- PRING, D.R.; LEVINGS, C.S.; HU, W.W.L.; TIMOTHY, D.H. Unique DNA associated with mitochondria in the S-type cytoplasm of male-sterile maize. Proc. Natl. Acad. Sci., 74 (7): 2904-2908. 1977.
- REDDY, G.M. Genetic control of leucoanthocyanidin formation in maize. Genetics, 50: 485-489. 1964.
- RENGEL, Z. & KORDAN, H.A. Age, fluence rate, and anthocyanin production in *Zea mays* seedlings. Annals of Botany, 59: 41-43. 1987.
- SCHARDL, C.L.; LONSDALE, D.M.; PRING, D.R.; ROSE, K.R. Linearization of maize mitochondrial chromosomes by recombination with linear episomes. Nature, 310: 292-296. 1984.
- SCOTT, N.S. & TIMMIS, J.N. Homologies between nuclear and plastid DNA in spinach. Theor. Appl. Genetics, 67: 279-288. 1984.
- SEDEROFF, R.R. Structural variation in mitochondrial DNA. In: SCANDALIOS, J.G. Molecular Genetics of Plants. Academic Press, Inc. p.1-108. 1984.

- SHAH, D.M. & LEVINGS, C.S. Characterization of chloroplasts and nuclear DNAs of *Zea mays* L. Crop Science, 13: 709-713. 1973.
- SINGH, A. & LAUGHNAN, J.R. Instability of S male - sterile cytoplasm in maize. Genetics, 71: 607-620. 1972.
- SNYDER, R.J. & DUVICK, D.N. Chromosomal location of Rf₂, a restorer gene for cytoplasmic pollen sterile maize. Crop Science, 9: 156-157. 1969.
- STERN, D.B. & LONSDALE, D.M. Mitochondrial and chloroplast genomes of maize have a 12-kilobase DNA sequence in common. Nature, 299: 698-702. 1982.
- THOMPSON, R.D.; KEMBLE, R.J.; FLAVELL, R.B. Variations in mitochondrial DNA organization between normal and male-sterile cytoplasms of maize. Nuc. Acids Res., 8: 1999-2008. 1980.
- TORNÉ, J.M. & BERVILLÉ, A. Cultivo in vitro de tejidos de maiz, con citoplasma T, para obtener una resistencia al Metomil. Proceedings of a Symposium on Nucl. Techn. and in vitro culture for plant improvement. IAEA. Vienna, 301-303. 1986.
- TZAGOLOFF, A. Mitochondria. Plenum Press, New York and London. 342p. 1982.
- ULLSTRUP, A.J. The impacts of the southern corn leaf blight epidemics of 1970-1971. Ann. Review Phytopathol., 10: 37-50. 1972.

- VAL LOON, L.C. Tobacco polyphenoloxidases: a specific staining method indicating non-identity with peroxidases. Phytochemistry, 10: 503-507. 1971.
- VAUGHN, K.C.; LAX, A.R.; DUKE, S.O. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 72: 659-665. 1988.
- ZABALA, G. & WALBOT, V. An S₁ episomal gene of maize mitochondria is expressed in male-sterile and fertile plants of the S-type cytoplasm. Mol. Gen. Genetics, 211: 386-392. 1988.
- WALKER, N.H.; QIN, J.; ABBOTT, A.G. Northern hybridization analysis of mitochondrial gene expression in maize cytoplasm with varied nuclear backgrounds. Theor. Appl. Genet., 74: 531-537. 1987.
- WANG, J.W. & XUE, Y.L. Studies on plant phenylalanine ammonia-lyase. III. The stimulation effect of *H. maydis* race T - toxin on phenylalanine ammonia lyase (PAL). Acta Phytophysiol. Sin. 8: 237-244. 1982.
- WARMKE, H.E. & LEE, S.L.J. Mitochondrial degeneration in Texas cytoplasmic male-sterile corn anthers. The Journal of Heredity, 68: 213-222. 1977.
- WARMKE, H.E. & LEE, S.L.J. Pollen abortion in T cytoplasmic male-sterile corn (*Zea mays* L.): a suggested mechanism. Science, 200: 561-563. 1978.
- WATRUD, L.S.; HOOKER, A.L.; KOEPPE, D.E. The effects of nuclear restorer genes of Texas male-sterile cytoplasm on host response to *Helminthosporium maydis*, race T. Phytopathology, 65: 178-182. 1975.

- WEI, J.K.; LIU, K.M.; CHEN, J.P.; LUO, P.C.; STADELMANN, O. K.Y.L. Pathological and physiological identification of race C of *Bipolaris maydis* in China. Phytopathology, 78 (5): 550-554. 1988.
- WEISSINGER, A.K. & ALBERTSON, M.C. Measurement of cytoplasmic and its applications in corn breeding. Proceedings of the Thirtieth-ninth Annual Corn & Sorghum Industry Research Conference. p.111-122. 1984.
- WHEELER, H.; WILLIAMS, A.S.; YOUNG. *Helminthosporium maydis* T-toxin as an indicator of resistance to southern corn leaf blight. Plant Disease Reporter, 55: 667-671. 1971.
- WISE, R.P.; PRING, D.R.; GENGENBACH, B.G. Mutation to male fertility and toxin insensitivity in Texas (T) cytoplasm maize is associated with a frameshift in a mitochondrial-open reading frame. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 84: 2858-2862. 1987.
- WRIGHT, R.J. & CUMMINGS, D.J. Integration of mitochondrial gene sequences within the nuclear genome during senescence in a fungus. Nature, 302: 86-88. 1983.

A P E N D I C E

APÊNDICE IANÁLISE DOS CRUZAMENTOS REALIZADOS ENTRE LINHAGENS DO
GRUPO T₁ COM LINHAGENS DO GRUPO PF 23

Dos cruzamentos realizados na Estação de Pesquisa de Capinópolis, foram submetidos a análise eletroforética de PPO:

- T₁ cms Trfrf x PF 23 cit Nrfrf
- T₁ cms Trfrf x PF 23 cms TRfRf

Tais cruzamentos, juntamente com as linhagens T₁ cms T rfrf e PF 23 cms T rfrf, foram ensaiados nas dosagens anteriormente utilizadas de Methomyl e DNP, tendo como controle a H₂O destilada. Os procedimentos experimentais foram idênticos aos mencionados no item 3.2 (Métodos).

Os resultados podem ser observados na Figura a seguir.

Número da canaleta	Origem	Tratamento
1	T1 cms T rfrf	H ₂ O
2	T1 cms T rfrf x PF23 cit N rfrf	H ₂ O
3	T1 cms T rfrf x PF23 cms T RfRf	H ₂ O
4	PF23 cms T rfrf	H ₂ O
5	T1 cms T rfrf	2x10 ⁻³ M(Methomyl)
6	T1 cms T rfrf x PF23 cit N rfrf	2x10 ⁻³ M(Methomyl)
7	T1 cms T rfrf x PF23 cms T RfRf	2x10 ⁻³ M(Methomyl)
8	PF 23 cms T rfrf	2x10 ⁻³ M(Methomyl)
9	T1 cms T rfrf	10 ⁻⁵ M (DNP)
10	T1 cms T rfrf x PF23 cit N rfrf	10 ⁻⁵ M (DNP)
11	T1 cms T rfrf x PF23 cms T RfRf	10 ⁻⁵ M (DNP)
12	PF23 cms T rfrf	10 ⁻⁵ M (DNP)

Fica evidente a complementação apresentada pelos híbridos entre as linhagens PF23 e T1, quanto as formas de elevado peso molecular da PP0, indicando a utilidade da análise em estudos sobre o controle genético da enzima, dada a existência de alelos.

Quanto a expressão das formas ativas da enzima, na presença de toxinas, existem dois aspectos interessantes:

- a) Os híbridos, na presença do Methomyl, apresentaram um comportamento semelhante ao da linhagem PF23 cms T rfrf, no que se refere ao "desaparecimento" da forma de alto peso molecular. Embora o mesmo ocorra com a linhagem T1 cms T rfrf, existe evidência de atividade intensa numa forma "intermediária" da enzima (*);
- b) A menor sensibilidade ao Methomyl apresentada pelo cruzamento T1 cms T rfrf x PF 23 cit N rfrf, com relação as linhagens endogâmicas e ao híbrido T1 cms T rfrf x PF 23 cms T RfRf.

APENDICE II

APRESENTAÇÃO GERAL DOS DADOS

Data file **MET2**
Title: ENSAIO DE DOSES DE METOMIL

Function: PRLIST
Data case no. 1 to 187
Without selection

LIST OF VARIABLES

VAR	TYPE	NAME/DESCRIPTION
1	numeric	REP.
2	numeric	DOSES
3	numeric	LINHAGENS
4	numeric	PESO AEREA
5	numeric	PESO RAIZ
6	numeric	A520
7	numeric	A535
8	numeric	A545
9	numeric	A520/g
10	numeric	A535/g
11	numeric	A545/g

CASE NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1	1	1	6.28	0.99	0.503	0.522	0.458	0.508	0.527	0.463
2	1	1	2	5.82	0.87	0.228	0.233	0.205	0.262	0.268	0.236
3	1	1	3	5.85	0.84	0.227	0.244	0.226	0.270	0.290	0.269
4	1	1	4	4.74	0.91	0.240	0.366	0.317	0.264	0.402	0.348
5	1	1	5	4.14	0.82	0.076	0.073	0.069	0.093	0.089	0.084
6	1	1	6	5.09	1.06	0.128	0.127	0.120	0.121	0.120	0.113
7	1	2	1	3.97	0.65	0.054	0.053	0.053	0.083	0.082	0.082
8	1	2	2	4.24	0.54	0.144	0.147	0.136	0.267	0.272	0.252
9	1	2	3	4.05	0.51	0.158	0.164	0.152	0.310	0.322	0.298
10	1	2	4	4.72	0.83	0.316	0.331	0.295	0.381	0.399	0.355
11	1	2	5	3.17	0.58	0.026	0.029	0.027	0.045	0.050	0.047
12	1	2	6	5.14	0.96	0.141	0.146	0.131	0.147	0.152	0.136
13	1	3	1	3.81	0.56	0.003	0.008	0.003	0.005	0.014	0.005
14	1	3	2	3.75	0.64	0.010	0.009	0.004	0.016	0.014	0.006
15	1	3	3	3.42	0.72	0.017	0.017	0.012	0.024	0.024	0.017
16	1	3	4	5.16	0.78	0.319	0.331	0.292	0.409	0.424	0.374
17	1	3	5	2.77	0.60	0.013	0.018	0.013	0.022	0.030	0.022
18	1	3	6	4.59	0.92	0.110	0.115	0.095	0.120	0.125	0.103
19	1	4	1	2.49	0.47	0.004	0.002	0.008	0.009	0.004	0.017
20	1	4	2	3.06	0.51	0.008	0.003	0.006	0.016	0.006	0.012
21	1	4	3	3.02	0.46	0.010	0.005	0.007	0.022	0.011	0.015
22	1	4	4	3.26	0.49	0.152	0.169	0.151	0.310	0.345	0.308
23	1	4	5	2.09	0.46	0.011	0.011	0.009	0.024	0.024	0.020
24	1	4	6	3.52	0.74	0.072	0.080	0.075	0.097	0.108	0.101
25	1	5	1	4.73	0.74	0.152	0.173	0.180	0.205	0.234	0.243
26	1	5	2	4.38	0.64	0.100	0.122	0.109	0.156	0.191	0.170
27	1	5	3	4.68	0.68	0.107	0.104	0.115	0.157	0.153	0.169
28	1	5	4	3.91	0.74	0.198	0.210	0.217	0.268	0.284	0.293
29	1	5	5	3.86	0.79	0.051	0.049	0.045	0.065	0.062	0.057
30	1	5	6	3.28	0.78	0.052	0.050	0.041	0.067	0.064	0.053
31	1	6	1	3.27	0.51	0.044	0.046	0.046	0.086	0.090	0.090
32	1	6	2	3.68	0.53	0.058	0.062	0.064	0.109	0.117	0.121
33	1	6	3	3.56	0.48	0.061	0.053	0.054	0.127	0.110	0.113
34	1	6	4	2.86	0.52	0.062	0.063	0.064	0.119	0.121	0.123
35	1	6	5	2.42	0.45	0.033	0.033	0.035	0.073	0.073	0.078
36	1	6	6	2.87	0.57	0.032	0.028	0.036	0.056	0.049	0.063
37	1	7	1	3.44	0.30	0.268	0.276	0.248	0.893	0.920	0.827
38	1	7	2	4.13	0.70	0.273	0.285	0.254	0.390	0.407	0.363
39	1	7	3	4.54	0.76	0.226	0.237	0.213	0.297	0.312	0.280
40	1	7	4	3.85	0.71	0.357	0.373	0.329	0.503	0.525	0.463
41	1	7	5	4.41	1.18	0.178	0.188	0.166	0.151	0.159	0.141
42	1	7	6	3.91	0.97	0.092	0.099	0.087	0.095	0.102	0.090
43	2	1	1	4.70	0.73	0.444	0.484	0.423	0.608	0.663	0.579
44	2	1	2	4.79	0.72	0.197	0.213	0.188	0.274	0.296	0.261
45	2	1	3	5.68	0.82	0.351	0.371	0.329	0.428	0.452	0.401
46	2	1	4	5.76	0.85	0.412	0.440	0.388	0.485	0.518	0.456
47	2	1	5	4.36	0.62	0.073	0.078	0.076	0.118	0.126	0.123
48	2	1	6	5.04	1.19	0.083	0.090	0.086	0.070	0.076	0.072
49	2	2	1	3.50	0.45	0.045	0.040	0.040	0.100	0.089	0.089
50	2	2	2	3.95	0.35	0.181	0.185	0.168	0.517	0.529	0.480
51	2	2	3	4.27	0.50	0.189	0.192	0.176	0.378	0.384	0.352
52	2	2	4	5.50	0.78	0.273	0.286	0.259	0.350	0.367	0.332
53	2	2	5	3.23	0.43	0.040	0.040	0.036	0.093	0.093	0.084
54	2	2	6	4.96	1.02	0.162	0.167	0.154	0.159	0.164	0.151

CASE NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
55	2	3	1	2.53	0.47	0.004	0.000	0.006	0.009	0.000	0.013
56	2	3	2	3.33	0.62	0.014	0.013	0.016	0.023	0.021	0.026
57	2	3	3	2.80	0.56	0.006	0.004	0.007	0.011	0.007	0.013
58	2	3	4	3.52	0.48	0.225	0.235	0.206	0.469	0.490	0.429
59	2	3	5	2.16	0.35	0.009	0.007	0.008	0.026	0.020	0.023
60	2	3	6	4.07	0.80	0.133	0.133	0.120	0.166	0.166	0.150
61	2	4	1	2.83	0.52	0.008	0.007	0.005	0.015	0.013	0.010
62	2	4	2	3.06	0.62	0.006	0.003	0.003	0.010	0.005	0.005
63	2	4	3	2.86	0.51	0.008	0.003	0.004	0.016	0.006	0.008
64	2	4	4	4.73	0.72	0.239	0.236	0.208	0.332	0.328	0.289
65	2	4	5	2.54	0.47	0.012	0.004	0.007	0.026	0.009	0.015
66	2	4	6	3.47	0.50	0.055	0.043	0.042	0.110	0.086	0.084
67	2	5	1	3.60	0.47	0.175	0.162	0.167	0.372	0.345	0.355
68	2	5	2	3.98	0.63	0.128	0.118	0.125	0.203	0.187	0.198
69	2	5	3	3.97	0.68	0.130	0.119	0.125	0.191	0.175	0.184
70	2	5	4	4.20	0.66	0.135	0.125	0.118	0.205	0.189	0.179
71	2	5	5	4.36	0.79	0.039	0.022	0.037	0.049	0.028	0.047
72	2	5	6	4.13	0.86	0.052	0.033	0.047	0.060	0.038	0.055
73	2	6	1	2.66	0.37	0.045	0.048	0.043	0.122	0.130	0.116
74	2	6	2	2.96	0.49	0.044	0.042	0.038	0.090	0.086	0.078
75	2	6	3	3.13	0.45	0.042	0.039	0.041	0.093	0.087	0.091
76	2	6	4	4.08	0.42	0.046	0.041	0.040	0.110	0.098	0.095
77	2	6	5	3.33	0.53	0.033	0.027	0.034	0.062	0.051	0.064
78	2	6	6	2.81	0.46	0.039	0.033	0.041	0.085	0.072	0.089
79	2	7	1	3.98	0.69	0.305	0.313	0.285	0.442	0.454	0.413
80	2	7	2	3.40	0.45	0.110	0.103	0.096	0.244	0.229	0.213
81	2	7	3	4.55	0.67	0.240	0.245	0.218	0.358	0.366	0.325
82	2	7	4	4.13	0.63	0.369	0.376	0.337	0.586	0.597	0.535
83	2	7	5	4.23	0.77	0.109	0.105	0.095	0.142	0.136	0.123
84	2	7	6	4.13	0.78	0.131	0.125	0.116	0.168	0.160	0.149
85	3	1	1	5.31	0.89	0.559	0.575	0.487	0.628	0.646	0.547
86	3	1	2	4.61	0.66	0.294	0.297	0.258	0.445	0.450	0.391
87	3	1	3	5.24	0.68	0.312	0.317	0.283	0.459	0.466	0.416
88	3	1	4	4.54	0.72	0.476	0.475	0.424	0.661	0.660	0.589
89	3	1	5	4.30	0.64	0.088	0.077	0.076	0.138	0.120	0.119
90	3	1	6	4.76	0.97	0.133	0.131	0.119	0.137	0.135	0.123
91	3	2	1	3.81	0.58	0.038	0.040	0.035	0.066	0.069	0.060
92	3	2	2	4.59	0.59	0.199	0.210	0.186	0.337	0.356	0.315
93	3	2	3	5.50	0.67	0.244	0.258	0.234	0.364	0.385	0.349
94	3	2	4	5.21	0.95	0.272	0.281	0.253	0.286	0.296	0.266
95	3	2	5	3.50	0.61	0.033	0.030	0.031	0.054	0.049	0.051
96	3	2	6	4.62	0.76	0.132	0.131	0.122	0.174	0.172	0.161
97	3	3	1	2.33	0.55	0.009	0.013	0.010	0.016	0.024	0.018
98	3	3	2	3.00	0.52	0.012	0.017	0.014	0.023	0.033	0.027
99	3	3	3	2.74	0.59	0.008	0.017	0.016	0.014	0.029	0.027
100	3	3	4	3.55	0.54	0.227	0.248	0.222	0.420	0.459	0.411
101	3	3	5	2.38	0.59	0.007	0.022	0.022	0.012	0.037	0.037
102	3	3	6	3.67	0.76	0.073	0.088	0.082	0.096	0.116	0.108
103	3	4	1	3.75	0.71	0.000	0.005	0.001	0.000	0.007	0.001
104	3	4	2	3.50	0.65	0.000	0.005	0.001	0.000	0.008	0.002
105	3	4	3	3.78	0.56	0.000	0.004	0.004	0.000	0.007	0.007
106	3	4	4	4.01	0.62	0.217	0.236	0.209	0.350	0.381	0.337
107	3	4	5	2.95	0.51	0.005	0.016	0.011	0.010	0.031	0.022
108	3	4	6	3.87	0.62	0.097	0.099	0.094	0.156	0.160	0.152
109	3	5	1	4.13	0.65	0.171	0.185	0.156	0.263	0.285	0.240

CASE NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
110	3	5	2	4.00	0.56	0.134	0.135	0.117	0.239	0.241	0.209
111	3	5	3	4.87	0.70	0.139	0.146	0.127	0.199	0.209	0.181
112	3	5	4	3.79	0.53	0.194	0.201	0.179	0.366	0.379	0.338
113	3	5	5	4.10	0.63	0.044	0.040	0.045	0.070	0.063	0.071
114	3	5	6	4.38	0.69	0.042	0.035	0.041	0.061	0.051	0.059
115	3	6	1	4.12	0.46	0.050	0.047	0.046	0.109	0.102	0.100
116	3	6	2	3.86	0.50	0.044	0.044	0.042	0.088	0.088	0.084
117	3	6	3	4.30	0.60	0.068	0.071	0.067	0.113	0.118	0.112
118	3	6	4	3.30	0.39	0.024	0.029	0.025	0.062	0.074	0.064
119	3	6	5	3.86	0.64	0.034	0.038	0.031	0.053	0.059	0.048
120	3	6	6	3.60	0.48	0.029	0.028	0.021	0.060	0.058	0.044
121	3	7	1	5.68	0.73	0.296	0.317	0.277	0.405	0.434	0.379
122	3	7	2	3.98	0.52	0.137	0.148	0.134	0.263	0.285	0.258
123	3	7	3	4.68	0.52	0.109	0.122	0.105	0.210	0.235	0.202
124	3	7	4	4.29	0.80	0.277	0.306	0.270	0.346	0.383	0.338
125	3	7	5	5.16	0.95	0.124	0.132	0.123	0.131	0.139	0.129
126	3	7	6	4.39	1.03	0.095	0.103	0.098	0.092	0.100	0.095
127											
128	1	1	1			0.268	0.284	0.252	0.332	0.350	0.311
129	1	2	1			0.147	0.152	0.138	0.228	0.235	0.214
130	1	3	1			0.067	0.072	0.064	0.105	0.113	0.101
131	1	4	1			0.050	0.052	0.047	0.083	0.086	0.078
132	1	5	1			0.113	0.113	0.111	0.178	0.177	0.172
133	1	6	1			0.044	0.043	0.043	0.090	0.088	0.087
134	1	7	1			0.205	0.214	0.192	0.318	0.330	0.296
135						0.011	0.009	0.008	0.025	0.023	0.020
136											
137	1	1	1			0.151	0.158	0.142	0.235	0.244	0.221
138	1	1	2			0.111	0.114	0.103	0.189	0.195	0.177
139	1	1	3			0.126	0.130	0.120	0.192	0.198	0.182
140	1	1	4			0.240	0.255	0.229	0.347	0.368	0.330
141	1	1	5			0.049	0.049	0.047	0.069	0.069	0.067
142	1	1	6			0.090	0.090	0.084	0.109	0.108	0.102
143						0.007	0.007	0.006	0.013	0.013	0.012
144											
145	1	1	1			0.502	0.527	0.456	0.581	0.612	0.530
146	1	1	2			0.240	0.248	0.217	0.327	0.338	0.296
147	1	1	3			0.297	0.311	0.279	0.386	0.403	0.362
148	1	1	4			0.376	0.427	0.376	0.470	0.527	0.464
149	1	1	5			0.079	0.076	0.074	0.116	0.112	0.109
150	1	1	6			0.115	0.116	0.108	0.109	0.110	0.103
151	1	2	1			0.046	0.044	0.043	0.083	0.080	0.077
152	1	2	2			0.175	0.181	0.163	0.374	0.386	0.349
153	1	2	3			0.197	0.205	0.187	0.351	0.364	0.333
154	1	2	4			0.287	0.299	0.269	0.339	0.354	0.318
155	1	2	5			0.033	0.033	0.031	0.064	0.064	0.061
156	1	2	6			0.145	0.148	0.136	0.160	0.163	0.149
157	1	3	1			0.005	0.007	0.006	0.010	0.013	0.012
158	1	3	2			0.012	0.013	0.011	0.021	0.023	0.020
159	1	3	3			0.010	0.013	0.012	0.016	0.020	0.019
160	1	3	4			0.257	0.271	0.240	0.433	0.458	0.405
161	1	3	5			0.010	0.016	0.014	0.020	0.029	0.027
162	1	3	6			0.105	0.112	0.099	0.127	0.136	0.120
163	1	4	1			0.004	0.005	0.005	0.008	0.008	0.009
164	1	4	2			0.005	0.004	0.003	0.009	0.006	0.006

Title: ENSAIO DE DOSES DE METOMIL

CASE NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
165	1	4	3			0.006	0.004	0.005	0.013	0.008	0.010
166	1	4	4			0.203	0.214	0.189	0.331	0.351	0.311
167	1	4	5			0.009	0.010	0.009	0.020	0.021	0.019
168	1	4	6			0.075	0.074	0.070	0.121	0.118	0.112
169	1	5	1			0.166	0.173	0.168	0.280	0.288	0.279
170	1	5	2			0.121	0.125	0.117	0.199	0.206	0.192
171	1	5	3			0.125	0.123	0.122	0.182	0.179	0.178
172	1	5	4			0.176	0.179	0.171	0.280	0.284	0.270
173	1	5	5			0.045	0.037	0.042	0.061	0.051	0.058
174	1	5	6			0.049	0.039	0.043	0.063	0.051	0.056
175	1	6	1			0.046	0.047	0.045	0.106	0.107	0.102
176	1	6	2			0.049	0.049	0.048	0.096	0.097	0.094
177	1	6	3			0.057	0.054	0.054	0.111	0.105	0.105
178	1	6	4			0.044	0.044	0.043	0.097	0.098	0.094
179	1	6	5			0.033	0.033	0.033	0.063	0.061	0.063
180	1	6	6			0.033	0.030	0.033	0.067	0.060	0.065
181	1	7	1			0.290	0.302	0.270	0.580	0.603	0.540
182	1	7	2			0.173	0.179	0.161	0.299	0.307	0.278
183	1	7	3			0.192	0.201	0.179	0.288	0.304	0.269
184	1	7	4			0.334	0.352	0.312	0.478	0.502	0.445
185	1	7	5			0.137	0.142	0.128	0.141	0.145	0.131
186	1	7	6			0.106	0.109	0.100	0.118	0.121	0.111
187						0.019	0.018	0.016	0.035	0.034	0.031