

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINARIAS**

**INFLUÊNCIA DA FONTE E DO DRENO DE
FOTOASSIMILADOS NO METABOLISMO GLICÍDICO DE
PLANTAS DE MILHO**

Uilson Fernando Matter

Engenheiro Agrônomo

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
2002

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINARIAS**

**INFLUÊNCIA DA FONTE E DO DRENO DE
FOTOASSIMILADOS NO METABOLISMO GLICÍDICO DE
PLANTAS DE MILHO**

Uilson Fernando Matter

Orientador: Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal-UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Jaboticabal – SP

Fevereiro – 2002

Matter, Uilson Fernando

Influência da fonte e dreno de fotoassimilados no metabolismo glicídico de plantas de milho / Uilson Fernando Matter. – Jaboticabal, 2002.

viii, 47 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2002

Orientador: Jairo Osvaldo Cazetta / Banca examinadora:
Antônio Álvaro Corsetti Purcino, Marcelo Murad Magalhães
Bibliografia Bibliografia

1. Milho-carboidratos. 2. Invertases. 3. Sacarose sintetase. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.15

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

UILSON FERNANDO MATTER - Nascido em 09/10/1977 na cidade de Santa Helena-PR, é filho de Valdir Matter e Zelmira Matter. Iniciou sua formação na área Agrária em fevereiro de 1992 ingressando no Curso de Técnico em Agropecuária do Colégio Augusto Ribas em Ponta Grossa-PR, o qual concluiu em dezembro de 1994. Em abril de 1995 iniciou o Curso de Agronomia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, onde participou na elaboração e execução de vários projetos de pesquisa e foi bolsista CNPQ-RHAE, durante o ano 1999, quando foi graduado. Iniciou a Pós-Graduação em Agronomia em nível de Mestrado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, com conclusão em 22 de fevereiro de 2002. Em março deste ano iniciou o Doutorado nesta mesma Escola.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tantas dádivas e pelo amor.

Aos pais pelo carinho na criação e empenho na educação, e pelo incentivo aos estudos.

Ao Prof. Dr. José Fernando Durigan, que por primeiro acreditou no meu potencial. À FCAVJ-Unesp e ao Departamento de Tecnologia pelo acolhimento.

Ao Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta pela orientação, amizade e conhecimentos transmitidos.

A todos os professores pelos ensinamentos.

Aos Profs. Drs. João Suzuki, Wanderey José de Mello, Eliana Macedo Lemos, Jesus Aparecido Ferro e João Martins Pizauro Júnior pelos préstimos concedidos à realização do trabalho.

Aos técnicos e funcionários, especialmente Sueli, Fátima, Roberto, Marcelo, Nascimento e José Carlos.

À FAPESP pela concessão de bolsa e financiamento do projeto.

Ao colega e amigo Cesar, principal companheiro nesta jornada.

Aos demais colegas de Curso, especialmente Adilson Pelá e Caciana.

Aos alunos de graduação estagiários do Laboratório de Análises Química e Bioquímica de Plantas, Everton, Priscila, Juliana, Carlos, Andressa e Débora.

Ao graduando Anderson Voldinei Kauffman pelo imprescindível apoio na instalação do experimento.

A todos que de alguma forma colaboraram comigo e com o desenvolvimento do trabalho.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
REFERÊNCIAS	5
CAPÍTULO 2- DISTRIBUIÇÃO DE MATÉRIA SECA EM MILHO SOB DIFERENTES PROPORÇÕES DE FOLHAS E ESTIGMAS POLINIZADOS	9
RESUMO	9
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
CONCLUSÕES	17
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 3 - CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM PLANTAS DE MILHO SOB ALTERAÇÃO DA FONTE E DRENO	19
RESUMO	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
Metabólitos	24
Atividade enzimática	29
CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO 4 – IMPLICAÇÕES	38
APÊNDICES	41

Apêndice A: Concentrações de metabólitos nas folhas	42
Apêndice B: Concentrações de metabólitos nos colmos	43
Apêndice C: Concentrações de metabólitos nos endospermas	44
Apêndice D: Atividade enzimática nas folhas	45
Apêndice E: Atividade enzimática nos colmos	46
Apêndice F: Atividade enzimática nos endospermas	47

INFLUÊNCIA DA FONTE E DO DRENO DE FOTOSSINTATOS NO METABOLISMO GLICÍDICO DE PLANTAS DE MILHO E SEUS REFLEXOS NOS FATORES DE PRODUÇÃO

RESUMO – Avaliou-se os efeitos de diferentes proporções de folhas e grãos sobre o metabolismo glicídico de milho. As principais características produtivas, o acúmulo de matéria seca, os teores de açúcares redutores, sacarose e amido nas folhas, colmos e endospermas bem como as atividades de: invertase nas folhas e colmos; invertase e sacarose sintetase nos endospermas, foram determinados. O experimento foi conduzido na FCAV/Unesp-Jaboticabal, em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições, com o híbrido Agromen 3050. Os tratamentos foram: 1) testemunha (100 % de folhas e grãos); 2) retirada de 100% das folhas, mantendo-se 100% de grãos; 3) retirada de 33% das folhas, mantendo-se 100% de grãos; 4) retirada de 66% das folhas, mantendo-se 100% de grãos; 5) sem polinização da espiga mantendo-se as folhas; 6) polinização de 25% da espiga mantendo-se as folhas; 7) polinização de 50% da espiga mantendo-se as folhas. O menor número de estigmas polinizados resultou em maior acúmulo de matéria seca no caule e folhas, acúmulo de sacarose nos colmos, acúmulo de açúcares redutores, sacarose e amido nas folhas. O desfolhamento e a polinização parciais não afetaram a concentração de açúcares redutores e sacarose nos endospermas, e açúcares redutores nos colmos. A desfolha parcial acarretou menor matéria seca na espiga, principalmente pelo menor número de grãos; menor concentração de amido nos endospermas, colmos e folhas; menor concentração de sacarose nos colmos. Plantas sem grãos tiveram acúmulo de amido nos colmos. A atividade enzimática no endosperma e nas folhas não foi afetada pelos tratamentos.

Palavras-chave: *Zea mays* L., desfolha, polinização parcial, açúcares redutores, sacarose, atividade enzimática.

SOURCE/SINK INFLUENCE ON GLICIDIC METABOLISM OF MAIZE AND ITS EFFECT ON GRAIN YIELD COMPONENTS

Abstract - The development and dry matter accumulation in stem, leaves and ear, the concentrations of reducing sugars, sucrose and starch in leaves, stems and endosperms besides the activities of: invertase in leaves and stems; invertase and sucrose synthase in endosperms of corn plants submitted to defoliation and partial pollination were evaluated. A completely randomized block design with four replications was used. The treatments were constituted by the control (100% of leaves and grains), three variations of the source size (0%, 33% and 66% of leaves) with 100% of grains, and three variations in the sink size (0%, 25% and 50% of grains) keeping 100% of leaves. Leaf number reduction resulted in smaller ear dry matter, due to smaller grain number, but the 100 kernels weight was not altered. Grain number reduction increased stem and leaf dry matter, but increase in the remaining weight was not significant. There was no ear and grain development when plants were completely defoliated. Defoliation and partial pollination did not affect the concentration of reducing sugars and sucrose in the endosperms, and reducing sugars in the stems. Partial defoliation did not result in smaller starch concentration in the endosperm and stalks; but induced lower sucrose levels. The reduction of grain number caused sucrose accumulation in the stems. Plants without grains had starch accumulation in leaves. Leaf soluble invertase activity was much higher than that from the particulate form. Leaf and endosperm enzyme activities were not altered by treatments.

Key words: reducing sugars, sucrose, starch, invertase, sucrose synthase, defoliation, partial pollination.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A produção de fotoassimilados é diretamente relacionada com a atividade da enzima sacarose fosfato sintetase nas folhas (ROCHER et al., 1989), que se localiza exclusivamente no mesofilo no caso de folhas maduras (LUNN e FURBANK, 1997), ao passo que nas folhas em desenvolvimento encontra-se nas células da bainha vascular (CHENG et al., 1996).

O processo e as enzimas envolvidas na síntese de sacarose têm sido estudados intensivamente em espinafre (NEUHAUS et al., 1990; SIEGL e STITT, 1990; WALKER e HUBER, 1989). A síntese de sacarose ocorre no citosol e começa com a conversão das trioses fosfatos exportadas do cloroplasto em hexoses fosfatos e por último a sacarose e sua regulação é dividida pelas enzimas frutose-2,6-bisfosfatase e sacarose fosfato sintetase, que catalisam as reações que levam à síntese de sacarose (HUBER e HUBER, 1992).

A síntese de carboidratos tem sido concomitante a incrementos na radiação, mas as taxas absolutas de síntese foram sempre menores quando as folhas continham altos níveis endógenos de sacarose. Isto acontece durante o dia quando, além do acúmulo de sacarose, ocorre a formação de amido que é metabolizado durante a noite. O controle grosseiro da sacarose fosfato sintetase foi eficiente em regular os fluxos sob baixas taxas fotossintéticas e em manter os níveis de metabólitos relativamente constantes; sob altas taxas fotossintéticas a síntese de sacarose resultou em aumento bastante expressivo das concentrações deste metabólito (NEUHAUS et al., 1990).

A expressão de altos níveis de sacarose fosfato sintetase em plantas transgênicas de tomate oriunda de milho tiveram baixos níveis de amido e aumentadas concentrações de sacarose nas folhas. Baxter et al. (2001) também demonstraram a importância da sacarose fosfato sintetase como o principal ponto de controle na partição entre amido e sacarose durante a fotossíntese, sendo que plantas transgênicas de tabaco tiveram elevadas concentrações de sacarose no final do fotoperíodo associadas a uma paralela redução no conteúdo de amido e linearmente

correlacionadas com altas atividades de sacarose fosfato sintetase proveniente de milho.

Uma vez transportada via floema, inicia-se a utilização da sacarose pela sua clivagem, que é catalisada por duas enzimas distintas que apresentam diversas isoformas diferindo em suas localizações subcelulares: a β -frutofuranosidase (β -D-frutofuranosidase frutoidrolase, EC 3.2.1.26, também chamada de β -furanosidase ou invertase) e sacarose sintase (UDP-glicose:D-frutose 2- α -transferase, EC 2.4.1.13, também chamada de sacarose sintetase) (STURM et al., 1995).

A clivagem da sacarose pela invertase é uma reação irreversível e gera glicose e frutose, suprimindo as necessidades energéticas da célula e também está envolvida em reações de biossíntese. A sacarose sintetase preserva a energia da ligação glicosídica e hidrolisa sacarose na presença de UDP em UDP-glicose e frutose, reação esta reversível (COPELAND, 1990). A pirofosforólise de UDP-glicose pode diminuir a atividade das vias catabolítica e anabolítica de utilização de sacarose através do fornecimento de glicose-1-fosfato (SUNG et al., 1989).

As folhas em crescimento, que funcionam temporariamente como órgãos dreno, importam carbono das folhas fotossinteticamente ativas consideradas fonte até atingirem 30 a 50% do seu tamanho final. Durante a primeira fase de crescimento foliar, altas atividades da sacarose fosfato sintetase e invertase parecem ser necessárias para o fornecimento de energia e metabólitos pela clivagem e hidrólise da sacarose proveniente das folhas maduras. O aumento da capacidade fotossintética leva a um excesso de carbono, reduzindo a importação e a partir desta fase, quando a folha se torna madura e passa a ser considerada como fonte de fotoassimilados, a atividade da sacarose sintetase no limbo foliar de milho é reduzida a aproximadamente 10%. A nervura principal sofre similar redução na atividade da sacarose sintetase, ao passo que na bainha da folha observa-se redução em torno de 20% (CLAUSSEN et al., 1985).

Em folhas de soja em desenvolvimento com 4% do tamanho final da lâmina foliar, toda clivagem da sacarose foi efetuada exclusivamente pela sacarose sintetase; quando as folhas tinham 7,6% do tamanho final da lâmina, a contribuição da invertase ao metabolismo da sacarose foi de 47%, 54% com 11% da expansão e então se

manteve ao redor de 42% para o restante da fase de importação de sacarose. Para folhas de beterraba com 30% de expansão da lâmina foliar a contribuição da invertase ao metabolismo da sacarose foi 58% (SCHMALSTIG e HITZ, 1987).

As formas solúveis da invertase, presentes nos vacúolos e no citoplasma, são especialmente importantes na fase de expansão celular, que ocorre na formação das folhas, no desenvolvimento inicial dos frutos/sementes e demais tecidos em rápido alongamento (SCHAFFER et al., 1987; SUNG et al., 1994). Neste sentido, Morris e Arthur (1984a) encontraram alta correlação positiva entre o alongamento de segmentos do caule de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e a atividade específica da invertase solúvel, mediante a incubação dos explantes sob diferentes concentrações de ácido indol acético e auxina. Durante a fase inicial de expansão da lâmina foliar foi observada alta atividade da invertase solúvel; com a maturidade da folha a atividade de invertase diminuiu e houve aumento da concentração de sacarose (MORRIS e ARTHUR, 1984b).

Pelo menos duas formas de invertase, solúvel e ligada à parede celular, são encontradas nas plantas. Apesar de não estarem completamente elucidadas as funções fisiológicas das invertases, sabe-se que a invertase ligada à parede celular atua no transporte via floema convertendo sacarose para órgãos em crescimento (SHANKER et al., 1995). As isoformas de invertase podem ser distinguidas pela localização subcelular (parede celular, vacúolo e citosol), solubilidade (solúvel ou insolúvel em tampão de baixa força iônica), pH ótimo (ácido, neutro ou alcalino) e pelo ponto isoelétrico (STURM e CHRISPEELS, 1990). As invertases presentes na parede celular e vacúolo são glicosiladas e tem pH ótimo ácido, enquanto a invertase citosólica aproxima-se mais de uma forma não glicosilada com pH ótimo neutro/alcalino (KIM et al., 2000).

A importância da atividade de invertase no estabelecimento e manutenção do tamanho do dreno durante a fase de polinização e desenvolvimento inicial do grão foi demonstrada por Zinselmeier et al. (1995). Segundo eles o déficit hídrico inibiu a atividade da invertase ácida, reduzindo os níveis de açúcares redutores e principalmente de amido, com conseqüente acúmulo de sacarose. Como resultado o crescimento do ovário foi inibido.

Conforme descrito por Shannon e Dougherty (1972) nos grãos de milho a invertase solúvel apresenta atividade crescente entre 12 e 16 dias após a polinização, se mantém estável até aos 20 e depois tende a diminuir; por outro lado, a forma ligada apresenta atividade inicial menor que a solúvel, porém crescente até 32 dias após a polinização, quando se estabiliza, sendo que em torno de 25 dias a forma ligada passa a ser mais importante do que a solúvel. No tecido do pedicelo a atividade de invertase é decrescente a partir de 12 dias após a polinização.

No início do desenvolvimento dos grãos a invertase é encontrada em todo o endosperma e no pedicelo, mas ao redor dos 20 dias após a polinização, encontra-se principalmente no terço inferior do endosperma e pedicelo, não sendo detectada atividade de invertase no embrião em desenvolvimento (DOHELERT et al., 1988) ou no tecido da região placentó chalazal (DOHELERT e FELKER, 1987). Nos grãos de milho a atividade da sacarose sintetase se localiza principalmente no embrião e na porção superior do endosperma, as quais são áreas de biossíntese de compostos de reserva (DOHELERT e FELKER, 1987).

Mediante caracterização parcial das enzimas envolvidas na atividade de invertase no endosperma de milho foram descritas duas formas solúveis (I e II) com valores de K_m de 2,0 e 9,7 mM para sacarose e uma forma ligada à parede celular (III) de K_m para sacarose de 8,7 mM. A invertase I é presente no endosperma entre 10 e 28 dias após a polinização, ao passo que a invertase II aparece em embriões em germinação e no endosperma até 6 dias após a polinização (JAYNES e NELSON, 1971).

A seqüência do gene *Ivr1* de invertase solúvel, que apresenta 42% de similaridade a forma ligada à parede celular ao nível de aminoácidos e uma identidade de aproximadamente 60% com as invertases solúveis (XU et al., 1996)

A abundância relativa das transcrições e produtos protéicos de um gene de invertase ligada à parede celular (*Incw2*) e do gene *Ivr1* de invertase solúvel em grãos de milho em desenvolvimento foram analisadas por Carlson e Chourey (1999). Os níveis de transcrição do gene *Incw2* aumentaram dramaticamente de 0 a 12 dias após a polinização, enquanto não foi detectada transcrição do gene *Ivr1*. E coerentemente com

os dados de expressão do RNA, a proteína Ivr1 não pode ser detectada nos extratos de grãos. O fracionamento da forma solúvel de invertase (Ivr 1) através do focalização isoelétrica e revelação de bandas de eletroforese sugeriram que a atividade enzimática atribuída à invertase solúvel foi proveniente de contaminação pela invertase ligada à parede celular. Estes resultados foram reforçados pelos resultados de análise eletroforética da proteína proveniente de cultura de suspensão de células de milho onde a atividade enzimática da forma “solúvel” foi também atribuída à contaminação pela proteína ligada, indicando que as ligações iônicas são bastante fracas e podem ser rompidas mesmo na extração com tampão de baixa força iônica. Baseado nestes resultados os autores apontam a invertase ligada como o ponto crítico no desenvolvimento de órgãos dreno como os grãos de milho.

Referências

BAXTER, C.J. et al. A comparison of the carbohydrate composition and kinetic properties of sucrose phosphate synthase (SPS) in transgenic tobacco (*Nicotiniana tabacum*) leaves expressing maize SPS protein with untransformed controls. **Ann. Appl. Biol.**, Wellesbourne, v.138, p.47-55, 2001.

CARLSON, S.J.; CHOUREY, P.S. A re-evaluation of the relative roles of two invertases, INCW2 and IVR1, in developing maize kernels and other tissues. **Plant Physiol.**, Rockville, v.121, p.1025-1035, 1999.

CHENG, W-H. et al. Sucrose phosphate synthase expression at the cell and tissue level is coordinated with sucrose sink-to-source transitions in maize leaf. **Plant Physiol.**, Rockville, v.111, p.1021-1029, 1996.

CLAUSSEN, W. et al. Comparative investigations on the distribution of sucrose synthase activity and invertase activity within growing, mature and old leaves of some C₃ and C₄ plant species. **Physiol Plant.**, Copenhagen, v.65, p.275-280, 1985.

COPELAND, L. Enzymes of sucrose metabolism. **Methods Plant Biochem.**, London, v.3, p.73-85, 1990.

DOHELERT, D.C.; FELKER, R.C. Characterization and distribution of invertase activity in developing maize (*Zea mays*) kernels. **Physiol Plant.**, London, v.70, p.51-57, 1987.

HUBER, S.C.; HUBER, J.L. Role of sucrose phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. **Plant Physiol.**, Rockville, v.99, p.1275-1278, 1992.

KIM, J-Y. et al. Characterization of two members of the maize gene family, *Incw3* and *Incw4*, encoding cell-wall invertases. **Gene**, Amsterdam, v.245, p.89-102, 2000.

LUNN, J.E.; FURBANK, R.T. Localisation of sucrose-phosphate synthase and starch in leaves of C₄ plants. **Planta**, Heidelberg, v.20, p.106-111, 1997.

JAYNES, T.A.; NELSON, O.E. Invertase activity in normal and mutant maize endosperms during development. **Plant Physiol.**, Rockville, v.47, p.623-628, 1971.

MORRIS, D.A.; ARTHUR, E.D. Invertase and auxin-induced elongation in internodal segments of *Phaseolus vulgaris*. **Phytochemistry**, Oxford, v.23, n.10, p.2163-2167, 1984a.

MORRIS, D.A.; ARTHUR, E.D. An association between acid invertase activity and cell growth during leaf expansion in *Phaseolus vulgaris* L. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v.35, n.158, p.1369-1379, 1984b.

NEUHAUS, H.E. et al. Control of photosynthate partitioning in spinach leaves. Analysis of the interaction between feedforward and feedback regulation of sucrose synthesis. **Planta**, Heidelberg, v.181, p.583-592, 1990.

ROCHER, J.P. et al. Genetic variability in carbon fixation, sucrose-P synthase and ADP glucose pyrophosphorilase in maize plants of differing growth rate. **Plant Physiol.**, Rockville, v.89, p.416-420, 1989.

SHANKER, S. et al. Cloning and characterization of full-length cDNA encoding cell-wall invertase from maize. **Plant Physiol.**, Rockville, v.108, p.873-874, 1995.

SHANNON, J.C.; DOUGHERTY, C.T. Movement of ¹⁴C-labeled assimilates into kernels of *Zea mays* L. II. Invertase activity of the pedicel and placento-chalazal tissues. **Plant Physiol.**, Rockville, v.49, p.203-206, 1972.

SCHAFFER, A.A. et al. Invertase and sucrose synthase activity, carbohydrate status and endogenous IAA levels during *Citrus* leaf development. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.69, p.151-155, 1987.

SCHMALSTIG, J.G.; HITZ, W.D. Contributions of sucrose synthase and invertase to the metabolism of sucrose in developing leaves: estimation by alternate substrate utilization. **Plant Physiol.**, Rockville, v.85, p.407-412, 1987.

SIEGL, G.; STITT, M. Partial purification of two forms of spinach leaf sucrose-phosphate synthase which differ in their kinetic properties. **Plant Sci.**, Limerick, v.66, p.205-210, 1990.

STURM, A. et al. Development- and organ-specific expression of the genes for sucrose synthase and three isoenzymes of acid β -fructofuranosidase in carrot. **Planta**, Heidelberg, v.195, p.601-610, 1995.

STURM, A.; CHRISPEELS, M.J. cDNA cloning of carrot extracellular **BETA**-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. **Plant Cell**, Rockville, v.2, p.1107-1119, 1990.

SUNG, S.J.S. et al. Identification of actively filling sucrose sinks. **Plant Physiol.**, Rockville, v.89, p.1117-1121, 1989.

WALKER, J.L.; HUBER, S.C. Regulation of sucrose-phosphate synthase activity in spinach leaves by protein level and covalent modification. **Planta**, Heidelberg, v.177, p.116-120, 1989.

WORRELL, A.C. et al. Expression of a maize sucrose-phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. **Plant Cell**, Rockville, v.3, p.1121-1130, 1991.

XU, J. et al. The *Ivr 1* for invertase in maize. **Plant Physiol.**, Rockville, v.108, p.1293-1294, 1995.

ZINSELMEIER, C. et al. Low water potential disrupts carbohydrate metabolism in maize (*Zea mays* L.) ovaries. **Plant Physiol.**, Rockville, v.107, p.385-391, 1995.

CAPÍTULO 2 – Distribuição de matéria seca em milho sob diferentes proporções de folhas e estigmas polinizados.

RESUMO - Objetivou-se avaliar as principais características produtivas, o acúmulo de matéria seca nos colmos, folhas e espigas de plantas de milho submetidas a desfolhamento e polinização parcial. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições, empregando-se o milho híbrido triplo superprecoce “Agromen 3050”. Os tratamentos constituíram-se de diferentes proporções de folhas e grãos. A redução da fonte acarretou menor matéria seca acumulada na espiga, principalmente pelo menor número de grãos. A redução no número de estigmas polinizados proporcionou maior acúmulo de matéria seca no caule e folhas, mas os aumentos do peso médio dos grãos remanescentes não foram significativos. Não houve desenvolvimento de grãos nas plantas completamente desfolhadas dois dias após a polinização.

Palavras-chave: *Zea mays* L., desfolha, polinização parcial, crescimento, número de grãos.

Introdução

Experimentos em condições de campo baseados no desfolhamento como forma de variação do suprimento de fotoassimilados aos grãos em desenvolvimento têm sido realizados por diversos autores (DUNCAN et al. 1965; EGHAREVBA et al., 1976; EDMEADES e LAFITTE, 1993; CIRILO e ANDRADE, 1994; SCHUSSLER e WESTEGATE, 1995; ANDRADE e FERREIRO, 1996; MADONNI et al., 1998; RAJCAN e TOLLENAAR, 1999). Embora seja evidente que o desfolhamento afeta a produção de grãos, não está clara a forma com que o metabolismo da planta reage frente à

diminuição da fonte de fotoassimilados ou limitação do tamanho do dreno de metabólitos, havendo necessidade por mais informações, principalmente em se tratando de estudos realizados em âmbito nacional.

Neste trabalho foram estudados os efeitos de diferentes proporções de folhas e de grãos, portanto numa ampla faixa de suprimento de fotoassimilados, sobre o acúmulo e partição de matéria seca e os fatores de produção da cultura.

O conhecimento dos processos que determinaram os aumentos de produção da cultura do milho observados nas últimas décadas, como resultado principalmente do melhoramento genético e de práticas culturais mais adequadas, pode fornecer bases para novas melhorias (HO, 1988). Com intuito de contribuir para o conhecimento dos processos que determinam os aumentos de produção de milho, foi desenvolvido o presente trabalho cujo objetivo foi avaliar o desenvolvimento e acúmulo de matéria seca no caule, folhas e espiga de plantas, e as principais características produtivas de milho submetido a desfolhamento e polinização parcial.

Material e métodos

O milho híbrido triplo superprecoce “Agromen 3050” foi cultivado seguindo-se as recomendações de adubação, controle de pragas e plantas daninhas, descritas por Fornasieri Filho (1992).

Utilizou-se o delineamento de blocos casualizados com quatro repetições.

Os tratamentos foram: 1) testemunha (100% de folhas e grãos); 2) retirada de 100% das folhas, mantendo-se 100% dos grãos; 3) retirada de 33% das folhas, mantendo-se 100% dos grãos; 4) retirada de 66% das folhas, mantendo-se 100% dos grãos; 5) sem polinização da espiga, mantendo-se todas as folhas; 6) polinização de 25% da espiga, mantendo-se todas as folhas; 7) polinização de 50% da espiga, mantendo-se todas as folhas.

Para controlar o tamanho da fonte de fotoassimilados manteve-se 0, 4, 8 ou 12 folhas, correspondendo a 0%, 33%, 66% e 100%, e retirando-se as demais. A folha da

vizinha à espiga foi uma das mantidas nas plantas com 33% e 66% de folhas, sendo que estas primeiras ficaram com uma folha abaixo da espiga e duas acima, e as últimas com três folhas acima e quatro abaixo. A desfolha e a polinização controlada foram efetuadas em três plantas selecionadas por metro, baseando-se na uniformidade de desenvolvimento da espiga e emissão de estigmas. Esta medida também objetivou evitar alterações no microclima das parcelas, principalmente nos níveis mais severos de desfolha.

O tamanho do dreno foi controlado através da polinização parcial das espigas. Para tanto, antes da emissão dos estigmas as espigas foram protegidas com saco plástico. Efetuou-se um corte a aproximadamente 3 cm da ponta das espigas com objetivo de facilitar a exposição dos estigmas apicais e a polinização. Para realizar a polinização controlada, a espiga foi coberta para evitar a polinização aleatória enquanto parte dos estigmas foi envolvida em papel parafinado, de modo que somente a porção de estigmas que se desejava polinizar ficava exposta. O pólen foi aplicado com pincel e manteve-se a espiga ensacada até a coleta. Plantas com 100% de grãos foram também polinizadas artificialmente e mantidas expostas à polinização natural.

A redução do número de grãos baseou-se na diminuição do número de grãos nas fileiras, apesar de certa limitação devido à impossibilidade de polinização dos estigmas apicais. Mediante a meticulosidade deste processo obteve-se 25% e 50% de grãos quando se objetivou 33% e 66% de grãos.

As parcelas de 10 m de comprimento e 8 linhas espaçadas de 0,90 m foram demarcadas uma semana antes do florescimento (antes do estágio VT), sendo que cada bloco foi inserido em uma área uniforme da cultura. Tomou-se como bordadura 1 m nas extremidades das linhas e as duas linhas laterais. A densidade populacional foi de 50.000 plantas ha⁻¹.

Dez plantas por parcela foram amostradas aos 2, 10, 20, 30 e 40 DAP (dias após a polinização), para a determinação da matéria seca. As plantas foram levadas para o laboratório onde foram separados colmos (juntamente com as bainhas foliares), folhas (lâminas foliares) e espigas, e secos em estufa de circulação forçada de ar a 70° C até peso constante. Estimativas de perdas de matéria seca para respiração não

foram consideradas, pois de acordo com Ruggert (1993) estes decréscimos, devido aos baixos valores e limitações em termos de quantificação, normalmente não são levadas em conta em estudos de remobilização.

Em amostra de dez espigas obtidas no ponto de colheita determinou-se o número de fileiras de grãos, número de grãos ao longo das fileiras, peso médio de 100 grãos e a produção de grãos por planta.

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey, utilizando-se esquema de parcelas subdivididas para comparar os tratamentos nas diferentes épocas de avaliação.

Resultados e discussão

A redução no número de folhas teve influência direta sobre o acúmulo de matéria seca na espiga, comparado ao testemunha, desde 10 dap. Aos 20 dap. o efeito da retirada de 66% de folhas foi superior ao observado com 33% de desfolha, sendo que este tratamento induziu menor matéria seca em relação ao testemunha somente a partir de 30 dap.

Não houve diferenças significativas entre as avaliações quanto ao acúmulo de matéria seca no caule no tratamento de desfolha total da planta, indicando que este órgão não forneceu fotossintatos ao desenvolvimento dos grãos. Isto ocorre porque o carbono incorporado durante o alongamento do colmo sofre remobilização desprezível (0,5%), participando principalmente na formação de celulose em órgãos vegetativos (CLIQUET et al., 1990). Em condições normais de cultivo a contribuição de carboidratos formados antes do florescimento varia entre 5% e 10% do peso final dos grãos (SIMMONS e JONES, 1985). Nas plantas completamente desfolhadas o desenvolvimento dos grãos dependeria do colmo e, como resultado da ausência de reservas a serem remobilizadas, o crescimento e o desenvolvimento da espiga foram interrompidos, havendo deterioração da espiga.

Tabela 1. Acúmulo de matéria seca (g) nos órgãos de plantas de milho com diferentes proporções de folhas e grãos.

% folhas/% grãos	Amostragem (dias após a polinização)				
	2	10	20	30	40
Espiga					
0/100	7,98 Aa	7,36 Ac	9,46 Ac	5,46 Ad	8,01 Ad
33/100	6,52 Ea	25,17 Db	49,97 Cb	62,93 Bc	83,49 Ac
66/100	5,46 Ea	28,44 Dab	78,38 Ca	112,14 Bb	148,35 Ab
100/100	5,58 Ea	40,38 Da	86,92 Ca	130,70 Ba	187,11 Aa
Colmo (com bainhas foliares)					
0/100	59,95 Aa	46,91 Ac	47,80 Aabc	54,52 Ac	50,04 Ac
33/100	62,77 Ba	61,54 Aab	55,79 Ac	59,27 Ac	55,96 Abc
66/100	51,86 Aa	63,02 Abc	53,17 Abc	61,04 Abc	65,43 Abc
100/100	55,90 Aa	67,18 Aab	60,66 Aab	67,61 Abc	74,44 Ab
100/50	49,62 Ca	70,76 Bab	53,80 Cab	87,78 Ab	101,08 Aa
100/25	53,14 Ca	70,90 Bab	65,62 Bca	95,19 Ab	100,63 Aa
100/0	52,24 Ca	84,60 Ba	64,45 Ca	120,44 Aa	114,40 Aa
Folhas*					
100/100	29,56	32,85	30,38	32,53	33,15
100/50	28,30	32,45	31,09	33,51	31,57
100/25	28,82	32,56	31,46	34,07	39,44
100/0	28,16	32,82	39,29	36,64	43,32

* As médias não apresentaram diferenças significativas. Letras iguais maiúsculas na linha e minúsculas na coluna indicam igualdade estatística ao nível de 1%. Espiga: F = 212,0 e C.V.% = 16,23; e F = 64,77 e C.V.% = 22,64; Caule: F = 34,46 e C.V.% = 14,21; e F = 62,36 e C.V.% = 12,61; Folhas: F = 8,69 e C.V.% = 9,77; e F = 6,39 e C.V.% = 14,12, para tratamentos e épocas de amostragem, respectivamente.

Plantas com redução do número de grãos (0, 25, e 50% de grãos) apresentaram maior acúmulo de matéria seca no colmo comparado ao testemunha, mas a matéria seca total da planta foi menor (Figura 1), e está de acordo com resultados de Kiniry et al. (1992).

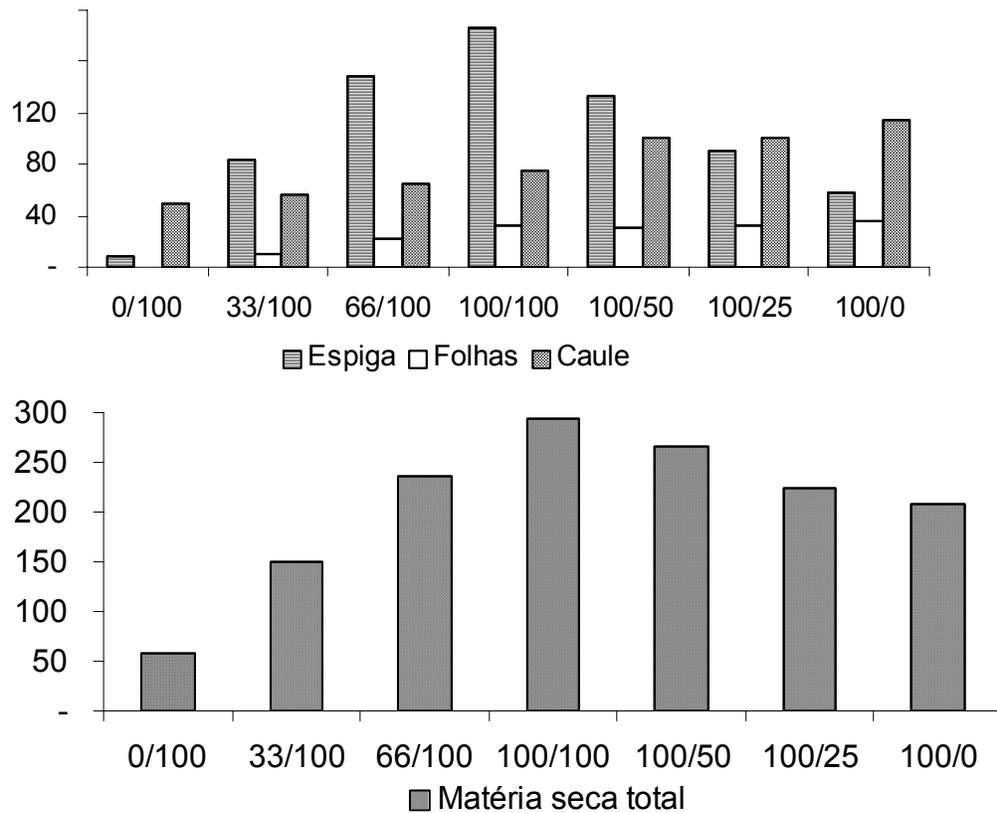


Figura 1. Matéria seca (g/planta) de espiga, caule e folhas de plantas submetidas ao controle da fonte e do dreno de fotoassimilados, aos 40 dias após a polinização.

Plantas sem grãos apresentaram sintomas de senescência após o término do crescimento da espiga (palha e sabugo). É interessante destacar também o acúmulo (33,16% de aumento) de matéria seca ocorrido no colmo de plantas a partir de 30 dap. com 100% de folhas e grãos, demonstrando que a capacidade de produção de fotoassimilados foi superior aos requerimentos dos grãos nesta fase.

O número de grãos por planta foi o componente da produção mais afetado pela desfolha (Tabela 2). Em termos percentuais o número de grãos por planta foi reduzido em 17,23% e 32,79% nas plantas com 66% e 33% de folhas, respectivamente.

O peso médio de grãos foi pouco afetado pelos tratamentos de desfolha, sendo que as retiradas de 33% e 66% das folhas 2 dap., proporcionaram reduções

respectivas de 2,59% e 4,4%. As reduções de 50% e 75% do número de grãos possibilitaram aumentos estimados em 6,75% e 12,23% no peso médio de 100 grãos. O peso médio dos grãos não foi alterado a ponto de compensar, pelo menos em parte, o menor número de grãos.

Tabela 2. Características agrônômicas de plantas de milho submetidas a redução do tamanho da fonte e do dreno de fotoassimilados.

Característica	Proporções de folhas e de grãos				
	33/100	66/100	100/100	100/50	100/25
Número de grãos por fileira**	24,75 d	30,50 b	36,25 a	27,50 c	24,00 d
Número de grãos por espiga**	371,50 c	457,50 b	552,75 a	275,00 d	132,0 e
Peso de 100 grãos*	32,25 b	32,75 ab	33,75 ab	37,88 a	36,00 ab
Produção de grãos por planta**	62,41 c	115,43 b	144,98 a	70,93 c	25,01 d

Letras iguais indicam igualdade estatística pelo teste de Tukey; * e **: 5 e 1% de probabilidade.

A matéria seca da palha da espiga geralmente foi maior nos tratamentos de redução do dreno, o mesmo ocorrendo para o sabugo, exceto para o tratamento sem grãos, indicando que o acúmulo de matéria seca no sabugo depende da presença de grãos (Figura 2).

Diferenças no acúmulo de matéria seca nos grãos entre os tratamentos com 100/100 e 66/100 de folhas/grãos foram notadas a partir de 20 DAP. A partir de então houve menor acúmulo para o tratamento 66/100 comparado ao testemunha, indicando que a retirada de 33% das folhas limitou a produção de grãos, mas neste período o tratamento testemunha induziu acúmulo de matéria seca no colmo.

O aumento na quantidade de matéria seca acumulada nos grãos das plantas submetidas à desfolha não foi acompanhado por respectiva redução da matéria seca de sabugo e/ou palha. Isto mostra que não houve remobilização de reservas entre estes órgãos, principalmente do sabugo para os grãos.

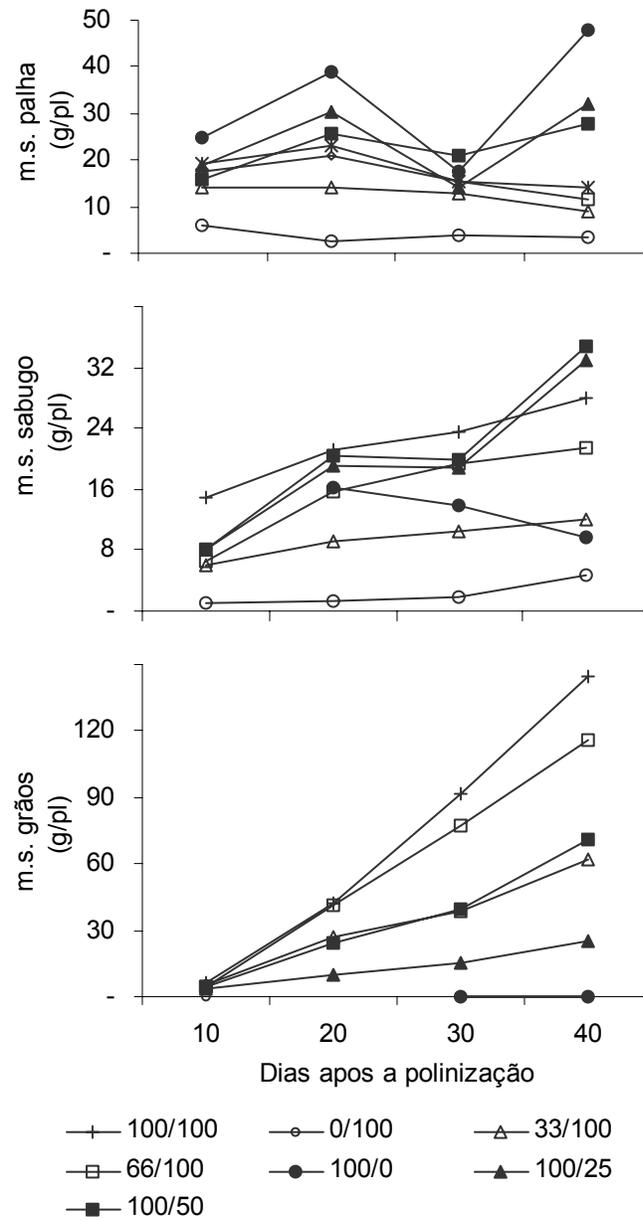


Figura 2. Distribuição de matéria seca nos componentes da espiga (palha, sabugo e grãos), de plantas submetidas a diferentes proporções de folhas e estigmas polinizadas.

Conclusões

- Não foi observada redução da matéria do colmo de plantas desfolhada.
- Não houve crescimento de grãos em plantas sem folhas.
- A redução do número de grãos induziu acúmulo de matéria seca no colmo.
- Plantas com 100% de folhas e grãos tiveram acúmulo de matéria seca no colmo.
- O número de grãos por planta foi o componente da produção mais afetado pela desfolha.
- O acúmulo de matéria seca no sabugo foi dependente da presença de grãos;
- Não houve remobilização de reservas da palha e sabugo da espiga para os grãos.
- Plantas sem grãos apresentaram coloração avermelhada e tiveram a senescência acelerada.

Referências

ANDRADE, F. H.; FERREIRO, M. A. Reproductive growth of maize, sunflower and soybean at different source levels during grain filling. **Field Crops Res.**, Amsterdam, v.48, p.155-165, 1996.

BELOW, F. E.; CHRISTENSEN, L. E.; REED, A. J.; HAGEMAN, R. H. Availability of reduced N and carbohydrates for ear development of maize. **Plant Physiol.**, Rockville, v.68, p.1186-1190, 1981.

CLIQUE, J-B.; DELÉENS, E.; MARIOTTI, A. C and N mobilization from stalk and leaves during kernel filling by ^{13}C e ^{15}N tracing in *Zea mays* L. **Plant Physiol.**, Rockville, v.94, p.1547-1553, 1990.

EGHAREVBA, P. N.; HORROCKS, R. D.; ZUBER, M. S. Dry matter accumulation in maize in response to defoliation. **Agron. J.**, Madison, v.68, p.40-43, 1976.

Fornasieri Filho, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal:Funep, 1992, 273p.

FREY, N. M. Dry matter accumulation in kernels of maize. **Crop Sci.**, Madison, v.21, p.118-122, 1981.

HO, L. C. Metabolism and compartamentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, Palo Alto, v.39, p.355-378, 1988.

KINIRY, J. R. et al. Nonstructural carbohydrates utilization by sorghum and maize shaded during grain growth. **Crop Sci.**, Madison, v.32, p.131-137, 1992.

MADONNI, G. A.; OTEGUI, M. E.; BONHOMME, R. Grain yield components in maize II. Post silking growth and kernel weight. **Field Crops Res.**, Amsterdam, v.56, p.257-264, 1998.

RAJCAN, I.; TOLLENAAR, M. Source:sink ratio and leaf senescence in maize: I. Dry matter acumulation and partitioning during grain filling. **Field Crops Res.**, v.60, p.245-253, 1999.

RUGGET, F. Contribution of storage reserves during grain-filling of maize in northern European conditions. **Maydica**, Bergamo, v.38, p.51-59, 1993.

SIMMONS, S.R.; JONES, R. J. Contributions of pre-silking assimilate to grain yield in maize. **Crop Sci.**, Madison, v.25, p.1004-1006, 1985.

CAPÍTULO 3 - Concentração de carboidratos e atividade enzimática em plantas de milho sob alteração da fonte e dreno.

RESUMO - Objetivou-se avaliar os teores de açúcares redutores, sacarose e amido nas folhas, colmos e endospermas bem como as atividades enzimáticas de: invertase solúvel e ligada nas folhas e colmos; invertase solúvel, invertase ligada e sacarose sintetase nos endospermas de grãos de plantas de milho submetidas a diferentes proporções de folhas e estigmas polinizados. Utilizou-se o delineamento de blocos casualizados com quatro repetições, empregando-se milho híbrido triplo superprecoce (*Zea mays* L., "Agromen 3050"). Os tratamentos foram constituídos por diferentes proporções de folhas e grãos. O desfolhamento e a polinização parciais não afetaram a concentração de açúcares redutores e sacarose nos endospermas, e açúcares redutores nos colmos. A desfolha parcial não acarretou menor concentração de amido nos endospermas. A desfolha proporcionou menor concentração de sacarose nos colmos. A redução do número de grãos provocou acúmulo de sacarose nos colmos. Plantas sem grãos tiveram acúmulo de amido nos colmos. A concentração de amido no caule e nas folhas não foi afetada pela desfolha. A redução do número de grãos acarretou acúmulo de açúcares redutores, sacarose e amido nas folhas. A atividade de invertase nas folhas foi maior para a forma solúvel. Nem a desfolha parcial nem a redução no número de grãos alteraram as atividades enzimáticas no endosperma de grão e nas folhas.

Palavras-chave: açúcares redutores, sacarose, amido, invertase solúvel, invertase ligada, sacarose sintetase.

Introdução

Os grãos de milho em desenvolvimento dependem do suprimento de sacarose proveniente de outras partes da planta e transportada via floema, sendo inicialmente hidrolisada a glicose e frutose. Este processo ocorre principalmente na parte basal do grão, é desempenhado pela atividade da invertase e se constitui em meio de manter um gradiente de concentração para promover o enchimento do grão, conforme sugerido por Shannon e Dougherty (1972). A sacarose pode ainda ser metabolizada pela sacarose sintase também conhecida como sacarose sintetase (TSAI et al., 1970; DOEHLERT e FELKER, 1987; COPELAND, 1990; STURM et al., 1995).

Pelo menos duas formas de invertase, solúvel e ligada à parede celular, são encontradas nas plantas. As invertases presentes na parede celular e vacúolo são glicosiladas e tem pH ótimo para atividade na faixa ácida, enquanto a invertase citosólica aproxima-se mais de uma forma não glicosilada e com pH ótimo para atividade na faixa neutra/alcalina (KIM et al., 2000).

Analisando a abundância relativa das transcrições e produtos protéicos de um gene de invertase ligada à parede celular (*Incw2*) e do gene *Ivr1* de invertase solúvel em grãos de milho em desenvolvimento e foi apontada a invertase ligada como o ponto crítico no desenvolvimento de órgãos dreno como é o caso dos grãos de milho (CARLSON e CHOUREY, 1999).

Apesar de não estarem completamente elucidadas as funções fisiológicas destas invertases, foi sugerido que a invertase ligada à parede celular atua no transporte via floema convertendo sacarose para órgãos em crescimento (SHANKER et al., 1995). De acordo com Zinselmeier et al. (2000) a sacarose que atinge os ovários parece ser principalmente processada pela invertase, de modo que a performance da atividade desta enzima associa-se também com o crescimento dos ovários. A manutenção de um gradiente de concentração favorável facilita a continuidade do fluxo e a hidrólise da sacarose previne seu retorno ao floema (DELROT e BONNEMAIN, 1985).

Pesquisas recentes utilizando técnicas de cultivo *in vitro* de grãos e infusão do colmo com sacarose revelam que os níveis de açúcares no endosperma são

diretamente relacionados com o suprimento de sacarose e concomitante desenvolvimento da atividade de invertase (BOYLE et al., 1991a e 1991b; FALEIROS et al., 1996, BELOW et al., 2000). Nestas condições foi observado que a disponibilidade excessiva de sacarose causou redução na atividade de invertase.

Experimentos em condições de campo baseados no desfolhamento como forma de variação do suprimento de fotossintatos aos grãos em desenvolvimento têm sido realizados por diversos autores (DUNCAN et al. 1965; EGHAREVBA et al., 1976; EDMEADES e LAFITTE, 1993; CIRILO e ANDRADE, 1994; SCHUSSLER e WESTEGATE, 1995). Embora seja evidente que o desfolhamento afeta a produção de grãos, não está clara a forma com que o metabolismo da planta reage frente à diminuição da fonte de fotoassimilados ou à limitação do tamanho do dreno de metabólitos, sendo escassas as informações na literatura (KINIRY et al., 1990), especialmente envolvendo experimentos de campo.

Em função do acima exposto e visando contribuir ao conhecimento de metabolismo glicídico durante a fase reprodutiva da cultura do milho em condições de campo foi desenvolvido este trabalho. Objetivou-se verificar quais são os reflexos da alteração da proporção de folhas e grãos, obtida por meio de desfolhamento e polinização parcial, sobre o metabolismo glicídico de plantas de milho.

Material e Métodos

Conduziu-se experimento na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp-Jaboticabal, utilizando-se o delineamento de blocos casualizados com quatro repetições. Empregou-se o milho híbrido triplo superprecoce (*Zea mays* L., "Agromen 3050"), cultivado seguindo-se as recomendações de adubação, controle de pragas e plantas daninhas, descritas por Rajj (1985) e Fornasieri Filho (1992).

Os tratamentos foram constituídos por um testemunha (100 % de folhas e grãos), três variações do tamanho da fonte (0%, 33% e 66% de folhas) com 100% de

grãos, e três variações no dreno (0%, 25% e 50% de grãos) mantendo-se 100% de folhas.

Dentre as plantas que receberam os tratamentos, foram escolhidas dez ao acaso, e usando-se um bisturi retirou-se amostras da parte central da folha mais próxima da espiga, eliminando-se a nervura. Seguindo as indicações de Singletary et al. (1990), tal material foi imediatamente identificado e mergulhado em nitrogênio líquido. As plantas foram transportadas para o laboratório, onde se obteve amostras de colmo retirando-se porções dos internódios dos colmos adjacentes à espiga. As amostras de grãos foram constituídas de grãos localizados no quarto médio superior da espiga, segundo indicado por Singletary et al. (1990), sendo que nos grãos foram separados os endospermas retirando-se pericarpo e embrião. As amostras foram liofilizadas até atingir peso constante, moídas em almofariz contendo nitrogênio líquido e armazenadas em freezer (- 65 °C).

Os carboidratos solúveis (açúcares redutores e sacarose) foram extraídos em etanol 80%, sendo uma massa de aproximadamente 50 mg adicionada de 2,0 mL de solução alcoólica e mantido em banho-maria a 60°C por 30 min, conforme Hendrix (1993). Após centrifugação a 1800 g durante 20 min o sobrenadante era coletado e o processo repetido mais três vezes. Para as amostras de folhas efetuou-se a evaporação do etanol para provocar a precipitação da clorofila. Os sobrenadantes foram conjugados, o volume da solução completado para 14 mL, colocado em banho de gelo pó 1 hora e novamente centrifugado.

Os teores de açúcares redutores foram determinados no sobrenadante através da reação com DNSA (ácido 3,5-dinitrosalicílico), com posterior determinação espectrofotométrica a 520 nm (MILLER, 1959; FALEIROS et al., 1996). A sacarose foi determinada pela reação quantitativa com resorcinol e leitura espectrofotométrica a 520 nm, após eliminação da interferência dos monossacarídeos fervendo-se a alíquota na presença de NaOH 0,2 M durante 10 min em banho-maria.

Para a determinação do conteúdo de amido o resíduo da centrifugação era adicionado de 1 mL de KOH 0,2 N e fervido em banho-maria por 30 min. Após ajustar o pH com 0,2 mL de HAc 1 N era adicionado 1 mL de tampão HAc e submetido a

incubação por 24 horas com 1 mL das soluções contendo α -amilase (50 UI mL^{-1}) e amiloglicosidase (50 UI mL^{-1}), sendo o volume completado para 14 mL e centrifugado por 20 min a 1800 g, sendo feita a determinação dos açúcares redutores formados pelo método do DNSA e os valores multiplicados por 0,9, obtendo-se o equivalente de amido.

A extração das enzimas foi realizada de acordo com Singletary et al. (1990) e Cazetta (1997). Uma massa de 50 mg de amostra liofilizada foi submetida ao homogeneizador tipo Turrax, por 30 segundos, a 4° C , em 1 mL de tampão extrator HEPES (ácido N-2-hidroximetilpiperazina- N'-2-etanosulfônico) 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl_2 5 mM e DTT (Ditiotreitol) 1 mM, centrifugada em centrífuga refrigerada (20.000 g, 4° C , 20 minutos), sendo o sobrenadante utilizado para determinação da atividade da invertase solúvel e o resíduo (pellet) reservado para extração e determinação da invertase ligada.

Para a determinação da atividade da invertase solúvel o extrato enzimático foi dialisado com tampão HEPES 10 mM, pH 7,2, contendo MgCl_2 5 mM e DTT 1 mM em tubos de diálise "Spectrapor 4", durante 24 horas a 4° C . Uma alíquota do extrato dialisado foi misturada ao meio reacional contendo tampão acetato 200 mM, pH 5,0 e sacarose 10 mM, a 30° C (DOEHLERT e FELKER, 1987). A reação foi interrompida após 20 minutos pela adição de DNSA e os açúcares redutores determinados segundo Miller (1959).

Os precipitados resultantes da extração com tampão HEPES 50 mM foram extraídos por 3 min a 4° C com o mesmo tampão contendo NaCl 1 M. Após centrifugação (20.000 g, 20 minutos) uma alíquota do sobrenadante foi imediatamente submetida à determinação da atividade da invertase ligada, seguindo o mesmo procedimento usado para a invertase solúvel (DOEHLERT e FELKER, 1987; FALEIROS et al., 1996).

A atividade da sacarose sintetase foi determinada de acordo com indicações de Doehlert et al. (1988), utilizando-se uma alíquota do extrato dialisado, que foi incubada em meio contendo tampão MÊS (ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico) 80 mM, pH 6,0, sacarose 300 mM e UDP (uridina difosfato) 10 mM, a 30° C . A reação foi interrompida

após 20 minutos através da adição de DNSA, determinando-se os açúcares redutores formados conforme Miller (1959).

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, de acordo com Banzatto e Kronka (1989).

Resultados e Discussão

Metabólitos

Nas plantas com menor proporção de grãos houve aumento na concentração de açúcares redutores nas folhas com o decorrer do tempo (Figura 1). Aos 30 d.a.p. as plantas com 0% de grãos apresentaram maior concentração de açúcares redutores nas folhas comparativamente a do testemunha.

A concentração de sacarose nas folhas aumentou entre 10 e 20 d.a.p. para todos os tratamentos (Figura1). Aos 30 d.a.p. os tratamentos de desfolha tiveram resultados semelhantes ao testemunha quanto à concentração de sacarose, e nesta época, quanto mais intensa a redução do número de grãos maior o acúmulo de sacarose nas folhas.

Para as plantas com 0% e 33% de grãos, o conteúdo de amido nas folhas aumentou até os 30 d.a.p., ao passo que as plantas dos demais tratamentos apresentaram aumento até 20 d.a.p. e diminuição a partir de então (Figura 1). Aos 20 d.a.p. observou-se nas plantas com 33% e 66% de folhas tiveram menores conteúdos de amido nas folhas do que as com 0% e 25% de grãos, porém em relação à testemunha não houve efeito significativo da desfolha. Aos 30 d.a.p. observou-se que quanto menor a proporção de grãos na espiga maior o conteúdo de amido no tecido foliar.

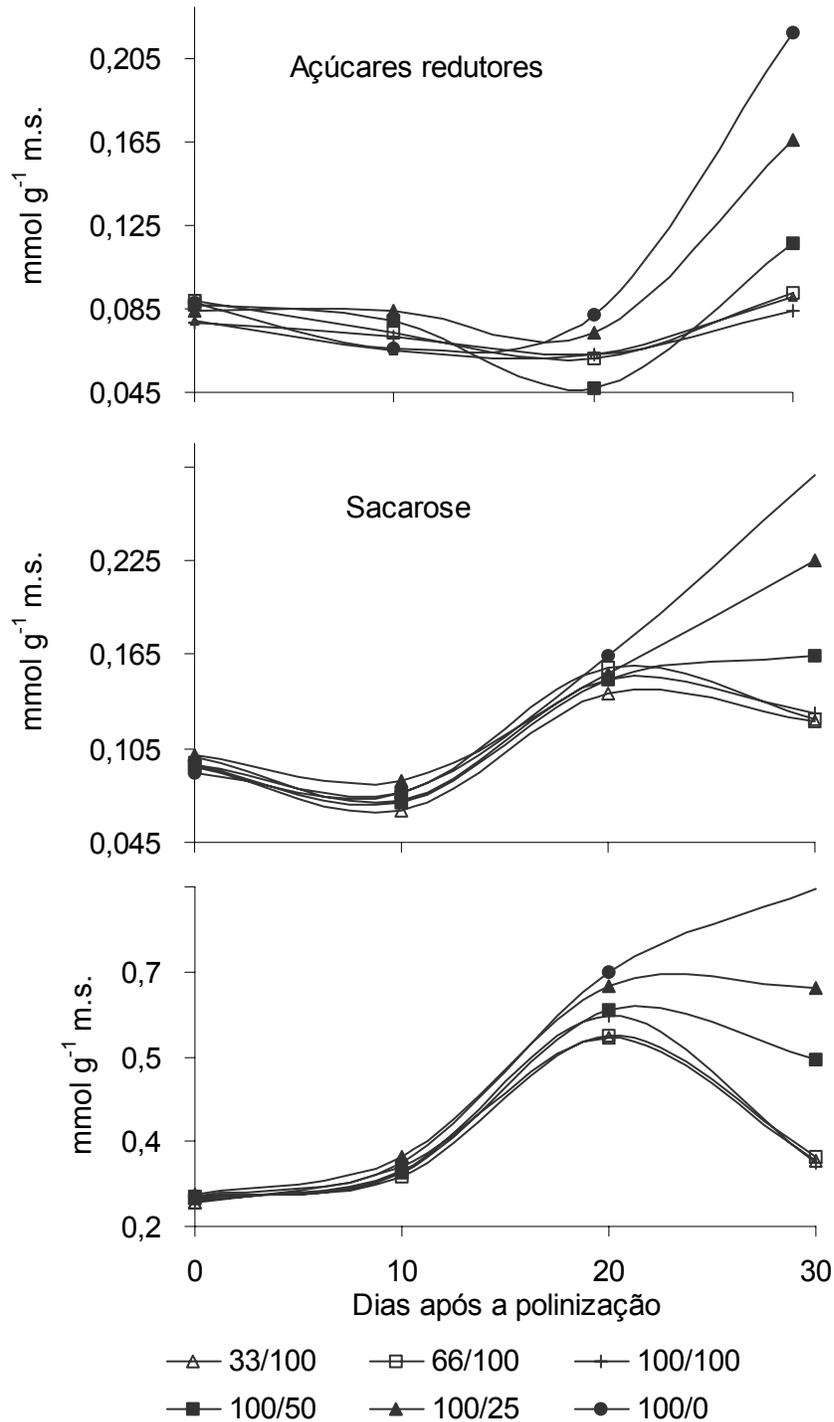


Figura 1. Concentração de açúcares redutores, sacarose e amido nas folhas adjacentes às espigas de plantas de milho submetidas a diferentes proporções de folhas e estigmas polinizadas.

A concentração de açúcares redutores nos colmos diminuiu com o tempo e foi observada tendência dos tratamentos de desfolha e testemunha em apresentar maior concentração de açúcares redutores nos colmos do que os de redução do número de grãos (Figura 2).

Aos 10 d.a.p. as plantas com 0% e 33% de folhas tiveram menor concentração de sacarose nos colmos do que a do testemunha, e observou-se tendência de maior concentração de sacarose nos colmos das plantas com menor número de grãos. Aos 30 d.a.p. as plantas com menor número de folhas apresentaram menor concentração de sacarose nos colmos, ao passo que plantas com 0% e 25% de grãos acumularam mais sacarose do que o testemunha (Figura 2).

Até os 20 d.a.p. não houve diferença entre as plantas sob os diferentes tratamentos quanto à concentração de amido nos colmos. Plantas sem grãos apresentaram tendência de maior conteúdo de amido nos colmos aos 30 d.a.p. comparativamente ao testemunha (Figura 2).

Aos 10 d.a.p. a concentração de açúcares redutores nos endospermas foi ligeiramente maior para os tratamentos de desfolha. Plantas sem folhas apresentaram maior concentração de açúcares redutores nos endospermas até aos 20 d.a.p. comparado aos demais tratamentos, que por sua vez tiveram concentrações semelhantes. Houve redução da concentração de açúcares redutores nos endospermas com o decorrer do tempo, principalmente entre 10 e 20 d.a.p. (Figura 3).

A concentração de sacarose nos endospermas foi menor aos 10 e 20 d.a.p. somente em função do desfolhamento total (Figura 3). Neste período, que coincide com a fase de crescimento linear e com o rápido aumento do teor de amido no endosperma, a concentração de sacarose nos endospermas diminuiu significativamente e a partir de então as reduções não foram significativas. Em plantas com menores proporções de grãos (25% e 50%) não foi observado aumento da concentração de sacarose no endosperma.

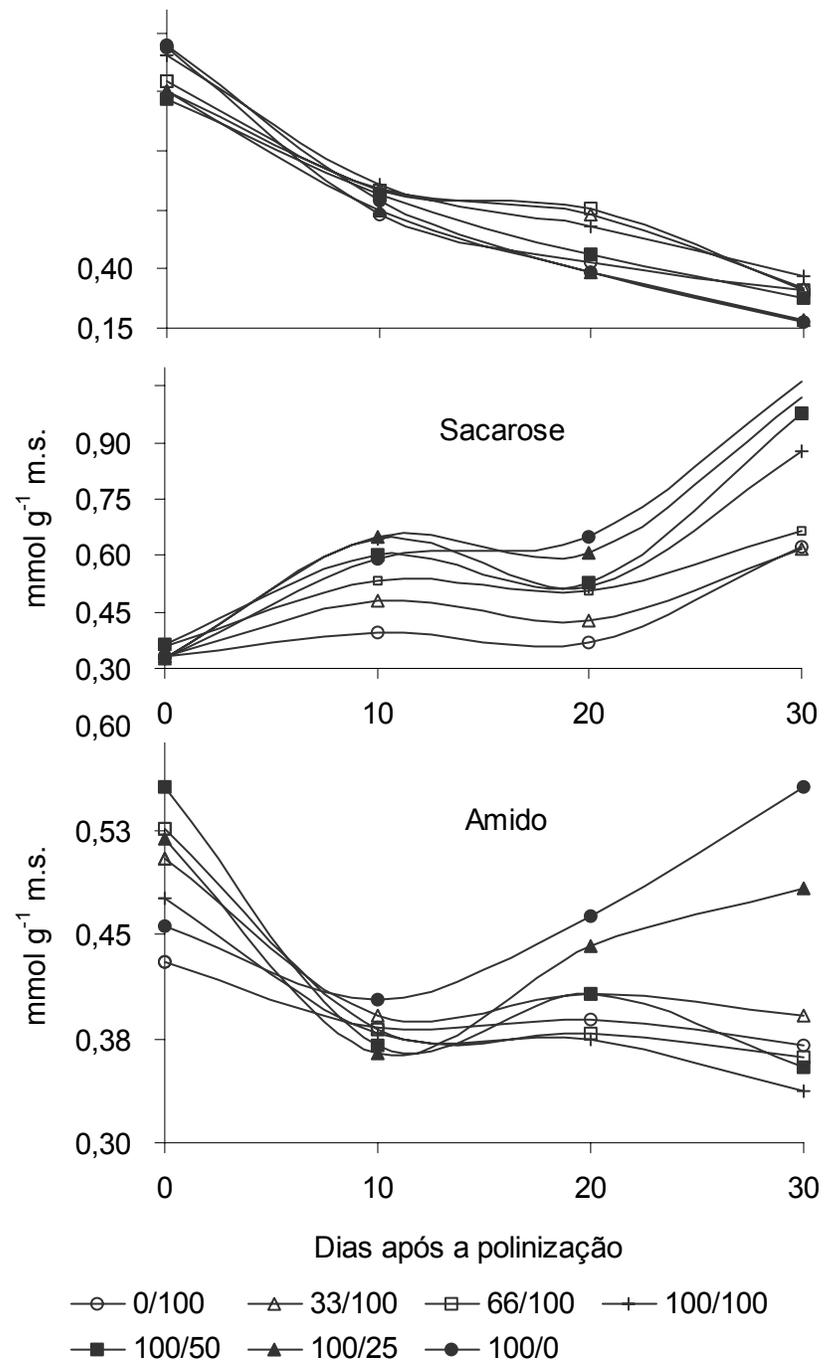


Figura 2. Concentração de açúcares redutores, sacarose e amido nos internódios dos colmos adjacentes à espiga de plantas de milho submetidas a diferentes proporções de folhas e estigmas polinizadas.

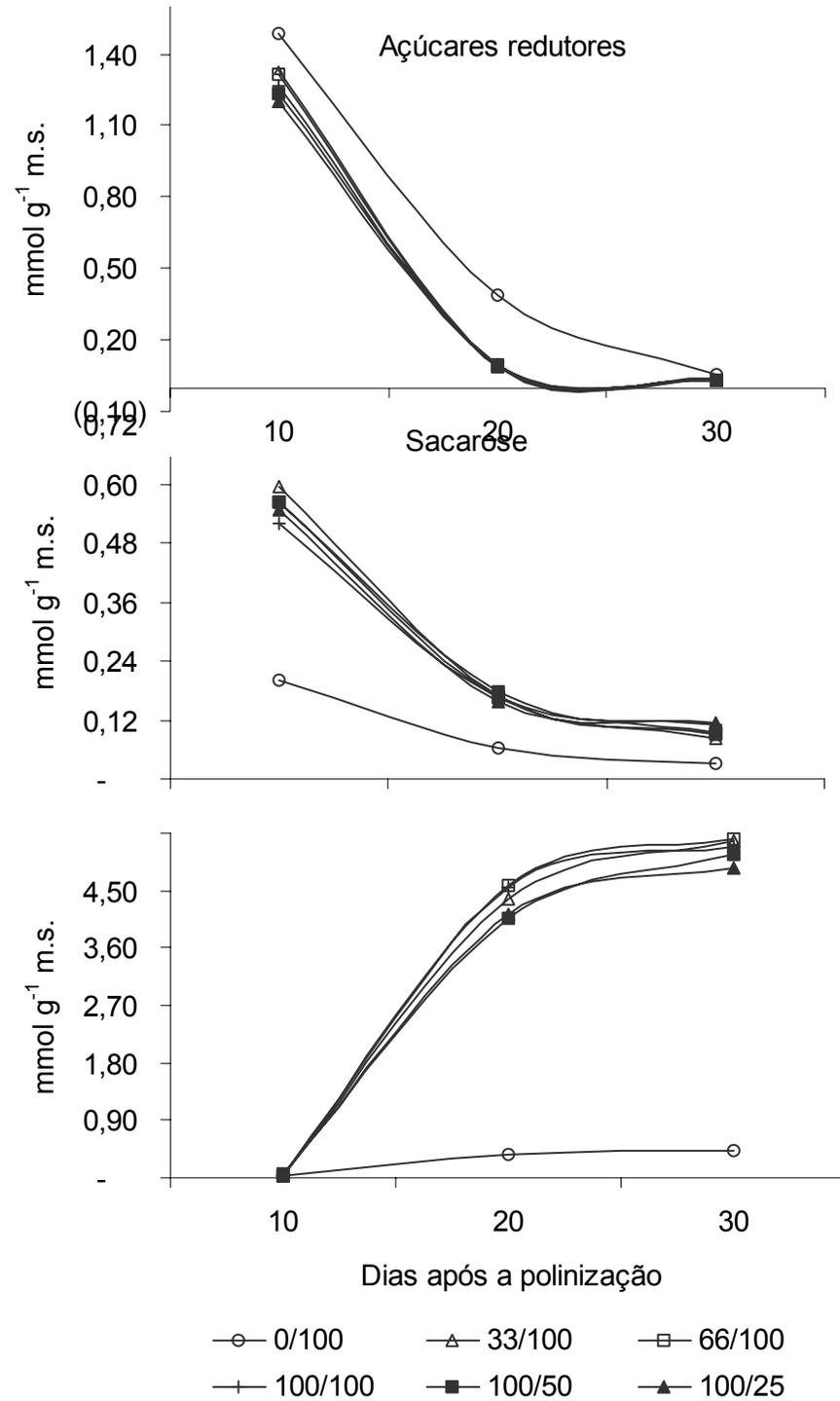


Figura 3. Concentração de açúcares redutores, sacarose e amido nos endospermas de grãos de plantas de milho submetidas a diferentes proporções de folhas e estigmas polinizadas.

Este resultado difere do obtido por Cazetta et al. (1999), que verificaram maior concentração de sacarose no endosperma como resultado do aumento na concentração de sacarose no meio de cultivo de grãos *in vitro*. A inibição da fotossíntese pelo aumento da concentração de sacarose nas folhas relatada por Neuhaus et al. (1990) não pode ser a razão destes resultados devido ao aumento da concentração de sacarose, causada pela redução da proporção de grãos por espiga, observado tanto nas folhas como nos colmos (Figuras 1 e 2). Uma possível explicação para estes comportamentos diferentes é a absorção de sacarose intacta pelo grão cultivado *in vitro*.

Plantas com desfolhamento total apresentaram baixa formação de amido nos grãos, mas não foram observadas diferenças entre os tratamentos aos 10 d.a.p. quanto ao conteúdo de amido nos endospermas. Aos 20 e 30 d.a.p. os tratamentos de desfolha não se diferenciaram da testemunha, ao passo que os de redução do número de grãos proporcionaram menor conteúdo de amido nos grãos, contrariando a expectativa de que o aumento do suprimento de sacarose por unidade de grãos promovesse maior conteúdo de amido (Figura 3).

Atividade Enzimática

A atividade da invertase solúvel encontrada nas folhas quando as plantas encontravam-se em pleno florescimento foi menor do que aos 10 e 20 d.a.p. (Figura 4). Apesar de não haver diferença significativa em função dos tratamentos de desfolha e redução do tamanho do dreno, observa-se menor atividade aos 20 d.a.p. indicando tendência de queda a partir deste período.

A atividade de invertase nas folhas de milho foi em função principalmente da forma solúvel, com maior atividade do que a forma ligada. A atividade da invertase ligada teve comportamento similar à solúvel, apresentando pico aos 10 d.a.p. Não foi observado efeito significativo da alteração das proporções de folhas e grãos sobre a atividade de invertase.

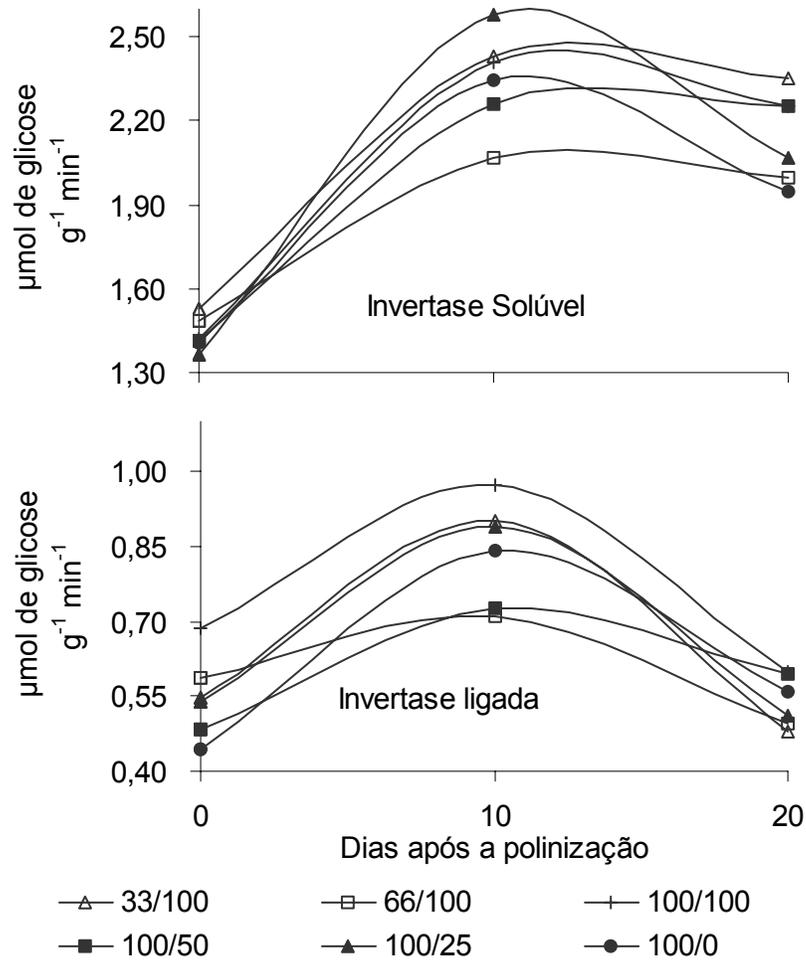


Figura 4. Atividade enzimática das invertases solúvel e ligada em folhas de plantas de milho submetidas a diferentes proporções de folhas e estigmas polinizados.

Exceto para plantas com 25% de grãos, a atividade da invertase solúvel nos colmos foi maior aos 10 d.a.p. do que na data de polinização (Figura 5). Os tratamentos de 0% e 66% de folhas induziram maior atividade em relação aos demais aos 10 d.a.p. A atividade da invertase ligada aumentou entre 0 e 10 d.a.p., quando os níveis de 33%, 66% e o tratamento testemunha induziram maior atividade do que a observada em plantas com 0% de folhas e de todos os tratamentos de redução do número de grãos. Aos 20 d.a.p. a atividade foi semelhante para todos os tratamentos, e nas plantas com 33% e 66% de folhas e testemunha houve diminuição em relação a 10 d.a.p.

Nos endospermas as atividades da sacarose sintetase e invertase solúvel foram maiores aos 10 d.a.p., a partir de quando diminuiu (Figura 6). Não foram observadas diferenças significativas em função dos tratamentos de desfolha parcial e redução do número de grãos, ao passo que a desfolha total induziu redução na atividade aos 10 d.a.p. A invertase ligada teve pico de atividade nos endospermas aos 20 d.a.p.

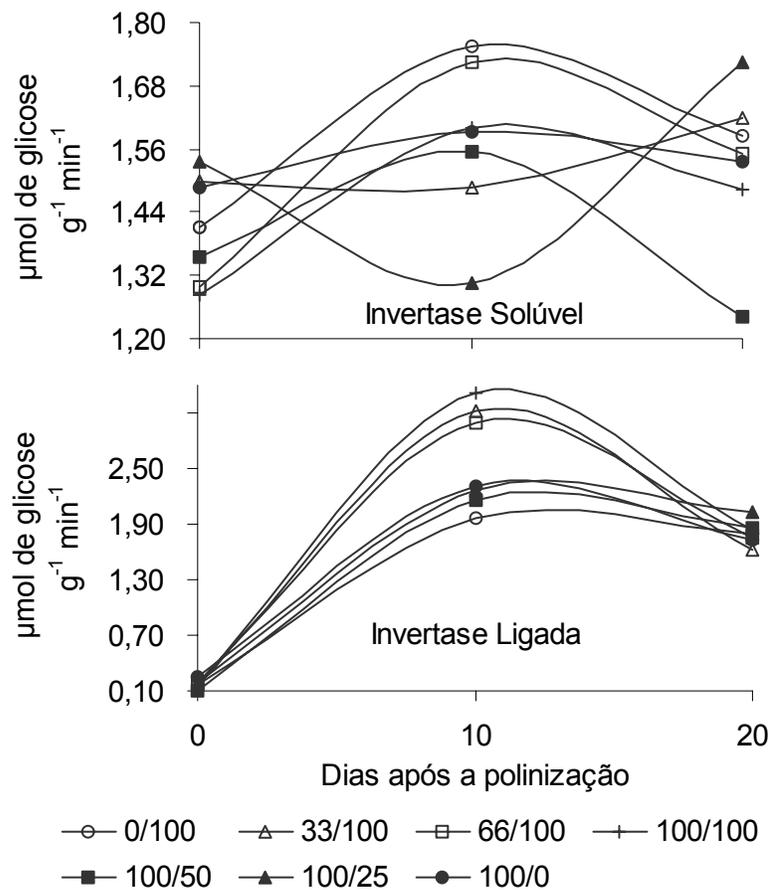


Figura 5. Atividade enzimática das invertases solúvel e ligada em colmos de plantas de milho submetidas a diferentes proporções de folhas e estigmas polinizados.

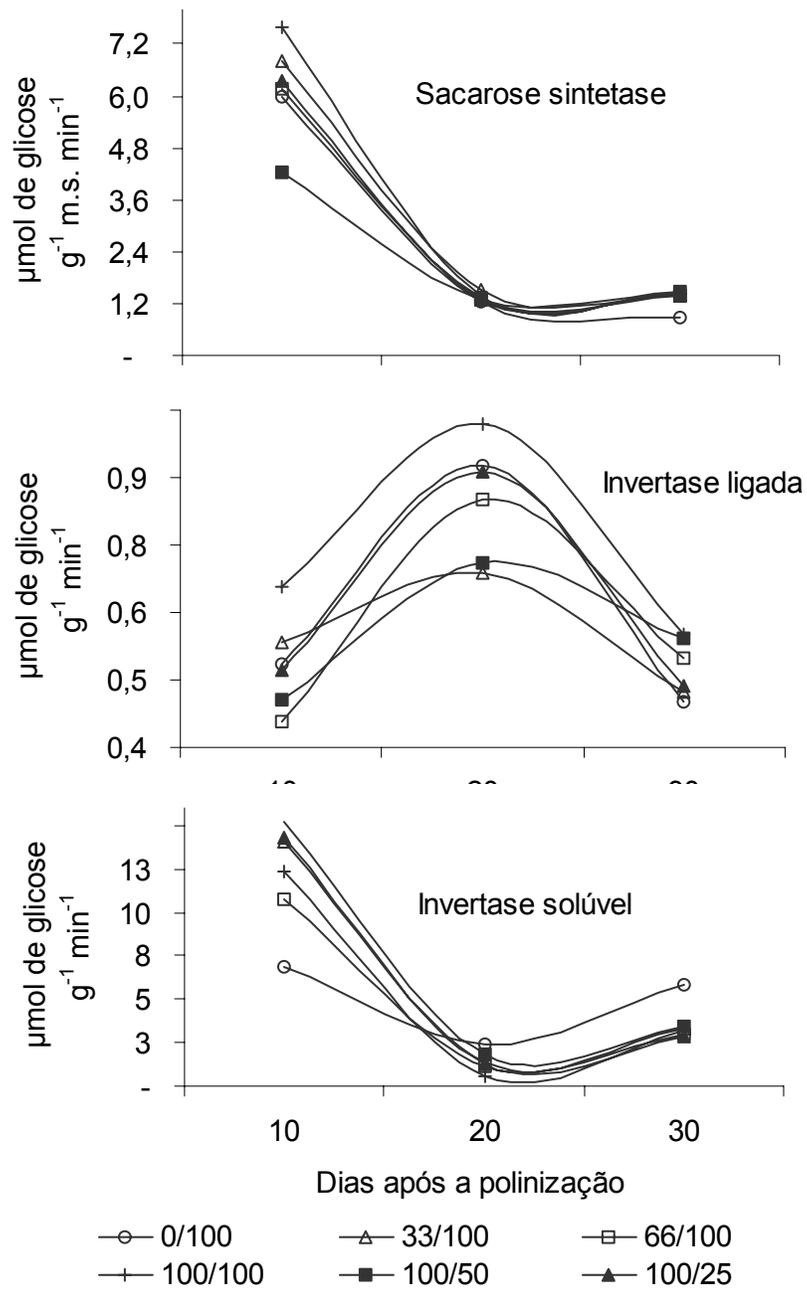


Figura 6. Atividade de sacarose sintetase, invertase solúvel e ligada nos endospermas de grãos de plantas de milho submetidas a diferentes proporções de folhas e estigmas polinizadas.

Os resultados das atividades enzimáticas estão de acordo com os encontrados por Sturm e Chrispeels (1990). Estes autores cultivaram uma suspensão de células de cenoura para verificar a regulação pelo substrato (sacarose) ou pelos produtos da clivagem (glicose e frutose), e observaram que a expressão e a atividade enzimática de invertase parecem não ser regulada pelo substrato ou produtos. Por outro lado, Cazetta et al. (1999) verificaram redução da atividade de invertase solúvel nos endospermas de grãos cultivados *in vitro* com excesso de sacarose e no presente trabalho mesmo havendo aumento na concentração de sacarose no endosperma (Figura 3) a atividade de invertase não foi influenciada.

CONCLUSÕES

- O desfolhamento e a polinização parcial não afetaram a concentração de açúcares redutores e sacarose nos endospermas, e açúcares redutores nos colmos;
- A concentração de amido nos endospermas não foi afetada pela redução do número de folhas;
- A desfolha proporcionou menor concentração de sacarose nos colmos;
- A redução do número de grãos provocou acúmulo de sacarose nos colmos;
- Plantas sem grãos tiveram acúmulo de amido nos colmos;
- A concentração de amido no caule não foi afetada pela desfolha;
- A redução do número de grãos acarretou acúmulo de açúcares redutores, sacarose e amido nas folhas;
- A desfolha não afetou a concentração de amido nas folhas.
- As atividades enzimáticas no endosperma dos grãos e nas folhas não foram afetadas pela alteração da proporção de folhas e grãos.
- A atividade de invertase nas folhas foi maior para a forma solúvel.

REFERÊNCIAS

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 247p.

BELOW, F.E.; CAZETTA, J.O.; SEBAUER, J.R. Carbon/nitrogen interactions during ear and kernel development of maize. *In*: WESTGATE, M.E.; BOOTE, K. (Ed.) **Physiology and Modeling Kernel Set in Maize**. Madison: Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, 2000. p.15-24. (Special Publication 29).

BOYLE, M.G., BOYER, J.S.; MORGAN, P.W. Stem infusion of maize plants. **Crop Sci.**, Madison, v.31, p.1241-1245, 1991a.

BOYLE, M.G., BOYER, J.S.; MORGAN, P.W. Stem infusion of liquid culture medium prevents reproductive failure of maize at low water potential. **Crop Sci.**, Madison, v.31, p.1246-1252, 1991b.

CARLSON, S.J.; CHOUREY, P.S. A re-evaluation of the relative roles of two invertases, INCW2 and IVR1, in developing maize kernels and other tissues. **Plant Physiol.**, Rockville, v.121, p.1025-1035, 1999.

CAZETTA, J.O. **Influência do nitrogênio, fósforo e potássio no metabolismo, no desenvolvimento e na produção de plantas de milho**. 121 folhas, 1997, Tese (Livre-Docência). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CAZETTA, J.O., SEEBAUER, J.R.; BELOW, F.E. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels. **Ann Bot.**, London, v.84, p.747-754, 1999.

CIRILO, A.G.; ANDRADE, F.H. Sowing date and maize productivity: I. Crop growth and dry matter partitioning. **Crop Sci.**, Madison, v.34, p.1039-1043, 1994.

COPELAND, L. Enzymes of sucrose metabolism. **Meth Plant Biochem.**, London, v.3, p.73-85, 1990.

DELROT, S.; BONNEMAIN, J-L. Mechanism and control of phloem transport. **Physiol Vég.**, Mountrouge, v.23, p.199-220, 1985.

DOEHLERT, D.C.; FELKER, F.C. Characterization and distribution of invertase activity in developing maize endosperm. **Physiol Plant.**, Copenhagen, v.70, p.51-57, 1987.

DOEHLERT, D.C.; KUO, T.M., FELKER, F.C. Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbreds of maize. **Plant Physiol.**, Rockville, v.86, p.1013-9, 1988.

DUNCAN, W.G. et al. The growth and yield of corn. II. Daily growth of corn kernels. **Agron J.**, Madison, v.57, p.221-223, 1965.

EDMEADES, G.O.; LAFITTE, H.R. Defoliation and plant density effects on maize selected for reduced plant height. **Agron J.**, Madison, v.85, p.850-857, 1993.

EGHAREVBA, P.N. et al. Dry matter accumulation in maize in response to defoliation. **Agron J.**, Madison, v.68, p.40-43, 1976.

FALEIROS, R.R.S., SEEBAUER, R.J., BELOW, F.E. Nutritionally induced changes in endosperm of shrunken-1 and brittle-2 maize kernels grown in vitro. **Crop Sci.**, Madison, v.36, p.947-954, 1996.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal:Funep, 1992. 273p.

HENDRIX, D.L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Sci.**, Madison, v.25, p.1306-1311, 1993.

KIM, J-Y. et al. Characterization of two members of the maize gene family, *Incw3* and *Incw4*, encoding cell-wall invertases. **Gene**, Amsterdam, v.245, p.89-102, 2000.

KINIRY, J. R. et al. Seed weight response to decreased seed number in maize. **Agron J.**, Madison, v.54, p.98-102, 1990.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem.**, Washington, v.31, p.426-428, 1959.

NEUHAUS, H.E. et al. Control of photosynthate partitioning in spinach leaves. Analysis of the interaction between feedforward and feedback regulation of sucrose synthesis. **Planta**, Heidelberg, v.181, p.583-592, 1990.

RAIJ, B. van. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1985. p.11.

SCHUSSLER, J.R.; WESTEGATE, M.E. Assimilate flux determines kernel set at low water potential in maize. **Crop Sci.**, Madison, v.35, p.1074-1080, 1995.

SHANKER, S. et al. Cloning and characterization of full-length cDNA encoding cell-wall invertase from maize. **Plant Physiol.**, Rockville, v.108, p.873-874, 1995.

SHANNON, J.C.; DOUGHERTY, C.T. Movement of ¹⁴C-labeled assimilates into kernels of *Zea mays* L. II. Invertase activity of the pedicel and placento-chalazal tissues. **Plant Physiol.**, Rockville, v.49, p.203-206, 1972.

SINGLETERY, G.W. et al. Response of enzymes and storage proteins of maize endosperm to nitrogen supply. **Plant Physiol.**, Rockville, v.94, p.858-864, 1990.

STURM, A. et al. Development- and organ-specific expression of the genes for sucrose synthase and three isoenzymes of acid β -fructofuranosidase in carrot. **Planta**, Heidelberg, v.195, p.601-610, 1995.

TSAI, C.Y.; SALAMINI, F.; NELSON, O. E. Enzymes of carbohydrate metabolism in developing endosperm of maize. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 6, p.299-306, 1970.

ZINSELMEIER, C. et al. Carbohydrate metabolism in setting and aborting maize ovaries. *In*: WESTGATE, M.E.; BOOTE, K. (Ed.) **Physiology and Modeling Kernel Set in Maize**. Madison: Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, 2000. p.1-13. (Special Publication 29).

CAPÍTULO 4 – Implicações

O milho é o principal cereal cultivado no Brasil e a segunda cultura em termos de produção, sendo inferior somente à cultura da soja. O produto é empregado em diferentes formas na alimentação humana e na indústria, mas em grande parte é transformado em carne e leite destinando-se à alimentação principalmente de aves, suínos e bovinos leiteiros, como fonte de energia e proteína. Sua importância é destacada também pela produção insuficiente de produtos substitutos, como o sorgo e a nível internacional o trigo e o arroz.

A despeito da importância da cultura, os efeitos dos fatores que limitam a produção de fotoassimilados sobre o metabolismo de carboidratos são ainda pouco conhecidos, principalmente no tocante a estudos desenvolvidos em âmbito nacional.

A produtividade brasileira enfrenta as barreiras climáticas e ambientais, destacando-se as deficiências hídricas e o comprimento do dia, que limitam a produção de fotoassimilados e, portanto, o potencial produtivo.

Dada esta condição, despertou-se o interesse pelo assunto e foi desenvolvido esse trabalho buscando verificar os efeitos da variação no suprimento de fotoassimilados sobre as principais características produtivas; a distribuição de matéria seca, as concentrações de metabólitos e atividades enzimáticas nas folhas, colmo e grãos. Para tanto, foi desenvolvido um experimento preliminar para averiguar a metodologia de implantação dos tratamentos, o qual forneceu prática e informações básicas para o experimento principal.

Observou-se que o híbrido triplo “Agromen 3050” não remobilizou carboidratos acumulados nas folhas e nos colmos para os grãos quando submetido à desfolha total, pois não houve crescimento da espiga e produção de grãos. Este tratamento foi incluído porque o híbrido simples “Agromen 3150” produziu uma certa quantidade de grãos no experimento preliminar. Daí destaca-se a hipótese da existência de variabilidade de resposta às condições que restringem o suprimento de fotoassimilados, como redução da radiação solar, deficiência hídrica, deficiências nutricionais, sombreamento e desfolha, entre diferentes materiais genéticos. Os mecanismos

fisiológicos desempenhados pelas plantas na remobilização de reservas também poderiam constituir objeto de estudo. Seria interessante também verificar a existência de materiais capazes de compensar a redução do número de grãos, via polinização controlada, através do aumento do peso médio dos grãos remanescentes.

Plantas com menos folhas apresentaram forte redução do número de grãos e conseqüentemente da produção, mas o peso médio dos grãos remanescentes foi pouco alterado. Isto comprova que o abortamento de grãos é o principal fator limitante da produção e que existe um limite para o crescimento individual do grão. Por outro lado, também a polinização parcial não alterou o peso médio dos grãos, mas seria interessante verificar se não há material genético com capacidade para compensar, pelo menos em parte, a redução do número de grão pelo aumento do peso médio.

Não foi observada alteração significativa da atividade enzimática nos grãos amostrados em função dos tratamentos. Por isso, descrições sobre a ordem de desenvolvimento de estigmas e grãos na espiga necessitam ser verificadas juntamente com a movimentação de fotoassimilados ao longo do sabugo e o nível de suprimento disponível aos grãos ao longo da espiga.

Outras informações como as respostas imediatas e as ocorrentes na fase de crescimento rápido sobre os conteúdos de sacarose e amido nas folhas fonte, no colmo e no dreno, especialmente no sabugo ou em grãos da ponta sujeitos ao abortamento em plantas submetidas à desfolha, também favoreceriam o entendimento do processo de abortamento. Nesse sentido foi observado ser necessária a presença de grãos para haver acúmulo de matéria seca no sabugo.

A análise de grãos já estabelecidos aos quais o suprimento de fotoassimilados foi restringido poderia informar quais são as possíveis chaves que controlam o abortamento.

Considerando-se a possibilidade de diferentes isoenzimas atuarem em condições de falta e excesso no fornecimento de fotoassimilados seria interessante a determinação eletroforética destas isoformas. Para isso, porém, é imprescindível checar se a desfolha afeta a espiga como um todo ou de forma crescente em direção à ponta,

e se os grãos nela localizados tiveram concentrações deficientes de fotoassimilados quando da expressão gênica.

Além dos metabólitos, notadamente a sacarose, é possível que outras substâncias atuem na comunicação entre fonte e dreno, havendo necessidade de se verificar o envolvimento de fitormônios no processo de abortamento.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Concentrações de metabólitos nas folhas.

Resultados das análises estatísticas das concentrações de metabólitos nas folhas de plantas de milho submetidas à desfolhamento e redução do número de estigmas polinizados, expressas em mM por g de matéria seca de tecido.

Aval.	Proporções de folhas e grãos					
	33/100	66/100	100/100	100/50	100/25	100/0
Açúcares redutores						
2 dap	0,079 Aa	0,089 ABa	0,079 Aa	0,087 Ba	0,084 Ba	0,088 Ba
10 dap	0,065 Aa	0,073 ABa	0,071 Aa	0,079 Ba	0,084 Ba	0,066 Ba
20 dap	0,063 Aab	0,061 Bab	0,063 Aab	0,047 Cb	0,074 Bab	0,082 Ba
30 dap	0,091 Acd	0,092 Acd	0,084 Ad	0,117 Ac	0,166 Ab	0,218 Aa
Sacarose						
2 dap	0,093 Ba	0,094 Ca	0,099 BCa	0,094 Ba	0,100 Ca	0,089 Ca
10 dap	0,065 Ba	0,076 Ca	0,072 Ca	0,070 Ba	0,085 Ca	0,076 Ca
20 dap	0,140 Aa	0,156 Aa	0,149 Aa	0,150 Aa	0,153 Ba	0,164 Ba
30 dap	0,122 Ad	0,124 Bd	0,127 ABd	0,164 Ac	0,225 Ab	0,280 Aa
Amido						
2 dap	0,242 Ba	0,252 Ba	0,244 Ba	0,249 Ca	0,256 Ba	0,254 Ca
10 dap	0,305 Ba	0,287 Ba	0,297 Ba	0,296 Ca	0,323 Ba	0,312 Ca
20 dap	0,533 Ab	0,538 Ab	0,572 Aab	0,582 Aab	0,626 Aa	0,648 Ba
30 dap	0,317 Bd	0,323 Bd	0,311 Bd	0,494 Bc	0,619 Ab	0,795 Aa

Letras diferentes maiúsculas na linha e minúsculas na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1%.

Açúcares redutores: C.V.% = 15,73 (tratamentos) e 17,98 (épocas).

Sacarose: C.V.% = 13,82 (tratamentos) e 12,32 (épocas).

Amido: C.V.% = 8,63 (tratamentos) e 10,55 (épocas).

APÊNDICE B. Concentrações de metabólitos nos colmos.

Resultados das análises estatísticas das concentrações de metabólitos nos colmos de plantas de milho submetidas à desfolhamento e redução do número de estigmas polinizados, expressas em mM por g de matéria seca de tecido.

Aval.	Proporções de folhas e grãos						
	0/100	33/100	66/100	100/100	100/50	100/25	100/0
Açúcares redutores							
0 dap	1,343	1,158	1,196	1,307	1,122	1,151	1,35
10 dap	0,629	0,743	0,731	0,753	0,713	0,65	0,692
20 dap	0,425	0,627	0,654	0,584	0,458	0,384	0,383
30 dap	0,31	0,316	0,311	0,368	0,274	0,188	0,179
Sacarose							
0 dap	0,332 Ba	0,334 Ca	0,361 Ca	0,326 Da	0,362 Ca	0,328 Ca	0,328 Ca
10 dap	0,395 Bc	0,482 Bbc	0,535 Bab	0,644 Ba	0,604 Ba	0,648 Ba	0,592 Bab
20 dap	0,367 Bd	0,429 BCcd	0,505 Bbc	0,518 Cabc	0,528 Babc	0,605 Bab	0,649 Ba
30 dap	0,625 A	0,618 A	0,666 A	0,875 Ab	0,979 Aab	1,019 Aa	1,064 Aa
Amido							
0 dap	0,430 Aa	0,505 Aa	0,525 Aa	0,475 Aa	0,556 Aa	0,519 Aa	0,456 Aba
10 dap	0,383 Aa	0,392 Aa	0,381 Ba	0,379 Aa	0,370 Ba	0,364 Ba	0,403 Ba
20 dap	0,389 Aa	0,407 Aa	0,379 Ba	0,374 Aa	0,408 Ba	0,441 Aa	0,462 Aba
30 dap	0,369 Ab	0,392 Ab	0,361 Bb	0,337 Ab	0,355 Bb	0,483 Abab	0,555 Aa

Letras diferentes maiúsculas na linha e minúsculas na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1%.

Sacarose: C.V.% = 11,36 (tratamentos) e 11,26 (épocas).

Amido: C.V.% = 15,72 (tratamentos) e 14,95 (épocas).

APÊNDICE C. Concentrações de metabólitos nos endospermas.

Resultados das análises estatísticas das concentrações de metabólitos nos endospermas de grãos de plantas de milho submetidas à desfolhamento e redução do número de estigmas polinizados, expressas em mM por g de matéria seca de tecido.

Avaliação	Proporções de folhas e grãos					
	0/100	33/100	66/100	100/100	100/50	100/25
Açúcares redutores						
10 dap	1,484 Aa	1,335 Aab	1,314 Aab	1,270 Ab	1,231 Ab	1,203 Ab
20 dap	0,388 Ba	0,098 Bb	0,089 Bb	0,091 Bb	0,091 Bb	0,092 Bb
30 dap	0,051 Ca	0,035 Ba	0,030 Ba	0,030 Ba	0,033 Ba	0,031 Ba
Sacarose						
10 dap	0,202 Ab	0,595 Aa	0,564 Aa	0,518 Aa	0,563 Aa	0,548 Aa
20 dap	0,063 Bb	0,171 Ba	0,167 Ba	0,164 Ba	0,176 Ba	0,157 Ba
30 dap	0,030 Ba	0,083 Ca	0,092 Ba	0,108 Ba	0,094 Ca	0,114 Ba
Amido						
10 dap	0,039 Ba	0,040 Ca	0,040 Ca	0,036 Ca	0,046 Ca	0,043 Ca
20 dap	0,361 Ac	4,378 Ba	4,573 Ba	4,540 Ba	4,050 Bb	4,117 Bb
30 dap	0,418 Ad	5,283 Aab	5,300 Aa	5,197 Aab	5,053 Abc	4,847 Ac

Letras diferentes maiúsculas na linha e minúsculas na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1%.

Açúcares redutores: C.V.% = 20,02 (tratamentos) e 16,93 (épocas).

Sacarose: C.V.% = 17,16 (tratamentos) e 18,79 (épocas).

Amido: C.V.% = 3,93 (tratamentos) e 4,37 (épocas).

APÊNDICE D. Atividade enzimática nas folhas.

Resultados das análises estatísticas das atividades enzimáticas de invertase solúvel e ligada nas folhas, expressa em μmol de glicose formada por minuto por g de matéria seca de tecido.

Avaliação	Proporções de folhas e grãos					
	33/100	66/100	100/100	100/50	100/25	100/0
Invertase solúvel						
2 dap	1,528	1,484	1,419	1,415	1,362	1,404
10 dap	2,430	2,070	2,410	2,256	2,577	2,346
20 dap	2,353	1,999	2,249	2,252	2,068	1,946
Invertase ligada						
2 dap	0,547 B	0,586 B	0,686 B	0,484 B	0,538 B	0,444 B
10 dap	0,900 A	0,712 A	0,975 A	0,727 A	0,889 A	0,842 A
20 dap	0,480 B	0,497 B	0,600 B	0,594 B	0,511 B	0,560 B

Letras diferentes maiúsculas na linha e minúsculas na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1%.

Invertase solúvel: C.V.% = 10,82 (tratamentos) e 14,01 (épocas).

Invertase ligada: C.V.% = 24,65 (tratamentos) e 28,04 (épocas).

APÊNDICE E. Atividades enzimáticas nos colmos.

Resultados das análises estatísticas das atividades enzimáticas de invertase solúvel e ligada nos colmos, expressa em μmol de glicose formada por minuto por g de matéria seca de tecido.

Avaliação	Proporções de folhas e grãos						
	0/100	33/100	66/100	100/100	100/50	100/25	100/0
Invertase solúvel							
2 dap	1,413	1,497	1,299	1,283	1,355	1,537	1,486
10 dap	1,753	1,486	1,723	1,600	1,555	1,305	1,593
20 dap	1,587	1,619	1,550	1,482	1,243	1,724	1,537
Invertase ligada							
2 dap	0,168 B	0,156 B	0,191 B	0,164 B	0,110 B	0,186 B	0,241 B
10 dap	1,971 A	3,116 A	3,003 A	3,313 A	2,158 A	2,267 A	2,314 A
20 dap	1,793 A	1,619 A	1,747 A	1,830 A	1,855 A	2,027 A	1,738 A

Letras diferentes maiúsculas na linha e minúsculas na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1%.

Invertase solúvel: C.V.% = 11,23 (tratamentos) e 16,54 (épocas).

Invertase ligada: C.V.% = 28,62 (tratamentos) e 30,12 (épocas).

APÊNDICE F. Atividades enzimáticas nos endospermas.

Resultados das análises estatísticas das atividades enzimáticas de invertase solúvel e ligada nos endospermas, expressa em μmol de glicose formada por minuto por g de matéria seca de tecido.

Avaliação	Proporções de folhas e grãos					
	0/100	33/100	66/100	100/100	100/50	100/25
Invertase solúvel						
10 dap	6,801 Ac	14,005 Aa	10,705 Ab	12,335 Aab	15,167 Aa	14,274 Aa
20 dap	2,375 Ba	1,340 Ba	1,164 Ba	0,610 Ba	1,872 Ba	1,203 Ba
30 dap	5,821 Aa	3,369 Ba	2,997 Ba	3,251 Ba	3,486 Ba	2,859 Ba
Invertase ligada						
10 dap	0,547 B	0,586 B	0,444 B	0,686 B	0,484 B	0,538 B
20 dap	0,900 A	0,712 A	0,842 A	0,975 A	0,727 A	0,889 A
30 dap	0,480 B	0,497 B	0,560 B	0,600 B	0,594 B	0,511 B
Sacarose sintetase						
10 dap	5,983 A	6,818 A	6,179 A	7,575 A	4,222 A	6,327 A
20 dap	1,230 B	1,511 B	1,336 B	1,382 B	1,294 B	1,283 B
30 dap	0,891 B	1,385 B	1,399 B	1,411 B	1,492 B	1,438 B

Letras diferentes maiúsculas na linha e minúsculas na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1%.

Invertase solúvel: C.V.% = 22,08 (tratamentos) e 29,34 (épocas).

Invertase ligada: C.V.% = 22,15 (tratamentos) e 42,27 (épocas).

Sacarose sintetase: C.V.% = 35,29 (tratamentos) e 36,46 (épocas).