

CLAUDIA TEIXEIRA GUIMARÃES



Caracterizacao de populacoes
1994 TS - T.01/94

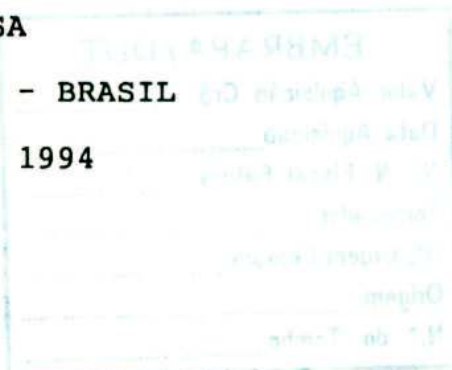


3141 - 1

**CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES INDÍGENAS DE MILHO
(Zea mays L.) QUE APRESENTAM GRÃOS OPACOS**

Tese Apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como Parte das Exigências do
Curso de Genética e
Melhoramento, para Obtenção do
Título de "Magister Scientiae".

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
JULHO - 1994



Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

G963c
1994
Guimarães, Claudia Teixeira, 1968-
Caracterização de populações indígenas de milho
(*Zea mays* L.) que apresentam grãos opacos/Claudia
Teixeira Guimarães. - Viçosa : UFV, 1994.
69p. : il.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
de Viçosa.

1. Milho - Genética molecular. 2. Milho indíge-
na - Caracterização. 3. Milho - Proteína de re-
serva. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Títu-
lo.

CDD. 18.ed. 633.153
CDD. 19.ed. 633.153

EMBRAPA/DDT

Valor Aquisição Cr\$

Data Aquisição 09/03/94

N.º N. Fiscal Fatura

Fornecedor

N.º Ordem Compra

Origem doação

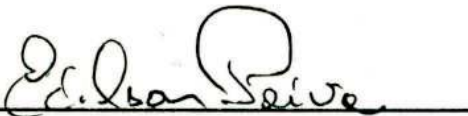
N.º do Tombo 01/94

CLAUDIA TEIXEIRA GUIMARÃES

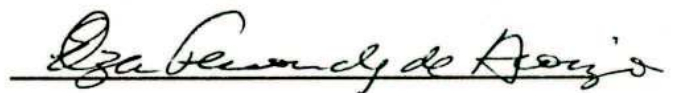
CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES INDÍGENAS DE MILHO
(Zea mays L.) QUE APRESENTAM GRÃOS OPACOS

Tese Apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como Parte das Exigências do
Curso de Genética e
Melhoramento, para Obtenção do
Título de "Magister Scientiae".

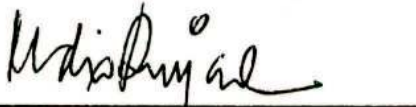
Aprovada: 26 de outubro de 1993



Dr. Edilson Paiva
Conselheiro



Profa. Elza Fernandes Araújo
Conselheira



Prof. Maurílio Alves Moreira



Dr. Maurício Antônio Lopes



Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
Orientador

Aos meus Pais,
Paulo e Evangelina;
Aos meus irmãos,
Sérgio e Adriana;
À Ysatis.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - EMBRAPA, cujo apoio possibilitou a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária - BIOAGRO.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa de estudos.

Ao professor e orientador Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação, amizade e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Edilson Paiva, pela confiança e orientação.

Ao Miguel Reis e à Edna Pacheco, pela dedicação no laboratório, amizade e pelo incentivo.

À Maria José V. Vasconcelos, Maurício A. Lopes, Sidney N. Parentoni, Fernando H. Valicenti, Evandro e Bárbara Mantovani, Antônio Carlos de Oliveira, Manoel T. Souza, Paulo César Magalhães, Frederico O. Durães, Paulo E. Guimarães, José D. Fabris, Didio Gazzinelli e a todos os pesquisadores do CNPMS-EMBRAPA, pelo apoio e pela amizade.

Aos professores Vicente Wagner D. Casali, Elza F. Araújo, Carlos Floriano de Moraes, Maurílio A. Moreira e Eveline Mantovani, pelas sugestões e pelo incentivo.

A todos os funcionários do CNPMS-EMBRAPA, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Aos professores e estudantes do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, CBMEG-UNICAMP, pela utilização do densitômetro à laser.

Ao Marco Antônio, Gonçalo, Roberta, Adriana, Brandão, Claudio, Jurandir, Yumi, Fernanda, Flávia, Marlúcia, Valéria, César e a todos os amigos da UFV e do CNPMS, pelo convívio e apoio na horas mais difíceis.

À minha família, pelo incentivo e pela compreensão.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

E a Deus, por tudo.

BIOGRAFIA

CLAUDIA TEIXEIRA GUIMARÃES, filha de Paulo Martins Guimarães e Evangelina Teixeira da Costa Guimarães, nasceu em Sete Lagoas, Minas Gerais, em 26 de junho de 1968.

Em março de 1986, ingressou na Universidade Federal de Viçosa onde diplomou-se Engenheira Agrônoma, em janeiro de 1991.

Iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento em março de 1991, na Universidade Federal de Viçosa. Cumpriu as exigências para a obtenção do título de "Magister Scientiae" e defendeu tese no dia 26 de outubro de 1993.

CONTEÚDO

	Página
EXTRATO	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. As Proteínas do Endosperma do Milho	4
2.2. As Zeínas	6
2.3. Síntese e Deposição das Zeínas em Corpos Protéicos	9
2.4. Organização Genética das Zeínas	12
2.5. Mutações que Alteram a Estrutura do Endosperma	
2.5.1. Mutantes na Síntese de Zeínas	14
2.5.2. Mutantes na Formação do Amido	16
2.6. Proteína b-32	17
2.7. Dureza dos Grãos	18
2.8. Os Genótipos <u>opaco-2</u> Modificados	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Material Genético	23
3.2. Preparo do Endosperma	24

	Página
3.3. Determinação da Densidade dos Grãos	24
3.4. Determinação da Qualidade Protéica do Endosperma	25
3.5. Determinação dos Teores de Açúcares Solúveis ..	26
3.6. Extração e Fracionamento das Proteínas do Endosperma	27
3.7. Quantificação das Frações Protéicas	28
3.8. Análise por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida das Frações Protéicas	28
3.9. Delineamento Estatístico	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5. RESUMO E CONCLUSÕES	52
BIBLIOGRAFIA	54
APÊNDICE	64

EXTRATO

GUIMARÃES, Claudia Teixeira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 1993. **Caracterização de Populações Indígenas de Milho (Zea mays L.) que Apresentam Grãos Opacos**. Orientador: Prof. Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Dr. Edilson Paiva e Prof^a. Elza Fernandes Araújo.

A dureza dos grãos de milho é um importante parâmetro correlacionado diretamente com várias características agronômicas desejáveis e, normalmente, de maneira inversa à qualidade protéica. Vários mutantes com a estrutura do endosperma alterada têm sido caracterizados em milho, o que, além de ajudar a desvendar os mecanismos envolvidos na determinação da estrutura do endosperma, torna a síntese das zeínas um modelo interessante para o estudo da expressão gênica em organismos superiores.

Neste trabalho foram caracterizadas onze populações indígenas de milho, pela análise da densidade dos grãos, qualidade protéica, porcentagem de zeínas e não-zeínas, pelas frações componentes das zeínas e não-zeínas e pelo

teor de açúcares solúveis no endosperma. Dos resultados obtidos, concluiu-se que essas populações indígenas não estão incluídas em nenhuma classe de mutantes até então descritos, podendo ser classificadas como novos mutantes para a textura do endosperma, apresentando, portanto, grande potencial para estudos futuros acerca dos mecanismos que afetam a estrutura do endosperma em milho.

1. INTRODUÇÃO

O milho é uma das culturas mais importantes do mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, onde as fontes alimentares são deficientes em quantidade e qualidade. É consumido basicamente como fonte energética, apesar de possuir teores protéicos relativamente altos, em torno de 10% da matéria seca. Entre 1985 e 1987, o milho forneceu aproximadamente 43 milhões de toneladas de proteína, comparáveis a 38 milhões fornecidas pela soja, cujo conteúdo de proteína é de 38% da matéria seca (BJARNASON e VASAL, 1992). A proteína do milho, no entanto, é nutricionalmente inadequada a seres humanos e animais monogástricos, devido à sua deficiência em alguns aminoácidos essenciais (NELSON, 1969). Existe, portanto, grande interesse em que o milho, além de fonte energética, se torne fonte protéica de alta qualidade.

A caracterização do mutante opaco-2 por MERTZ et alii (1964) despertou grande interesse por parte dos

melhoristas de milho, em virtude do seu alto conteúdo de lisina e triptofano. Infelizmente, esse alto valor nutricional está associado a uma série de características agronômicas indesejáveis (ORTEGA e BATES, 1983), impedindo sua ampla utilização comercial.

Através de um longo processo de retrocruzamento e seleção recorrente, melhoristas do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) combinaram os genes opaco-2 com modificadores genéticos, que suprimiram o fenótipo opaco dos grãos, mantendo a alta qualidade nutricional das proteínas (VASAL et alii, 1980). Esses genótipos opaco-2 modificados foram denominados QPM ("Quality Protein Maize").

O teor de zeínas afeta diretamente a produtividade do milho, sendo, portanto, desejável manter altos níveis dessas proteínas no endosperma. Por outro lado, por serem deficientes em lisina e triptofano, altos teores de zeínas reduzem a qualidade nutricional do grão (TSAI, 1983).

Um meio de contornar tal problema seria a utilização de técnicas de DNA recombinante, para alterar os genes que codificam as zeínas com os códons daqueles aminoácidos essenciais. Para o eventual sucesso dessa metodologia, é necessário um conhecimento mais completo da estrutura e regulação dos genes que codificam as zeínas (PEDERSEN et alii, 1982). Além desse lado aplicado, a síntese das zeínas oferece um sistema atraente para o estudo da regulação gênica em organismos superiores (TSAI, 1983).

O objetivo principal do presente trabalho foi a caracterização, em nível molecular, de populações indígenas

que apresentam fenótipo opaco e baixa qualidade protéica. Esses genótipos possuem um grande potencial para serem utilizados como fonte adicional de variabilidade no estudo do complexo sistema genético que determina as alterações na estrutura e na qualidade protéica do endosperma de milho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As Proteínas do Endosperma do Milho

O grão de milho é uma cariopse que consiste de embrião, endosperma, pericarpo e pedicelo (WOLF et alii, 1952). O endosperma é um tecido triplóide especializado no acúmulo de amido e proteínas, como fontes de reserva utilizadas durante a germinação do embrião, participando com 80 a 85% da matéria seca do grão maduro e com aproximadamente 70% das proteínas totais do grão (TSAI, 1983).

As proteínas do grão de milho podem ser separadas seqüencialmente, de acordo com a sua solubilidade, em quatro frações: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas (OSBORNE e MENDEL, 1914). As albuminas são solúveis em água e as globulinas são extraídas em soluções salinas diluídas. Várias dessas albuminas e globulinas são enzimas e são sintetizadas no início do desenvolvimento

do grão (MISRA et alii, 1975; TSAI, 1979), contribuindo com 6% das proteínas totais. As proteínas extraídas subsequentemente, com soluções alcoólicas, são as prolaminas e perfazem aproximadamente 60% das proteínas totais do endosperma em genótipos normais (WILSON, 1985). Essa fração protéica não possui atividade enzimática, sendo apenas fonte de aminoácidos, nitrogênio e esqueletos carbônicos para o desenvolvimento da plântula. A solubilidade das prolaminas é consequência de sua composição aminoacídica, rica em aminoácidos apolares e polares não-carregados como glutamina, leucina, alanina e prolina (ESEN et alii, 1983). As demais proteínas que permanecem insolúveis após a extração das albuminas, globulinas e prolaminas são as glutelinas. Essas podem ser extraídas com soluções ácidas ou alcalinas diluídas, sendo uma fração heterogênea e difícil de ser definida (WOLF et alii, 1969), contribuindo com 30 a 40% das proteínas totais do grão (MURPHY e DALBY, 1971).

Alternativamente, as proteínas presentes no endosperma do milho podem ser divididas em duas frações distintas: as zeínas, proteínas do grupo das prolaminas, caracterizadas pelo seu teor reduzido de lisina e triptofano (DOLL, 1984), e as não-zeínas, que englobam as albuminas, globulinas e glutelinas, possuem atividade enzimática e são, nutricionalmente, mais balanceadas que as zeínas (WALLACE et alii, 1990).

2.2. As Zeínas

O principal grupo de proteínas do endosperma de cereais é o das prolaminas, termo originalmente utilizado por Osborne, em 1908 (ESEN, 1987), devido ao seu alto conteúdo de prolina e glutamina. As prolaminas são mais freqüentemente citadas como um nome comum derivado do gênero do cereal correspondente (TSAI, 1983), que, no caso do milho, são as zeínas.

A extração e a purificação das zeínas têm sido alvo de vários estudos, desde a sua descoberta por Gorham, em 1822 (ESEN, 1986). A extração quantitativa das zeínas é afetada pelo conteúdo de lipídios no endosperma, temperatura, tipo de solvente utilizado e interações entre proteínas (TSAI, 1983). Vários procedimentos de extração têm sido publicados, todos baseados na solubilização das zeínas em solventes orgânicos. Tais procedimentos sofrem duas limitações: a extração dos vários tipos de zeínas em um único solvente é incompleta, sendo recuperadas várias frações e, dependendo da presença ou ausência de agentes redutores, várias proteínas podem ou não vir a ser extraídas pelo mesmo solvente (LOPES, 1989; 1993). Isto torna difícil a comparação dos padrões protéicos obtidos pelos diferentes métodos de fracionamento, o que resulta num confuso sistema de nomenclatura para as zeínas (WALLACE et alii, 1990; PAIVA et alii, 1991; WILSON, 1991).

Com base no padrão eletroforético das zeínas em géis de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), elas podem ser divididas em quatro grupos

estruturalmente distintos: alfa-zeínas de 19 e 22 kD, gama-zeínas de 16 e 27 kD, beta-zeína de 14 kD, e delta-zeína de 10 kD (ESEN, 1986; LARKINS et alii, 1989). Análises eletroforéticas dessa fração protéica já são utilizadas em rotina na seleção em programas de melhoramento de milho visando a obtenção de variedades de alto valor nutritivo (PAIVA et alii, 1992).

Cada uma das bandas protéicas, obtidas por SDS-PAGE, pode ser separada por focalização isoelétrica (IEF), gerando vários componentes diferentemente carregados (SOAVE et alii, 1975; RIGHETTI et alii, 1977; HASTINGS, 1984; WILSON, 1985). Em muitos casos, não se sabe se cada um dos componentes da IEF representa o produto de um gene estrutural. Desde que as zeínas consistem de um grupo de proteínas hidrofóbicas com alto conteúdo de glutamina, fatores como agregação, pontes dissulfídicas, desamidação e modificações pós-traducionais podem contribuir para essa heterogeneidade de cargas (TSAI, 1983).

As alfa-zeínas, constituídas por grupos de polipeptídeos de 19 e 22 kD, são as mais abundantes em genótipos normais, representando 70 a 80% da zeína total (ESEN, 1986). Uma característica que distingue as alfa-zeínas é a presença, na região central da proteína, de uma seqüência de 20 aminoácidos repetida, 8 a 10 vezes, e separada por um ou mais resíduos de glutamina (GERAGHTY et alii, 1981; PEDERSEN et alii, 1982). Essas repetições estão organizadas em alfa-hélice, fazendo com que a proteína se dobre numa estrutura em forma de bastão. Pontes de hidrogênio entre aminoácidos polares na superfície e

resíduos de glutamina na extremidade das repetições, assim como interações apolares, devem contribuir para o empacotamento dessas proteínas dentro dos corpos protéicos (ARGOS et alii, 1982).

A gama-zeína de 27 kD é a segunda mais abundante entre as zeínas, representando aproximadamente 20% da zeína total (ESEN, 1986). É uma proteína com níveis elevados de aminoácidos sulfurados (WILSON e LARKINS, 1984), cuja estrutura primária é caracterizada por cinco regiões distintas, distribuídas entre os seus 180 aminoácidos. Essas regiões correspondem a um segmento amino terminal, com elevada proporção de aminoácidos hidrofóbicos, uma região com o hexapeptídio "Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu", repetido oito vezes, uma seqüência alternante Pro-X, entre os resíduos 70 e 91, uma região rica em cisteína, entre os resíduos 92 e 148, e um segmento na extremidade carboxílica, altamente concentrado em glutamina (PRAT et alii, 1985).

Recentemente, um polipeptídio de 12 kD, com uma composição aminoacídica semelhante à da gama-zeína de 27 kD, foi detectado, tendo sido informalmente incluído nessa fração (LARKINS et alii, 1991). Já o polipeptídio de 58 kD, que reage com anticorpos policlonais específicos para a gama-zeína de 27 kD, parece ser um dímero dessa proteína (LOPES e LARKINS, 1991a). A gama-zeína, apesar de ser estruturalmente distinta das demais zeínas, possui duas regiões de homologia com a beta-zeína de 14 kD. Essa região corresponde ao quarto domínio, com alta concentração de cisteína da gama-zeína de 27 kD, e contribui para a

reação cruzada entre a beta-zeína e o anti-soro contra a gama-zeína (PRAT et alii, 1985).

As zeínas do tipo beta e delta de, 14 e 10 kD, respectivamente, representam em torno de 10% das proteínas presentes nos corpos protéicos e são ricas em metionina (WILSON, 1985). A beta-zeína é composta por 180 aminoácidos, incluindo os 20 resíduos do peptídio sinal. Análise dessa proteína, através de dicróismo circular, revelou uma estrutura secundária predominantemente do tipo beta (PEDERSEN et alii, 1986). Os resíduos de cisteína e metionina, na beta-zeína, contribuem com 15,6% dos aminoácidos totais, composição aminoacídica esta que se assemelha à da delta-zeína de 10 kD (GIANAZZA et alii, 1976). Essa proteína possui 192 aminoácidos, dos quais 22% são resíduos de metionina, sendo incluídos os 21 aminoácidos do peptídio sinal (KIRIHARA et alii, 1988).

2.3. Síntese e Deposição das Zeínas em Corpos Protéicos

As zeínas são coordenadamente sintetizadas no endosperma, entre 12 e 50 dias após a polinização, com a taxa máxima ocorrendo entre 15 e 25 dias, em genótipos normais (SOAVE et alii, 1975), apresentando, portanto, uma expressão tecido-específica e controlada ao longo do estágio de desenvolvimento do tecido.

As moléculas de mRNA que codificam as zeínas são traduzidas por polirribosomas ligados à membrana do retículo endoplasmático granular (REG). Na medida em que

são sintetizadas, as moléculas de zeína são transportadas simultaneamente para o lúmen do REG, onde se agrupam de maneira organizada, em estruturas conhecidas como corpos protéicos (LENDING e LARKINS, 1989). O transporte das zeínas para o interior do REG é direcionado por seqüências de 20 a 21 aminoácidos, localizadas na extremidade amino da proteína, denominadas peptídios sinais, que são clivados por peptidases durante o transporte (GERAGHTY et alii, 1981; MARKS e LARKINS, 1982).

As diferentes classes de zeínas são depositadas em regiões específicas dos corpos protéicos maduros. A formação desses depósitos inicia-se com a deposição de beta e gama-zeína. Posteriormente, moléculas de alfa-zeína se acumulam e se agregam no interior dos depósitos, formando a região central (LENDING e LARKINS, 1989), ficando a beta e a gama-zeína distribuídas na periferia dos corpos protéicos (LENDING et alii, 1988). Recentemente, a delta-zeína tem sido encontrada na região central dos corpos protéicos, junto com a alfa-zeína (ESEN e STETLER, 1992).

A elevada síntese de alfa-zeína em genótipos normais causa um aumento no diâmetro dos corpos protéicos, que atingem de 1 a 2 micrômetros (LENDING e LARKINS, 1989). Já o diâmetro desses depósitos no endosperma QPM e opaco-2 é bastante reduzido, tendo em vista o seu menor conteúdo de alfa-zeínas. O pequeno tamanho dos corpos protéicos no endosperma opaco-2 parece resultar em bolsas de ar em torno dos grãos de amido, causando a opacidade do endosperma (ROBUTTI et alii, 1974). O endosperma do milho QPM possui uma alta concentração da fração gama-zeína,

apresentando uma maior quantidade de corpos protéicos, que se distribuem ao longo de todo o endosperma, ao contrário do milho normal e opaco-2, onde os corpos protéicos são menos numerosos e estão mais concentrados no citoplasma das primeiras quatro ou cinco camadas de células abaixo da camada de aleurona. Talvez o denso empacotamento dos corpos protéicos em torno dos grãos de amido nos milhos QPM torne o endosperma mais vítreo (GEETHA et alii, 1991).

A associação das zeínas nos corpos protéicos resulta primariamente de interações entre as próprias proteínas. A agregação das alfa-zeínas pode ocorrer na ausência de beta e gama-zeínas; entretanto, os corpos protéicos formados são menos densos que aqueles que apresentam uma mistura normal das zeínas (LARKINS et alii, 1991).

A habilidade da gama-zeína em formar oligômeros e a necessidade de condições extremas de redução e desnaturação para a sua extração quantitativa indicam a existência de uma grande quantidade de ligações cruzadas "in vivo", promovidas por pontes dissulfídicas entre resíduos de cisteína (LOPES e LARKINS, 1991b). Estas evidências, associadas à sua localização periférica nos corpos protéicos e às diferenças no diâmetro e na distribuição dos corpos protéicos no endosperma, indicam que a gama-zeína deve exercer um importante papel na estrutura do endosperma (LOPES e LARKINS, 1991b). WANG e ESEN (1986) sugeriram a participação da gama-zeína como esqueleto ou revestimento da superfície interna da membrana dos corpos protéicos, onde formaria uma rede unida por ligações dissulfídicas entre moléculas de gama-zeína e

entre estas e outras proteínas ricas em cisteína, facilitando o empacotamento molecular dentro dos corpos protéicos.

2.4 - Organização Genética das Zeínas

Os genes que codificam as zeínas possuem seqüências regulatórias transcricionais e de poliadenilação típicas dos genes eucariotos; entretanto, não possuem íntrons (BURR et alii, 1978; LARKINS et alii, 1979; PEDERSEN et alii, 1982). Uma característica não usual é a presença de múltiplos promotores e sítios de iniciação da transcrição, como é o caso de um gene que codifica a alfa-zeína de 22 kD (LANGRIDGE et alii, 1982), que possui dois promotores envolvidos na sua transcrição (LANGRIDGE e FEIX, 1983). As seqüências codificadoras das zeínas são organizadas em domínios estruturais, que possibilitam às proteínas sintetizadas assumir estruturas secundárias adequadas para seu empacotamento compacto nos corpos protéicos (ARGOS et alii, 1982).

As alfa-zeínas são codificadas por uma grande família multigênica (PARK et alii, 1980; HAGEN e RUBENSTEIN, 1981; MARKS et alii, 1985), cujos membros estão localizados em três posições diferentes no genoma: no braço longo dos cromosomas 4 e 10 e no braço curto do cromosoma 7 (SOAVE et alii, 1978; VALENTINI et alii, 1979; SOAVE e SALAMINI, 1984). São estimadas entre 75 e 150 cópias dos genes das zeínas por genoma de milho (HAGEN e RUBENSTEIN,

1981; MARKS et alii, 1985). Não existe comprovação se todas essas sequências genômicas são funcionais; no entanto, vários clones genômicos isolados possuem códons de iniciação alterados ou códons de terminação prematura, podendo ser pseudogenes (SPENA et alii, 1983; MARKS et alii, 1985).

A complexidade entre os polipeptídios da alfa-zeína, detectada por IEF, tem sido também demonstrada entre os genes que codificam essas proteínas. Através da hibridização com clones genômicos e cDNA, esses genes podem ser agrupados em subfamílias, de acordo com sua homologia (WILSON e LARKINS, 1984). A designação de subfamílias enfatiza uma possível importância da organização destas no controle da síntese das zeínas (RUBENSTEIN e GERAGHTY, 1985). Estes dados sugerem uma base genética para a grande heterogeneidade das zeínas. Uma vez que as zeínas não possuem atividade catalítica, a pressão seletiva sobre elas deve ser menor do que a sofrida por enzimas, indicando que esses genes originaram-se de um único gene ancestral, por meio de duplicações e subsequente mutação (TSAI, 1983). No entanto, a complexidade da população de mRNA é menor que aquela sugerida pela análise das proteínas e do DNA (PEDERSEN et alii, 1982).

As zeínas dos tipos beta, delta e gama são codificadas por genes presentes em poucas cópias no genoma (WILSON e LARKINS, 1984). Um gene que codifica a beta-zeína de 14 kD foi mapeado no braço longo do cromosoma 6 e o gene que codifica a delta-zeína de 10 kD, no braço longo do cromosoma 9 (BENNER et alii, 1989). O gene da gama-zeína de

27 kD está localizado na região centromérica do cromosoma 7 (MURRAY et alii, 1988) e parece estar presente, em algumas linhagens, como uma duplicação em "tanden" de 12 kb, com dois genes funcionais designados "A" e "B". Apesar da elevada homologia, esses genes podem ser diferenciados, uma vez que o gene "A" possui três sítios para PstI, enquanto o gene "B" possui apenas dois (DAS et alii, 1990). Outras linhagens, como a W64A, Oh43, Mo17 e B73, apresentam um único gene recombinante ("Ra"), gerado por uma recombinação que levou à excisão e perda do gene "B" (DAS et alii, 1990; GEETHA et alii, 1991; LOPES, 1993).

2.5. Mutações que Alteram a Estrutura do Endosperma

2.5.1. Mutantes na Síntese de Zeínas

O complexo genético das zeínas oferece uma grande vantagem em seu estudo: a disponibilidade de um grande número de mutantes para locos regulatórios com influências distintas e bem definidas nos diferentes polipeptídios que compõem as zeínas (FEIX e QUAYLE, 1993). As mutações que alteram a síntese das proteínas de reserva normalmente provocam alterações drásticas na composição química e na estrutura do endosperma (MERTZ et alii, 1964; NELSON et alii, 1965).

Desde o surgimento do mutante opaco-2, caracterizado pelo elevado teor de lisina e triptofano, conteúdo reduzido

de zeínas e fenótipo opaco dos grãos (MERTZ et alii, 1964), vários mutantes apresentando tais características têm sido identificados, como: opaco-5, opaco-6, opaco-7, floury-2, floury-3, B-30 defeutivo e mucronato (NELSON et alii, 1965; MISRA et alii, 1972; DALBY e TSAI, 1975; MA e NELSON, 1975; SALAMINI et alii, 1983), que são coletivamente denominados como genes de alta lisina. Algumas dessas mutações alteram a síntese de certos grupos de polipeptídios mais do que outros (DI FONZO et alii, 1991); entretanto, em todos esses mutantes, a quantidade total de zeínas sintetizada é substancialmente reduzida (PEDERSEN et alii, 1982). No opaco-2 e B-30 defeutivo, a alfa-zeína de 22 kD é drasticamente reduzida; no opaco-7, a alfa-zeína de 19 kD é o principal grupo de polipeptídios afetado; no opaco-6, mucronato e floury-2, todos os grupos são igualmente afetados (DI FONZO et alii, 1980).

No entanto, dois mutantes farináceos, o floury-1 e o opaco-1, apresentam níveis normais de lisina (NELSON et alii, 1965), indicando que, nesses mutantes, a baixa densidade não estava diretamente ligada à alta qualidade protéica, como até então havia sido demonstrado.

Nenhuma dessas mutações está localizada diretamente em genes que codificam as zeínas, visto que afetam a síntese de mais de uma proteína, sendo, portanto, de natureza regulatória (DI FONZO et alii, 1980). Os genes floury-2 e floury-3 são semidominantes (JONES, 1978; SOAVE et alii, 1978), enquanto que os genes opaco-2, opaco-6 e opaco-7 são recessivos (MOTTO et alii, 1989).

Dentre os mutantes anteriormente mencionados, o mais estudado e conhecido, ao nível molecular, é o opaco-2. O locus opaco-2 está situado no braço curto do cromosoma 7 (SOAVE e SALAMINI, 1984) e está envolvido na transcrição diferencial dos genes da zeína (KODRZYCKI et alii, 1989). O gene funcional codifica uma proteína de 47 kD, que possui uma região básica rica em leucina, formando uma estrutura em bZIP, que é capaz de se ligar a seqüências de nucleotídeos específicas localizadas na região promotora dos genes da alfa-zeína de 22 kD (SCHMIDT et alii, 1992) e do gene da b-32 (BASS et alii, 1992), fazendo parte de uma classe de fatores de transcrição do tipo zipper de leucina e atuando, portanto, como um transativador transcricional positivo para os genes das zeínas (SCHMIDT et alii, 1987; SCHMIDT et alii, 1992; UEDA et alii, 1992). Essa proteína está localizada no núcleo de células do endosperma de milhos normais e possui sinais de localização nuclear (NLS) (VARAGONA et alii, 1992). A mutação no gene opaco-2 inativa a proteína codificada por ele, causando uma redução de 50 a 70% no conteúdo das zeínas (PEDERSEN et alii, 1980).

2.5.2. Mutantes na Formação do Amido

Os mutantes na formação do amido podem ser separados em dois grupos: os amido-modificados e os amido-deficientes. Os amido-modificados, como dull, sugary-2 e waxy, possuem pequeno efeito no acúmulo do amido no endosperma, mas alteram a taxa normal de amilose para amilopectina e contêm níveis de sacarose no endosperma

superiores aos normais. Os mutantes amido-deficientes, a exemplo do shrunken-1 e 2, brittle-1 e 2 e sugary-1, apresentam conteúdo de amido reduzido e maior acúmulo de sacarose no endosperma (CREECH, 1965). Portanto, uma característica que diferencia esses mutantes dos demais genótipos é o elevado teor de açúcares solúveis no endosperma.

Essas mutações afetam também o acúmulo de zeínas (DALBY e TSAI, 1975). Como o endosperma desses mutantes possui altas concentrações de sacarose, é gerado um potencial osmótico mais negativo a favor da água, o que reduz o movimento de solutos (aminoácidos) no grão, reduzindo a síntese das zeínas (TSAI, 1983). Apesar de possuírem níveis reduzidos de zeína, o padrão eletroforético dessas proteínas por SDS-PAGE é semelhante ao dos normais, e o teor da fração não-zeína nesses mutantes não é alterado.

2.6. Proteína b-32

Uma proteína de 32 kD, denominada b-32 (SOAVE et alii, 1981), faz parte de uma classe de proteínas tóxicas amplamente distribuída em plantas, que inativa cataliticamente ribossomos eucariotos ("ribosome inactivating protein") (BASS et alii, 1992). Essas proteínas são N-glicosidases, que removem uma adenina específica em uma região do rRNA 28S bastante conservada e requerida para a ligação do fator de alongação 1- α ; essa

modificação irreversível bloqueia o processo de tradução (STIRPE et alii, 1992).

A b-32 é uma proteína monomérica de 303 resíduos de aminoácidos, que não possui peptídio sinal e apresenta uma região acídica central separada por dois domínios em estrutura secundária (DI FONZO et alii, 1986).

O controle da expressão do gene da b-32 é mediado pelo locus regulatório Opaco-2. A transcrição de um promotor da b-32 pode ser especificamente ativada pela proteína Opaco-2, em ensaios de expressão transiente (SOAVE et alii, 1981; DI FONZO et alii, 1988); portanto, o nível dessa proteína nos mutantes opaco-2 é bastante reduzido. A expressão dessa proteína é temporária e quantitativamente coordenada com a deposição das proteínas de reserva no endosperma.

2.7. Dureza dos Grãos

A dureza dos grãos é um aspecto de fundamental importância que limita a produção de milhos de alta qualidade nutricional (LOPES, 1989), sendo, também, de grande importância para os produtores e beneficiadores do grão, uma vez que afeta as várias etapas do seu processo produtivo. Essa característica está relacionada com densidade, ataque de insetos e suscetibilidade à quebra causada pelos processos de secagem, armazenamento e classificação (POMERANZ et alii, 1984).

A vitreosidade e a dureza são termos comumente utilizados para se referir à textura do grão, embora não

designem a mesma propriedade (SHULL, 1988). A vitreosidade está mais relacionada com a aparência do endosperma, enquanto a dureza se refere à sua textura ou propriedade física (SHULL, 1988). A dureza pode também ser designada como resistência do grão à deformação imposta por uma força externa. Dentre as características diretamente relacionadas com a dureza, a densidade dos grãos é bastante utilizada para expressar as propriedades texturais e agronômicas do milho, pelo fato de a sua determinação ser fácil e precisa.

Apesar de a dureza dos grãos ser de fundamental importância no processo produtivo do milho, pouco é conhecido sobre os fatores bioquímicos e estruturais que afetam essa característica (LOPES, 1989). Os grãos de milho freqüentemente apresentam porções vítreas e opacas. Vários estudos têm descrito diferenças entre esses dois tipos de endosperma. As células da porção opaca são tipicamente maiores e possuem paredes celulares mais espessas que as da porção vítrea (WOLF et alii, 1952); os corpos protéicos no endosperma mais denso são maiores e mais numerosos que no endosperma opaco (WOLF et alii, 1967) e os grãos de amido são compactados e poligonais no endosperma vítreo, mas são esféricos e possuem espaços entre eles no endosperma opaco (ROBUTTI et alii, 1974). As porções mais densas do endosperma contêm maior quantidade de zeínas totais e de alfa-zeína quando comparadas às porções menos densas (DOMBRINK-KURTZMAN e BIETZ, 1993). Essas diferenças sugerem que a composição protéica, sua distribuição espacial dentro do endosperma e sua interação com os demais componentes

moleculares do endosperma devem afetar o desenvolvimento e a estrutura física do grão maduro.

2.8. Os Genótipos opaco-2 Modificados

Os milhos de alta qualidade protéica, normalmente denominados QPM, são genótipos opaco-2, com alta frequência de genes modificadores, que conferem dureza e fenótipo normal ao endosperma, mantendo altos níveis de lisina e triptofano (LOPES e LARKINS, 1991b). Em 1984, 23 variedades de milho QPM, do CIMMYT, foram introduzidas no Brasil por pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS-EMBRAPA), que avaliaram o seu desempenho em diversas regiões do País (MAGNAVACA et alii, 1988). Em 1988, foi lançada a variedade BR451, derivada da população 64 Blanco Dentado-2 QPM, apresentando boa adaptação a vários ambientes brasileiros, além de características protéicas e industriais desejáveis (BJARNASON e VASAL, 1992).

Assim como os genótipos opaco-2, as variedades QPM apresentam baixas concentrações das zeínas do tipo alfa e beta (WALLACE et alii, 1990; PAIVA et alii, 1991), além de um elevado conteúdo da fração não-zeína, quando comparados com os genótipos normais.

A conversão do endosperma opaco em vítreo foi associada a um aumento na síntese da gama-zeína de 27 kD (LOPES, 1989; WALLACE et alii, 1990; PAIVA et alii, 1991). Além das alterações quantitativas, mudanças na distribuição espacial de zeínas no endosperma ocorrem pela ação de genes

modificadores (GEETHA et alii, 1991). Tudo isto, aliado às características físico-químicas da gama-zeína, sugere um envolvimento dessa proteína na determinação das características físicas do endosperma do milho. Entretanto, as relações entre o aumento do conteúdo de gama-zeína, sua distribuição nos corpos protéicos e a modificação das características do endosperma não estão ainda bem estabelecidas.

Análise de cruzamento recíproco entre genótipos QPM e linhagens opaco-2 demonstraram uma correlação direta entre a vitreosidade do endosperma e o conteúdo de gama-zeína (LOPES e LARKINS, 1991a). Resultados semelhantes foram obtidos quando genótipos QPM foram cruzados com linhagens normal, mutantes floury-2 e duplo mutante fl-2 e o-2 (LOPES e LARKINS, 1991a).

O aumento na expressão da gama-zeína é dependente da dose dos genes modificadores, que parecem agir de maneira semidominante e parecem ser independentes do locus opaco-2 (KODRZYCKI et alii, 1989; LOPES e LARKINS, 1991a).

Sabe-se que o aumento da síntese da gama-zeína no endosperma QPM não ocorre em razão de uma amplificação gênica (GEETHA et alii, 1991). A maior quantidade de mRNA de gama-zeína no endosperma QPM, comparada a genótipos normais e opaco 2, sugere que os genes modificadores devem atuar ou em nível da transcrição ou na estabilidade do mRNA. Dados de DAS et alii (1990) indicam que a estabilidade do mRNA é o principal fator determinante da variação nas concentrações do mRNA. Assim, os genes modificadores parecem representar um novo sistema

regulatório da expressão gênica das zeínas (GEETHA et alii, 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Genético

Foram utilizadas 11 populações de milho indígenas de diversas regiões do Brasil e de outros países da América do Sul. A identificação desses materiais indica o local de origem (estado ou o país), como: AC-81 (Acre), MT-01, MT-10, MT-24, MT-II, MT-III, Nodzob Udza (Mato Grosso), PR-I (Paraná), BOL-I, BOL-II (Bolívia) e Preto Chileno (Chile). Como testemunhas foram utilizados: o híbrido duplo BR-201, as variedades BR-106 e BR-451 (QPM) e os mutantes opaco-2 UFV o2 e IAC o2-IV.

As sementes dos materiais indígenas e opaco-2 foram fornecidas, em pequenas quantidades, pelo Banco de Germoplasma do CNPMS-EMBRAPA e multiplicadas nos campos experimentais do CNPMS-EMBRAPA, em Sete Lagoas, no verão de 1992, sob condições de irrigação e adubação controladas, e polinização no sistema "full-sib". As sementes dos

materiais normal e QPM foram fornecidas pelo Programa de Melhoramento de Milho do CNPMS-EMBRAPA.

3.2. Preparo do Endosperma

Para as análises quantitativas e qualitativas, aproximadamente 30 grãos de cada genótipo foram imersos, separadamente, em água por 5 minutos, após os quais o pericarpo, o escutelo e o embrião foram removidos com auxílio de um bisturi. A porção restante do grão, o endosperma, foi secada a 65 °C por 16 horas e triturada em moinho tipo ciclone. O pó obtido foi armazenado a -20 °C.

3.3. Determinação da Densidade dos Grãos

A umidade dos grãos foi padronizada colocando-os em estufa a 37 °C por três dias. A densidade dos grãos foi determinada segundo KNIEP e MASON (1989). Uma proveta de 50 ml foi colocada sobre uma balança eletrônica, onde pesaram-se 50 grãos. O volume foi completado com etanol absoluto (densidade igual a 0,78612 g/ml) até 30 ml e o peso dos grãos em etanol foi registrado. Resultados em triplicata foram obtidos para cada genótipo e a densidade em g/ml foi calculada segundo a equação:

$$\text{Densidade (g/ml) dos grãos} = \frac{m1}{30 - [(m2 - m1) / 0,78612]} \quad \text{em que}$$

m1 = massa dos grãos

m2 = massa do etanol + grãos

3.4. Determinação da Qualidade Protéica do Endosperma

A porcentagem de proteínas do endosperma foi determinada multiplicando-se o teor de nitrogênio obtido pelo método micro-Kjeldhal pelo fator 6,25 (Association of Official Agricultural Chemistry, 1980).

Para se obter o teor de nitrogênio, uma amostra de 200 mg do endosperma foi digerida por 90 minutos a 370 °C, com 4,0 ml de ácido sulfúrico concentrado e 1,0 g da mistura catalisadora contendo nitrato de potássio e selênio na proporção de 100:1 (p/p).

Após resfriar à temperatura ambiente, o volume foi completado com água até 70 ml e uma alíquota de 10 ml foi destilada com 5,0 ml de hidróxido de sódio 12,5N. O destilado foi recebido em 2,0 ml de ácido bórico saturado e titulado com ácido sulfúrico 0,012N.

O teor de triptofano na proteína foi analisado pelo método descrito por HERNANDEZ e BATES (1969). A 80 mg de endosperma pulverizado foram adicionados 4,0 ml de uma solução de 4,0 mg de papaína Merck por ml de acetato de sódio 0,1N pH 7,0 a 65 °C, por 16 horas, para hidrolisar as proteínas. Após atingir a temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 1.600xg, em rotor horizontal, por 5 minutos. Uma alíquota de 1,0 ml do sobrenadante foi retirada e adicionada a 4,0 ml de uma mistura contendo 270 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ por litro de ácido acético glacial e ácido sulfúrico concentrado, na proporção de 1:1 (v/v), preparada 2 horas antes do uso, e incubada por 15 minutos a 65 °C. Após resfriamento à temperatura ambiente, procedeu-se a

leitura em espectrofotômetro a 560 nm, para a determinação da concentração de triptofano. Paralelamente, foi construída uma curva-padrão com amostras contendo concentrações conhecidas de triptofano. As quantidades de triptofano obtidas nas amostras foram corrigidas em função da proteína total, para a obtenção dos valores em porcentagem de triptofano na proteína, sendo realizadas três repetições para cada resultado.

A determinação da lisina foi segundo a fórmula: $Lis = 0,3601 + (4,0745 \times Trp)$, deduzida da correlação existente entre as concentrações desses dois aminoácidos em endosperma de milho (HERNANDEZ e BATES, 1969).

3.5. Determinação dos Teores de Açúcares Solúveis

A 100 mg do endosperma foram adicionados 8,0 ml de etanol 80% (v/v) em início de fervura, para a extração dos açúcares solúveis totais. A mistura foi centrifugada a 1.600xg, em rotor horizontal, por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um béquer. A extração do precipitado foi repetida por mais duas vezes e o resíduo foi descartado. Os sobrenadantes foram combinados, evaporados a 55 °C e o resíduo seco foi ressuspenso em 10 ml de água destilada. Uma alíquota de 1 ml foi retirada e adicionada a um tubo contendo 2,0 ml de água destilada e 6,0 ml de uma solução a 0,2% (p/v) de antrona em ácido sulfúrico concentrado, com os tubos imersos em água. Os tubos foram, então, vedados e incubados por 3 minutos em banho-maria em ebulição. Após resfriamento à temperatura

ambiente, foram determinadas as absorvâncias em espectrofotômetro a 600 nm, juntamente com os padrões de glicose, para obtenção dos valores em porcentagem de açúcares solúveis no endosperma.

3.6. Extração e Fracionamento das Proteínas do Endosperma

As proteínas totais do endosperma foram extraídas pela adição de 500 ul de tampão de extração [borato de sódio 0,0125M, pH 10, contendo duodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (p/v) e 2-mercaptoetanol 2% (v/v)], a 50 mg de endosperma. Após agitação constante por 60 minutos à temperatura ambiente, em tubos do tipo Eppendorf de 1,5 ml, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos em microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, ao qual adicionou-se etanol absoluto até a concentração de 70% (v/v). Após 30 minutos, com agitações a cada 10 minutos à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante, contendo as zeínas, foi transferido para outro tubo e o precipitado, contendo a fração não-zeína, foi secado e ressuspenso em 500 ul do tampão de extração.

A proteína b-32 foi extraída em almofariz, no gelo, adicionando-se 2 ml de tampão Tris-HCl (Tris-hidroximetilaminometano) 60 mM pH 6,8 com 1 mM de PMSF (Fenil-metil-sulfonil fluoreto) a 200 mg de endosperma moído. O extrato foi centrifugado a 30.000xg por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante (S-30) foi transferido para tubos Eppendorf e armazenados a 4 °C (SOAVE et alii, 1981).

3.7. Quantificação das Frações Protéicas

As frações zeína, não-zeína e a proteína total extraídas foram quantificadas pelo teor de nitrogênio determinado pelo método micro-Kjeldhal, que foi modificado pelo fato de as concentrações serem bastante reduzidas.

A modificação em relação ao método citado no item 3.4 consistiu basicamente em completar o volume da amostra digerida para 25 ml e destilar todo o volume.

Os resultados em porcentagem de zeínas e não-zeínas foram calculados tendo como base a proteína total extraída pelo método descrito no item 3.6, sem a etapa de fracionamento, sendo realizadas três repetições para cada extração.

3.8. Análise por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida das Frações Protéicas

Foram utilizados géis em poliacrilamida contendo SDS, no sistema descontínuo descrito por LAEMMLI (1970) e com tampão Tris de alta molaridade no gel de separação e no tampão de corrida, segundo FLING e GREGERSON (1986).

A separação dos polipeptídios foi realizada em um sistema envolvendo dois géis: um empilhador, contendo Tris 0,125M pH 6,8, SDS 0,1% e acrilamida 6%, e um gel de separação contendo Tris 0,75M pH 8,8, SDS 0,1% e gradiente de acrilamida de 7,5 a 17,5% para as zeínas, e de 10 a 18% para a b-32.

A corrida foi feita em cuba vertical com tampão de corrida contendo Tris 0,05M, glicina 0,192M pH 8,3 e SDS 0,1%, sob uma corrente de 12 mA por 30 minutos, tempo necessário para que as proteínas atingissem o gel de resolução, seguida de 24 mA por 3 horas.

Em cada canaleta do gel de poliacrilamida foram aplicados 20 μ l do extrato protéico de cada amostra da fração zeína, equivalentes a 0,6 mg do endosperma, e 40 μ l do extrato S-30, equivalentes a 4 mg do endosperma. Antes da corrida, os extratos foram diluídos (1:1) em tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,0625M pH 6,8, SDS 2%, glicerol 15% e azul de bromofenol 0,5% e fervidos por 4 minutos.

Quatro géis das zeínas foram submetidos à leitura no densitômetro a laser UltroScan XL-2222 LKB - Pharmacia, para quantificação das bandas, sendo selecionados os três melhores resultados. Foram utilizados os valores relativos e absolutos fornecidos pelo equipamento.

3.9. Delineamento Estatístico

Para cada parâmetro analisado foram realizados 16 tratamentos com três repetições. A análise de variância e o teste de média foram feitos com o auxílio do programa estatístico MSTAT. O teste de média empregado foi o teste de Tukey a 1% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os milhos normais e QPM apresentaram altos valores para a densidade dos grãos, além de possuírem aspecto vítreo. Já as populações de milho indígenas, juntamente com os mutantes opaco-2, apresentaram densidades significativamente inferiores, e os grãos eram opacos (Figuras 1 e 2). Estes resultados indicam, em milho, uma correlação direta entre dureza e vitreosidade dos grãos, confirmando os resultados de POMERANZ et alii (1984).

Os cereais são geralmente considerados nutricionalmente deficientes (NELSON, 1969; DOLL, 1984). Em genótipos normais de milho, a qualidade nutricional das proteínas é baixa, devido à deficiência em lisina e triptofano, nessa ordem, os aminoácidos essenciais mais limitantes na dieta humana e, em ordem inversa, na dieta dos suínos (KIES e FOX, 1972). Portanto, o termo "qualidade protéica" é expresso, essencialmente, pelos níveis desses dois aminoácidos na proteína.

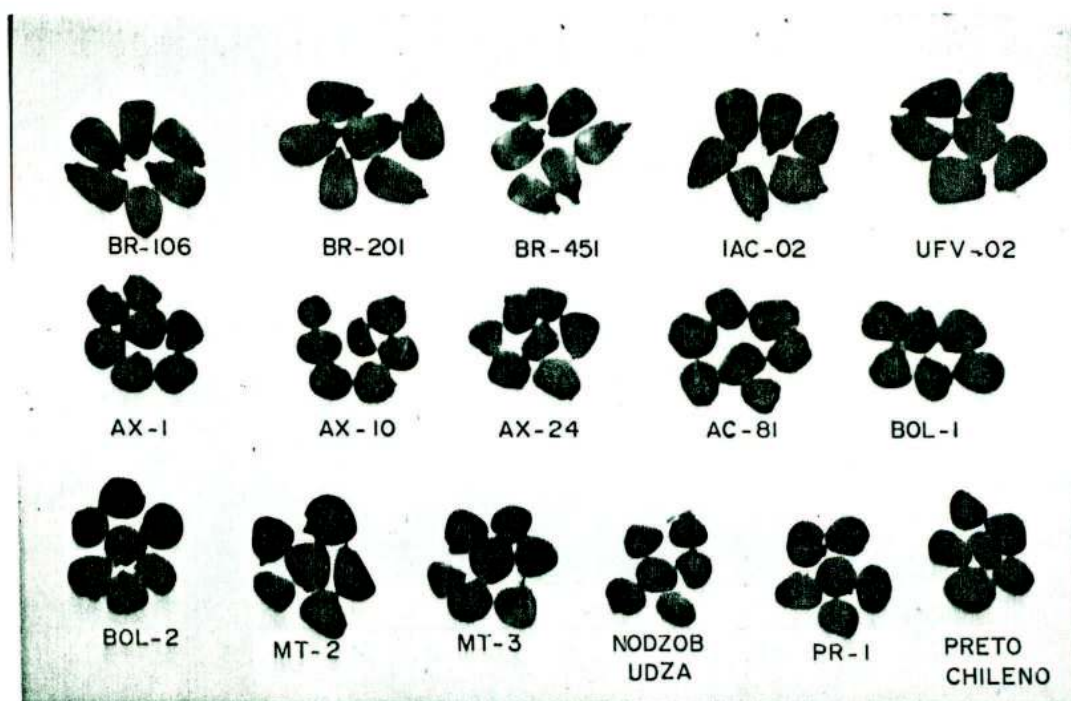


FIGURA 1 - Fotografia dos Grãos de Milho de Genótipos Normais, QPM, opaco-2 e Indígenas, Vistos Sobre Transiluminador.

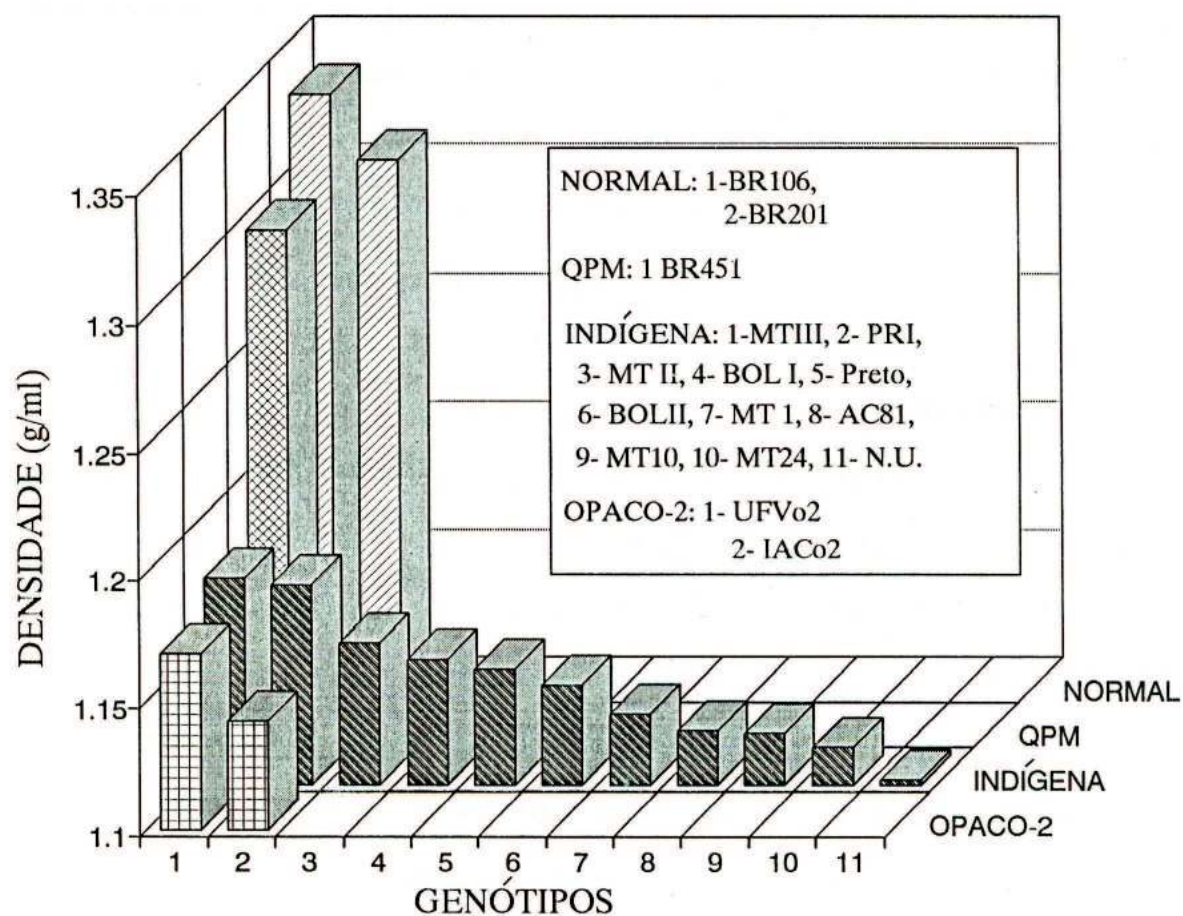


FIGURA 2 - Densidade dos Grãos, Determinada Segundo Kniep e Mason (1989), dos Genótipos Normais, QPM, Indígenas e opaco-2.

Os resultados obtidos para qualidade protéica permitem a identificação de três grupos distintos entre os genótipos estudados (Figura 3). Os genótipos opaco-2 se destacam pelo alto conteúdo de lisina e triptofano, possuindo, portanto, alta qualidade protéica, como descrito por Mertz et alii (1964). A variedade QPM apresenta qualidade protéica intermediária entre os genótipos opaco-2 e os normais, confirmando os dados de Vasal et alii (1980). Os genótipos normais e indígenas apresentam baixos níveis desses aminoácidos essenciais, sendo, portanto, desbalanceados nutricionalmente.

Analisando conjuntamente os dados de densidade e qualidade protéica dos grãos, os genótipos indígenas comportam-se diferentemente das testemunhas, apresentando grãos com densidades e opacidade semelhantes aos dos mutantes opaco-2 e qualidade protéica inferior, como os genótipos normais (Figuras 1, 2 e 3). Os mutantes opaco-1 e floury-1, cujas características de densidade e qualidade protéica são semelhantes às dos genótipos indígenas, foram descritos na literatura (NELSON et alii, 1965). No entanto, estudos mais aprofundados envolvendo esses mutantes não foram realizados, aparentemente devido a um maior interesse naqueles genótipos que apresentavam qualidades protéicas mais elevadas.

A quantificação das frações zeína e não-zeína pelo método micro-Kjeldhal demonstrou que a recuperação das proteínas após o fracionamento foi, em média, de 95% (Quadro 5). A perda de 5%, em média, das proteínas, foi, provavelmente, devido ao grande número de etapas envolvidas

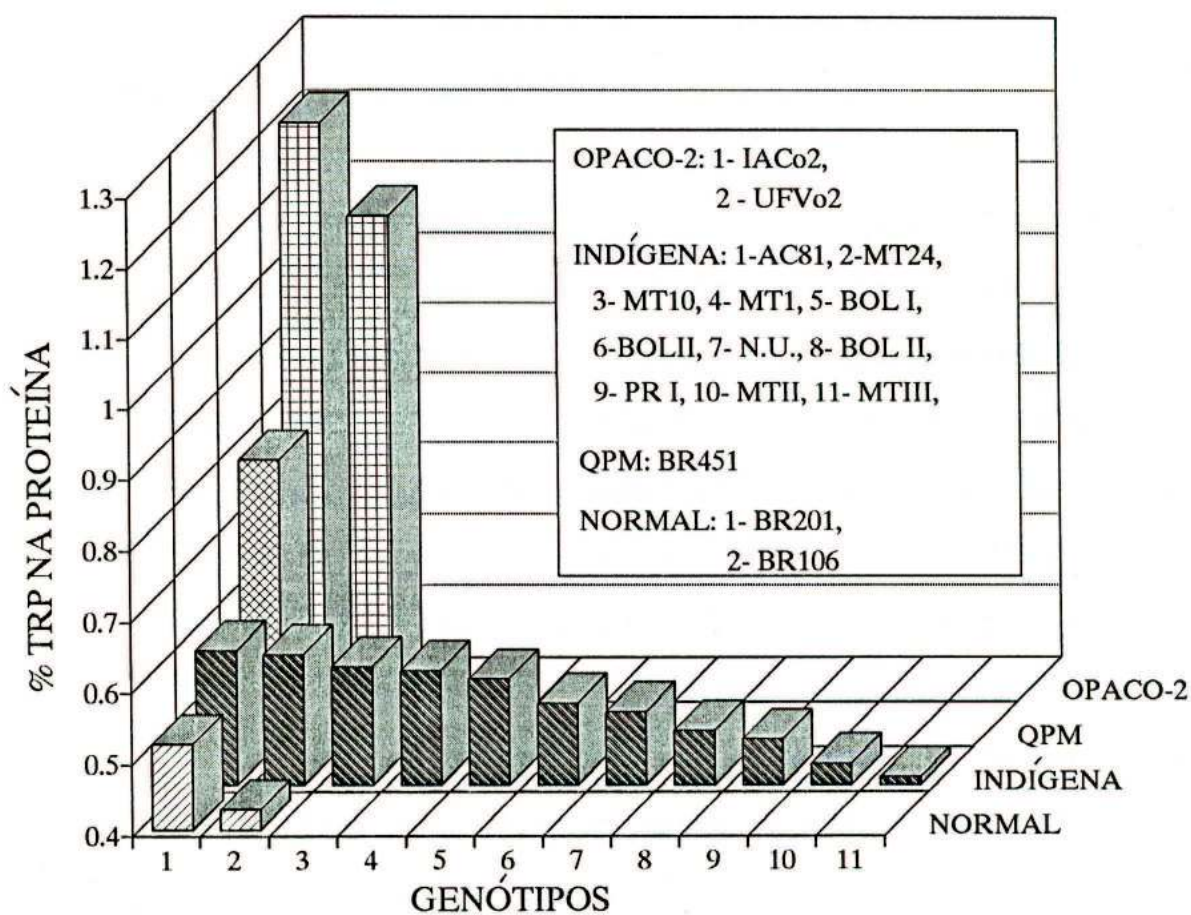


FIGURA 3 - Qualidade Protéica Medida em Função do Teor de Triptofano na Proteína Total, Segundo Hernandez e Bates (1969), dos Genótipos opaco-2, QPM, Indígenas e Normais.

desde o fracionamento até a quantificação, o que ocasionou também um maior desvio padrão dos dados, quando analisados estatisticamente.

As zeínas estão presentes em altas concentrações nos genótipos normais e indígenas, 63,9% em média (Figura 4 e Quadro 5), confirmando os dados publicados na literatura para genótipos normais (WILSON, 1985). A esse fator tem sido atribuída a baixa qualidade protéica desses materiais, uma vez que zeínas não apresentam resíduos de lisina e muito poucos de triptofano (LOPES, 1993). Nos genótipos opaco-2 e QPM, as zeínas correspondem, em média, a 37,4 e 41,3%, respectivamente, da proteína total (Figura 4 e Quadro 5), em consonância com os resultados obtidos desde o trabalho pioneiro de MERTZ et alii (1964).

As zeínas parecem ser um importante fator na determinação da densidade dos grãos (TSAI, 1983) e, conseqüentemente, nas suas características agrônômicas. Essa relação, no entanto, no que se refere à densidade do grão, não parece ser verdadeira para os genótipos indígenas, que, apesar de possuírem altos níveis de zeínas, como os normais, possuem baixa densidade, à semelhança dos mutantes opaco-2 (Figuras 2 e 4). Em função desse resultado inesperado, resolveu-se caracterizar de modo mais aprofundado os componentes da fração zeína dos genótipos indígenas, em comparação com as testemunhas.

A fração zeína é composta por vários polipeptídios, que podem ser separados em grupos distintos, por eletroforese em géis de poliacrilamida. No padrão eletroforético mostrado na Figura 5, podem ser

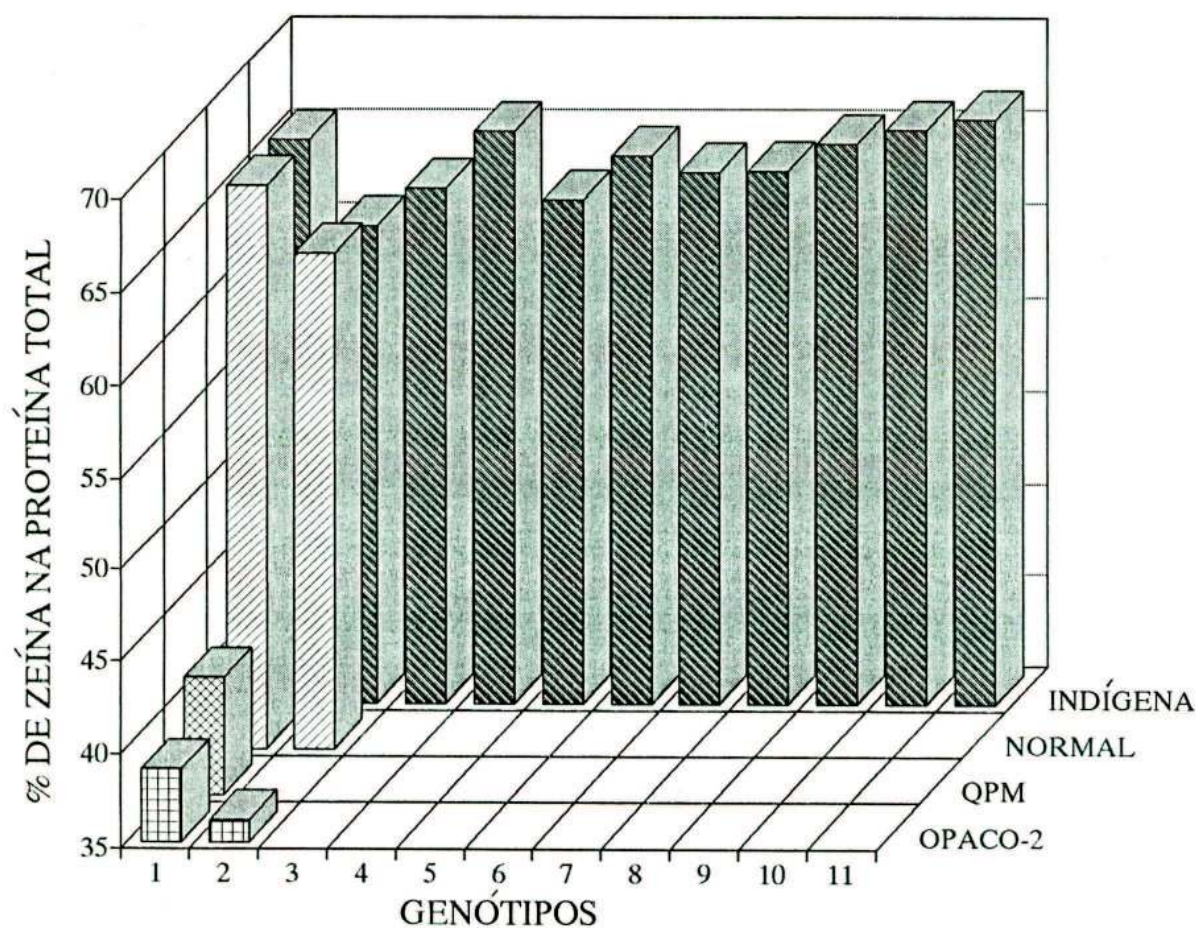


FIGURA 4 - Porcentagem da Fração Zeína na Proteína Total, Extraída pelo Método Descrito por Wallace et alii (1990) e Quantificada pelo Micro-Kjeldhal, dos Genótipos Indígenas: 1: MT-24, 2: MT-10, 3: AC-81, 4: BOL-1, 5: MT-II, 6: MT-1, 7: BOL-II, 8: PR-1, 9: Preto Chileno, 10: MT-III, 11: Nodzob Udza; Normal: 1: BR-106, 2: BR-201; QPM: 1: BR-451 e opaco-2: 1: UFVo2, 2: IACo2-IV.

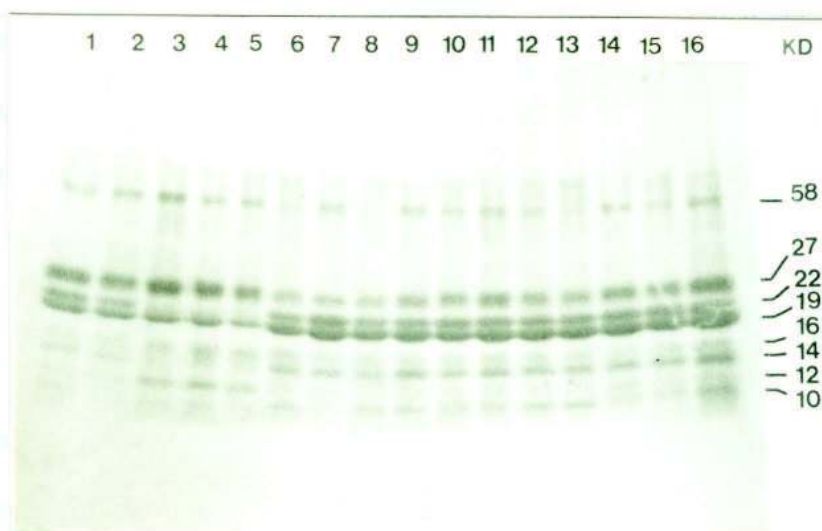


FIGURA 5 - Análise de Zeínas por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) em Gradiente de 7,5 a 17,5%, de Genótipos Normais, QPM, opaco-2 e Indígenas. Em Cada Canaleta Foram Aplicados 20 ul do Extrato Total, Equivalente a 0,6 mg do Endosperma, de Acordo com a Seqüência a Seguir: 1: BR-106, 2: BR-201, 3: BR-451, 4: UFVo2, 5: IACo2-IV, 6: AC-81, 7: Preto Chileno, 8: MT-24, 9: Nodzob Udza, 10: BOL-II, 11: MT-II, 12: MT-01, 13: MT-10, 14: PR-I, 15: MT-III e 16: BOL-I.

identificados os quatro grupos de zeínas descritos na literatura (LOPES, 1989; WALLACE et alii, 1990; PAIVA et alii, 1991), isto é, alfa-zeína de 19 e 22 kD, gama-zeína de 16 e 27 kD, beta-zeína de 14 kD, delta-zeína de 10 kD, além dos polipeptídios de 12 e 58 kD.

As alfa-zeínas, a fração mais abundante nos genótipos normais, estão também presentes em altas concentrações nos genótipos indígenas (Figuras 5 e 6). Essa fração sofre uma drástica redução nos genótipos opaco-2 e QPM, sendo o polipeptídio de 22 kD o mais afetado. Isto ocorre porque a proteína Opaco-2 é um ativador transcricional que controla a expressão dos genes que codificam a alfa-zeína de 22 kD (SCHMIDT et alii, 1992). Esse fator de transcrição não está presente nos mutantes opaco-2 e QPM, uma vez que nesses genótipos o gene opaco-2 não é funcional. O baixo nível de transcrição dos genes que codificam a zeína de 22 kD no endosperma deve favorecer a síntese de outros polipeptídios nutricionalmente mais balanceados, normalmente presentes na fração não-zeína.

Ainda comparando genótipos de qualidade protéica contrastantes, podem-se observar alterações nas concentrações dos polipeptídios de 12 e 14 kD. O polipeptídio de 12 kD apresenta-se em maior proporção nos genótipos de maior qualidade protéica, onde se incluem os genótipos opaco-2 e QPM. Já os genótipos indígenas e normais apresentam níveis significativamente reduzidos desse polipeptídio (Figuras 5 e 6), que, segundo LARKINS et alii (1991), possui uma composição aminoacídica semelhante à da gama-zeína de 27 kD.

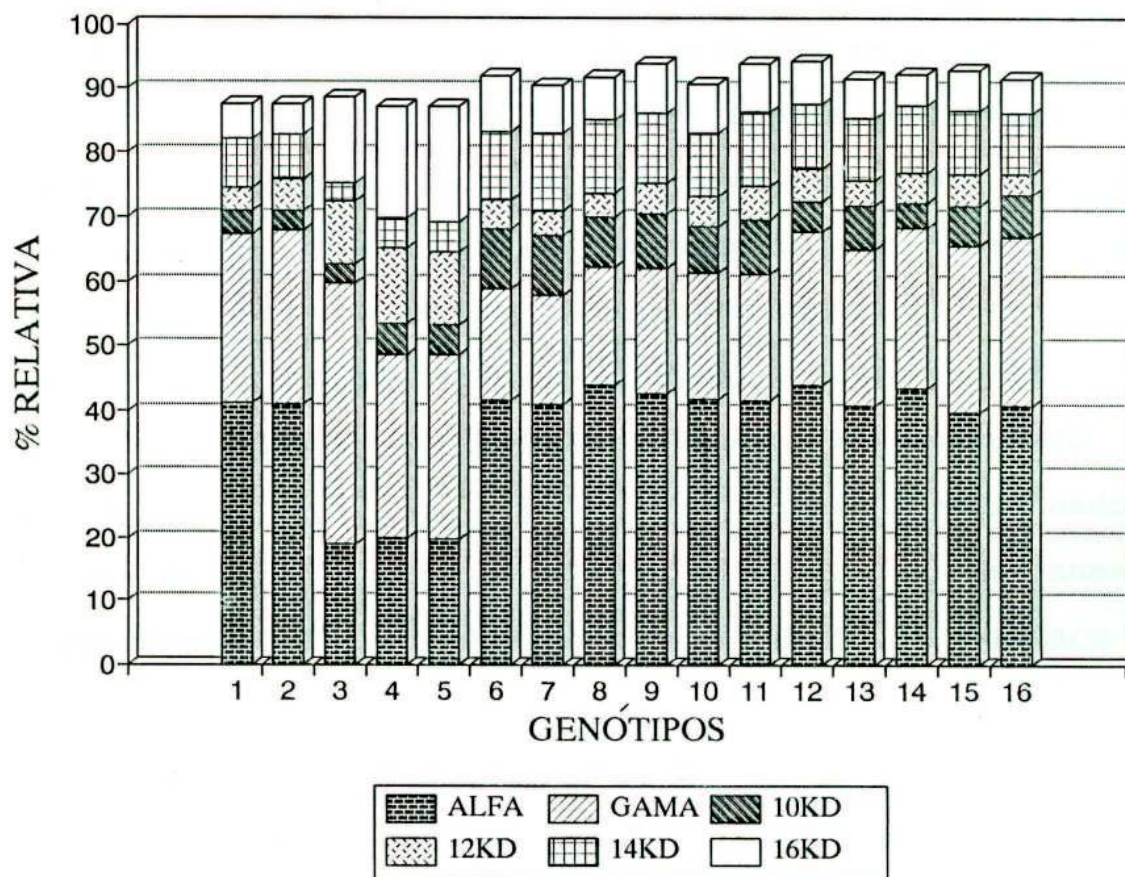


FIGURA 6 - Porcentagem Relativa dos Polipeptídeos que Compõem a Fração Zeína, Obtida pela Média da Leitura de Três Géis de Poliacrilamida no Densitômetro a Laser UltoScan XL-2222. Os Genótipos Estão na Seguinte Ordem: 1: BR-106, 2: BR-201, 3: BR-451, 4: IACo2-IV, 5: UFVo2, 6: AC-81, 7: MT-10, 8: Preto Chileno, 9: MT-1, 10: Nodzob Udza, 11: MT-24, 12: MT-II, 13: BOL-II, 14: MT-III, 15: BOL-I, 16: PR-1.

A beta-zeína de 14 kD, de modo semelhante à alfa-zeína de 22 kD, aparece em menor quantidade nos genótipos opaco-2 e QPM, em comparação com os normais (Figuras 5 e 6), como já verificado por WALLACE et alii (1990). Esse tipo de zeína se acumula na periferia dos corpos protéicos, junto com a gama-zeína (LENDING e LARKINS, 1989). No entanto, as populações indígenas apresentam níveis superiores desta proteína com relação aos normais.

Dentre os polipeptídios que compõem as zeínas, a gama-zeína de 27 kD se destaca pela sua localização na periferia dos corpos protéicos, pelo seu alto conteúdo de cisteína (LENDING e LARKINS, 1989) e pela necessidade de alta concentração de agentes redutores para a sua extração quantitativa, indicando a existência de uma grande quantidade de ligações intermoleculares, "in vivo", promovidas por pontes dissulfídicas entre resíduos de cisteína (LOPES e LARKINS, 1991a). A conversão do endosperma opaco em vítreo por genes modificadores presentes nos genótipos QPM foi associada a um aumento considerável na síntese da gama-zeína de 27 kD (WALLACE et alii, 1990; PAIVA et alii, 1991).

Para avaliar as variações nos níveis dessa proteína nos grãos dos genótipos indígenas, a fração zeína foi separada por eletroforese em géis de poliacrilamida e quantificada por densitometria a laser (Figura 7 e Quadro 7). Optou-se por essa metodologia e não por métodos imunológicos pelo fato de os anticorpos policlonais específicos para a gama-zeína de 27 kD apresentarem uma taxa de reação cruzada com o polipeptídio de 58 kD (LOPES e

LARKINS, 1991b) e com a zeína de 16 kD (PRAT et alii, 1985). Portanto, a quantificação dessa proteína por métodos imunológicos, como o teste de ELISA, pode mascarar a sua real concentração, uma vez que as concentrações dos polipeptídios de 14 e 58 kD são bastante variáveis entre os diferentes genótipos analisados.

Os níveis da gama-zeína de 27 kD obtidos por densitometria foram padronizados em relação à concentração desta proteína na variedade normal BR 106. Os genótipos QPM apresentaram uma concentração de gama-zeína aproximadamente duas vezes superior à do normal, enquanto que nos mutantes opaco-2 esses valores foram em torno de 20% menores do que para o genótipo normal (Figura 7). Níveis semelhantes foram encontrados por outros autores (WALLACE et alii, 1990; LOPES e LARKINS, 1991a), com a utilização da técnica imunológica de ELISA, indicando a possibilidade de utilização de ambas as técnicas de quantificação protéica para este fim.

De posse desses dados, os genótipos indígenas foram separados em dois grupos, de acordo com a quantidade relativa de gama-zeína. Os genótipos 6 a 11 (Grupo 1) constituem um grupo de baixa concentração relativa, com 20 a 40% menos gama-zeína do que o genótipo normal. Os genótipos 12 a 16 (Grupo 2) apresentam uma concentração de gama-zeína similar à do genótipo normal (Figura 7). As densidades inferiores e a opacidade dos grãos dos genótipos indígenas do Grupo 1 podem ser, em parte, explicadas pelos níveis mais baixos da gama-zeína de 27 kD nos corpos protéicos do endosperma dos grãos. Tendo em vista as

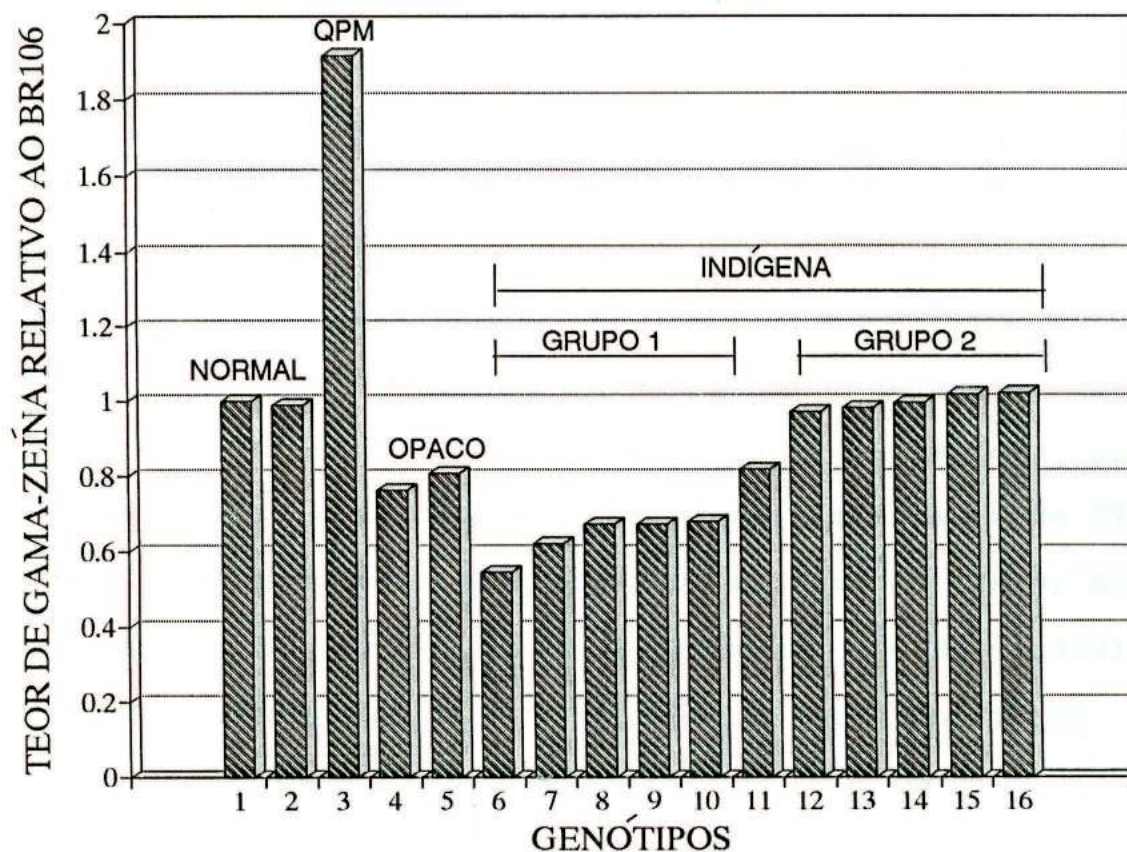


FIGURA 7 - Quantidade Relativa da Gama-Zeína de 27 kD, Obtida Pela Leitura de Três Géis de Poliacrilamida no Densitômetro a Laser UltroScan XL-2222 e Padronizada em Função da Quantidade Dessa Proteína no BR-106, na Sequência dos Genótipos Analisados: 1:BR-106, 2: BR-201, 3: BR-451, 4: IACo2-IV, 5: UFVo2, 6: AC-81, 7: MT-10, 8: Preto Chileno, MT-1, 10: Nodzob Udza, 11: MT-24, 12: MT-II, 13: BOL-II, 14: MT-III, 15: BOL-I, 16: PR-1.

características físico-químicas da gama-zeína e sua localização nos corpos protéicos, a redução de 20 a 40% no acúmulo e deposição dessa proteína, nos corpos protéicos, seria suficiente para causar distúrbios na formação e na estrutura desses depósitos, afetando, conseqüentemente, a agregação destes e sua função na estrutura do endosperma. Esse grupo de genótipos indígenas apresenta um grande potencial para o estudo molecular, uma vez que nenhum "locus" regulatório alterando a síntese da gama-zeína de 27 kD foi identificado até então (FEIX e QUAYLE, 1993).

Os genótipos indígenas do Grupo 2 (Figura 7) possuem concentrações de gama-zeína estatisticamente iguais às dos normais, pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade, e características físicas do grão semelhantes às dos mutantes opaco-2. Nesse caso, parece não haver qualquer relação entre a gama-zeína de 27 kD e a textura dos grãos. Inicialmente, pode ser sugerido que a gama-zeína de 27 kD não é o único fator que afeta a densidade dos grãos, o que concorda com vários autores. Segundo LOPES (1993), a presença dos genes "A" e "B" da gama-zeína de 27 kD, que aumentam a síntese dessa proteína com relação ao gene "Ra", é necessária mas não suficiente para afetar a modificação do fenótipo opaco-2 nos genótipos QPM, sugerindo haver outros fatores envolvidos na determinação da estrutura física do endosperma. Como os conhecimentos em torno dos fatores que afetam as características físicas do endosperma são reduzidos, esse segundo grupo de genótipos indígenas pode trazer, também, alguma contribuição para este estudo.

Com o objetivo de procurar algum outro fator que pudesse estar afetando tais características, novos parâmetros foram analisados.

Larkins et alii (1991) sugeriram que o balanço entre as zeínas do tipo alfa e gama "in vitro" também seja importante para a determinação da densidade dos corpos protéicos. No entanto, essa relação, nos genótipos indígenas do Grupo 2, é significativamente igual à dos genótipos normais (Quadro 1).

Para complementar os estudos das proteínas presentes no endosperma do milho, a fração não-zeína foi também analisada. Essa fração representa, nos genótipos normais, uma média de 33,1% das proteínas totais do endosperma, valor bem próximo àquele dos genótipos indígenas, cuja média foi de 30,7% (Figura 8). No caso dos genótipos opaco-2 e QPM esses valores são significativamente maiores, 56,1 e 52,4%, respectivamente. Esses resultados indicam a correlação direta entre a qualidade protéica e a fração não-zeína com $r^2 = 0,886$ (Figura 9), concordando com os resultados obtidos por LOPES (1993), que demonstram não haver alteração na composição aminoacídica da fração não-zeína dos materiais QPM em comparação com os normais, mas que a síntese dessa fração protéica, nutricionalmente mais balanceada que as zeínas, foi coordenadamente intensificada.

Como mais um esforço no sentido de caracterizar os genótipos indígenas, a fração não-zeína desses foi extraída, juntamente com a das testemunhas, e fracionada em SDS-PAGE. O resultado final evidenciou a presença de uma

QUADRO 1 - Relação Entre as Zeínas do Tipo Gama/Alfa nos Genótipos QPM, Normais, Indígenas e opaco-2. Os Resultados Foram Obtidos Dividindo a Média dos Valores Absolutos, Obtidos por Densitometria a Laser, das Frações Alfa-Zeína de 22 e 19 kD e Gama-Zeína de 27 kD

Genótipos	Relação Entre as Zeínas Gama/Alfa*	
BR-451	2,75	a
IACo2-IV	1,20	b
UFVo2	1,19	b
BOL-I	0,66	c
MT-II	0,66	c
BR-106	0,65	c
BR-201	0,64	c
PR-1	0,60	c
BOL-II	0,57	c
MT-III	0,56	c
Nodzob Udza	0,49	c
MT-24	0,48	c
Preto Chileno	0,48	c
MT-10	0,43	c
MT-01	0,40	c
AC-81	0,36	c

* Média de três repetições, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

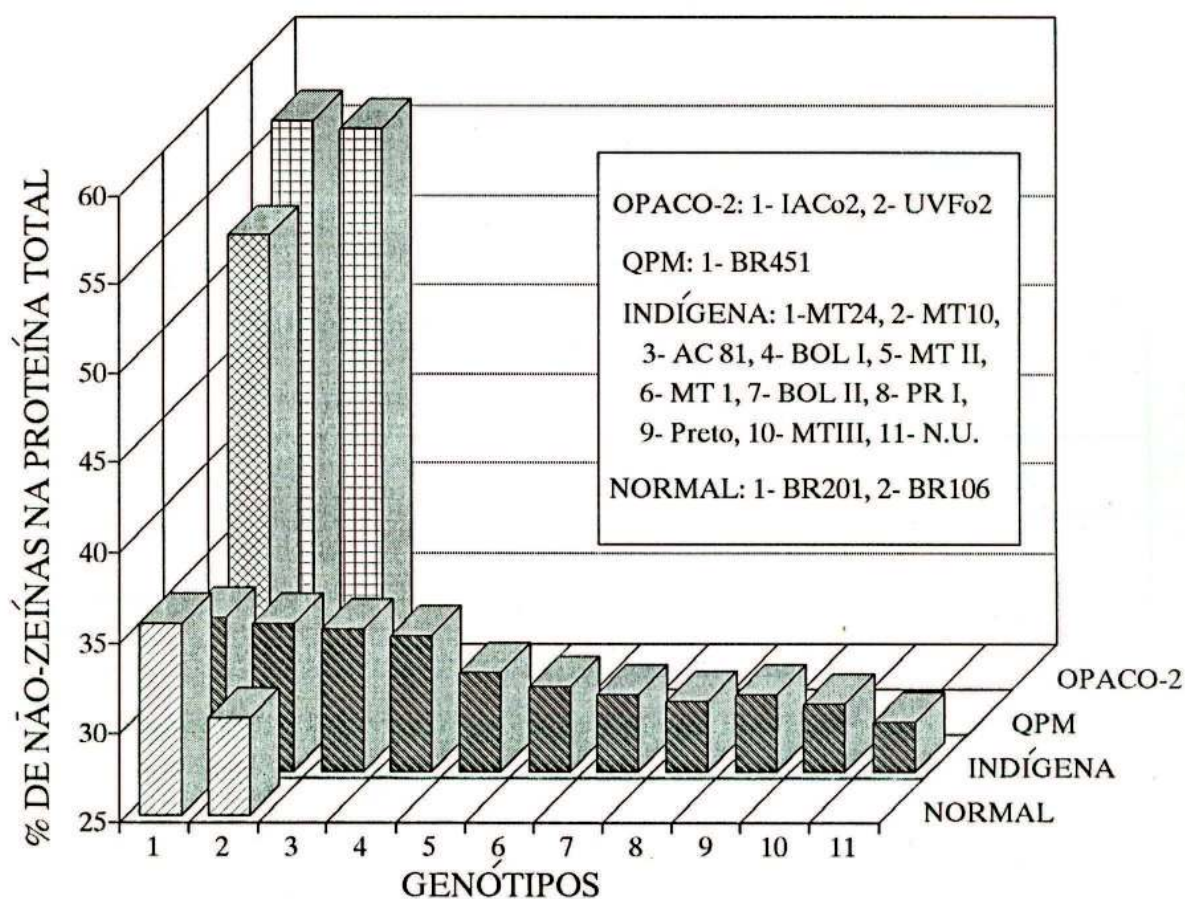


FIGURA 8 - Porcentagem da Fração Não-Zeína na Proteína Total, Extraída pelo Método Descrito por Wallace et alii (1990) e Quantificada pelo Micro-Kjeldhal, dos Genótipos opaco-2, QPM, Indígenas e Normais.

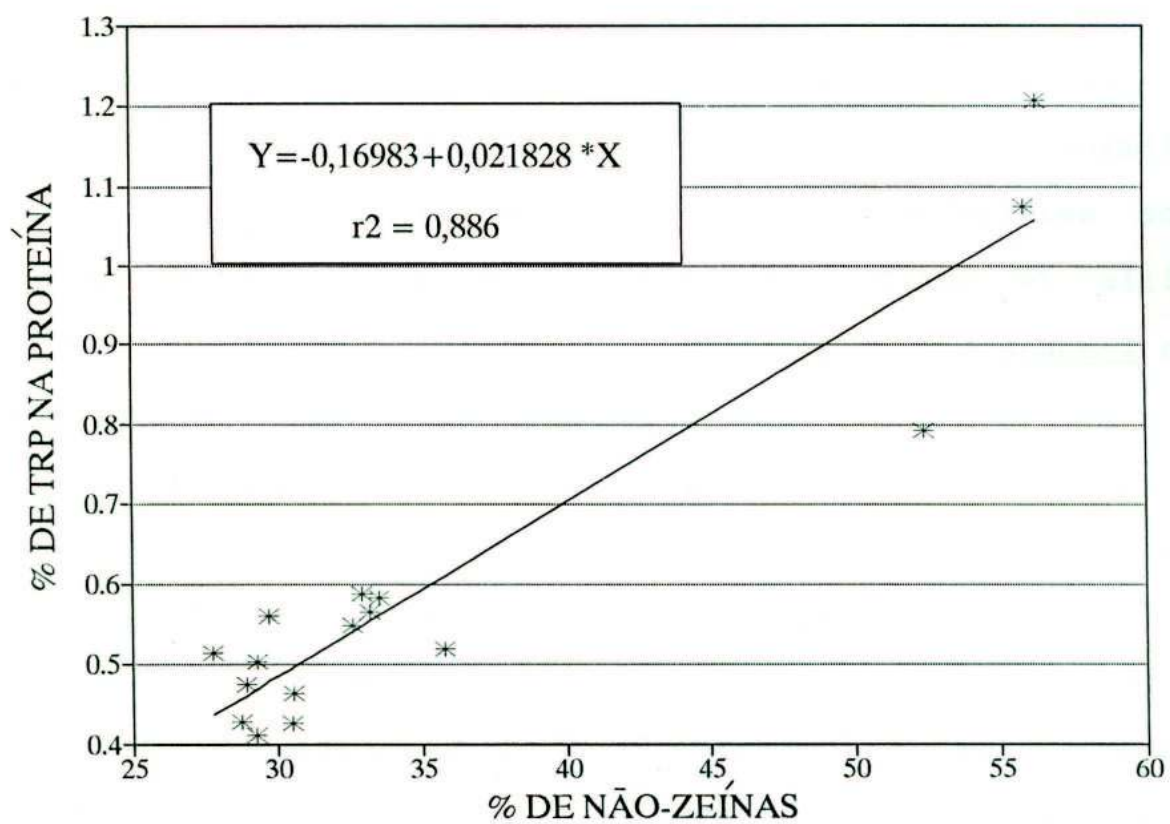


FIGURA 9 - Correlação Entre a Fração Não-Zeína e a Qualidade Protéica nos Genótipos Normais, QPM, Indígenas e opaco-2.

banda de 32 kD, a proteína b-32, nos genótipos indígenas e normais, banda esta que estava ausente nos genótipos opaco-2 e QPM (Figura 10), confirmando que a opacidade e a baixa densidade dos grãos indígenas não é conferida pela mutação no gene opaco-2.

O endosperma do milho é composto, basicamente, por amido e proteínas; portanto, a interação entre esses componentes deve também influenciar a densidade dos grãos (ROBUTTI et alii, 1974). Como os genótipos indígenas não se comportam como os mutantes já descritos na literatura, para a síntese e deposição de proteínas, resolveu-se investigar alguma possível alteração ao nível da deposição de amido. Esses mutantes geralmente se distinguem dos genótipos normais pelo seu elevado teor de açúcares solúveis no endosperma (CREECH, 1965; TSAI, 1983). Este não parece ser o caso dos genótipos indígenas, uma vez que os teores de açúcares solúveis desses são semelhantes ao dos normais (Quadro 2) e aproximadamente cinco vezes inferiores aos apresentados pelo milho doce Nutrimaiz (SILVA et alii, 1978), que contém os genes recessivos sugary-2 e opaco-2 em homozigose.

As populações indígenas analisadas no presente trabalho apresentaram as seguintes características: grãos opacos com baixas densidades e qualidades protéicas, teores normais de zeína, não-zeína e da proteína b-32, teores variáveis da gama-zeína de 27 kD, proporção normal entre as frações alfa e gama-zeína e teor normal de açúcares solúveis no endosperma. Com este conjunto de características, essas populações indígenas não se

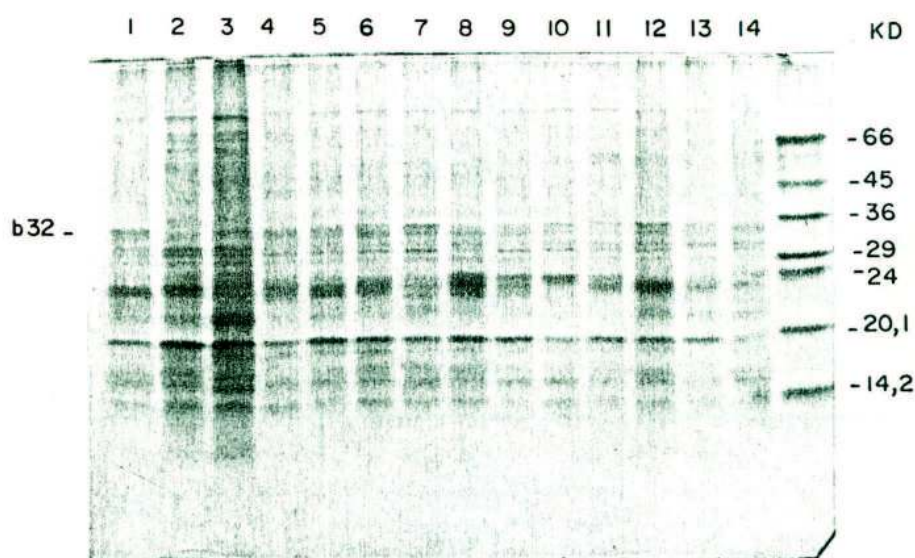


FIGURA 10 - Análise da Fração S-30 por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) em Gradiente de 10 a 18%, Extraída Segundo Soave et alii (1981). Em Cada Canaleta Foram Aplicados 30 ul do Extrato, Equivalente a 3 mg do Endosperma, de Acordo com a Sequência: 1: BR-106, 2: IACo2, 3: BR-451, 4: AC-81, 5: MT-1, 6: MT-10, 7: MT-24, 8: BOL-I, 9: BOL-II, 10: MT-II, 11: MT-III, 12: Nodzob Udza, 13: PR-1, 14: Preto Chileno.

QUADRO 2 - Teor de Açúcares Solúveis no Endosperma dos Genótipos Normais, QPM, opaco-2 e Indígenas

Genótipos	Porcentagem de Açúcares Solúveis
BR-106	0,69
BR-201	1,12
BR-451	0,72
IACo2-IV	0,94
UFVo2	1,09
AC-81	0,85
MT-1	0,69
MT-10	0,97
MT-24	1,13
BOL-I	0,77
BOL-II	0,81
MT-II	0,71
MT-III	0,85
Nodzob Udza	0,86
PR-1	0,81
Preto Chileno	0,60
Média	0,85
Nutrimaiz (<u>o-2</u> , <u>s-1</u>)	4,88*
Maya Normal	0,82*

* Silva et alii (1978).

assemelham a nenhum dos mutantes até então descritos na literatura, para a síntese de zeínas e de amido no endosperma do milho (TSAI, 1983; DI FONZO et alii, 1991; FEIX e QUAYLE, 1993).

Tais resultados, no entanto, são insuficientes para sustentar suposições sobre possíveis alterações que possam ter ocorrido, ao nível molecular, com a gama-zeína de 27 kD, sendo necessária uma série de estudos envolvendo imunocitocalização dos diferentes tipos de zeína nos corpos protéicos e no endosperma, microscopia eletrônica, clonagem do gene da gama-zeína e análise da seqüência de nucleotídeos da região promotora e codificadora e da seqüência de aminoácidos da proteína. A comparação dos dados então obtidos entre os diferentes genótipos indígenas e os materiais já estudados molecularmente poderá trazer grandes avanços para a compreensão do complexo sistema envolvido na síntese das zeínas.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O nível de não-zeínas no endosperma apresentou uma alta correlação com a qualidade protéica, podendo ser utilizado como mais um parâmetro na seleção de milhos com alta qualidade protéica, em programas de melhoramento genético.

As populações indígenas de milho caracterizadas no presente trabalho apresentaram grãos opacos e de baixa densidade, como os mutantes opaco-2, e baixa qualidade protéica, como os genótipos normais. Análises das zeínas, não-zeínas e açúcares solúveis no endosperma desses genótipos não apresentaram diferença significativa em relação aos genótipos normais. Com relação à quantidade relativa da gama-zeína de 27 kD, as populações indígenas foram divididas em dois grupos distintos, um grupo apresentando níveis reduzidos e o outro, com níveis normais dessa proteína. As populações indígenas, portanto, parecem constituir uma nova classe de mutantes para a

textura do grão. Uma caracterização mais aprofundada em nível molecular dessas populações indígenas poderá contribuir para a elucidação dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na determinação da textura do endosperma.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ARGOS, P.; PEDERSEN, K.; MARKS, M.D.; LARKINS, B.A. A structural model for maize zein protein. *J. Biol. Chem.*, 257:9984-9990, 1982.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTRY. Official methods of analysis, 13. ed. Washington, D.C., 1980. 858 p.
- BASS, H.W.; WEBSTER, C.; O'BRIAN, G.R.; ROBERTS, J.K.M.; BOSTON, R.S. A maize ribosome-inactivating protein controlled by the transcriptional activator Opaque-2. *The Plant Cell*, 4:225-234, 1992.
- BENNER, M.S.; PHILLIPS, R.L.; KIRIHARA, J.A.; MESSING, J.W. Genetic analysis of methionine-rich storage protein accumulation in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 78:761-767, 1989.
- BJARNASON, M. & VASAL, S.K. Breeding of quality protein maize (QPM). In: JANICK, J., ed. *Plant breeding reviews*. Westport, AVI Publishing, 1992. v. 9, p. 181-216.
- BURR, B.; BURR, F.A.; RUBENSTEIN, I.; SIMON, M.N. Purification and translation of zein messenger RNA from maize endosperm protein bodies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75:696-700, 1978.
- CREECH, R.G. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. *Genetics*, 52:1175-1186, 1965.
- DALBY, A. & TSAI, C.Y. Comparisons of lysine and zein and non-zein proteins contents in immature and mature maize endosperm mutants. *Crop Sci.*, 15:513-515, 1975.

- DAS, O.P.; MINZI, S.L.; KOURY, M.; BENNER, M.; MESSING, J. A somatic gene rearrangement contributing to genetic diversity in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87:7809-7813, 1990.
- DI FONZO, N.; FORNASARI, E.; SALAMINI, F.; REGGIANE, R.; SOAVE, C. Interaction of the mutants floury-2, opaque-7 with opaque-2 in the synthesis of endosperm proteins. *J. Hered.*, 71:397-402, 1980.
- DI FONZO, N.; MANZOCCHI, L.; SALAMINI, F.; SOAVE, C. Purification and properties of an endospermic protein of maize associated with opaque-2 and opaque-6 genes. *Planta*, 167:587-594, 1986.
- DI FONZO, N.; HARTINGS, H.; BREMBILLA, M.; MOTTO, M.; SOAVE, C.; PALAU, J.; RHODE, W.; SALAMINI, F. The b-32 protein from maize endosperm, an albumin regulated by the O2 locus: Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences. *Mol. Gen. Genet.*, 212:481-487, 1988.
- DI FONZO, N.; HARTINGS, H.; MADDALONI, M.; LOHMER, S.; THOMPSON, R.; SALAMINI, F.; MOTTO, M. Genetic and molecular studies in maize. In: HERMANN, R.G. & LARKINS, B.A., eds. *Plant Mol. Biol.* New York, Plenum Press, 1991. v.2, p. 627-634.
- DOLL, H. Nutritional aspects of cereal proteins and approaches to overcome their deficiencies. *Phil. Trans. Res. Soc. London*, 304:373-380, 1984.
- DOMBRINK-KURTZMAN, M.A. & BIETZ, J.A. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. *Cereal Chem.*, 70:105-108, 1993.
- ESEN, A.; CONROY, I.M.; WANG, S. A simple and rapid dot immunobinding assay for zein and other prolamins. *Anal. Biochem.*, 132:462-467, 1983.
- ESEN, A. Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. *Plant Physiol.*, 80:623-627, 1986.
- ESEN, A. A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (Zea mays L.). *J. Cereal Chem.*, 5:117-128, 1987.
- ESEN, A. & STETLER, D.A. Immunocytochemical localization of delta-zein in the protein bodies of maize endosperm cells. *Amer. J. Bot.*, 79:243-248, 1992.
- FEIX, G. & QUAYLE, T. Structure and expression of zein genes of maize. *Critical Rev. Plant Sci.*, 12:111-127, 1993.

- FLING, S.P. & GREGERSON, D.S. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.*, 155:83-88, 1986.
- GEETHA, K.B.; LENDING, C.R.; LOPES, M.A.; WALLACE, J.C.; LARKINS, B.A. Opaque-2 modifiers increase gamma-zein synthesis and alter its spacial distribution in maize endosperm. *The Plant Cell*, 3:1207-1219, 1991.
- GENTINETTA, E.; MAGGIORE, T.; SALAMINI, F.; LORENZONI, C.; PIOLI, F.; SOAVE, C. Protein studies in 46 opaque-2 strains with modified endosperm texture. *Maydica*, 20:145-164, 1975.
- GERAGHTY, D.; PEIFER, M.A.; RUBENSTEIN, I.; MESSING, J. The primary structure of a plant storage protein: zein. *Nucl. Acids Res.*, 9:5163-5174, 1981.
- GIANAZZA, E.; RIGHETTI, P.H.; PIOLLI, F.; GALANTE, E.; SOAVE, C. Size and charge heterogeneity of zein in normal and opaque-2 maize endosperm. *Maydica*, 21:1-17, 1976.
- HAGEN, G. & RUBENSTEIN, I. Complex organization of zein genes in maize. *Gene*, 13:239-249, 1981.
- HASTINGS, H.; BONANOMI, S.; SOAVE, C.; DI FONZO, N.; SALAMINI, F. Mapping genes for minor zein SDS subunits and revision of zein genes nomenclature. *Genet. Agric.*, 38:447-464, 1984.
- HERNANDEZ, H.H. & BATES, L.S. A modified method for a rapid tryptophan analysis in maize. Mexico, D.C., International Maize and Wheat Improvement Center, 1969. 7 p. (Research Bulletin, 13).
- JONES, R.A. Effects of floury-2 locus on zein accumulation and RNA metabolism during maize endosperm development. *Biochem. Genet.*, 16:27-38, 1978.
- KIES, C. & FOX, M. Interrelationships of leucine with lysine, tryptophan and niacin as they influence protein value of cereal grains for humans. *Cereal Chem.*, 49:223-231, 1972.
- KIRIHARA, J.A.; HUNSPERGER, J.P.; MAHONEY, W.C.; MESSING, J.W. Differential expression of a gene for a methionine-rich storage protein in maize. *Mol. Gen. Genet.*, 211:477-484, 1988.
- KNIEP, K.R. & MASON, S.C. Kernel breakage and density of normal and opaque-2 maize grain as influenced by irrigation and nitrogen. *Crop Sci.*, 29:159-163, 1989.
- KODRZYCKI, R.; BOSTON, K.S.; LARKINS, B.A. The opaque-2 mutation of maize differentially reduces zein gene

- transcription. *The Plant Cell*, 1:105-114, 1989.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-684, 1970.
- LANDRY, J. & MOUREAUX, T. Heterogeneity of the glutelins of the grain of corn: selective extraction and composition in amino acids of the insoluble fractions. *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 52:1021-1037, 1970.
- LANGRIDGE, P.; PINTOR-TORO, J.A.; FEIX, G. Zein precursor mRNAs from maize endosperm. *Mol. Gen. Genet.*, 187:432-438, 1982.
- LANGRIDGE, P. & FEIX, G. A zein gene of maize is transcribed from two widely separated promoter regions. *Cell*, 34:1015-1022, 1983.
- LARKINS, B.A.; PEDERSEN, K.; HANDA, A.K.; HURKMAN, W.J.; SMITH, L.D. Synthesis and processing of maize storage proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76:6448-6452, 1979.
- LARKINS, B.A.; WALLACE, J.C.; GALILI, G.; LENDING, C.R.; KAWATA, E.E. Structural analysis and modification of maize storage proteins. *Dev. Ind. Microbiol.*, 30:203-209, 1989.
- LARKINS, B.A.; LENDING, C.R.; WALLACE, G.G.; LOPES, M.A. Application of biotechnology for improving cereal protein quality. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SORGHUM NUTRITIONAL QUALITY. Proceedings... West Lafayette, Indiana, Purdue University, 1991b. p.155-163.
- LENDING, C.R.; KRIZ, A.L.; BRACKER, C.E.; LARKINS, B.A. Structure of maize protein bodies and immunocytochemical localization of zein. *Protoplasma*, 143:51-62, 1988.
- LENDING, C.R. & LARKINS, B.A. Changes in zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *The Plant Cell*, 1:1011-1023, 1989.
- LOPES, M.A. Fractionation and characterization of storage proteins in hard-endosperm opaque-2 maize. West Lafayette, Purdue University. 1989. 115 p. (Tese M.S.)
- LOPES, M.A. & LARKINS, B.A. Gamma-zein content is related to endosperm modification in quality protein maize. *Crop Sci.*, 31:1655-1662, 1991a.
- LOPES, M.A. & LARKINS, B.A. Genetic regulation of modified protein composition in hard-endosperm opaque-2 maize (QPM). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SORGHUM NUTRITIONAL QUALITY. Proceedings... West Lafayette, Indiana, Purdue University, 1991b. p. 143-154.

- LOPES, M.A. Genetic and biochemical characterization of the maize mutants floury-2 and modified opaque-2. Tucson, University of Arizona. 1993. 269 p. (Tese Ph.D.)
- MAGNAVACA, R.; PAIVA, E.; WINKLER, E.I.; CARVALHO, H.W.L.; SILVA FILHO, M.C.; PEIXOTO, M.J.V.V.D. Avaliação de populações de milho de alta qualidade protéica. *Pesq. Agropec. Bras.*, 23:1263-1268, 1988.
- MA, Y. & NELSON, O.E. Amino acid composition and storage protein in two new high lysine mutants in maize. *Cereal Chem.*, 52:412-419, 1975.
- MARKS, M.D. & LARKINS, B.A. Analysis of sequence heterogeneity among zein messenger RNAs. *J. Biol. Chem.*, 257:9976-9983, 1982.
- MARKS, M.D.; LINDELL, J.S.; LARKINS, B.A. Nucleotide sequence analysis of zein mRNAs from maize endosperm. *J. Biol. Chem.*, 260:16451-16459, 1985.
- MERTZ, E.T.; BATES, L.S.; NELSON, O.E. Mutant genes that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science*, 145:279-280, 1964.
- MERTZ, E.T. Genetic and biochemical control of grain protein synthesis in normal and high lysine cereals. *World Rev. Nutr. Diet.*, 48:222-262, 1986.
- MISRA, P.S.; JAMBANATHAN, R.; MERTZ, E.T.; GLOVER, D.V.; BARBOSA, H.M.; McWRITTER, K.S. Endosperm protein synthesis in maize mutants with increased lysine content. *Science*, 176:1425-1426, 1972.
- MISRA, P.S.; MERTZ, R.T.; GLOVER, D.V. Studies on corn proteins. VII. Developmental changes in endosperm proteins of high-lysine mutants. *Cereal Chem.*, 52: 734-739, 1975.
- MOTTO, M.; DI FONZO, N., HARTINGS, H.; MADDALONI, M.; SALAMINI, F.; SOAVE, C.; THOMPSON, R.D. Regulatory genes affecting maize storage protein synthesis. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, 6:87-114, 1989.
- MURPHY, J.J & DALBY, A. Changes in the protein fraction of developing normal and opaque-2 maize endosperm. *Cereal Chem.*, 48:336-341, 1971.
- MURRAY, M.; CRAMER, J.; MA, Y.; WEST, D.; ROMERO-SVERSON, J.; PITAS, J.; DEMARS, S.; VILBRANDT, L.; KIRSHMAN, J.; MACLEESTER, R.; SCHILZ, J.; LOTZER, J. Agrigenetics maize RFLP linkage map. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 68:89-90, 1988.
- NELSON, O.E. Genetic modification of protein quality in plants. *Adv. Agron.*, 21:171-194, 1969.

- NELSON, O.E.; MERTZ, E.T.; BATES, L.S. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. *Science*, 150:1469-1470, 1965.
- ORTEGA, E.I. & BATES, L.S. Biochemical and agronomic studies of two modified hard endosperm opaque-2 maize (*Zea mays*) populations. *Cereal Chem.*, 60:107-111, 1983.
- OSBORNE, T.B. & MENDEL, L.B. Nutritive properties of protein of maize kernel. *J. Biol. Chem.*, 18:1-16, 1914.
- PAIVA, E.; KRIZ, A.L.; PEIXOTO, M.J.V.V.D.; WALLACE, J.D.; LARKINS, B.A. Quantitation and distribution of gamma-zein in the endosperm of maize kernels. *Cereal Chem.*, 68:276-279, 1991.
- PAIVA, E.; VASCONCELOS, M.J.V.; PARENTONI, S.N.; GAMA, E.E.G.; MAGNAVACA, R. Seleção de progênies de milho doce de alto valor nutritivo com auxílio de técnicas eletroforéticas. *Pesq. Agropec. Bras.*, 27: 1213-1218, 1992.
- PARK, W.D.; LEWIS, E.D.; RUBENSTEIN, I. Heterogeneity of zein mRNA and protein in maize. *Plant Physiol.*, 65:98-106, 1980.
- PEDERSEN, K.; BLOOM, K.S.; ANDERSON, J.N.; GLOVER, D.V.; LARKINS, B.A. Analysis of complexity and frequency of zein genes in maize genome. *Biochemistry*, 19:1644-1650, 1980.
- PEDERSEN, K.; DEVEREUX, J.; WILSON, D.R.; SHELDON, E.; LARKINS, B.A. Cloning and sequence analysis reveal structural variations among related zein genes in maize. *Cell*, 29:1015-1026, 1982.
- PEDERSEN, K.; ARGOS, P.; NARAVANA, S.V.L.; LARKINS, B.A. Sequence analysis and characterization of a maize gene encoding a high-sulfur zein protein of Mr. 15,000. *J. Biol. Chem.*, 261:6279-6284, 1986.
- POMERANZ, Y.; MARTIN, C.R.; TRAYLOR, D.D.; LAI, F.S. Corn hardness determination. *Cereal Chem.*, 61:147-150, 1984.
- PRAT, S.; CORDATAS, J.; PUIGDOMENECH, P.; PALAU, J. Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of the maize endosperm protein glutelin-2. *Nucl. Acids Res.*, 13:1493-1504, 1985.
- RIGHETTI, P.G.; GIANAZZA, E.; VIOTTI, A.; SOAVE, C. Heterogeneity of storage proteins in maize. *Planta*, 136:115-123, 1977.

- RIZZI, E.; BALCONI, C.; AJMONE-MARSAN, P.; SALAMINI, F.; THOMPSON, R.; MOTTO, M. Growth requirements of the opaque-6 mutant and its relationship with the gene encoding the RIP protein B-32 of maize endosperm. *Maydica*, 37:275-281, 1992.
- ROBUTTI, J.L.; HOSENEY, R.C.; WASSOM, C.W. Modified opaque-2 corn endosperms. II. Structure viewed with a scanning electron microscope. *Cereal Chem.*, 51:173-180, 1974.
- RUBENSTEIN, I. & GERAGTHY, D.E. The genetic organization of zein. In: *Adv. Cereal Sci. Technol.*, 8:297-315, 1985.
- SALAMINI, F.; DI FONZO, N.; FORNASARI, E.; GENTINETTA, E.; REGGIANI, R.; SOAVE, C. Mucronate, Mc, a dominant gene of maize which interact with opaque-2 to suppress zein synthesis. *Theor. Appl. Gen.*, 65:123-128, 1983.
- SCHMIDT, R.J.; BURR, F.A.; BURR, B. Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus opaque-2. *Science*, 238:960-963, 1987.
- SCHMIDT, R.J.; KETUDAT, M.; AUKERMAN, M.J.; HOSCHEK, G. Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22 kD zein genes. *The Plant Cell*, 4:689-700, 1992.
- SHULL, J.M. Developmental study of a hard, intermediate and soft variety of sorghum. West Lafayette, Purdue University. 1988. 85 p. (Tese M.S.)
- SILVA, W.J.; TEIXEIRA, J.P.F.; ARRUDA, P.; LOVATO, M.B. Nutrimaiz, a tropical sweet maize cultivar of high nutritional value. *Maydica*, 23:129-136, 1978.
- SOAVE, C.; PIOLI, F.; VIOTTI, A.; SALAMINI, F.; RIGHETTI, P.G. Synthesis and heterogeneity of endosperm proteins in normal and opaque-2 maize. *Maydica*, 20:83-94, 1975.
- SOAVE, C.; SUMAN, N.; VIOTTI, A.; SALAMINI, F. Linkage relationships between regulatory and structural gene loci involved in zein synthesis in maize. *Theor. Appl. Gen.*, 52:263-267, 1978.
- SOAVE, C.; TARDANI, L.; DI FONZO, N.; SALAMINI, F. Zein level in maize endosperm depends on a protein under control of the opaque-2 and opaque-6 loci. *Cell*, 27:403-410, 1981.
- SOAVE, C. & SALAMINI, F. Organization and regulation of zein genes in maize endosperm. *Phil. Trans. Res. Soc. London*, 304:341-347, 1984.

- SPENA, A.; VIOTTI, A.; PIRROTTA, V. Two adjacent genomic zein sequences: structure, organization and tissue-specific restriction pattern. *J. Mol. Biol.*, 169:799-811, 1983.
- STIRPE, F.; BARBIERI, W.; BATTELLI, M.G.; SORIA, M.; LAPPI, D.A. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology*, 10:405-411, 1992.
- TSAI, L.Y. Early termination of zein accumulation in opaque-2 maize mutant. *Maydica*, 24:129-140, 1979.
- TSAI, L.Y. Genetics of storage protein in maize. In: JANICK, J. ed. *Plant breeding reviews*. Westport, AVI Publishing, 1983. v.1, p. 103-138.
- UEDA, T.; WAVERCZA, W.; WARD, K.; SHERN, N.; KETUDAT, M.; SCHMIDT, R.J.; MESSING, J. Mutations of the 22 and 27 kD zein promoters affect transactivation by the opaque-2 protein. *The Plant Cell*, 4: 701-709, 1992.
- VALENTINI, G.; SOAVE, C.; OTTAVIANO, E. Chromosomal location of zein genes in Zea mays. *Heredity*, 42:33-40, 1979.
- VARAGONA, M.J.; SCHMIDT, R.J.; RAIKHEL, N.V. Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of maize regulatory protein Opaque-2. *The Plant Cell*, 4:1213-1227, 1992.
- VASAL, S.K.; VILLEGAS, E.; BJARNASON, M.; GELAW, B.; GOERTZ, P. Genetic modifiers and breeding strategies in developing hard endosperm opaque-2 materials. In: POLLMER, W.G. & PHILLIPS, R.H. eds. *Improvement of quality traits of maize grain and silage use*. London, Martinus Nijhoff. 1980. p.37-73.
- WALLACE, J.C.; LOPES, M.A.; PAIVA, E.; LARKINS, B.A. New method for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of gamma-zein in modified opaque-2 maize. *Plant Physiol.*, 92:191-196, 1990.
- WANG, S.Z. & ESEN, A. Primary structure of a proline-rich zein and its cDNA. *Plant Physiol.*, 81:70-74, 1986.
- WILSON, C.M.; SHEWRY, P.R.; MIFLIN, B.J. Maize endosperm proteins compared by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Cereal Chem.*, 58:275-281, 1981.
- WILSON, D.R. & LARKINS, B.A. Zein gene organization in maize and related grasses. *J. Mol. Evol.*, 20:330-340, 1984.

- WILSON, C.M. A nomenclature for zein polypeptides based on isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chem.*, 62:361-365, 1985.
- WILSON, C.M. Multiple zeins from maize endosperms characterized by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.*, 95:777-786, 1991.
- WOLF, M.J.; BUZAN, C.L.; MAC MASTERS, M.M.; RIST, C.E. Structure of the mature corn kernel. I. Gross anatomy and structure relationship. *Cereal Chem.*, 29: 321-333, 1952.
- WOLF, M.J.; KHOO, U.; SECKINGER, H.L. Subcellular structure of endosperm protein in high-lysine and normal corn. *Science*, 157:556-557, 1967.
- WOLF, M.J.; KHOO, U.; SECKINGER, H.L. Distribution and subcellular structure of endosperm protein in varieties of ordinary and high-lysine maize. *Cereal Chem.*, 46:253-263, 1969.

APÊNDICE

APÊNDICE A

QUADRO 1A - Densidade dos Grãos de Milho Normais, QPM, opaco-2 e Indígenas

Genótipos	Densidade dos Grãos (g/ml)	*
BR - 106	1,30	a
BR - 201	1,28	a
BR - 451	1,27	a
MT - III	1,15	b
PR - I	1,15	b c
UFV o2	1,14	b c
MT - II	1,12	b c
BOL - I	1,12	b c
Preto Chileno	1,11	b c
IAC o2 - IV	1,11	b c
BOL - II	1,11	b c
MT - 01	1,10	b c
AC - 81	1,09	b c
MT - 10	1,09	b c
MT - 24	1,08	b c
Nodzob Udza	1,07	c

* Média de três repetições, pelo Teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

QUADRO 2A - Qualidade Protéica dos Genótipos Normais, QPM, opaco-2 e Indígenas, Medida pelo Teor Triptofano e Lisina na Proteína do Endosperma Segundo Hernandez e Bates (1969)

Genótipos	% na Proteína Total		
	Triptofano*	Lisina*	
IAC o2 - IV	1,21	5,28	a
UFV o2	1,08	4,74	a
BR - 451	0,79	3,59	b
AC - 81	0,58	2,73	c
MT - 24	0,58	2,73	c
MT - 10	0,57	2,67	c
MT - 01	0,56	2,64	c d
BOL - I	0,55	2,60	c d
BR - 201	0,52	2,48	c d
Nodzob Udza	0,51	2,45	c d
BOL - II	0,50	2,41	c d
PR - I	0,47	2,26	c d
MT - II	0,46	2,25	c d
MT - III	0,43	2,11	d
BR - 106	0,43	2,11	d
Preto Chileno	0,41	2,03	d

* Média de três repetições, pelo teste de Tukey, 1% de probabilidade.

QUADRO 3A - Porcentagem das Zeínas e Nao-Zeínas na Proteína Total, Extraída pelo Método de Wallace et alii (1990) e Quantificada pelo Método Micro-Kjeldhal

Genótipos	% Zeínas*	% Não-zeínas*	% Perda
BR-106	65,37 a	30,50 b	4,13
BR-201	61,83 a	35,77 b	2,40
BR-451	41,30 b	52,40 a	6,30
IACo2-IV	36,13 b	56,30 a	7,57
UFVo2	38,77 b	55,90 a	5,33
AC-81	62,80 a	32,90 b	4,30
MT-01	64,56 a	29,73 b	5,71
MT-10	60,83 a	33,20 b	5,97
MT-24	65,37 a	33,53 b	1,10
BOL-I	65,83 a	32,57 b	1,60
BOL-II	63,63 a	29,30 b	7,07
MT-II	62,23 a	30,53 b	7,24
MT-III	65,90 a	28,73 b	5,37
Nodzob Udza	66,50 a	27,77 b	5,73
PR-1	63,70 a	29,93 b	6,37
Preto Chileno	65,20 a	29,27 b	5,53

* Média de três repetições, pelo teste Tukey, 1% de probabilidade.

QUADRO 4A - Porcentagem Relativa dos Componentes da Fração Zeína, Obtida por Densitometria à Laser dos Géis de Poliacrilamida

Polipeptídeos que Compõe a Fração Zeínas							
Genótipos	Alfa	Gama	Delta	Gama	Beta	Gama	Gama
kD	19-22	27	10	12	14	16	58
BR-106	41,2a	26,3b	3,8d	3,6b	7,6c	5,5d	12,0a
BR-201	41,0a	27,0b	3,0d	5,0b	7,0c	5,0d	12,0a
BR-451	18,8b	40,9a	3,1d	9,7a	2,7d	13,6b	11,2a
IACo2	19,9b	28,8b	5,0c	11,8a	4,8d	17,3a	12,4a
UFVo2	19,7b	28,9b	4,8cd	11,5a	4,7d	17,9a	12,5a
AC-81	41,6a	17,3c	9,3a	4,6b	10,7ab	8,9c	7,6b
MT-01	41,8a	19,7c	7,2ab	4,7b	9,8b	7,8c	9,0b
MT-10	42,6a	19,4c	8,6a	4,7b	11,0a	7,9c	5,8c
MT-24	41,0a	17,0c	9,3a	4,0b	12,2a	7,7c	8,8b
BOL-I	40,7a	26,2b	6,6b	3,3b	9,6b	5,6d	8,0b
BOL-II	40,8a	24,3b	6,2b	4,0b	9,8b	6,5c	7,8b
MT-II	39,7a	25,9b	6,2bc	5,0b	10,0b	6,4c	6,8c
MT-III	44,0a	24,0b	4,7c	5,2b	10,3b	6,8c	5,0c
N. U.	41,5a	19,7c	8,6a	5,2b	11,6a	7,7c	5,7c
PR-1	43,5a	25,0b	4,0d	4,8b	10,6ab	4,9d	7,2c
P. C.	43,8a	18,4c	7,9a	3,6b	11,4a	6,9c	7,9b

. Os valores seguidos de letras indicam diferenças entre médias, detectadas pelo teste Tukey, a 1% de probabilidade.

. Abreviaturas: N.U. - Nodzob Udza

P.C. - Preto Chileno

QUADRO 5A -Quantidade de Gama-Zeína de 27 kD Calculada Utilizando a Média dos Valores Absolutos Obtidos por Densitometria a Laser em Função da Quantidade Presente no Genótipo Normal BR-106

Genótipos	Quantidade Relativa de Gama-Zeína
BR-451	1,915 a
PR-1	1,023 b
BOL-I	1,019 b
BR-106	1,000 b
MT-III	0,998 b
BR-201	0,988 b
BOL-II	0,981 b
MT-II	0,970 b c
MT-24	0,820 b c d
UFVo2	0,808 b c d
IACo2-IV	0,765 b c d
Nodzob Udza	0,681 c d
MT-1	0,675 c d
Preto Chileno	0,673 c d
MT-10	0,621 d
AC-81	0,548 d

* Média de três repetições, pelo teste Tukey, a 1% de probabilidade.