

CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES PROTÉICOS DO ENDOSPERMA DO MILHO E SUA RELAÇÃO COM A ESTRUTURA FÍSICA DO GRÃO¹

RAIMUNDO PEREIRA DA SILVA²
LEANDRO LOPES LOGUERCIO³
EDILSON PAIVA³

RESUMO - As propriedades físicas do grão de milho são de grande importância no processamento desse cereal, embora pouco se conheça sobre os fatores bioquímicos, moleculares e estruturais que afetam essas características. A conversão do endosperma opaco em vítreo envolve uma relação intrínseca entre proteínas e corpos protéicos, numa distribuição espacial e temporal específica durante todo o período de formação do endosperma. Desse modo, o acompanhamento das alterações quantitativas das frações protéicas do endosperma poderia contribuir para o conhecimento dos mecanismos genéticos e bioquímicos envolvidos no processo. Utilizando-se de um genótipo indígena 'BOL II' (mutante), com característica fenotípica de endosperma opaco e mole, e uma linhagem Híbrido Simples (pater-

no) do 'BR201', de endosperma duro e vítreo, foram feitas avaliações de densidade (método da proveta) e dos padrões protéicos desses genótipos individualizados e dos cruzamentos recíprocos entre eles, mediante o uso de eletroforese de poliacrilamida e densitometria a laser. Os padrões protéicos referentes às gerações F₁, F₂ e F₃ desses cruzamentos e de outros genótipos indígenas referenciais foram estudados. Os resultados indicaram que a herança de densidade do endosperma é do tipo monogênica. Além disso, as análises da geração F_{2,3} revelaram que existe, para a fração protéica das 'não-zeínas', um padrão de polipeptídeos que pode estar associado à característica física de opacidade/vitrosidade do endosperma, podendo, assim, servir como um indicador molecular para essa característica.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Milho, endosperma, proteína, estrutura física, dureza.

CHARACTERIZATION OF THE PROTEIN PATTERNS FROM MAIZE ENDOSPERM AND THEIR RELATIONSHIP WITH THE PHYSICAL STRUCTURE OF THE GRAIN

ABSTRACT - The physical properties of corn grains are very important for its processing, although little is known about the biochemical, molecular and structural factors affecting this trait. The conversion of an opaque into a vitreous endosperm involves an intrinsic relationship between proteins and protein bodies, in a specific spatial and temporal distribution throughout the whole period of endosperm formation. Thus, a contribution to the knowledge about the genetic and biochemical mechanisms involved in this process could be achieved by following quantitative changes in the

protein fractions of the endosperm. By using both an exotic mutant genotype ('BOL II'), with opaque and soft endosperm, and a Single Hybrid (paternal) line of the 'BR201' cultivar, with hard and vitreous endosperm, the protein patterns for these individual genotypes, as well as for their reciprocal crosses, were evaluated through polyacrylamide gel electrophoresis and laser densitometry. The protein patterns referring to the F₁, F₂ and F_{2,3} generations from those crosses, and to the other exotic genotypes (used as a reference), were studied. The results indicated that endosperm

1. Parte da dissertação apresentada pelo primeiro autor à UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS - UFLA, para a obtenção do grau de Mestre em Agronomia - Área: Genética e Melhoramento de Plantas.

2. Engenheiro Agrônomo, Mestrando em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas na UFLA, Caixa Postal 37 - 37.200-000 - Lavras - MG.

3. Engenheiro Agrônomo, PhD, EMBRAPA/CNPMS, Caixa Postal 151, Sete Lagoas - MG

density is a monogenic trait. Furthermore, the analyses for the F₃ generation revealed, at least for the 'non-zein' fraction, that there is a possible association

between the polypeptide pattern obtained for the endosperm and its opaque/vitreous phenotype, which might serve as a molecular tracer for this trait.

INDEX TERMS: Maize, endosperm, protein, physical structure, hardness

INTRODUÇÃO

Apesar do potencial que o milho apresenta como fonte protéica, contendo cerca de 10% de proteína na matéria seca do grão, ele é considerado um alimento energético para seres humanos e animais monogástricos, graças a sua deficiência em aminoácidos essenciais, como a lisina e o triptofano (Lopes, 1993). O endosperma do milho é um tecido de armazenamento que corresponde a aproximadamente 85% do peso seco do grão. Por constituírem a maior parte do grão, os componentes do endosperma são essenciais na definição das propriedades químicas e físicas (Wolf et al., 1952). Dentre as proteínas totais do endosperma, a fração denominada 'não-zeína' é composta por proteínas estruturais, inibidores de proteases, enzimas, etc., com funções distintas das proteínas de reserva, ou 'zeínas'. Entretanto, as não-zeínas também podem atuar secundariamente como reserva, possuindo, inclusive, um valor nutricional maior e mais balanceado (Wallace et al., 1990).

Um frouxo empacotamento dos componentes do endosperma leva à formação de espaços preenchidos com ar, que bloqueiam a passagem da luz através da semente madura; por essa razão, mutantes desse tipo são geralmente conhecidos como opacos (Lopes, 1993; Robutti et al, 1974). Desde o surgimento do mutante *opaco-2* (02), caracterizado pelo elevado teor de lisina e triptofano, e apresentando fenótipo opaco, vários outros mutantes têm sido caracterizados (Soave e Salamini, 1984; Lopes, 1993). Por causa da presença de características desejáveis, muitos desses mutantes vêm sendo incorporados em programas de melhoramento. Contudo, em virtude de outros efeitos pleiotrópicos e deletérios associados a esse fenótipo, o seu aproveitamento só é possível por meio do uso de modificadores genéticos capazes de restaurar as características agrônomicas desejáveis. Um desses efeitos indesejáveis seria, por exemplo, o fato de sua semente possuir um endosperma com pouca densidade, o que a torna bastante suscetível ao ataque de insetos; além disso, quebra facilmente durante o manuseio. Portanto, o estudo e a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação desses genes são de fundamental importância para o seu aproveitamento no desenvolvimento de variedades com

grãos melhorados no que se refere à qualidade protéica e às características físicas.

O aperfeiçoamento de técnicas biotecnológicas permitiram o avanço no conhecimento das bases genéticas e dos mecanismos envolvidos na expressão das várias características de interesse agrônomico, tais como: dureza do grão, teor de aminoácidos essenciais, entre outros. Essas ferramentas constituem um importante apoio aos programas de melhoramento voltados para obtenção de milhos QPM, ou "*Quality Protein Maize*". Esses são genótipos do tipo 'opaco-modificados', semelhantes aos mutantes *opacos-2* em termos de qualidade nutricional, diferindo, porém, no aspecto físico do endosperma. Há também fenótipos de milhos indígenas que apresentam grãos opacos de baixa densidade, semelhantes aos mutantes *opaco-2*; porém, apresentam baixa qualidade protéica, como os fenótipos comerciais (vitreos). Observou-se que essas populações indígenas não estavam incluídas em nenhuma classe conhecida de mutantes para a densidade do endosperma, apresentando, portanto, um grande potencial para futuros estudos acerca dos mecanismos que afetam a estrutura e qualidade protéica do endosperma em milho.

A densidade é característica que está relacionada com a dureza: o grão mais denso é conseqüentemente mais duro, possui um maior peso e é menos suscetível à quebra durante os processos de secagem, armazenamento e classificação. Apesar de a vitreosidade e a dureza serem comumente utilizadas para se referir à textura do grão, tais termos não se referem à mesma propriedade. A vitreosidade está mais relacionada com a "aparência" do endosperma, enquanto que a dureza se refere nitidamente a uma propriedade física (Shull, 1988). Apesar de a dureza ser de fundamental importância para o processo produtivo do milho, há pouco conhecimento sobre os fatores bioquímicos e estruturais que governam essa característica (Lopes, 1993). Cavanaugh et al. (1995), pelo uso da seleção recorrente, mostraram que há pouca correlação entre a produtividade, a qualidade protéica e a dureza do endosperma, sugerindo com isso que, no curso da seleção, faz-se necessário a utilização de avaliações específicas para essas características.

Dentro desse contexto, o objetivo principal do presente trabalho foi a caracterização dos padrões eletroforéticos de polipeptídeos e sua possível associação com as características físicas do endosperma. Também foi realizado o estudo do efeito da dosagem de alelos nessas características, como forma de contribuir para o conhecimento sobre mecanismos genéticos e bioquímicos envolvidos na formação do endosperma do milho.

MATERIAL E METODOS

Os trabalhos foram conduzidos nos campos experimentais do CNPMS/EMBRAPA e nos Laboratórios do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA-CNPMS/EMBRAPA). A estratégia básica utilizada consistiu em se cruzar um híbrido simples de endosperma vítreo ('BR201') com um milho indígena de endosperma farináceo (opaco - 'BOL II'), obtendo-se populações F_1 . Estas foram, posteriormente, autofecundadas para a obtenção de populações segregantes F_2 e $F_{2,3}$ quanto aos fenótipos opacos, semi-opacos e vítreos.

Para a determinação da associação entre dosagem de alelos e densidade dos grãos, utilizaram-se sementes do cruzamento entre o 'BOL II' X 'BR201', bem como do seu recíproco. As sementes obedeceram a uma ordem gradual de dosagem de alelos - 'BOL II' (aaa), 'BOL II' x 'BR201' (aaA), 'BR201' x 'BOL II' (AAa), e 'BR201' (AAA). Na geração $F_{2,3}$, os indivíduos foram escolhidos com o auxílio de um transluminador, formando-se dois grupos de amostras para essa geração, isto é, fenótipos opaco e vítreo. Para se determinar a densidade, padronizou-se a umidade das sementes, colocando-as em estufa a 37°C por três dias, seguindo-se, então, os procedimentos descritos por Kinep e Mason (1989). Foram pesados 50 grãos em uma proveta de 50 ml (m_1) e o volume foi completado até 30ml com etanol absoluto (densidade = 0,78612g/ml), registrando-se o peso total correspondente (m_2). A densidade 'd' (g/ml) foi calculada segundo a equação: $d = m_1 / \{30 - [(m_2 - m_1) / 0.78612]\}$.

A extração de proteínas total foi feita em microtubos de 1,5 ml, adicionando-se 100mg de endosperma pulverizado a 1,0 ml de tampão de extração - borato de sódio 12,5 mM (pH 10,0); SDS 1,0 %; 2-β-mercaptoetanol 2,0 % (v/v). Centrifugaram-se as amostras a ~11.000 x g por 10 min. A extração das não-zeínas foi feita baseando-se na fração anterior, em que o sobrenadante de cada amostra foi transferido para outro microtubo, adicionando-se etanol absoluto, de modo a obter uma concentração final de 70% (v/v).

Centrifugou-se o material a ~11.000 x g durante 15 minutos, separando-se, assim, as frações solúveis (sobrenadante) contendo as zeínas, do pellet precipitado correspondendo à fração não-zeína. Para a precipitação das zeínas a partir do sobrenadante anterior, coletaram-se alíquotas de 200µl, adicionaram-se 1200µl de acetona na proporção 1:6, incubou-se o material a 4°C por um período mínimo de 4 horas, e repetiu-se o procedimento de centrifugação anterior. O pélete obtido nessa etapa representou a fração zeína.

Para as análises do perfil protéico das frações acima isoladas, optou-se por géis de poli(acrilamida) desnaturantes de 1,5mm de espessura, contendo gel concentrador a 6% (pH 6,8) e gel separador de gradiente (pH 8,8), numa faixa de 7,5% a 17,5% (Laemmli, 1970). Para a avaliação da geração $F_{2,3}$, escolheram-se duas famílias com características fenotípicas contrastantes para o grão - opaco e vítreo - dispondo-se cada uma em uma metade do gel. Foram realizadas três repetições para cada experimento. Para a análise de proteína total, utilizaram-se 60µl do primeiro sobrenadante (vide acima), adicionando-se 40µl de corante-tampão de amostra (0,2% de azul bromofenol (p/v), tris-HCl 25mM, glicerol 50%); para a análise dos péletes de não-zeínas e zeínas, esses foram ressuspensos em 60µl do tampão original de extração, adicionando-se então os mesmos 40 µl do corante-tampão de amostra. Esses materiais foram fervidos por 5 minutos antes de serem aplicados ao gel (15µl de amostra por canaleta para proteína total, e 12µl para não-zeínas e zeínas). Procedeu-se às eletroforeses a uma amperagem constante de 50 mA, durante um período médio de 12 horas. Os géis foram corados em solução de *Coomassie Blue R-250*, por um período de 8 horas, e descorados em ácido acético 10% (v/v) por ~6 horas.

Para as análises de densitometria no equipamento "Densitometer SI" (Molecular Dynamics), foram escolhidos os polipeptídeos dentro de uma mesma faixa de peso molecular e que mostraram diferenças visíveis entre os genótipos. Escolheram-se bandas de maior tamanho e delimitou-se sua área, a qual foi utilizada para individualizar as demais bandas de interesse. Os resultados corresponderam a valores adimensionais de absorbância, na unidade "*Relative Pixel Density*", ou RPD, os quais foram tabulados para proceder-se às análises estatísticas. Os valores densitométricos foram analisados estatisticamente usando o programa MSTAT. Diferenças entre médias foram avaliadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o caráter triplóide do endosperma, procurou-se acompanhar o efeito da dosagem de alelos usando cruzamentos recíprocos entre o híbrido simples 'BR201', de endosperma duro e fenótipo vítreo, e o milho indígena 'BOL II', de endosperma farináceo e fenótipo opaco. Como foi observado, as sementes originadas do cruzamento entre esses materiais apresentaram somente endosperma com característica vítrea. Além disso, os resultados do teste de "qui-quadrado" para as populações segregantes da geração $F_{2:3}$ ($p < 0.05$) sugerem a hipótese de herança monogênica para essa característica (Tabela 1).

Nesse sentido, todavia, seria recomendada cautela nas conclusões, visto que: (i) uma maior amostragem experimental poderia gerar resultados distintos, (ii) a expressividade do caráter pode ter influenciado na avaliação da segregação fenotípica das sementes (ação de possíveis genes modificadores), e (iii) sementes com características fenotípicas opacas podem ter sido confundidas com semi-opacas e vice-versa, efeito este decorrente das limitações naturais da técnica disponível (caixa de luz) para avaliação dessa característica.

No estudo da determinação das características físicas das sementes, foram realizadas análises de densidade em duas gerações (F_1 e $F_{2:3}$), em função da característica fenotípica de opacidade/vitreosidade do endosperma. Dessa forma, procurou-se verificar se o tipo de herança proposto para essa característica (monogênica dominante) estaria associado ou não com o tipo de herança para densidade do grão. Como parâmetros de comparação e controle, utilizaram-se outros genótipos contrastantes quanto à opacidade/vitreosidade (Figura 1). No geral, os valores de densidade obtidos revelaram, estatisticamente, haver um efeito da dosagem de alelos

na determinação da densidade do endosperma, sugerindo, assim, que essa característica estaria provavelmente sujeita a efeitos genéticos distintos do mecanismo de herança proposto para opacidade/vitreosidade. Como se percebe, a maioria das sementes vítreas (cruzamento 'BR201' x 'BOL II' [AAa], genótipos 'BR201' [AA] e 'BR451', e fenótipo vítreo segregante da $F_{2:3}$) apresentaram valores de densidade significativamente maiores. Uma importante exceção foi identificada, a qual ilustraria a provável diferença entre os mecanismos genéticos que governam densidade e vitreosidade: as sementes do cruzamento 'BOL II' x 'BR201' (genótipo 2, Figura 1) apresentaram baixa densidade, porém com fenótipo vítreo. No primeiro caso, aparece um possível efeito aditivo dos alelos; no segundo, a presença do único alelo derivado do progenitor vítreo ('BR201') foi suficiente para a expressão desse caráter, sugerindo, portanto, herança monogênica dominante. No campo especulativo, e aliado aos dados acima discutidos, o fato de o genótipo indígena MT II (5), de endosperma farináceo e opaco, ter sido o de menor valor para densidade poderia sugerir uma associação entre essas duas características. Contudo, outros experimentos envolvendo linhagens contrastantes para essas características seriam necessários para avaliar mais precisamente essa possibilidade.

Com as análises dos padrões protéicos obtidos por eletroforese (Figuras 2 e 3), procurou-se verificar se havia alguma alteração nesses padrões que fosse consistente com as diferenças fenotípicas, i.e., polipeptídeos possivelmente correlacionados com opacidade/vitreosidade. Para isso, utilizou-se a geração segregante $F_{2:3}$. Na faixa de peso molecular compreendida entre 66 a 29kDa, o padrão eletroforético de proteína total para indivíduos da geração $F_{2:3}$ do cruzamento entre o 'BR201' x 'BOL II' revelou algumas diferenças entre os materiais segregantes para o

TABELA 1 – Número de plantas F_2 e de plantas $F_{2:3}$ segregantes para os fenótipos opacos e semi-opacos (s-opacos).

Material População F_2	Fenótipo dos Grãos			X^2
	opacos	s-opacos	Total	
BR-201 X BOL-II F_2	81	332	413	6,39 ^{ns}
BR-201 X BOL-II $F_{2:3}$	16	80	96	3.56**

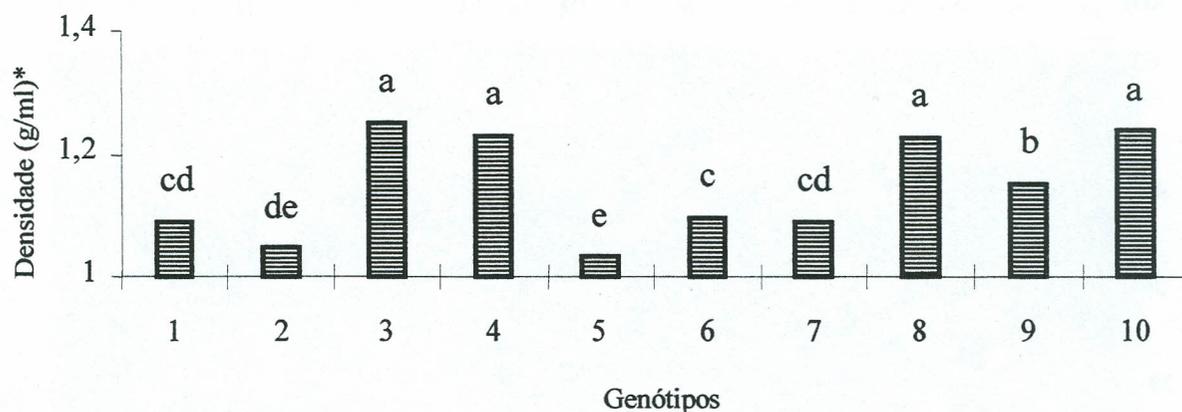


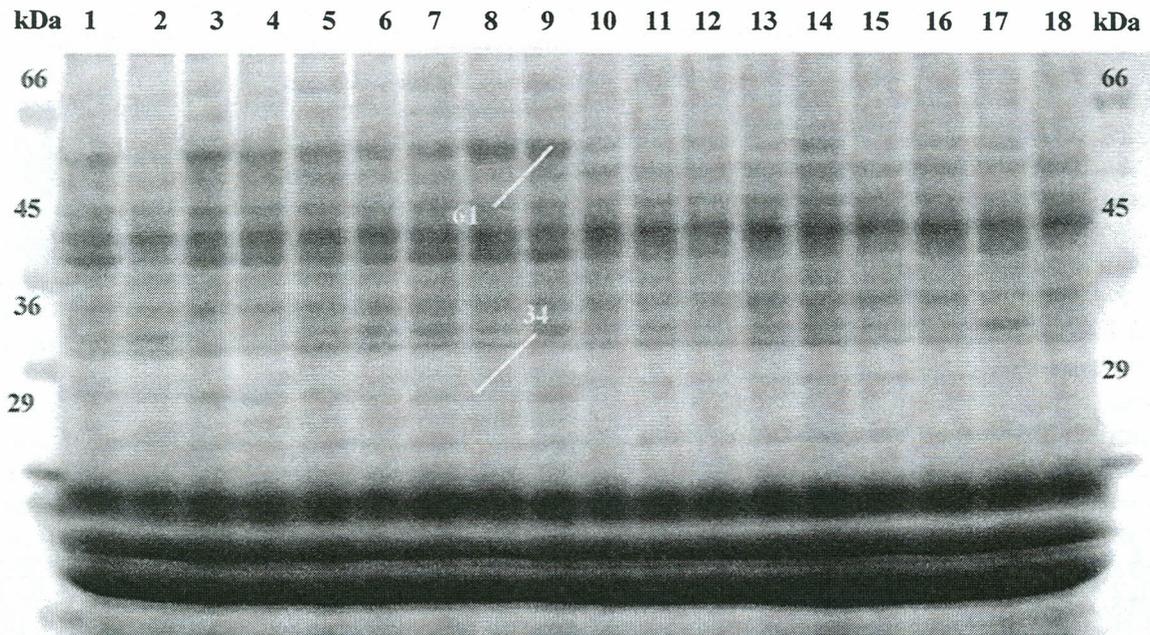
FIGURA 1 - Distribuição dos valores de densidade dos genitores da geração F_1 e os seus cruzamentos recíprocos 1 - BOL II; 2 - BOL II X BR201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II; 4 - BR201. Os genótipos indígenas: 5 - MT II; 6 - PR I; 7 - P. CHILENO. Um QPM, 8 - BR451. Fenótipos opacos e vítreos da Geração $F_{2,3}$ do cruzamento BR201 x BOL II (9 e 10 respectivamente). *Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

fenótipo opaco (Figura 2a). Apesar de as médias densitométricas terem sido estatisticamente semelhantes em alguns indivíduos contrastantes, observa-se uma tendência de agrupamento entre a quantidade dos polipeptídeos (e.g., 61 e 34 kDa) avaliada em RPD (ver métodos) e os indivíduos de mesmo fenótipo (Figura 2b, Tabela 2). Nesse sentido, poder-se-ia especular que, à medida que se avança com autofecundações nas gerações seguintes, estar-se-ia favorecendo a fixação (por homozigose) das características contrastantes. É plausível que o acúmulo diferenciado desses polipeptídeos possa estar relacionado com o endosperma opaco e/ou vítreo, apesar de que uma possível relação de causalidade entre eles é desconhecida até o momento. O mesmo comportamento evidenciado para proteína total foi obtido no padrão eletroforético da fração não-zeína da geração $F_{2,3}$ (Figura 3, Tabela 2). As diferenças entre os materiais, mais uma vez, são confirmadas na mesma faixa de peso detectada anteriormente, ou seja, entre 66 a 29kDa. Isso sugere que a associação encontrada nos dois casos seria atribuída a polipeptídeos pertencentes à fração não-zeína. Esse fato viria a reforçar uma idéia

ainda não levantada de que as características físicas do endosperma do milho poderiam ser também influenciadas pelo conteúdo de não-zeínas, e não somente pelo conteúdo de proteínas de reserva (Dombrink-Kurtzman e Bietz, 1993; Lopes 1993).

A utilização de experimentos de focalização isoeletrica (IEF), em todos os casos aqui avaliados, aparece como importante alternativa para o aprofundamento dos estudos comparativos de composição protéica do endosperma, associados ou não com a sua característica fenotípica. Tal tecnologia poderia fornecer pistas importantes a respeito de uma possível decomposição das bandas (analisadas por densitometria) em mais de um polipeptídeo de mesmo peso molecular, aprofundando, assim, o conhecimento acerca das reais associações de síntese e composição protéica com estrutura física do endosperma. Também a adoção de outros métodos mais eficazes na avaliação das características físicas do endosperma (por exemplo, a densidade) poderiam contribuir para uma melhor análise associativa entre fenótipo e conteúdo protéico do mesmo.

(a)



(b)

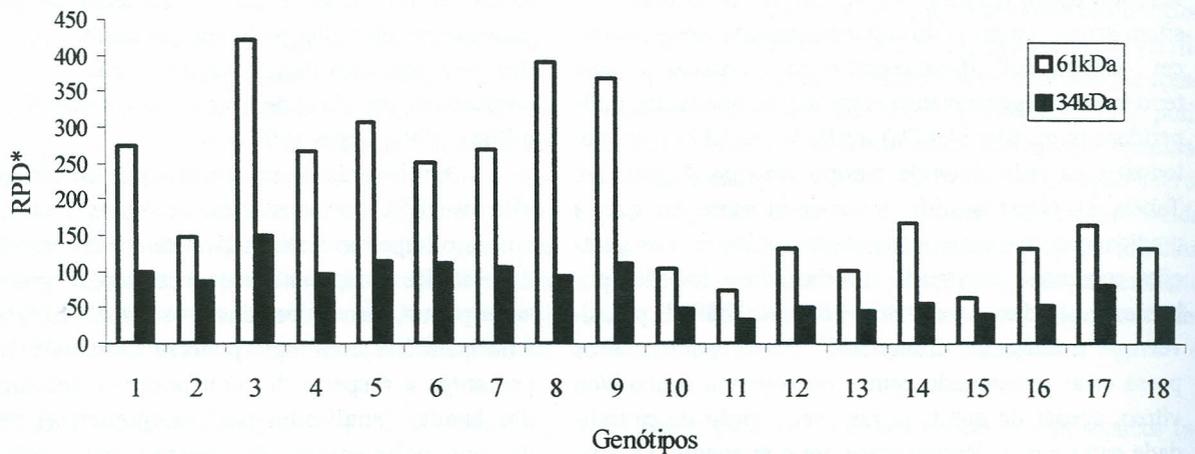
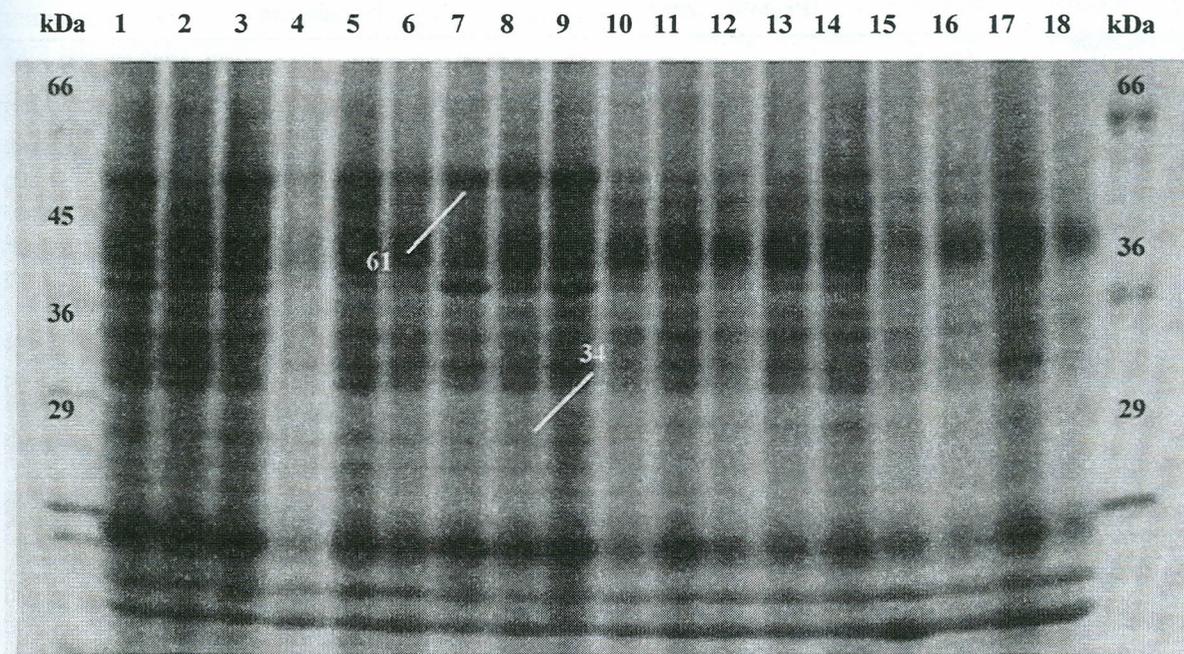


FIGURA 2 - (a) Padrão eletroforético de proteína total em gel de poliacrilamida (gradiente 7,5% a 17,5%) com os genótipos dos indivíduos segregantes da geração $F_{2,3}$, 1 a 9 (grãos opacos), 10 a 18 (grãos vítreos); (b) Distribuição dos valores percentuais de RPD (proteína total) para os polipeptídeos de 61, e 34kDa dos progenitores da geração da geração $F_{2,3}$.

(a)



(b)

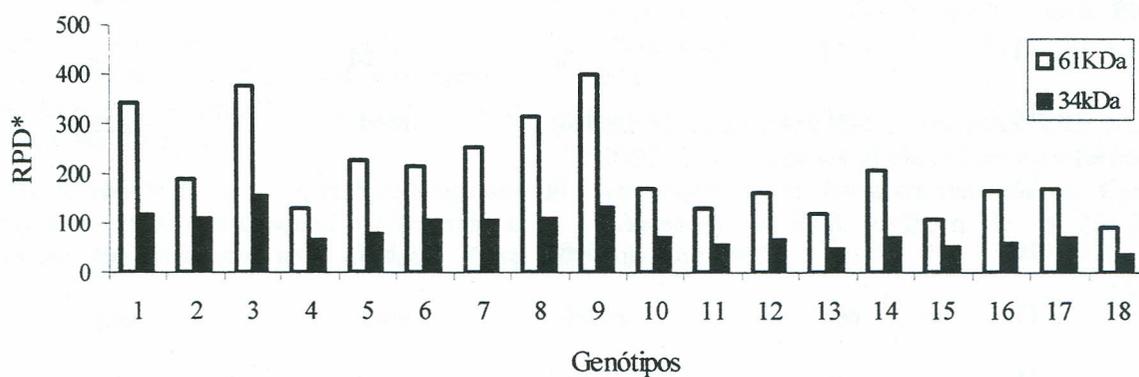


FIGURA 3 - (a) Padrão eletroforético de não-zeínas em gel de poliacrilamida (gradiente 7,5% a 17,5%) com os genótipos dos indivíduos da geração $F_{3,2}$, 1 a 9 (grãos opacos), 10 a 18 (grãos vítreos); (b) Distribuição dos valores percentuais de RPD (não-zeínas) para os polipeptídeos de 61 e 34 kDa dos progenitores da geração da geração $F_{2,5}$.

TABELA 2 - Valores médios de RPD da Geração F_{2,3}, em RPD*, para as frações proteína total e não-zeínas - grãos opacos (1 a 9) e vítreos (10 a 18).

Grãos	Proteína total		Não-zeínas	
	61kDa	34kDa	61kDa	34kDa
1	bcd	abcdef	abc	abc
2	def	bcdef	abcd	abcd
3	a	a	ab	a
4	bcde	abcdef	cd	bcde
5	abc	ab	abcd	bcde
6	cde	abcd	abcd	abcde
7	bcde	abcde	abcd	abcde
8	ab	abcdefg	abcd	abcd
9	abc	abc	a	ab
10	f	efg	bcd	bcde
11	f	g	cd	cde
12	ef	defg	bcd	bcde
13	f	fg	cd	de
14	cef	bcdefg	abcd	bcde
15	f	fg	d	cde
16	df	cdefg	bcd	cde
17	def	bcdefg	abcd	bcde
18	ef	defg	d	e

*Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0.05$) pelo Teste de Tukey.

CONCLUSÕES

a) Baseado no conteúdo triplóide do endosperma, a avaliação de famílias segregantes dos cru-

zamentos recíprocos entre o 'BOL II' X 'BR201' permitiu a identificação do efeito de dosagem de alelos na densidade do grão.

b) Os resultados de segregação dos fenótipos opaco e vítreo na geração $F_{2:3}$, bem como dados da análise de densidade do grão em distintos genótipos, reforçam a hipótese de herança monogênica dominante para essa característica.

c) O perfil das frações protéicas estudadas ('proteína total' e 'não-zeína') e a quantificação por densitometria dos polipeptídeos analisados para a geração $F_{2:3}$ permitiram uma associação entre o conteúdo de proteína e a vitreosidade/opacidade do endosperma, podendo ser utilizadas como indicadores moleculares para essa característica.

d) Os resultados demonstraram haver associação entre polipeptídeos da fração não-zeína com os fenótipos vítreos ou opacos. Além disso, observou-se o efeito da dosagem de alelos no endosperma (triplóide) no que diz respeito aos fenótipos opaco (menos denso) e vítreo (mais denso), sugerindo que essa característica se trata de uma herança monogênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAVANAUGH, K. J.; ZEHR, B. E.; NYQUIST, W. E.; HAMAKER, B. R. Responses to selection for endosperm hardness and associated changes in agronomic traits for cycles of recurrent selection in maize, **Crop Science**, Madison v. 35, n. 3, p. 745 - 748, May/June. 1995.
- DOMBRINK-KURTTZMAN, M. A.; BIETZ, J. A. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.70, n. 6, p. 660 - 668, Nov/Dec. 1993.
- KNIEP, K. R.; MASON, S. C. Kernel breakage and density of normal and *opaque-2* maize grain as influenced by irrigation and nitrogen. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 1, p. 159 - 163, Jan/Feb. 1989.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5258, p. 680 - 684, Aug. 1970.
- LOPES, M. A. **Genetic and biochemical characterization of the maize mutants floury-2 and modified opaque-2**. Tucson: University of Arizona, 269p. 1993 (Tese de PhD).
- ROBUTTI, J. L.; HOSENEY, R. C.; WASSOM, C. W. Modified *opaque-2* corn endosperms. II structure viewed with a scanning electron microscope. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 51, n. 2, p. 173-180, Mar/Apr. 1974.
- SHULL, J. M. **Developmental study of a hard, intermediate and soft variety of sorghum**. West Lafayette, Purdue University. 85 p. 1988 (Tese M.S).
- SOAVE, C.; SALAMINI, F. Organization and regulation of zein genes in maize. **Philosophical Transactions of The Royal Society of London [Biology]**, Oxford. v. 304, p. 341 - 347, 1984.
- 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 Physiology**, Baltimore, v.92, n. 1, p. 191 - 196, Jan. 1990.
- WOLF, M. J.; BUZAN, C. L.; MACMASTERS, M.M.; RIST, C. E., Structure of the mature corn kernel. I. Gross anatomy and structure relationships. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 29, n. 4, p. 231-333, July/Aug. 1952.