

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

RAIMUNDO PEREIRA DA SILVA

1998

Assessment

44093

117131060

DESCARTADO

maifin
ASSINATURA

Data 14, 08, 17

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
UFLA

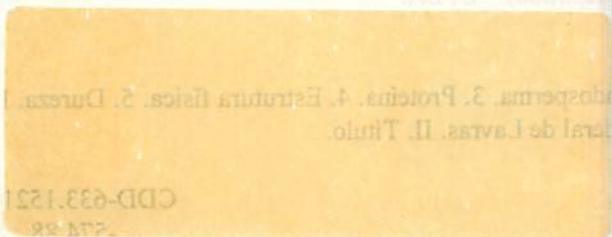
RAIMUNDO PEREIRA DA SILVA

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

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de "Mestre"

Orientador

Prof. Dr. Edilson Paiva



LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1998

B [REDACTED]
N. [REDACTED] T 633.1521
[REDACTED]
[REDACTED]
N. [REDACTED] 44093
D. [REDACTED] 88

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Pereira da Silva, Raimundo

Caracterização dos padrões protéicos do endosperma do milho e sua
relação com a estrutura física do grão / Raimundo Pereira da Silva. – Lavras
: UFLA, 1998.

89 p. : il.

Orientador: Edilson Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

I. Milho. 2. Endosperma. 3. Proteína. 4. Estrutura física. 5. Dureza. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.1521
-574.88

RAIMUNDO PEREIRA DA SILVA

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

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de "Mestre"

APROVADA em 4 de setembro de 1998.

Prof. João Bosco dos Santos

UFLA

Prof. Luciano Vilela Paiva

UFLA



Prof. Dr. Edilson Paiva

Embrapa/CNPMS

(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

A

Minhas mães:

Izaura, *in memoriam*,

Raimunda,

e ao meu filho,

Andrei,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA Milho e Sorgo, pelo apoio na realização deste trabalho, especialmente ao NBA (Núcleo de Biologia Aplicada).

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao orientador Edilson Paiva, pelos ensinamentos, apoio, orientação, e disponibilidade durante todo o curso.

Aos Drs Mauricio Lopes, Antonio Alvaro e Leandro L. Loguercio, pelas valiosas contribuições apresentadas para o êxito desse trabalho.

Aos pesquisadores José Edson F. Figueredo, Fernando H. Valicente, Sidney N. Parentoni, Maria José V. Vasconcelos, Walter Meirelles, pelo convívio e amizade.

Aos professores Samuel Carvalho, Moacir Pascoal, Luciano V. Paiva, pelo convívio e amizade

Aos funcionários do Galpão de Melhoramento de Milho da EMBRAPA de Milho e Sorgo e da Ilha de Edição do CNPMS

Aos servidores do Departamento de Biologia e Biblioteca Central da UFLA, pela disposição demonstrada e pronto atendimento.

Ao Miguel Reis, Osmar Santana e Edna Pacheco pelo apoio no laboratório e pela amizade.

A todos os amigos da Embrapa Mandioca e Fruticultura pelo incentivo, apoio e amizade.

SUMÁRIO

	Página
Abreviaturas e siglas utilizadas no texto.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1.0 – INTRODUÇÃO	1
2.0 – REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 – Grão de Milho – formação e estrutura	4
2.2 – Desenvolvimento do endosperma	5
2.3 – Proteínas do endosperma do milho	7
2.4 – Síntese e deposição das ‘zeínas’ em corpos protéicos	10
2.5 – Características dos genes das ‘zeínas’	12
2.6 – Mutações que alteram a estrutura do endosperma	14
2.7 – Proteína B-70	18
2.8 – Genótipos opaco-2 modificados	19
2.9 – Qualidade física do endosperma	21
3.0 – MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 – Material genético	24
3.1.1 - Condução dos experimentos.....	25
3.2 – Extração e fracionamento das proteínas do endosperma	26
3.2.1 – Preparo do endosperma	26
3.2.2 – Obtenção da proteína total	27
3.2.3 – Obtenção das frações ‘não-zeína’	27
3.2.4 – Obtenção da fração zeínas	28
3.3 – Análises de proteína	29
3.4 – Densidade dos grãos	29
3.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida	30
3.6 – Densitometria	32
3.7 – Delineamento estatístico	34
4.0 – RESULTADOS	35
4.1 – Densidade	36
4.2 – Geração F ₁	38
4.2.1 – Proteína total	38
4.2.2 – ‘Não zeínas’	41
4.2.3 – ‘Zeínas’	44
4.3 – Geração F ₂	47
4.3.1 – Proteína total	47

4.3.2 – ‘Não-zeínas’	49
4.3.3 – ‘Zeínas’	53
4.4 – Geração F ₃	57
4.4.1 – Proteína total	57
4.4.2 – ‘Não-zeínas’	60
4.4.3 – ‘Zeínas’	64
5.0 – DISCUSSÃO	66
6.0 – CONCLUSÕES	76
7.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
8.0 – ANEXO.....	84
8.1 – Resumo dos anovas (geração F ₁ F ₂ F ₃)	84

Ao amigo Edmilson Santos Silva, pelo apoio, amizade e incentivo durante todo o período que passei longe de minha família.

As pessoas que tiveram participação direta na minha formação: Rosalvo (*in memorian*), D. Ana, Leonice, Prof. Iolanda, Tia Gildinha, Rosália, D. Antônia, Sr. Domingos, Lucidalva.

Ao Evaldo, Carlos Humberto (Veloço), Luciano Pinto (Los Pinto), Edvan (Rabicó), Osvaldo da Paz, José Carlos, José Luiz, Keuder Magalhães, João Andrade, Romildo (Duito), Antonio (Buri), Neuza, Ridalva, Bomfim, Abelmon (Bel), Marinalva, Patrícia Mota, Elane; Lazaro, Joelson, Edwin, Fred, Patrícia, Limeira, Fábio e Carlos (TG) pelo convívio, apoio e amizade.

Aos colegas do NBA, Paulo, Geraldo, Cláudia Cristina, César, Clóvis, Gilberto, Vicente, Luciano, Giovana, Douglas, Jurandir, Mauricinho, Marcelo, Rogério, Mauro, Marliton, Alessandra, Célio, Fabio (Pompéu), Alcione, Ubiraci, Eliane, Cristina, Adriana, e Isaias, pelo convívio e pela força nas horas difíceis.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

E a Deus, por tudo.

Abreviaturas e Siglas utilizadas no texto

A : adenina nucleotídeo

bp : pares de bases

C : citosina nucleotídeo

cauda de poly (A) : seqüências de adeninas

cDNA : ácido desoxirribonucleico complementar

CIMMYT : Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo

CNPMS : Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo

Da : dalton, unidade de massa molecular

dH₂O : água destilada

DNA : ácido desoxirribonucleico

EF-1 α : fator de alongação na síntese protéica

EMBRAPA : Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

g : grama

g/ml : grama por mililitros

his : histidina

IEF : focalização isoelétrica

K : quilo

kDa : quilodaltons

l : litro

Leu : leucina

M : molar

mA : miliampére

MAP : marcador de alto peso molecular

MBP : marcador de baixo peso molecular

ml : mililitro
mM : milimolar
nm : nanometro
°C : graus Celsius
μl : microlitros
p/v : peso por volume
primer : iniciador
Pro : prolina
PSI : particle-size index
q.s.p. : quantidade suficiente para
QPM : Quality Protein Maize
RER : reticulo endoplasmático rugoso
RIP : ribosome inactivating protein
RNA : ácido ribonucleico
RPD : relative pixel density
rpm : rotações por minuto
S : coeficiente de sedimentação
SDS : sodium dodecyl sulfate
T : timina nucleotídeo
TEMED : tetrametiletinodiamina
Tris : trizma base
trp : triptofano
V : volts
v/v : volume por volume
Val : valina

RESUMO

SILVA, Raimundo Pereira da. **Caracterização dos padrões protéicos do endosperma de milho e sua relação com a estrutura física do grão.** Lavras: UFLA, 1998 89p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas)¹

As propriedades físicas do grão de milho são de grande importância no processamento deste 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 (paterno) do BR 201, de endosperma duro e vítreo, foram feitas avaliações dos padrões protéicos destes 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 F₃ revelaram que existe, para a fração protéica das 'não-zeínas', um padrão de polipeptídeos que podem estar associados à característica física de opacidade/vitreosidade do endosperma, podendo assim servir como um indicador molecular para essa característica.

¹ Orientador: Edilson Paiva, Membros da Banca: João Bosco dos Santos e Luciano Vilela Paiva.

ABSTRACT

Characterization of the protein patterns from maize endosperm and their relationship with the physical structure of the grain².

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 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.

² Guidance Committee: Edilson Paiva (Major Professor), João Bosco dos Santos – UFLA e Luciano Vilela Paiva – UFLA.

1 Introdução

Considera-se o milho como uma das culturas mais importantes do mundo não só pelo fato de ser produzido em grande volume, ou de ocupar uma imensa área cultivada, mas principalmente pelo seu papel sócio-econômico, constituindo-se em matéria-prima básica para uma ampla gama de aplicações, tais como: produção de amido, óleo, farinha e glicose, utilização com destaque na composição de rações, em especial na suinocultura e avicultura, utilização nas indústrias têxtil, de bebidas, papéis, papelões, curtume, colas, etc. No estado *in natura*, é empregado na forma de farelo, ração ou silagem.

Apesar do potencial que seu grão apresenta como fonte protéica, contendo cerca de 10% de proteína na matéria seca, é considerado um alimento energético para seres humanos e animais monogástricos devido a sua deficiência em aminoácidos essenciais, como a lisina e o triptofano. Após tentativas de se modificar o valor nutricional do milho via melhoramento genético, notou-se que este alto valor está associado a uma série de características agrônômicas indesejáveis, tais como maior susceptibilidade ao ataque de pragas e doenças, e menor produtividade, os quais afetam a sua ampla utilização comercial.

Grupos de pesquisadores do centro mundial de pesquisa em milho - CIMMYT (México), e de outros centros como Pietermariteburg (África do Sul), CNPMS/EMBRAPA (Brasil), Beijing (China), Purdue University, University of Illinois, Texas A & M, University of Arizona (USA), têm devotado um grande esforço ao estudo e melhoramento de milho mutante com alta qualidade protéica do grão, "Quality Protein Maize" ou QPM. Esses materiais ainda não são utilizados em grande escala em nenhum país do mundo porque, do ponto de vista genético, há ainda problemas de instabilidade fenotípica do grão a serem resolvidos, como, por exemplo, a dureza do endosperma

O aperfeiçoamento de técnicas biotecnológicas permitiram o avanço no conhecimento das bases genéticas e dos mecanismos envolvidos na expressão das várias características de interesse agrônômico, tais como dureza do grão, teor de aminoácidos essenciais, etc. Essas ferramentas constituem um importante apoio aos programas de melhoramento voltados para obtenção de milhos QPM. Apesar da textura do grão ser de uma importância fundamental para processo produtivo do milho, sobretudo no beneficiamento, pouco se conhece sobre os fatores bioquímicos e estruturais que afetam essa característica. “Vitreosidade” e “dureza” são termos comumente utilizados para se referir à composição do grão. A vitreosidade está relacionada com a aparência do endosperma enquanto que a dureza se refere a textura ou resistência física. As cultivares comerciais de milho tendem a possuir endosperma vítreo.

A conversão do endosperma “opaco” em “vítreo” foi associada a um aumento na síntese de uma proteína denominada ‘gama-zeína’, de 27kDa. Entretanto, as relações entre o aumento do conteúdo de gama-zeína, sua distribuição nos corpos protéicos e a modificação das características do endosperma não são ainda bem estabelecidos. Pesquisadores do CNPMS, em conjunto com a equipe do BIOAGRO-UFV (Núcleo de Biologia Aplicada à Agropecuária-Universidade Federal de Viçosa), vêm estudando comparativamente as populações de milhos indígenas e os fenótipos comerciais. Os fenótipos indígenas apresentam grãos opacos de baixa densidade, semelhantes, por exemplo, aos mutantes *opaco-2* (de alta qualidade protéica); porém, apresentam baixa qualidade protéica, como os fenótipos comerciais (vítreos). Observou-se que essas populações indígenas não estavam incluídas em nenhuma classe conhecida de mutantes para a textura (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.

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

2 Revisão de Literatura

2.1 Grão do milho - formação e estrutura

A planta do milho é uma espécie monóica, isto é, possui os dois sexos na mesma planta, separados em inflorescências diferentes: as flores masculinas localizam-se numa panícula terminal conhecida como “flecha” ou “pendão” e as femininas em espigas auxiliares. A espiga é constituída por um eixo ou ráquis (sabugo), ao longo do qual se desenvolvem centenas de ovários, cada um formado por um óvulo e um saco embrionário. Devido a esta natureza morfológica da planta, o processo de autofecundação é mínimo, sendo o milho, por isso, considerado uma planta de polinização cruzada.

O grão do milho formado é um tipo especial de fruto, botanicamente classificado como ‘cariopse’, composto predominantemente por um endosperma e um embrião que respondem por aproximadamente 90% e 5%, respectivamente, do peso seco da semente (Larkins, 1981). Durante a fecundação, uma das células generativas (gameta masculino), através do tubo polínico, se funde com o óvulo (gameta feminino), originando o embrião (2n); a outra célula generativa se funde com o núcleo secundário do saco embrionário, originando um tecido triploide (3n) denominado ‘endosperma’ (Messing, 1987). O endosperma e o embrião portanto, originam-se simultaneamente desta chamada dupla-fertilização (Dumas e Mogesen, 1993).

A localização do embrião no saco embrionário não é casual, sendo sua posição dependente dos planos em que as primeiras divisões da célula multinucleada ocorrem (Lopes e Larkins, 1993). A parede celular começa a se formar entre 3 e 4 dias após a polinização e o seu desenvolvimento completa-se entre 12 e 14 dias. O endosperma desenvolve-se mais rapidamente que o embrião;

mas esse desenvolvimento é acompanhado de diferenciações entre os tecidos, o que resulta em regiões com características distintas. A camada de tecido mais externa (células periféricas) modifica-se, forma-se uma região espessa chamada de 'aleurona'. Essa camada possui um alto conteúdo de proteínas solúveis que circundam o endosperma, em que encontram-se pequenos grãos de amido e corpos protéicos (Larkins, 1981; Lopes e Larkins, 1993). Na área adjacente ao embrião, entre o pericarpo e camada de aleurona, há uma região que tem como função principal a síntese de enzimas hidrolíticas responsáveis pela mobilização de polímeros de reserva (tais como amido e proteína), que são utilizados durante a germinação da semente. A semente acumula grandes quantidades de proteínas de reserva entre 10 e 50 dias após a polinização (Rubenstein e Geraghty, 1989), e a taxa máxima de síntese ocorre entre 15 e 25 dias (Soave et al., 1975).

2.2 Desenvolvimento do endosperma

A origem do endosperma está intrinsicamente ligada à dupla fertilização. Dependendo do padrão de desenvolvimento, três tipos podem ser observados: nuclear, celular e helicoidal (Lopes e Larkins, 1993). O tipo mais comum é o nuclear, em que o núcleo da célula primária é submetido a vários ciclos de divisão, sem citocinese, gerando assim um grande número de núcleos livres e organizados na periferia da célula. A citocinese, quando inicia, progride centripetalmente em direção ao grande vacúolo central, até que o endosperma torna-se completamente celular. Esse padrão é típico de semente de cereais como o milho, cevada e arroz (Lopes e Larkins, 1993).

No desenvolvimento do endosperma do tipo celular, a mitose e a citocinese ocorrem na primeira divisão do núcleo endospermico e persistem durante todo o processo. Esse padrão é típico em espécies do gênero

Lycopersicon e vários membros das famílias *Crassulaceae*, *Bignoniaceae*, e *Labiatae*. No tipo helicoidal, um padrão de divisão intermediário e incomum, a primeira célula do endosperma gera duas células com tamanhos diferentes, após a primeira divisão. A célula maior divide-se como no endosperma do tipo nuclear, enquanto que a célula menor permanece uninucleada sem se dividir, ou submete-se apenas a uma série limitada de divisões para formar uma célula multinucleada (Lopes e Larkins, 1993).

No endosperma formado, há o acúmulo de compostos que servem de suporte para as primeiras fases do desenvolvimento do embrião (Lohmer et al., 1991). Essas reservas incluem basicamente amido e proteínas, enquanto que lipídios, compostos orgânicos e inorgânicos existem apenas em pequenas quantidades no endosperma do milho (Lopes, 1993). O amido constitui a principal reserva de carboidratos do endosperma, sendo utilizado como fonte de energia e carbono pelo embrião durante a fase de crescimento (Lopes, 1993). As proteínas, por sua vez, representam aproximadamente 10% do peso seco do endosperma do milho, podendo ser divididas em duas categorias distintas: proteínas de reserva ('prolaminas' ou 'zeína') e proteínas que desempenham funções diferentes da de reserva ('não-zeínas', Lopes, 1993).

O arranjo, ou distribuição dos corpos protéicos dentro da matriz amilácea do endosperma apresenta as características fenotípicas "opaco" ou "vitreas". Indiretamente, esses fenótipos também estão associados a outras características agrônômicas que são muito importantes para o melhoramento genético, como a 'dureza' que basicamente descreve a resistência da semente a deformações externas, e à quebra mecânica durante a colheita e o armazenamento. Foram encontrados alguns mutantes de endosperma de milho em que 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 esta razão, esses mutantes geralmente são conhecidos como *opacos* (Robutti et al 1974; Lopes, 1993), apresentando conseqüentemente, um endosperma friável, de textura farinácea. Os grãos com endosperma 'vítreo', por outro lado, são translúcidos e duros (característica desejável do ponto de vista agrônômico). Existem ainda endospermas que apresentam características fenotípicas intermediárias, como os 'semi-opacos' ou semi-modificados, que são assim chamados por apresentarem setores com características de ambos os tipos anteriores.

2.3 Proteínas do endosperma do milho

O endosperma do milho tem sido estudado com grande detalhe, sobretudo do ponto de vista genético pois além de ser responsável pelo fornecimento de nutrientes durante a germinação, representa uma importante fonte alimentícia para animais e humanos (Messing, 1987). O endosperma ainda é subutilizado, como fonte protéica, devido ao seu baixo valor aminoacídico, atribuído à deficiência de aminoácidos essenciais (lisina, triptofano e metionina).

As proteínas totais do endosperma podem ser separadas seqüencialmente em quatro frações: albuminas, globulinas, prolaminas ('zeínas') e glutelinas (Osborne e Mendel, 1914). A fração 'não-zeína', neste caso, seria composta pelas 'albuminas', 'globulinas' e 'glutelinas', sendo essencialmente constituída de proteínas estruturais, inibidores de proteases, enzimas, etc., com funções distintas das de reserva ('zeínas'). Suas funções principais são estrutural, de proteção da semente contra patógenos e predadores, e biossintética (Lopes e Larkins, 1993). Entretanto, este grupo diverso de proteínas também pode atuar secundariamente como reserva, possuindo inclusive um valor nutricional maior e mais balanceado (Wallace et al., 1990).

Como já mencionado a primeira fração protéica extraída do endosperma compõe-se de proteínas solúveis somente em água, chamadas 'albuminas'; na seqüência de extração aparecem as 'globulinas', que são melhor solubilizadas em soluções salinas diluídas. Nessas duas primeiras frações, verifica-se também a presença de aminoácidos livres, pequenos fragmentos de polipeptídeos, e alguns outros compostos solúveis em soluções salinas aquosas (Mertz, 1986).

O terceiro grupo de proteínas extraídas é o das 'prolaminas' ou 'zeínas', formado por vários polipeptídeos que diferem na solubilidade em álcool, dependendo da presença ou ausência de agentes redutores. Vários investigadores têm usado diferentes procedimentos para isolamento das 'zeínas', resultando num complicado sistema de nomenclatura (Wilson, 1986; Shotwell e Larkins, 1989; Wallace et al., 1990; Paiva et al., 1991). A fração total de 'zeínas' perfaz cerca de 60% da proteína total do endosperma. Tal fração pode ser extraída em etanol 70% ou 2-propanol 55%, contendo 1% de 2-β-mercaptoetanol. Essa fração não possui atividade enzimática, servindo apenas como fonte de carbono e nitrogênio durante o início do desenvolvimento da plântula (Shotwell e Larkins, 1989). O restante das proteínas que permanecem insolúveis são as 'glutelinas', que podem ser extraídas em soluções alcalinas diluídas ou ácidas diluídas. As glutelinas representam uma fração heterogênea e biologicamente não-definida (Lopes, 1993).

Cabe citar que um método mais simples de extração de proteínas do endosperma do milho foi proposto por Wallace et al. (1990). Esse procedimento baseia-se na solubilização da proteína total do endosperma em um tampão alcalino, contendo duodecil sulfato de sódio (SDS) e um agente redutor, 2-β-mercaptoetanol. Com o acréscimo de etanol a uma concentração final de 70%, tem-se a precipitação da fração 'não-zeína' como um todo, incluindo as albuminas, globulinas e glutelinas.

Com base na estrutura primária e na solubilidade das proteínas, as 'zeínas' foram classificadas em quatro tipos distintos: alfa, beta, gama, e delta-zeínas (Essen, 1986; Larkins et al, 1989). A separação de componentes em SDS-PAGE resulta em bandas com peso molecular aparente de 27 kDa (gama-zeína), 22 a 19 kDa (alfa-zeínas), 15 a 14 kDa (beta-zeínas), e 10 kDa (delta-zeína). As alfas-zeínas (i) representam cerca de 70% da fração de 'zeínas' (Shotwell e Larkins, 1989), (ii) são proteínas deficientes em aminoácidos essenciais como a lisina e o triptofano (Nelson, 1969), (iii) possuem um conteúdo elevado de glutamina (25%) leucina (20%) alanina (15%) e prolina (11%) (Lopes, 1993), e (iv) podem ser separadas, dependendo do genótipo, em vários componentes diferentemente carregados, conforme dados de focalização isoeétrica IEF (Righetti et al, 1977; Hagen e Rubenstein, 1981). Entretanto, não se tem certeza de que estes últimos representem simples produtos de genes estruturais, visto que as 'zeínas' compõem um grupo de proteínas hidrofóbicas, ricas em amidas, nas quais fatores de agregação como desamidação, pontes dissulfídicas e outras modificações pós-transcricionais também podem contribuir para a heterogeneidade de cargas (Tsai, 1983). As 'alfas-zeínas' são sintetizadas como pré-proteínas contendo um peptídeo-sinal de 20 ou 21 aminoácidos. O comprimento da proteína madura varia numa faixa de 210 para 245 aminoácidos.

A característica que distingue as alfa-zeínas das demais 'zeínas' é a presença de polipeptídeos de aproximadamente 20 aminoácidos, repetidos em tandem, na região central da proteína (Shotwell e Larkins, 1989). Baseando-se em análises de dicroísmo circular e modelos gerados em computador, foi proposto que os polipeptídeos repetidos formam uma estrutura do tipo α -hélice, contribuindo para que a proteína adquira a forma de "bastão". As pontes de hidrogênio entre os aminoácidos polares e entre os resíduos de glutaminas, nas

extremidades das repetições, podem contribuir para a agregação das alfa-zeínas no interior dos corpos proteicos (Agros et al., 1982, Wallace et al., 1988).

As beta-zeínas, proteínas de peso molecular entre 14 e 16 kD, representam cerca de 15% da fração 'zeína'. Quando analisadas através de IEF, mostraram baixa heterogenidade de cargas, gerando componentes compostos por um ou dois polipeptídeos apenas. A análise de composição aminoacídica dessa proteína mostrou que o peptídeo-sinal contém 160 aminoácidos, sendo a mais rica em aminoácidos sulfurosos como a metionina (11%) e a cisteína (4%) (Esen et al., 1985; Pedersen et al., 1986). A estrutura secundária predominante dessa 'zeína' é do tipo *β -sheet* (Pedersen et al., 1986).

As gama-zeínas são também conhecidas como 'proteínas de solubilidade reduzida' (PSR), por possuírem elevados níveis de aminoácidos sulfurados (Wilson e Larkins, 1984), ou seja, a sua baixa solubilidade estaria associada à presença de pontes dissulfídicas (Vitale, Ceriotti e Denecke, 1993). Essa fração representa cerca de 20% da 'zeína' total, podendo chegar até 50% (Ortega e Bates, 1993). A gama-zeína é codificada por um único loco que pode, dependendo do genótipo, apresentar-se de duas formas distintas: como dois genes funcionais ligados em série, designados "A" e "B", ou como um gene "Ra" gerado por uma recombinação que resulta na perda do gene "B" (Lopes, 1993). A estrutura primária é caracterizada por cinco regiões distintas, numa seqüência formada de 180 aminoácidos. Essas regiões correspondem a um segmento amino-terminal de 11 aminoácidos, uma região com o hexapeptídeo "Pro - Pro - Pro - Val - His - Leu" repetido oito vezes, uma seqüência alternante Pro - X entre os resíduos 70 e 91, uma região rica em Cis entre os resíduos 92 - 148 e um segmento na extremidade carboxílica altamente concentrado em Glu.

2.4 Síntese e deposição das 'zeínas' em corpos protéicos

Como já se observou, os principais componentes de reserva do milho e de outros cereais são as prolaminas ('zeínas' no milho), as quais possuem uma grande variação em sua estrutura e nas rotas de síntese e deposição. Em alguns cereais, elas se agregam dentro de corpos protéicos, ainda no retículo endoplasmático rugoso (RER); em outros, elas são transportadas do RER, via Golgi, para membranas vacuolares (Larkins, Craing e Barros, 1991). Especialmente no milho, as prolaminas são sintetizadas no RER, e subseqüentemente depositadas no interior de corpos protéicos. O estudo mais detalhado dessas estruturas, assim como a localização das diversas classes de 'zeínas' no interior dos corpos protéicos, ocorreu através de técnicas imunocitológicas (Lending et al., 1988; Wallace et al., 1988; Larkins, Craing e Barros, 1991).

A distribuição dos diferentes tipos de 'zeínas' no interior dos corpos protéicos do milho parece ser determinada pelas variações temporais e espaciais na síntese de proteínas, durante o desenvolvimento do endosperma (Lending et al., 1988; Dumas e Mogesen, 1993). Existe uma relação próxima entre a composição das 'zeínas' e os diferentes tamanhos dos corpos protéicos, conforme os estádios de maturação da semente (Larkins, Craing e Barros, 1991). A síntese das 'zeínas' ocorre entre 10 e 40 dias após a polinização, sendo que o acúmulo dessa proteína se dá de forma linear, dos 14 até 35 dias após a polinização (Soave et al., 1975).

As 'zeínas' são transcritas por mRNAs que compõem polirribossomas aderidos à superfície das membranas do retículo endoplasmático. Mediante a clivagem do peptídeo-sinal, na porção amino-terminal do peptídeo, essas proteínas são direcionadas para o interior do lúmen do retículo endoplasmático, onde se agregam formando os corpos protéicos (Wallace et al, 1988). Os corpos

protéicos possuem uma estrutura quase esférica, com o diâmetro variando entre 1,0 a 2,0 μ m, sendo que a maioria possui diâmetro na faixa de 0,3 a 1,3 μ m (Lending et al, 1988). Em genótipos normais, os corpos protéicos possuem um diâmetro que varia de 0,8 a 1,2 μ m (Larkins, Craing e Barros, 1991).

Baseando-se nas diferentes distribuições das zeínas nos corpos protéicos, Larkins, Craing e Barros (1991), sugeriram um modelo padrão para essas deposições: inicialmente haveria uma formação de depósitos de beta e gama-zeínas. Posteriormente, as alfa-zeínas começariam a formar-se de forma discreta dentro da matriz formada pelas frações anteriores, culminando com o seu acúmulo no centro, deixando a beta- e gama-zeína na periferia (Lending et al., 1988; Larkins, Craing e Barros, 1991). No entanto, a quantidade e a distribuição relativa dessas proteínas variam substancialmente entre os diferentes corpos protéicos (Lending et al., 1988). Por causa da insolubilidade das prolaminas em solventes aquosos, existem muitas dificuldades para o estudo da sua conformação e interações estruturais (Larkins, Craing e Barros, 1991).

2.5 Características dos genes das 'zeínas'

Utilizando-se cDNAs como sondas de hibridação, fragmentos de DNA nuclear contendo genes de várias classes de 'zeínas' foram isolados e depois seqüenciados (Tsai, 1983). Os genes que codificam as alfa-zeínas compreendem uma grande família de aproximadamente 75-100 genes (Hagen e Rubenstein, 1981; Burr e Burr, 1982); porém, esse grande número não contribui como fator único para descrever a complexidade de cargas detectadas por análise de focalização isoeétrica (IEF) (Wilson, Shewry e Mifflin, 1981; Soave e Salamini, 1984; Motto et al., 1989), e eletroforese de SDS bidimensional (Thompson e

Larkins, 1989). Outros aspectos de regulação e modificação pós-transcricionais também colaboram para os complexos padrões isoelétricos (Tsai, 1983)

Os clones genômicos correspondendo às 'zeínas' de 19 e 22 kDa têm ajudado no conhecimento da organização molecular da complexa família multigênica da alfa-zeína (Lopes, 1993). Entre os genes de uma classe particular de 'zeínas', podem ser observados aspectos de similaridades e diferenças entre as suas seqüências. A heterogeneidade observada entre essas seqüências são, provavelmente, (i) resultantes do variado número de elementos repetidos, (ii) de uma alta freqüência de substituição de bases, ou (iii) de inserções e deleções (Shotowel e Larkins, 1989). Embora as seqüências de genes de 'zeínas' de diferentes classes tenham mostrado pouca homologia, eles apresentam funções similares. Suas expressões são bastante específicas e altamente coordenadas durante o desenvolvimento do endosperma, sendo que todos os produtos principais são guiados e empacotados nos corpos protéicos (Feix e Quayle 1993). Estruturalmente, estes genes diferentes também mostraram algumas características comuns: não possuem introns em suas regiões codificadoras, e as seqüências que codificam essas proteínas são organizadas em domínios estruturais, de forma a facilitar que as proteínas sintetizadas assumam estruturas secundárias adequadas para o seu empacotamento no interior dos corpos protéicos (Agros et al., 1982).

A comparação de seqüências flanqueadoras e elementos promotores entre as várias classes de 'zeínas' revelaram várias diferenças entre elas. A única exceção é o "box-300", também chamado "box da prolamina", que está presente em distâncias semelhantes nas regiões regulatórias de quase todos os genes conhecidos de proteínas de reserva dos cereais. Existem 7 pb altamente conservados compondo o elemento central TGTAAG, que é similar ao elemento central do SV40. Outro ponto interessante revelado é a ocorrência de múltiplos

promotores na classe de genes da proteína de 19 e 21kDa. Os dois promotores P1 e P2, localizados a 50 e 950pb da região do códon de iniciação, respectivamente, são seguidos pelo CAAT e TATA *boxes* (Feix e Quayle 1993). No caso dos genes que codificam para outras classes de 'zeínas' - 10, 14 e 15kDa, somente um ou poucos genes por classe têm sido detectados no genoma.

A proteína de 27kDa também pode ocorrer como uma proteína truncada de 16kDa de tamanho. A 'zeína' de 15kDa é uma proteína rica em metionina, possui 180 aminoácidos (incluindo os 20 aminoácidos do peptídeo-sinal), é codificada por um gene simples (no cromossomo 7) e não mostra alta homologia com outras 'zeínas', exceto para o domínio rico em cisteína da proteína de 27kDa. A 'zeína' de 10kDa também é codificada por um único gene (no cromossoma 9), sendo rica em metionina (22%), possuindo 192 aminoácidos e precedido de um peptídeo-sinal de 21 aminoácidos (Feix, e Quayle 1993).

Através do mapeamento genético, os genes que codificam as 'zeínas' têm sido localizados nos cromossomas 4, 7 e 10, agrupados no braço curto do cromossoma 7 e 4. Os genes que codificam as 'zeínas' também têm sido identificados no braço longo do cromossoma 10 e no braço longo do cromossoma 4. O único gene que corresponde à gama-zeína tem sido mapeado no braço curto do cromossoma 7. Recentemente, alguns genes correspondendo a beta- (14 kDa) e gama-zeínas (27 kDa) foram isolados, sendo mapeados através de RFLP, indicando que pertencem ao cromossoma 6 e 7, respectivamente (Lopes, 1993).

2.6 Mutações que alteram a estrutura do endosperma

Um grande número de mutações é conhecido por afetar a síntese das proteínas de reserva no endosperma do milho (Motto et al., 1989). Em geral, o endosperma desses mutantes é frágil e geralmente está associado com a baixa capacidade de sintetizar proteínas especiais como as prolaminas (Lopes, 1993).

Desde o surgimento do mutante *opaco-2* (*o2*), caracterizado pelo elevado teor de lisina e triptofano, e apresentando fenótipo opaco, vários outros mutantes têm sido caracterizados; dentre eles: *floury-1*(*fl1*), *floury-2* (*fl2*), *floury-3* (*fl3*), *opaco-1* (*o1*), *opaco-5* (*o5*), *opaco-6* (*o6*), *opaco-7* (*o7*), *opaco-10* (*o10*), *opaco-11* (*o11*), *opaco-12* (*o12*), *opaco-13* (*o13*), e o de endosperma defeutivo *B-30* (*DeB30*) (Soave e Salamini, 1984; Lopes et al, 1994). Devido à presença de características desejáveis, muitos mutantes vêm sendo incorporados em programas de melhoramento; contudo, por causa de outros efeitos pleiotrópicos e deletérios associados a este fenótipo, o seu aproveitamento só é possível através do uso de modificadores genéticos capazes de restaurar as características agronômicas 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 é de fundamental importância para o seu aproveitamento no desenvolvimento de variedades com qualidade protéica melhorada do grão.

Dentro desse contexto, o Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo - CIMMYT tem adotado a seleção recorrente com o uso de genes modificadores para viabilizar o aproveitamento dessas classes de mutantes, promovendo o restabelecimento dessas características agronômicas desejáveis. Localizado no cromossoma 7, em homozigose, o mutante *o2* afeta a classe das 'zeínas' de 22kDa, assim como o gene da *B-32* que codifica uma albumina (uma 'não-zeína', Feix e Quayle, 1993). Neste mutante, ocorre a redução ainda maior (de 50 - 70%) do conteúdo normal de 'zeínas', dependendo do *background* genético (Lohmer et al., 1991). O controle dessa expressão se dá ao longo do desenvolvimento do endosperma. Outras classes polipeptídicas são pouco afetadas.

O alelo *opaco-2* codifica uma seqüência interrompida por cinco íntrons e precede uma outra longa seqüência não-interrompida. A porção da seqüência de aminoácidos deduzida a partir de cDNAs revelou uma impressionante homologia com o “zíper básico de leucina”, característica de vários protooncogenes de mamíferos e outros fatores de transcrição de fungos (Schimdt, 1993, Feix e Quayle, 1993). Esta estrutura possui duas partes: uma de repetição periódica de uma leucina a cada 7 aminoácidos (o “zíper”) e um domínio adjacente de carga positiva, correspondendo ao domínio básico, que é responsável pelo reconhecimento do DNA alvo. O alelo funcional, portanto, mediante a sua estrutura é capaz de reconhecer e se ligar a seqüências de nucleotídeos específicos, localizados na região promotora dos genes da alfa-zeína, regulando assim sua expressão (Feix e Quayle, 1993).

O produto do gene *opaco-2* está localizado no endosperma amiláceo e no tecido de uma região abaixo da camada de aleurona (‘subaleurona’). O gene e o seu efeito, não foi detectado em outros tecidos como embrião e aleurona (Varagona, Schimdt e Raikhel, 1991). Em relação ao gene *B-32*, existe uma hipótese de que a proteína B-32 faz parte de uma classe que contribui para a regulação da expressão das ‘zeínas’, devido a sua íntima conexão com o loco *opaco-6*. Mediante a utilização de clones de cDNAs, a seqüência da proteína foi deduzida: trata-se de uma proteína monomérica composta de 303 aminoácidos, que não possui peptídeo-sinal e com uma região ácida central separada por dois domínios englobados por uma estrutura secundária. Tal configuração sugere que esta proteína funciona como um fator de transcrição, que poderia estar interagindo com as regiões regulatórias 5’ dos genes das ‘zeínas’ (Feix e Quayle, 1993). Entretanto, segundo Schimdt (1993), existem vários pontos que não foram considerados na hipótese em questão. Primeiro, foi demonstrado numa recente descoberta que a mutação *o6* é alélica para o *pro-I*, um gene que afeta o

acúmulo da prolina; portanto, o efeito da proteína O6 no acúmulo de 'zeína' seria um dos efeitos pleiotrópicos não-relatados na expressão da B-32. Segundo, a elevada abundância desta proteína no tecido endospermico similar aos níveis típicos de albuminas e globulinas, não seria uma quantidade típica de uma proteína regulatória o mesmo acontecendo com a sua localização que é de natureza citoplasmática. Terceiro, o fato da proteína O2 ligar-se à 'zeína' nos elementos promotores indica que ela tem uma influência direta na expressão dos genes das 'zeínas', e não indiretamente através da ativação do gene da B-32. Um artigo recente sugere que a B-32 é uma proteína que inativa ribossomos (RIP), com um possível papel na defesa contra o ataque de patógenos (ver Schmidt, 1993).

Um outro mutante opaco, *fl2*, foi reconhecido como capaz de afetar o acúmulo de proteínas de reserva do endosperma, produzindo altas quantidades de lisina, triptofano e metionina, quando comparado com genótipos normais (Nelson et al, 1965). Os genótipos do *floury-2* apresentam uma distribuição irregular de várias classes de 'zeínas' no interior de corpos protéicos (Lending et al., 1988) e, com isso, o ordenamento e distribuição dos corpos protéicos sofrem perturbação, resultando em grãos imaturos (Zhang e Boston, 1992). A mutação foi identificada no começo do século e foi mapeada perto dos genes que codificam várias classes de polipeptídeos de alfa-zeínas, no cromossoma 4. Assim como no *opaco-2*, as bases dessas mudanças refletem-se na proporção de vários aminoácidos essenciais no endosperma do *fl2*. Parece também, neste caso, que a síntese das 'zeínas' é reduzida e acompanhada do incremento da síntese de 'não-zeínas'. Através de análises genéticas e bioquímicas, foi demonstrado que o *o2* é epistático para o *fl2* (Di Fonzo et al., 1979). O fato de o *fl2* estar associado a um sério defeito pleiotrópico, quando comparado com *o2*, gera um reduzido interesse

em utilizar esse mutante em programas de desenvolvimento de cultivares com incremento na qualidade nutricional do grão (Lopes, 1993).

2.7 Proteína B-70

Em células eucarióticas existem proteínas do tipo ‘chaperonas’ que são conhecidas há muitos anos, mas cujo o papel de “acompanhantes moleculares” só foi descoberto recentemente (Gatenby, Vitonen e Lorimer, 1990). As ‘chaperoninas’ pertencem a este grupo, funcionando como um sub-grupo de proteínas que “acompanham” outras, promovendo a modelagem e estruturação secundária e terciária dessas últimas, sem tomar parte em suas estruturas. Esse sub-grupo inclui a Bip-hsp70 (Gatenby, Vitonen e Lorimer, 1990).

Os membros do grupo das hsp-70 são altamente conservados através da evolução e são fortemente induzidos por choques térmicos (*heat-shock proteins* – ‘hsp’) e outras formas de estresse celular. Uma proteína homóloga da Bip (uma imunoglobulina de mamífero), chamada de B-70, foi caracterizada (Marroco et al., 1991; Fontes et al., 1991). Essa proteína e a Bip apresentam seqüências de aminoácidos e propriedades bioquímicas similares (Fontes et al., 1991), possuindo também capacidade de ligarem-se ao ATP (Georgopoulos, 1992). Várias observações indicam uma possível atividade da B-70 como uma chaperonina.

Algumas sementes de milho mutantes, que expressam o fenótipo opaco, super-expressam um polipeptídeo de 70kDa (o B-70), solúvel em água, associado a corpos protéicos e com as espessas membranas do retículo endoplasmático (RE). Isto sugere que a B-70 é um componente do RE, daí a sua resistência ao tratamento com proteases, por estar assim protegida (Fontes et al., 1991). No *floury-2*, a B-70 está associada com corpos protéicos anormais, sendo que nesse mutante o decréscimo nos níveis de ‘zeína’ é acompanhado pelo aumento nos

níveis da B-70. Embora a base molecular da mutação *fl2* seja desconhecida, a super produção da B-70 pode refletir um defeito no processo de estruturação das proteínas de reserva e, conseqüentemente, no seu agrupamento no interior dos corpos protéicos.

2.8 Genótipos *opaco-2* modificados

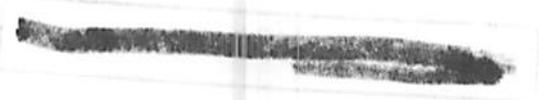
QPMs são genótipos do tipo 'opaco-modificados', semelhantes aos mutantes *opacos-2* em termos de qualidade nutricional, diferindo destes, porém, no aspecto físico do endosperma. Os QPMs possuem um endosperma duro, de textura vítrea aliada a uma qualidade nutricional maior e uma produtividade considerada normal. Assim, os QPMs fornecem meios para o desenvolvimento prático de genótipos de alto teor de lisina o que confere uma elevação na qualidade nutricional do grão. Contudo, ainda faz-se necessário o melhoramento neste e em outros aspectos de qualidade protéica (Moro et al., 1996), já que o conteúdo de lisina no QPM ainda é menor do que 5mg/100mg de proteína, nível mínimo recomendável para a dieta humana (Moro et al., 1996). Para a obtenção desses genótipos com alta qualidade protéica, vários ciclos de seleção são necessários. Nesses programas de melhoramento, além de se buscar melhorar as características nutricionais, consideram-se outras propriedades de performance agrônômica como dureza, textura, produtividade, porte, resistência ao quebramento, adaptação ambiental, etc. Nesse sentido, para cada ciclo de seleção, é necessário incluir análises criteriosas para o monitoramento dessas características no decorrer do processo de seleção.

Em 1984, pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo EMBRAPA introduziram 23 variedades de milho QPM do CIMMYT no Brasil, avaliou-se o seu desempenho em várias regiões do país. Em 1988, foi

lançada a variedade BR451, derivada da população 'Blanco Dentado-2' – QPM, que apresentou boa adaptação a vários ambientes brasileiros. A conversão do endosperma opaco em vítreo ocorreu por sucessivos retrocruzamentos, com o objetivo de aumentar a síntese da gama-zeína de 27kDa, o que está aparentemente associado a essa característica física (Lopes, 1983; Wallace et al., 1990; Paiva et al., 1991). Além disso, o aumento na expressão da gama-zeína é dependente da dose de genes modificadores que parecem agir de maneira semi-dominante e de forma independente do locus *opaco-2* (Lopes e Larkins, 1991).

A EF-1 α é uma das várias proteínas que aumenta seus níveis significativamente no endosperma do *o2* (Moro et al., 1996). Por causa da surpreendente relação entre a EF-1 α e o conteúdo de lisina no endosperma do milho, essas avaliações foram estendidas a outros genótipos de cereais, como sorgo e cevada, evidenciando que a concentração de lisina no endosperma está correlacionada à quantidade desta 'não-zeína' - o fator de síntese EF-1 α (Habben et al., 1995).

A EF-1 α é uma proteína multifuncional que participa da ligação do aminoacil-tRNA no ribossomo e executa outras funções celulares; ela estaria também associada ao citoesqueleto, ao retículo endoplasmático, e microtúbulos (Shiina et al., 1994; Durso e Cyr, 1993). Existe a evidência indireta de que o citoesqueleto desempenha um papel importante na síntese das 'zeínas', através de sua associação com a membrana do retículo endoplasmático rugoso que envolve os corpos protéicos (ver Habben et al., 1995). A associação da EF-1 α com o citoesqueleto que envolve os corpos protéicos também pode explicar a base dessa correlação por estimular a estruturação destes corpos (o diâmetro dos corpos protéicos nestes genótipos ricos em lisina variam de 1/5 a 1/10 do diâmetro em genótipos normais) assim, mais corpos protéicos poderiam ser sintetizados, aumentando, então, os níveis de lisina. No mutante *opaco-2*, tais corpos protéicos



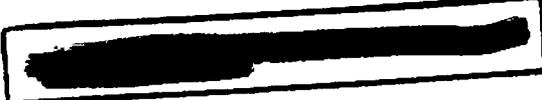
aparecem em grande número (Clore, Dannenhoffer e Larkins, 1996). Contudo, a base bioquímica da relação entre EF-1 α e o conteúdo de lisina ainda é desconhecida.

A super expressão de proteínas ricas em lisina, através da engenharia genética, é um método alternativo para o melhoramento tradicional na qualidade dos grão de milho (Habben, Kirleis e Larkins, 1993). A EF-1 α é, pois, um bom candidato para essa estratégia, já que a alta correlação entre EF-1 α e o conteúdo de lisina é função de uma relação estequiométrica no endosperma entre EF-1 α e outras proteínas contendo lisina (Moro et al., 1996).

2.9 Qualidade física do endosperma

A 'textura' (farinácea ou consistente) do endosperma do grão está relacionada com o seu peso, sua densidade (Cavanaugh et al., 1995) e seu teor de umidade (Mutuhkumarappan e Gunasekaran, 1994). A textura é muito influenciada pela umidade, sendo o seu conhecimento muito importante para se prever as condições ideais de armazenamento, secagem e aeração dos grãos. Apesar da importância dessa característica, o seu efeito entre os componentes da matriz do endosperma ainda não está bem estabelecido (Mutuhkumarappan e Gunasekaran, 1994).

Já para a 'dureza', não existe uma definição simples; diversas definições arbitrárias formam a base de vários testes de dureza, os quais variam muito em complexidade. Alguns destes incluem (i) o uso da simples penetração de um instrumento pontiagudo, (ii) o índice de tamanho de partícula (PSI), (iii) o teste de compressão, etc. Todos esses testes respondem de maneira diferente para mudanças no tamanho do grão, níveis de proteína, teor de umidade, temperatura, etc. (Abdelrahman e Hosney, 1984). Existem outros métodos mais rápidos que



auxiliam no processo de seleção para a dureza do endosperma muitos deles têm sido descritos e os resultados podem ser os mais variados por que eles respondem de forma diferente para as mudanças no tamanho do grão, proteínas e variações entre as proporções dos componentes do grão (Abdelrahman e Hosene, 1984). A comparação entre esses valores é complicada, em virtude dos vários fatores que podem estar envolvidos no controle dessa característica. Em termos de 'densidade', um dos testes mais utilizados é o "método da proveta" (ver Materiais e métodos), que consiste na padronização do teor de umidade das sementes e a posterior medição do volume de etanol para determinado número de grãos, comparando-se em seguida o peso seco com o peso em conjunto (sementes + etanol).

A densidade é uma 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 utilizados 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). A dureza pode ser definida como a resistência do grão à deformação imposta por forças externas. 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), através do 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 essa característica.

As diferentes estruturas do endosperma são consequência de um grande número de variáveis, tais como a espessura da parede celular, o número de corpos protéicos, o tamanho da célula, as características do citoesqueleto, etc. Microfotografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura revelaram que no endosperma duro as porções dos grânulos de amido são compactados e poligonais, enquanto que no farináceo essas partes são mais esféricas e levemente empacotadas (Robutti, Hoseney e Wassom, 1974). A porção interna do endosperma do milho é comumente mole ou farinácea e contém longas células com grossa parede celular (Wolf et al., 1952). A microscopia eletrônica, aliada à localização imunocitoquímica das proteínas do endosperma, tem revelado considerável variação no tamanho da célula e na reserva e distribuição de proteínas dentro delas (Lending e Larkins, 1989). Isto é consequência do fato de a composição da proteína de reserva ser diferente entre as regiões interna (textura mole) e externa (textura dura) do endosperma. O endosperma duro possui mais proteína de reserva que o endosperma mole, sugerindo que a composição da proteína de reserva e sua distribuição espacial podem afetar o seu desenvolvimento e estrutura física na maturação da semente (Wolf et al., 1967; Dombrink-Kurtzman e Bietz, 1993).

No endosperma mole, as células são maiores e os grânulos de amido são frouxamente empacotados, enquanto que no endosperma duro as células são pequenas e os grânulos de amido estão firmemente empacotados.

3 Material e métodos

3.1 Material genético

A estratégia utilizada para a execução dos experimentos consistiu em se cruzar um híbrido simples de endosperma vítreo (BR201) com um milho indígena de endosperma farináceo ou opaco (BOL II), obtendo-se populações F_1 que foram, posteriormente, autofecundadas para a obtenção de populações segregantes F_2 .

As populações de milho indígena de endosperma farináceo foram BOL II (Bolívia), MT II (Mato Grosso-BR), PR I (Paraná-BR) e Preto Chileno (Chile), identificadas de acordo com o local de origem. Utilizou-se como fonte de caráter vítreo, o híbrido simples (HS) BR201M (usado como fêmea) e, como controle, o BR451(QPM).

Os indivíduos utilizados nesse trabalho foram resultantes do cruzamento entre o BR201 (P_1) X BOL II (P_2), assim como o cruzamento recíproco entre esses materiais que constituíram a população F_1 . As sementes F_2 do mesmo cruzamento e os genótipos indígenas foram fornecidas pelo Programa de Melhoramento Genético do Milho do CNPMS/EMBRAPA. Os materiais foram classificados de acordo com o fenótipo por meio de um transluminador (caixa de luz). Para efeito prático, as sementes foram avaliadas em duas classes de segregação fenotípica opaco e semi-opaco (ou intermediários). Posteriormente, testou-se a hipótese de segregação entre os fenótipos opacos e semiopacos. Tais freqüências foram avaliadas através do teste de qui-quadrado. As sementes da geração F_2 foram plantadas para a obtenção de populações segregantes $F_{2:3}$.

3.1.1 Condução dos experimentos

A condução dos experimentos ocorreu no campo experimental do CNPMS/EMBRAPA, onde, numa faixa homogênea e de solo fértil, foram feitas adubações de cobertura e tratos culturais, visando proporcionar condições ótimas para o desenvolvimento das plantas. A área de plantio consistiu em 36 fileiras de cinco metros, com espaçamento, entre elas, de 1 metro. A população F_2 do cruzamento entre o BR201 X BOL II originou-se de 300 indivíduos que foram distribuídos de acordo com o fenótipo, obtendo-se dois grupos de plantas: as oriundas do fenótipo opaco e as originadas do fenótipo semi-opaco. O plantio do experimento foi efetivado em outubro de 1997; foram realizadas autofecundações, e em março de 1998 realizou-se a colheita da população $F_{2.3}$.

Para testar a hipótese, de tratar-se ou não de herança monogênica, as sementes da geração F_2 foram semeadas em lotes separados, de acordo com as duas características fenotípicas citadas anteriormente. As plantas foram autofecundadas manualmente e, após a colheita, avaliou-se mais uma vez a segregação fenotípica entre as espigas (famílias) e entre os grãos de cada espiga, isto é, avaliação 'entre' e 'dentro' de famílias. As espigas foram colhidas e autofecundadas, sendo que o tipo de segregação foi verificado por meio do teste de qui-quadrado. Os grãos foram contados e procedeu-se uma nova avaliação com o objetivo de se observar a segregação dentro das famílias (espigas).

Os genótipos envolvidos nos experimentos foram os seguintes: (i) os genitores da geração F_1 (BOL II e BR201 HS (M)), (ii) os indivíduos originados de cruzamentos recíprocos entre estes (BOL II X BR201 HS (M) e BR201 HS (M) X BOL II), (iii) três genótipos indígenas (MT II, PR I, e PRETO CHILENO) e BR 451-QPM (testemunha).

Nas análises da geração F_2 , foram incluídos os indivíduos da geração F_1 (1 a 4) descritos anteriormente, mais os indivíduos segregantes para o fenótipo opaco e semiopaco e também o QPM, como testemunha. Nesses estudos, uma maior atenção foi voltada para a interpretação dos dados referentes aos genótipos segregantes, isto é, opacos e semi-opacos.

Referente à geração $F_{2,3}$, os indivíduos foram escolhidos com o auxílio de um transluminador, formando-se dois grupos de amostras para essa geração: o primeiro formado por elementos que apresentavam o fenótipo opaco e o segundo caracterizado pelos indivíduos de fenótipo vítreo

3.2 Extração e fracionamento das proteínas do endosperma

3.2.1 Preparo do endosperma.

Com o auxílio de um bisturi, retirou-se o embrião das sementes, juntamente com o escutelo; as sementes foram trituradas manualmente em um pilão até que se obter um pó bastante fino, sendo posteriormente repassadas durante cinco minutos num moinho especial, comumente utilizado na moagem de pequenas quantidades de tecidos (WIG-L-BUG AMALGAMTOR, modelo 3110-3 A). O resultado da moagem foi armazenado em temperatura ambiente. As amostras foram pesadas obedecendo-se uma proporção de 1:10 p/v, ou seja, 100mg de endosperma por 1ml de tampão de extração. Todo o material utilizado para análise foi estratificado em quatro alíquotas que foram submetidas ao mesmo tampão de extração, originando, assim, as quatro repetições.

3.2.2 Obtenção da proteína total

A extração de proteína total foi feita em microtubos *ependorf* de 1,5ml, adicionando-se 100mg de endosperma pulverizado a 1ml de tampão de extração - borato de sódio 12,5 mM (pH 10,0); SDS 1,0 %; e 2- β -mercaptoetanol 2,0 % (v/v). As amostras foram homogeneizadas em vortéx (Genie 2) para permitir um melhor contato entre o pó (endosperma pulverizado) e o tampão. Em seguida, foram mantidas sob agitação constante durante uma noite, à temperatura ambiente. Posteriormente, centrifugou-se as amostras a 14000 rpm por 10 minutos, (microcentrífuga EPPENDORF modelo 5415C). O sobrenadante contendo as proteínas totais solubilizadas foi transferido para outro microtubo, o qual foi estocado (4 °C). Para aplicar no gel, retirou-se 50 μ l deste estoque e adicionou-se 40 μ l de corante-tampão de amostra - DYE, (0,2% de azul bromofenol (p/v), tris-HCl 25mM, glicerol 50%). Esta solução foi fervida durante 5 minutos antes de ser aplicada em gel de gradiente de poli(acrilamida).

3.2.3 Obtenção das frações 'não-zeínas'

A extração das não-zeínas a partir do endosperma pulverizado foi realizada com tampão contendo borato de sódio 0,125M (pH 10), SDS 1,0% (p/v), e 2- β -mercaptoetanol 2,0 % (v/v). Após agitação constante por no mínimo 4 horas à temperatura ambiente, em microtubos de 1,5ml, os materiais foram centrifugados a 14.000rpm por 10 minutos (microcentrífuga EPPENDORF modelo 5415C). O sobrenadante de cada amostra foi transferido para outro microtubo, ao qual adicionou-se etanol absoluto, de modo que a solução apresentasse uma concentração final de 70% v/v. Em seguida, com o auxílio do vortéx, procedeu-se a homogeneização das amostras, que foram armazenadas

durante 12 horas a 4°C, e posteriormente centrifugadas a 14.000 rpm durante 15 minutos. As frações solúveis em álcool (sobrenadante) contendo as zeínas foram separadas e acondicionadas em novos microtubos. O pellet (por amostra) formado pela precipitação com o etanol, o qual corresponde à fração 'não-zeína', foi seco ao ar num período aproximado de 20 minutos e resuspendido em 60µl de tampão de extração contendo SDS (vide acima). Antes de serem aplicadas em gel de gradiente de poliacrilamida, acresceu-se a cada amostra, 40µl de corante-tampão-DYE, para eletroforese a estes 60µl, fervendo-as durante 5 minutos.

3.2.4 Obtenção da fração 'zeínas'

As zeínas são representadas pela fração solúvel no álcool, resultantes, no sobrenadante, dos procedimentos descritos acima (amostra + etanol 70%). Da segunda etapa de centrifugação anterior, coletou-se alíquotas de 200µl e adicionou-se 1200µl de acetona, na proporção 1:6; em seguida, estas foram acondicionadas em geladeira, a 4°C, durante uma noite. Posteriormente, foram centrifugadas durante 15 minutos, sendo que o "pellet" obtido representou a fração 'zeína'. Estes materiais foram resuspendidos em volumes de 60µl do mesmo tampão de extração (Borato), sendo posteriormente adicionados 40µl do corante-tampão de amostra para eletroforese, e fervendo-se o total durante cinco minutos antes de serem aplicados em gel de poliacrilamida.

3.3 Análises de proteína

Para essas análises, optou-se por géis de poliacrilamida de gradiente 7,5% a 17,5%, num sistema descontínuo em que o sobregel foi formado com 20 poços e o gel separador com o comprimento de 20cm, com o objetivo de facilitar a separação das bandas e auxiliar no poder de resolução.

3.4 Densidade dos grãos

Para a determinação da densidade dos grãos, utilizou-se sementes do cruzamento entre o BOL II X BR201, do seu recíproco e dos milhos indígenas fornecidos para o estudo. Antes de se determinar a densidade, padronizou-se a umidade das sementes colocando-as em estufa a 37°C por três dias. A densidade foi determinada segundo Kniep e Mason (1989). Uma proveta de 50ml foi colocada sobre uma balança eletrônica, onde foram pesados 50 grãos; e o volume foi completado com etanol absoluto (densidade igual a 0,78612g/ml) até 30ml e o peso dos grãos em etanol foi registrado.

A densidade foi calculada segundo a seguinte equação:

$$\text{Densidade (g/ml)} = \frac{m_1}{30 - [(m_2 - m_1) / 0.78612]}$$

(m_1) = massa dos grãos

(m_2) = massa do etanol + grãos

As avaliações foram feitas com os genótipos da geração F₁ e F_{2,3}. Quanto à segunda geração, não foi possível avaliá-la em virtude da quantidade de materiais empregados para a análise, com as respectivas repetições (150 sementes). Para a avaliação da geração F_{2,3}, escolheu-se duas famílias com características fenotípicas contrastantes para o grão: opaco e vítreo. Para cada avaliação foram feitas três repetições.

3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As características dos géis utilizados estão sumarizadas na Tabela 1. Foram utilizados géis de poliacrilamida em gradiente de 7,5% a 17,5% (gel separador) num sistema descontínuo, com espessura de 1,5mm e contendo SDS, de acordo com a metodologia de Laemmli (1970). Os tampões utilizados foram Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) no gel concentrador e Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) no gel separador.

Aplicou-se 15µl de amostra por poço (canaleta) de gel para proteína total e 12µl para não-zeínas, num equivalente a 3,0 e 3,6mg de endosperma moído, respectivamente. Na separação eletroforética foi utilizado tampão Tris-glicina (Tris 0,05M, Glicina 0,192M, pH 8,3 e SDS 0,1%), sob uma amperagem de 50mA que permaneceu constante até o final da corrida.

Os géis foram corados em solução de *Coomassie Blue R-250* 0,1% em metanol 50% e ácido acético 10%, por um período de 8 horas, sob leve agitação. Durante a descoloração o excesso de corante foi retirado utilizando-se uma solução de ácido acético 10%, (v/v) os géis permaneceram sob leve agitação numa bandeja durante um período aproximado de 6 horas. Após a descoloração, eles foram visualizados com o auxílio de um transluminador. Foram escolhidos os

polipeptídeos que mostraram diferenças visíveis entre os genótipos para as análises posteriores.

TABELA 1 - Reagentes e concentrações utilizados no preparo de géis de poliacrilamida

GEL SEPARADOR			GEL CONCENTRADOR	
Reagentes	7,5%	17,5%	Reagentes	6,0%
dH ₂ O	10,0ml	3,3ml	dH ₂ O	3,9ml
Acrilamida	5,0ml	11,6ml	Acrilamida	1,4ml
Tris-HCl 1,5 M	5,0ml	5,0ml	Tris-HCl 0,5 M	1,7ml
P.Amônio (10%)	100µl	100µl	P.Amônio 10%	20µl
TEMED	16µl	16µl	TEMED	15µl

A estratégia utilizada para o ordenamento das amostras nos géis de poliacrilamida foi a de colocar os genitores nas canaletas, obedecendo-se uma ordem gradual de dosagem de alelos partindo-se do genótipo indígena BOL II, (aaa); BOL II X BR201 (aaA), BR201 X BOL II, (AAa); BR 201, (AAA). Essa ordem foi obedecida em todas as análises em géis de poliacrilamida das gerações F₁ e F₂

Nesses géis foram utilizados, como marcadores de peso molecular, dois kits padrões, MW - SDS 70L e MW SDS - 200 (SIGMA), com as respectivas faixas de peso molecular entre 66-14,2 kDA (baixo peso) 205 e 29-, kDA (alto peso).

3.6 Densitometria

Após a descoloração, os géis foram escaneados e submetidos à análise de densitometria a laser (Densitometer SI - Molecular Dynamics). A imagem foi gerada usando o programa 'ImageQuaNT™' v 4.2, sendo que seus ajustes dependeram do programa 'Grey/Color Adjuster Window'. Esse tipo de análise é baseada na intensidade de coloração do Comassie Blue Brillant, que é diretamente proporcional à quantidade de proteína presente na amostra. A unidade ('pixel') varia de 0,000 a 4095 de densidade ótica (OD). Os polipeptídeos foram selecionados dentro de uma mesma faixa de peso; tendo sido escolhido o que apresentou o maior tamanho e delimitada sua área. Esta mesma área foi utilizada para individualizar as bandas de interesse das demais (Figura 2).

O arranjo das áreas selecionadas foi feito de tal forma que a numeração facilitasse a identificação, tanto da banda como da amostra que constitui o genótipo. Com todos os polipeptídeos devidamente marcados, a imagem foi gravada e enviada para o programa 'Volume Report Window', que determina os resultados e os transferem para o 'Excel'. Estes resultados correspondem a valores adimensionais de absorbância, na unidade 'Relative Pixel Density', ou RPD. Esses valores foram tabulados, e a partir daí foram feitas as análises estatísticas .

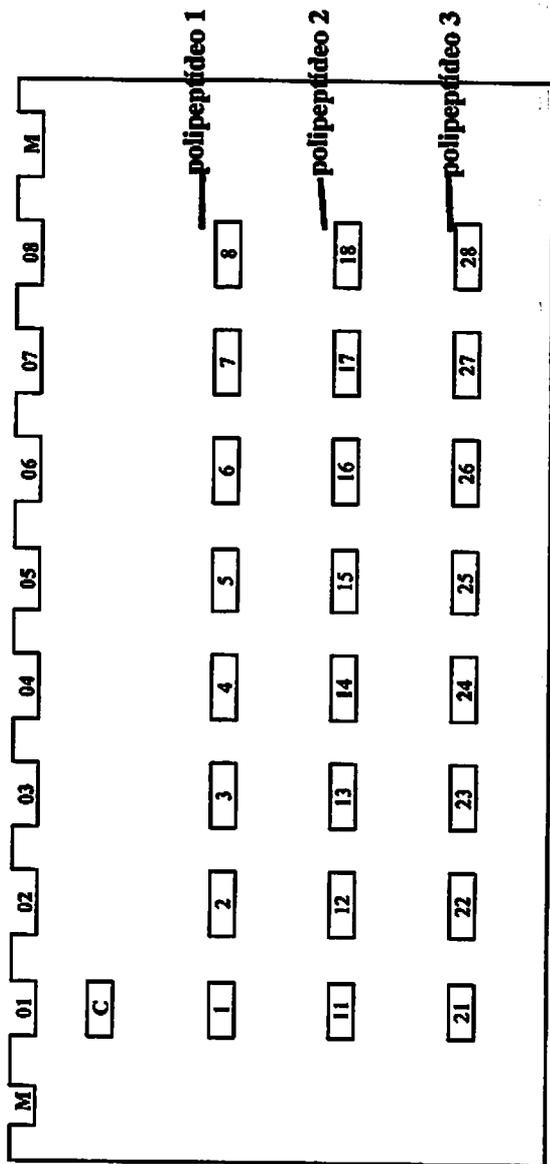


Figura 1 - Croqui do Gel de poliacrilamida, com as respectivas marcações das bandas polipeptídicas no densitômetro a Laser - C = Fator correção (background)

3.7 Delineamento estatístico

Com a finalidade de analisar os valores de absorvância (obtidos por densitometria a laser), foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições por tratamentos. A única exceção foi feita para as zeínas, analisadas com três repetições. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa MSTAT, tendo sido realizados testes de médias (teste de Tukey), para cada análise optando-se pelo nível de 5% de significância.

4 Resultados

Os materiais foram ordenados para o estudo dos padrões protéicos da seguinte forma: 1- BOL II; 2- BOL II X BR201 HS (M); 3- BR201 HS (M) X BOL II; 4- BR201 HS (M); 5- MT II; 6- PR I; 7- PRETO CHILENO; 8- BR451 QPM (testemunha). Um dos objetivos deste ordenamento (especialmente de 1 a 4) foi avaliar o efeito da dosagem de alelos entre os genótipos genitores descritos anteriormente, por meio de análise dos cruzamentos recíprocos entre eles. As análises foram executadas através da verificação das quantidades de proteínas, usando-se densitometria a laser em géis de poliacrilamida.

As sementes resultantes do cruzamento recíproco entre BOL II e BR201 correspondem à geração F_1 com o fenótipo vítreo. Estas sementes originaram plantas que foram autopolinizadas manualmente dando origem à geração F_2 cuja as sementes apresentaram fenótipo opaco e o intermediário do tipo semi-opaco (Tabela 2). O teste de X^2 (qui-quadrado) sugere não se tratar de uma segregação fenotípica na proporção de 3 semi-opaco:1 opaco, enfraquecendo a hipótese de herança monogênica. No entanto, a segregação entre plantas na geração F_{23} indica segregação típica de herança monogênica, resultado confirmado através do teste X^2 (Tabela 2)

TABELA 2 – Número de plantas F_2 e de plantas F_{23} segregantes para os fenótipos opacos e semi-opacos (s-opacos).

MATERIAL	FENÓTIPO DOS GRÃOS			X^2	
	População F_2	opacos	s-opacos		Total
BR-201 X BOL-II F_2		81	332	413	6,39 ^{ns}
BR-201 X BOL-II F_{23}		16	80	96	3,56**

Noventa e seis espigas da geração F_{23} foram avaliadas, tendo 16 delas apresentado fenótipo opaco, resultado que reforça a hipótese de herança monogênica para o caráter em questão. Dessas plantas que

originaram-se do lote de plantio com sementes opacas, apenas uma apresentou grãos com características fenotípicas semi-opacos. Essa segregação é explicada pela dificuldade na separação das sementes na caixa de luz, uma vez que as sementes opacas ainda apresentam pequeno grau de modificação (Lopes, 1993). A grande maioria das famílias $F_{2,3}$ apresentou grãos segregantes para os três fenótipos, isto é, sementes opacas, semi-opacas e vítreas, num total de 77. Apenas 3 famílias apresentaram grãos totalmente vítreos.

4.1 Densidade

Para a determinação das características físicas das sementes, foram realizadas análises de densidade nas três gerações em estudo, em função da característica fenotípica de opacidade do endosperma. Na Figura 2 são apresentados os valores obtidos para essa última característica, os quais revelam que as sementes vítreas (genótipos: 3, 4, 8 e 9) apresentaram maiores valores de densidade. As sementes de característica fenotípica opaca da geração $F_{2,3}$, resultantes do cruzamento entre o BR201 X BOL II(9), apresentaram uma média inferior apenas para as sementes do grupo de vítreos. Os milhos indígenas [PR I(6) e P. CHILENO(7)], o BOL II(1) e as sementes resultantes do cruzamento entre BOL II X BR201(2) de fenótipo vítreo formaram um grupo de médias com valores semelhantes e inferiores aos grupos vítreos. O milho de menor valor para essa característica foi o indígena MT II (5).

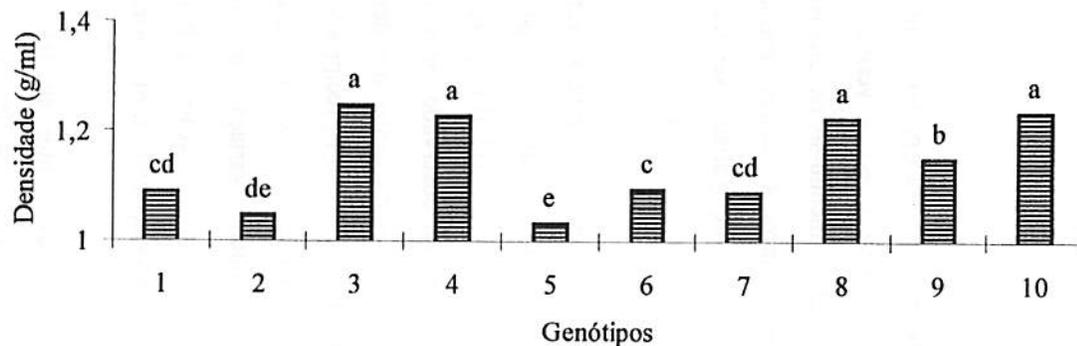


Figura 2.: Distribuição dos valores de densidade dos genitores da geração F_1 e os seus cruzamentos recíprocos 1 - BOL II; 2 - BOL II X BR201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II; 4 - BR201. Os genótipos indígenas: 5 - MT II; 6 - PR I; 7- P. CHILENO. Um QPM, 8 - BR451. Fenótipos opacos e vítreos da Geração $F_{2,3}$ (9 e 10 respectivamente).

*Médias abrangidas com a mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey

4.2 Geração F₁, incluindo genitores, genótipos indígenas e testemunha

4.2.1 Proteína total

Com o objetivo de avaliar alterações no padrão protéico entre os genitores BOL II e o BR201 (fenótipos contrastantes), e verificar sua possível associação com a dosagem de alelos, incluiu-se na análise os indivíduos resultantes dos cruzamentos recíprocos destes genótipos genitores. Os genótipos indígenas concomitantemente avaliados serviram de referência para confirmar ou não se as possíveis alterações seriam realmente devido às dosagens alélicas.

Na Figura 3 é apresentado o padrão protéico referente a proteína total dos genitores BOL II (1) e BR201(4), cruzamento recíproco F₁: BOL II X BR201(2), BR201 X BOL II(3), genótipos indígenas: MT II (5), PR I(6), P. Chileno(7) e um QPM BR451(8). Como pode ser observado, os padrões protéicos dos milhos indígenas são aparentemente semelhantes aos demais genótipos, com exceção do QPM. Os parentais (1 e 4) e o F₁ recíproco (2 e 3) não apresentaram diferenças visíveis nos padrões protéicos, no entanto, entre os genótipos indígenas há uma pequena variação na faixa compreendida entre 45 e 97kDa. Nessa faixa de variação, as bandas polipeptídicas foram selecionadas de forma aleatória, sendo posteriormente avaliadas por análise de densitometria.

Na Figura 4 aparecem os valores médios obtidos em RPD. O polipeptídeo de peso molecular aparente de 72kDa (Figura 4) apresentou diferenças significativas entre os valores médios de absorvância dos genótipos em questão, ocasionando a formação de dois grupos de médias: o primeiro formado pelos genótipos 6, 8, 2, 7, 4, e 3 e um segundo grupo com valores inferiores - os genótipos 5 e 1. Para o polipeptídeo de 60kDa (Figura

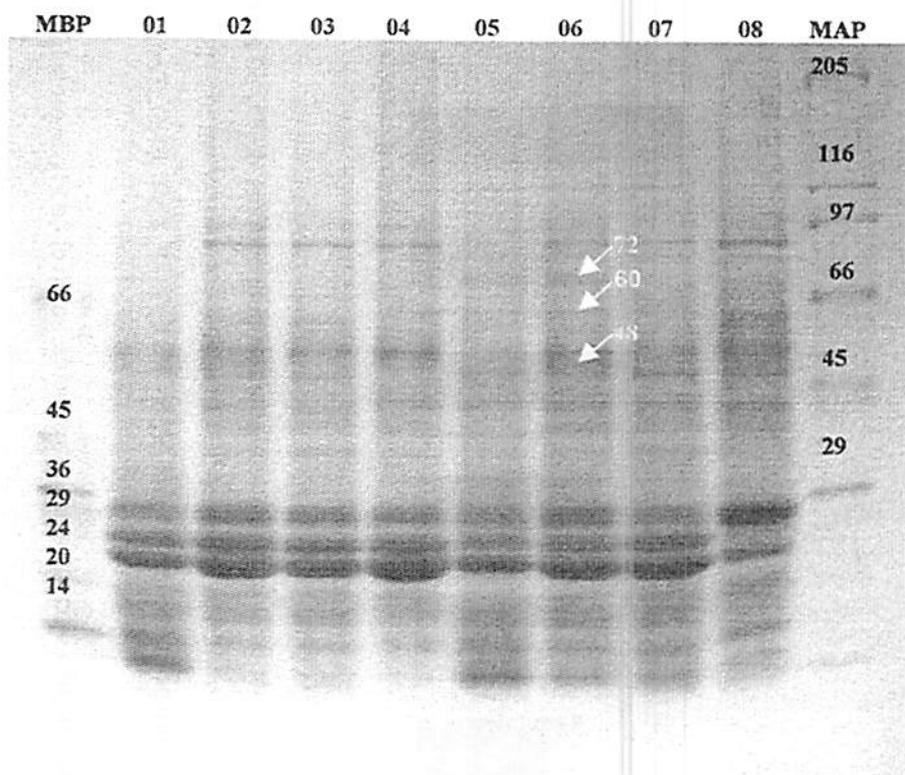


FIGURA 3 : Padrão eletroforético de proteína total em gel de poliacrilamida (gradiente 7,5% a 17,5%) com os genótipos dos progenitores da geração F_1 e os seus cruzamentos recíprocos: 1- BOL II; 2 - BOL II X BR201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II; 4 - BR201, genótipos indígenas: 5 - MT II; 6 - PR I; 7 - P. CHILENO; 8 : BR451. (QPM). **MBP** corresponde a Marcador de Baixo Peso Molecular e **MAP** a Marcador de Alto Peso Molecular.

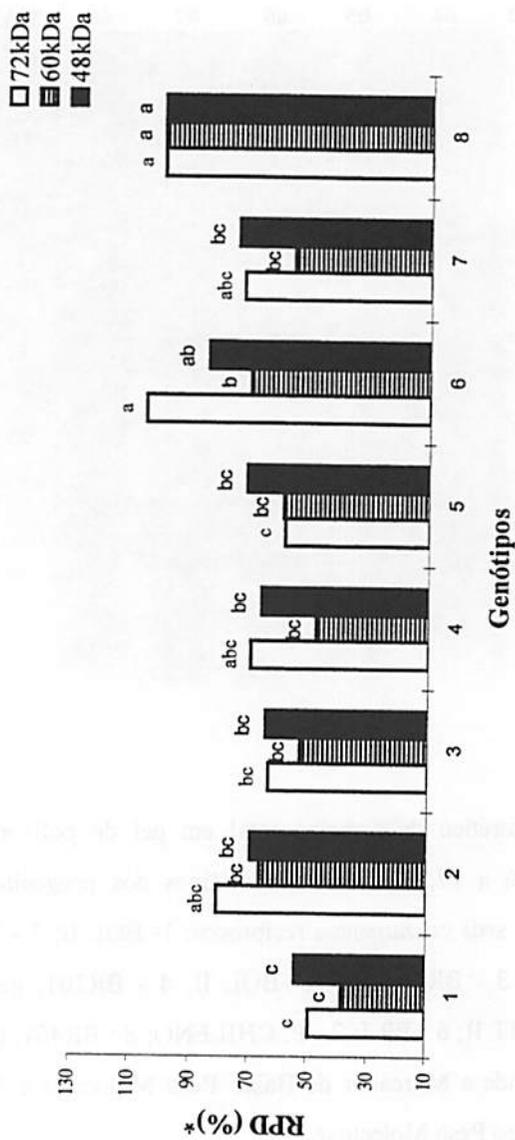


FIGURA 4.: Distribuição dos valores percentuais de RPD (proteína total) para os polipeptídeos de 72, 60 e 48kDa dos progenitores da geração F₁ e os seus cruzamentos recíprocos: 1 - BOL II; 2 - BOL II X BR201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II; 4 - BR201. Os genótipos indígenas: 5 - MT II; 6 - PR I; 7 - P. CHILENO. Testemunha: 8 - BR451 (QPM).

*Médias abrangidas com a mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey

4), o qual só foi detectado como diferente (com um valor médio superior aos demais) para o genótipo QPM (testemunha), o parental masculino do cruzamento em estudo - BOL II(1) - apresentou o menor valor de absorvância para o polipeptídeo em questão. Já para o polipeptídeo de 48kDa (Figura 4), surgiram dois grupos de médias distintos. Os genótipos QPMI (8) e indígena PR I (6) apresentaram os maiores valores, porém este último, estatisticamente, foi semelhante aos demais genótipos, incluindo os cruzamentos recíprocos, (2, 3), sendo que o genitor masculino BOL II(1) apresentou valores inferiores ao QPM (8).

4.2.2 'Não-zeínas'

Utilizando-se do mesmo critério adotado anteriormente, foram selecionados os mesmos polipeptídeos para o estudo das variações nessa classe protéica. Na Figura 5 estão representadas as 'não-zeínas', que compõe uma fração bastante heterogênea do endosperma. Para os mesmos genótipos descritos na análise de proteína total da Figura 3, é na faixa entre 45 e 97kDa que se observa uma maior variação entre as bandas polipeptídicas. Os valores percentuais em RPD são apresentados na Figura 6. Para o polipeptídeo de peso molecular 72kDa (Figura 6), os valores apresentados demonstram que apenas o genótipo QPM (testemunha) revelou uma média superior quando comparado com os demais genótipos; o PR I (6) apresentou valores estatisticamente diferentes em relação à testemunha e ao genitor masculino BOL II(1) que obteve os menores valores entre os genótipos avaliados. Os demais genótipos ou cruzamentos apresentaram médias semelhantes quando confrontadas com o genótipo PR I (6). Para o polipeptídeo de peso molecular aparente de 60kDa (Figura 6), entre os genitores e os cruzamentos recíprocos, houve diferenças estatísticas para os

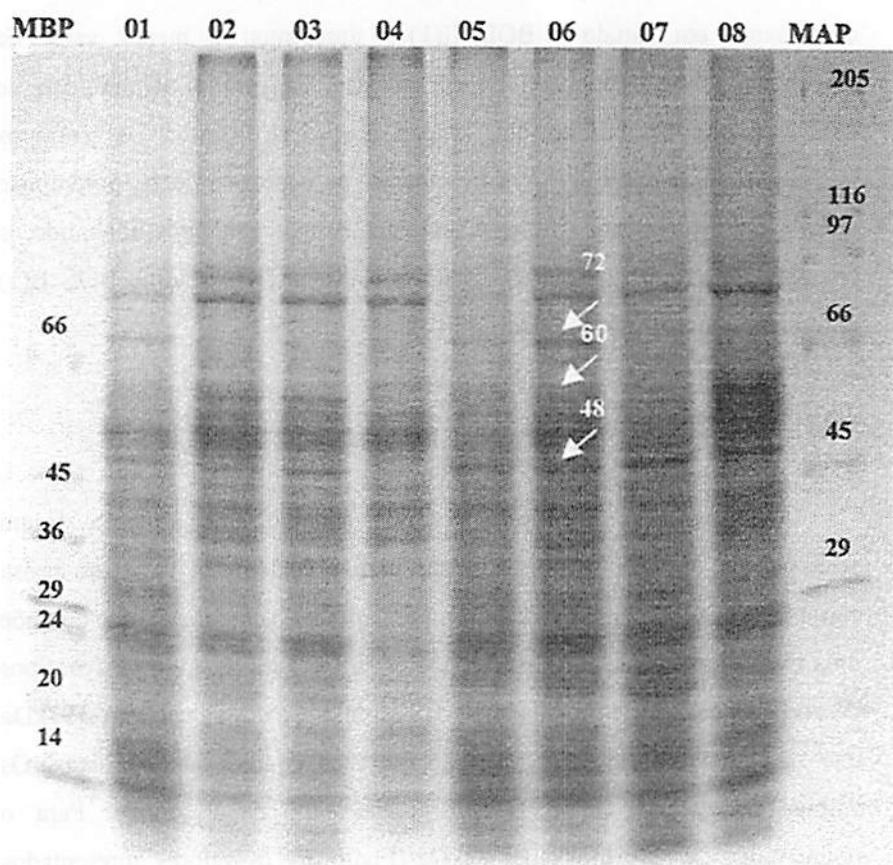


FIGURA 5: Padrão eletroforético de não-zeínas em gel de poliacrilamida (gradiente 7,5% a 17,5%) com os genótipos dos progenitores da geração F₁ e os seus cruzamentos recíprocos: 1 - BOL II; 2 - BOL II X BR201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II; 4 - BR201, genótipos indígenas; 5 - MT II; 6 - PR I; 7 - P. CHILENO; 8 : BR451. (QPM). **MBP** corresponde a Marcador de Baixo Peso Molecular e **MAP** a Marcador de Alto Peso Molecular.

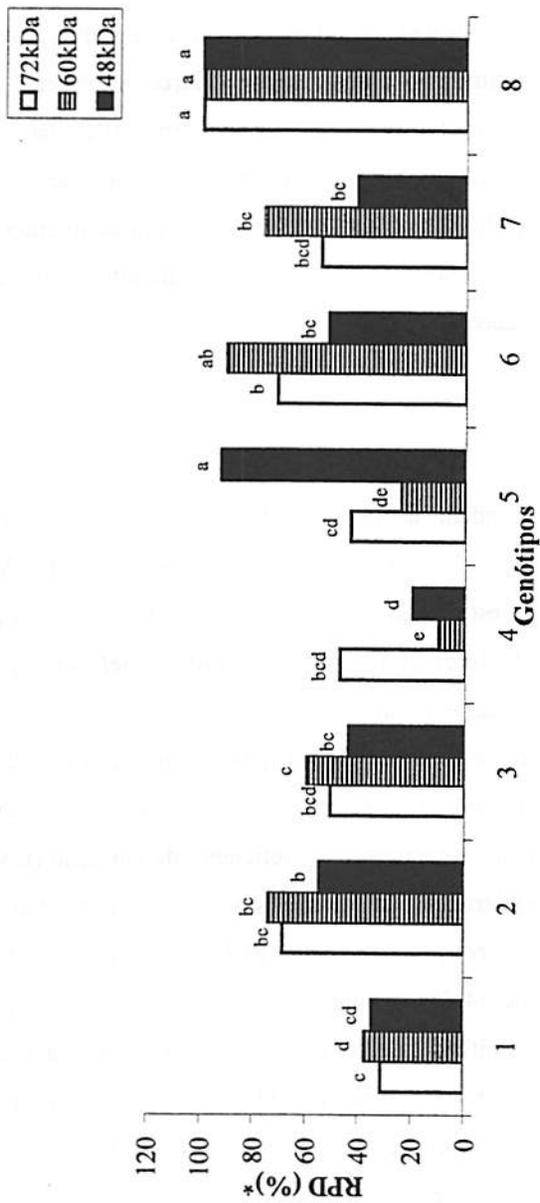


FIGURA 6: Distribuição dos valores percentuais de RPD (não-zeínas), para os polipeptídeos de 72, 60 e 48kDa, progenitores da geração F₁ e os seus cruzamentos recíprocos: 1 - BOL II; 2 - BOL II X BR201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II, 4 - BR201. Os genótipos indígenas: 5 - MT II; 6 - PR I; 7 - P. CHILENO. Testemunha: 8 - BR451 (QPM).

*Médias abrangidas com a mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.



valores em RPD, sendo que os genótipos dos cruzamentos apresentaram médias semelhantes e superiores aos genitores, enquanto que os valores do genótipo indígena PR I(6) e o QPM(8) foram estatisticamente semelhantes; os demais genótipos e cruzamentos apresentaram valores inferiores, se comparados com a testemunha QPM(8). Os valores em RPD para o polipeptídeo de 48 kDa, por sua vez (Figura 6), revelaram que apenas os genótipos MT II(5) e o QPM(8) apresentaram valores significativamente superiores aos demais os parentais envolvidos no cruzamento recíproco apresentaram as menores médias.

4.2.3 'Zeínas'

As 'zeínas' correspondem a, aproximadamente, 60 a 70% do endosperma, o que leva à suposição de seu envolvimento com a maioria das características bioquímicas e estruturais da semente. Portanto, a avaliação dessa classe de proteínas, obedecendo aos mesmos critérios definidos nas classes anteriores, seria de fundamental importância.

Na Figura 7, temos o padrão eletroforético característico das 'zeínas', sendo interessante notar que os resultados das análises estatísticas para esse grupo de proteínas apresentaram um coeficiente de variação (CV) bastante inferior quando comparados com as análises de proteínas totais e não-zeínas (ver anexo). Os valores percentuais em RPD estão representados na Figura 8; a gama-zeína de 54kDa está representada na Figura 8. Estes resultados não indicaram clara diferença entre os genótipos, visto que, apesar de o parental BOL II(1) e os genótipos indígenas MT II(5) e P. Chileno (7) terem apresentado valores menores em relação ao QPM(8) e ao PR I (6), não houve diferenças estatísticas entre eles; no entanto, esse grupo diferiu em relação ao QPM.

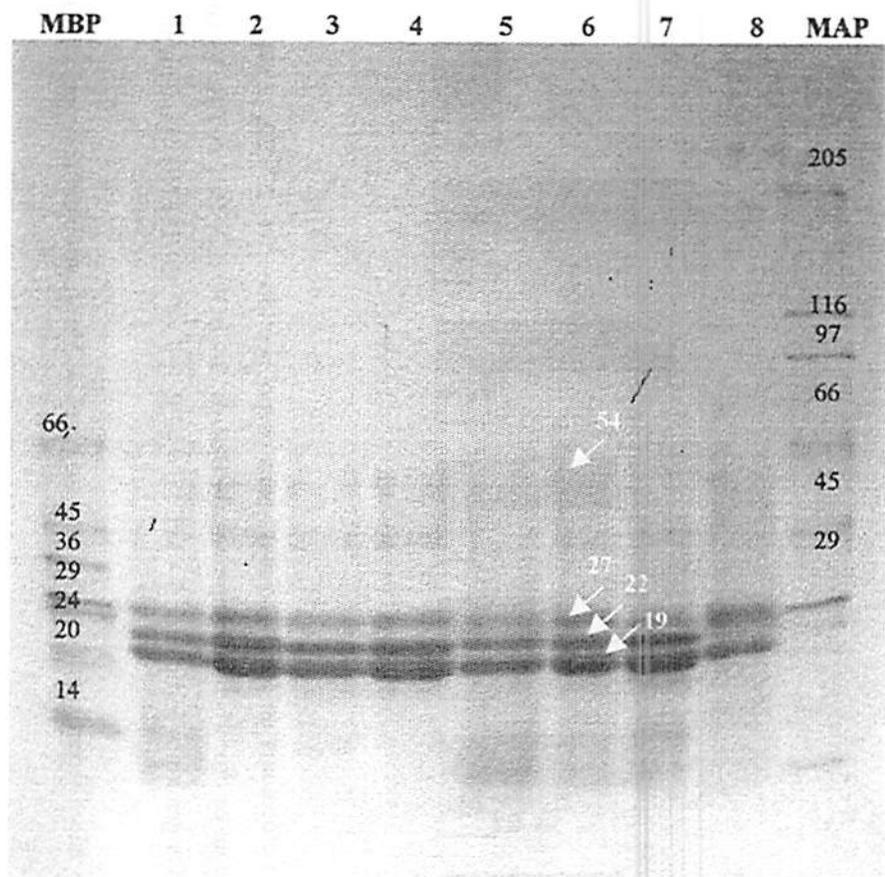


FIGURA 7.: Padrão eletroforético de zeínas em gel de poliacrilamida (gradiente 7,5% a 17,5%) com os genótipos dos progenitores da geração F_1 e os seus cruzamentos recíprocos: 1- BOL II; 2 - BOL II X B 201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II; 4 - BR201, genótipos indígenas: 5 - MT II; 6 - PR I; 7 - P. CHILENO; 8 : BR451 (QPM). **MBP** corresponde a Marcador de Baixo Peso Molecular e **MAP** a Marcador de Alto Peso Molecular.

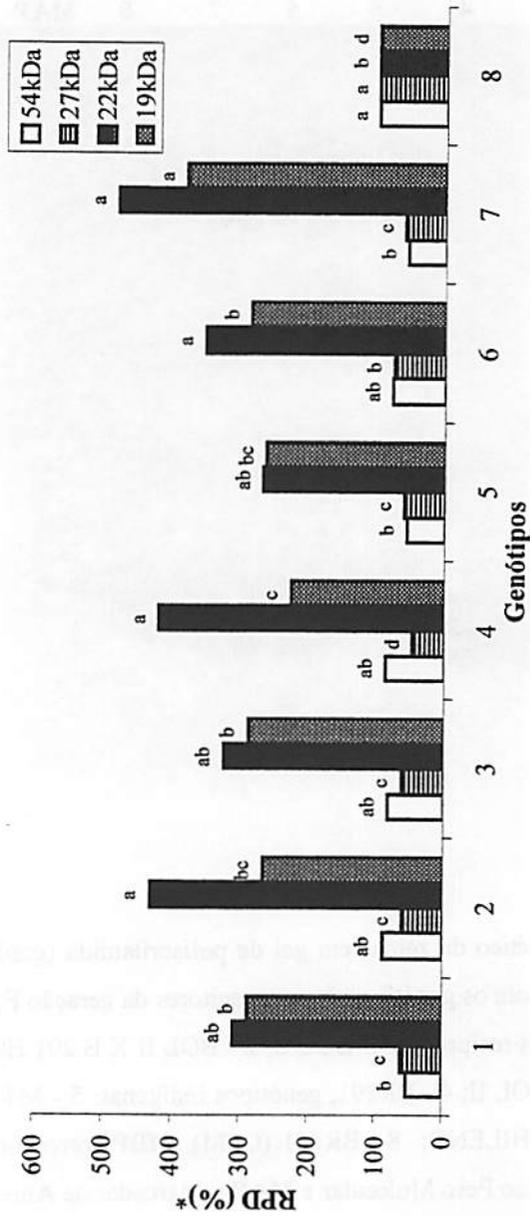


FIGURA 8.: Distribuição dos valores percentuais de RPD (zeínas) para os polipeptídeos 54, 27, 22, e 19kDa dos progenitores da geração F1 com os cruzamentos recíprocos: 1 - BOL II; 2 - BOL II X BR201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II, 4 - BR201. Os genótipos indígenas: 5 - MT II; 6 - PR I; 7 - P. CHILENO. Testemunha: 8 - BR451 (QPM).

*Médias abrangidas com a mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey

Para a gama-zeína de 27kDa, as médias dos recíprocos foram semelhantes aos demais genótipos indígenas, sendo a única exceção o PR I(6) com uma média só superada pelo QPM. O parental BR201 obteve a menor média, indicando que provavelmente um aumento nessa fração pode estar relacionado com a contribuição do parental BOL II. Entretanto, esse aumento não foi correspondido com uma classificação que indicasse um aumento gradual nas médias. A alfa-zeína de 22kDa (Figura 8) apresentou uma maior amplitude de variação para os genótipos analisados, com valores entre 100 e 420% RPD. O genótipo QPM(8) apresentou o menor valor e os demais não apresentaram valores estatisticamente diferentes entre si. Na Figura 8, os valores são referentes a alfa zeína de 19 kDa. O genótipo indígena Preto Chileno(7) obteve o maior valor para essa proteína. Um segundo grupo de médias foi formado pelo genitor (1), cruzamentos recíprocos (2 e 3) e os genótipos indígenas (6 e 5). O genitor BR201(4) apresentou valores estatisticamente inferiores ao grupo formado pelo BOL II (1), genótipo do cruzamento BR201 X BOL II (3) e o genótipo indígena PR I. O QPM (8) apresentou a menor média entre os genótipos.

4.3 Geração F₂, - incluindo genitores, recíprocos F₁ genótipos segregantes e testemunha

4.3.1 Proteína total

O objetivo dos experimentos nesta geração foi o de avaliar alterações no padrão protéico entre os genótipos segregantes que pudessem estar associadas ao fenótipo das sementes, bem como à densidade das sementes. O padrão protéico característico para proteína total dos genótipos em estudo aparece na Figura 9. Neste caso, é também incluída, além dos genitores e recíprocos F₁ (1 a 4), a geração segregante F₂ para o fenótipo opaco (5) e semi-opaco (6). Como pode ser observado nesse padrão eletroforético, há poucas diferenças visíveis; assim sendo, na faixa

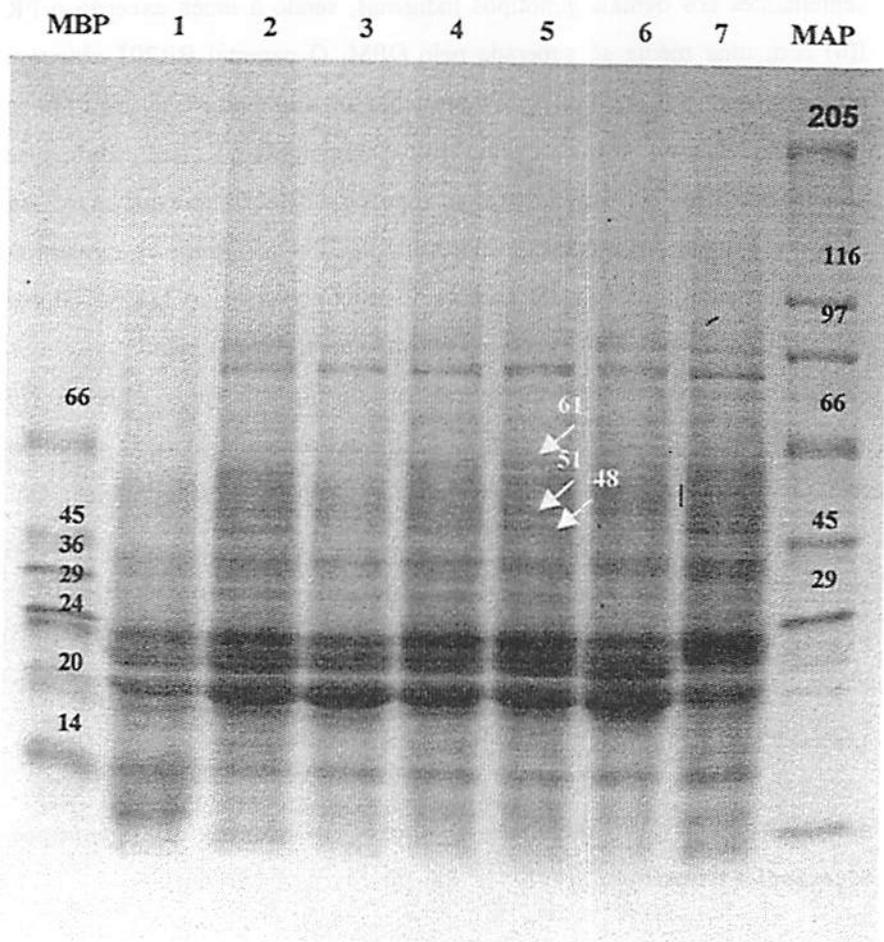


FIGURA 9 : Padrão eletroforético de proteína total em gel de poliacrilamida (gradiente 7,5% a 17,5%) com os genótipos dos progenitores da geração F_1 e os seus cruzamentos recíprocos: 1 - BOL II; 2 - BOL II X BR201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II; 4 - BR201, População segregante F_2 do cruzamento BR201HS(M) X BOL II; 05 - grãos opacos; 06 - grãos semi-opacos; 7 - BR451 (QPM).). **MBP** corresponde a Marcador de Baixo Peso Molecular e **MAP** a Marcador de Alto Peso Molecular.

compreendida entre 66 e 29kDa foram escolhidos arbitrariamente três polipeptídeos - 61, 51 e 48kDa – que, aparentemente, apresentavam alguma diferença visual. No estudo dessa geração, uma maior atenção foi dispensada aos genótipos segregantes (5 e 6, Figura 9).

Os valores de RPD encontrados para esse experimento estão representados na Figura 10, na qual percebe-se que o polipeptídeo de 61kDa demonstrou não apresentar diferenças entre os genótipos, exceto para a testemunha (QPM), a qual apresentou valor superior aos demais, com significância estatística. Maiores diferenças entre os genótipos foram encontradas para o polipeptídeo de 51kDa (Figura 10), em que o parental BOL II(1) apresentou menor valor; formando o segundo grupo de médias, os genótipos F₁ do cruzamento entre o BR201 X BOL II (3), os segregantes F₂ (5 e 6) do mesmo cruzamento, o parental BR201(4), o QPM(7), e o recíproco do cruzamento anterior (2), todos tiveram médias semelhantes. Para o polipeptídeo de 48kDa (Figura 10), apenas o QPM obteve valores que permitiu diferenciá-lo dos demais.

4.3.2 Não-zeínas

No padrão eletroforético das não-zeínas (Figura 11), os mesmos polipeptídeos citados anteriormente foram escolhidos para o estudo, visando verificar possíveis alterações no padrão de intensidade de bandas (RPD). As diferenças de intensidade de bandas observadas visualmente não foram confirmadas através das análises estatísticas para essas classes de proteínas. Os polipeptídeos com o peso aparente de 61 e 51kD não apresentaram valores que permitissem diferenciação entre os genótipos da geração F₂. Na Figura 12 encontra-se o teste de médias para os valores de RPD. Para os valores do polipeptídeo de 61 kDa, o parental BOL II(1), o cruzamento BR201 X BOL II(3) e o genótipo semi-opaco(6) apresentaram valores estatisticamente inferiores quando comparados com a testemunha; porém,

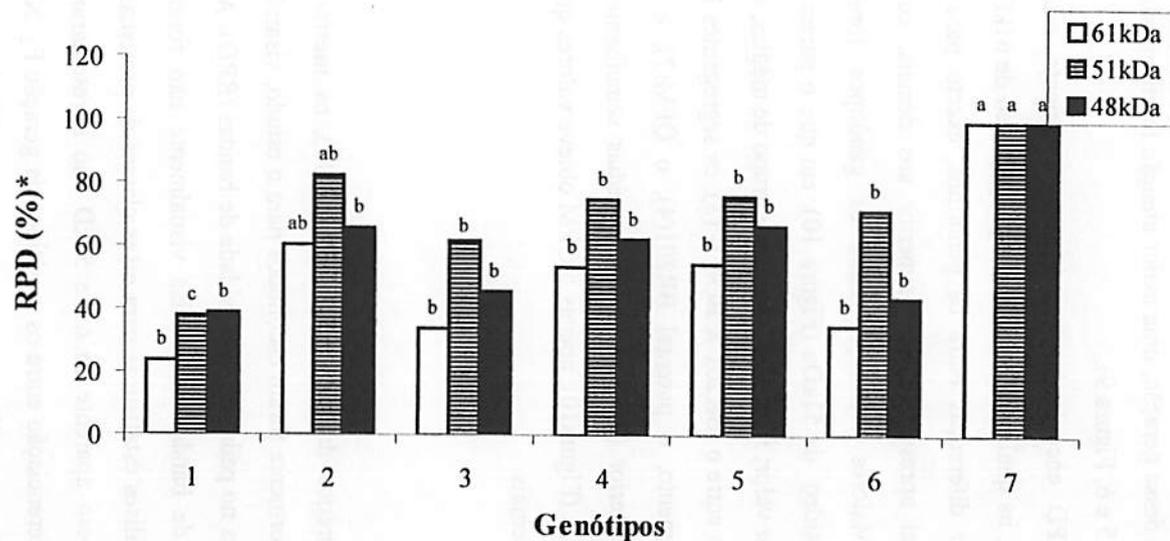


FIGURA 10.: Distribuição dos valores percentuais de RPD (proteína total) para os polipeptídeos: **61, 51 e 48kDa**, dos progenitores da geração F₁ e os seus cruzamentos recíprocos: 1- BOL II; 2 - BOL II X BR201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II; 4 - BR201.. População segregante F₂: 05:-grãos opacos; 06:-grãos semi-opacos. Testemunha: 8 - BR451 (QPM).

*Médias abrangidas com a mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

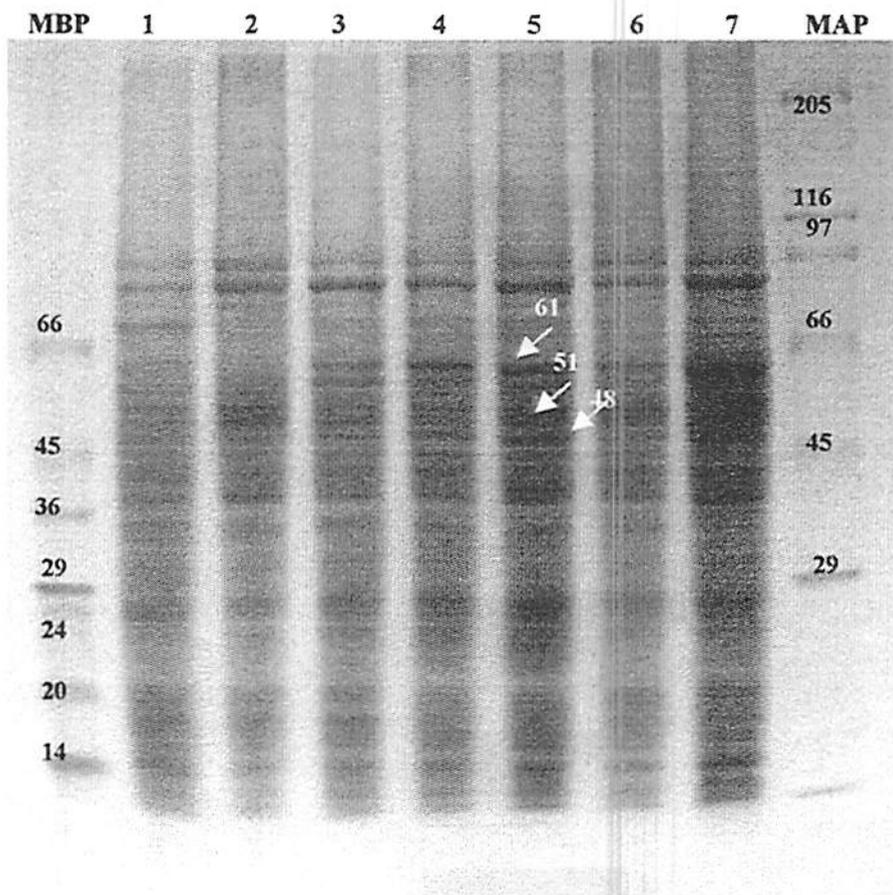


FIGURA 11.: Padrão eletroforético de não-zeínas em gel de poliacrilamida (gradiente 7,5% a 17,5%) com os genótipos dos progenitores da geração F_1 e os seus cruzamentos recíprocos: 1 - BOL II; 2 - BOL II X BR201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II; 4 - BR201, População segregante F_2 do cruzamento BR201HS(M) X BOL II; 05 - Grãos opacos; 06 - Grãos semi-opacos, 7 - BR451 (QPM). **MBP** corresponde a Marcador de Baixo Peso Molecular e **MAP** a Marcador de Alto Peso Molecular.

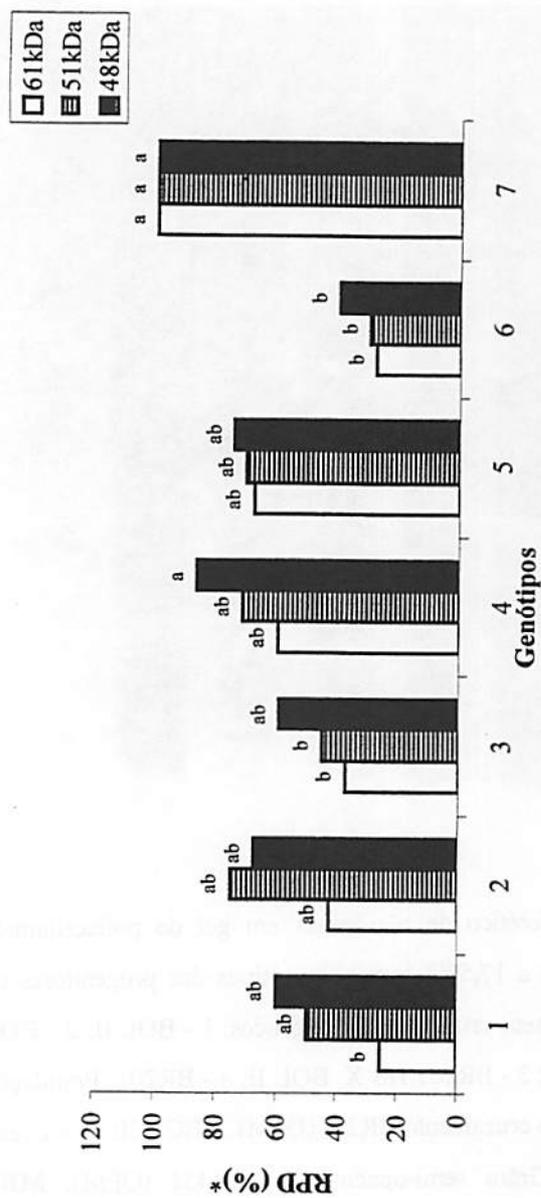


FIGURA 12.: Distribuição dos valores percentuais de RPD (não-zeínas) para os polipeptídeos: 61, 51 e 48kDa, dos progenitores da geração F₁ e os seus cruzamentos recíprocos: 1- BOL II; 2 - BOL II X BR201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II, 4 - BR201. População segregante F₂: 05:-grãos opacos; 06:-grãos semi-opacos. Testemunha: 8 - BR 451(QPM).

*Médias abrangidas com a mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey

quando comparados em conjunto, não apresentaram diferenças estatísticas entre si..

O mesmo fenômeno ocorreu de maneira semelhante com o polipeptídeo de 51kDa (Figura 12), Neste caso, apenas o genótipo do cruzamento citado anteriormente(3) e o genótipo semi-opaco(6) diferiram estatisticamente em relação à testemunha; porém, quando comparados no conjunto de médias, não houve diferença significativa entre os valores (Figura 12). Para o polipeptídeo de 48kDa (Figura 12), apenas o genótipo semi-opaco(6) apresentou diferenças quando comparado com QPM(7) e com o parental BR201(4). No entanto, novamente para conjunto de valores apresentados pelos demais genótipos, não houve diferenças significativas.

4.3.3 Zeínas

Na Figura 13, está o padrão protéico característico das zeínas e na Figura 14, os correspondentes valores de RPD. Nesse grupo de proteínas foram marcados quatro polipeptídeos - 54, 27, 22 e 19kDa. Para o polipeptídeo de 54kDa, o genótipo do genitor BOL II (1) e o genótipo opaco (5) apresentaram valores inferiores para as médias quando comparados com a testemunha, com os genótipos do cruzamento F_1 [BR201 X BOL II(2 e 3)] e com o segregante semi-opaco. Entretanto entre os genótipos segregantes (5 e 6) houve uma diferença estatística em relação aos valores em RPD e o genótipo opaco(5) apresentou média inferior quando comparado com o semi-opaco (6), (Figura 14).

O polipeptídeo que representa a fração gama-zeína de 27kDa (Figura 14) apresentou uma quantidade mais expressiva no genótipo QPM(7). Quando comparado com os genótipos normais, o progenitor BOL II(1) apresentou menor valor médio, o mesmo acontecendo com os genótipos segregantes opaco (5) e semi-opaco(6). Os polipeptídeos com respectivos pesos de 22 e 19kDa fazem parte do grupo das alfa-zeínas. As diferenças mostradas para o polipeptídeo de 22 kDa em relação à gama-zeína de 54kDa

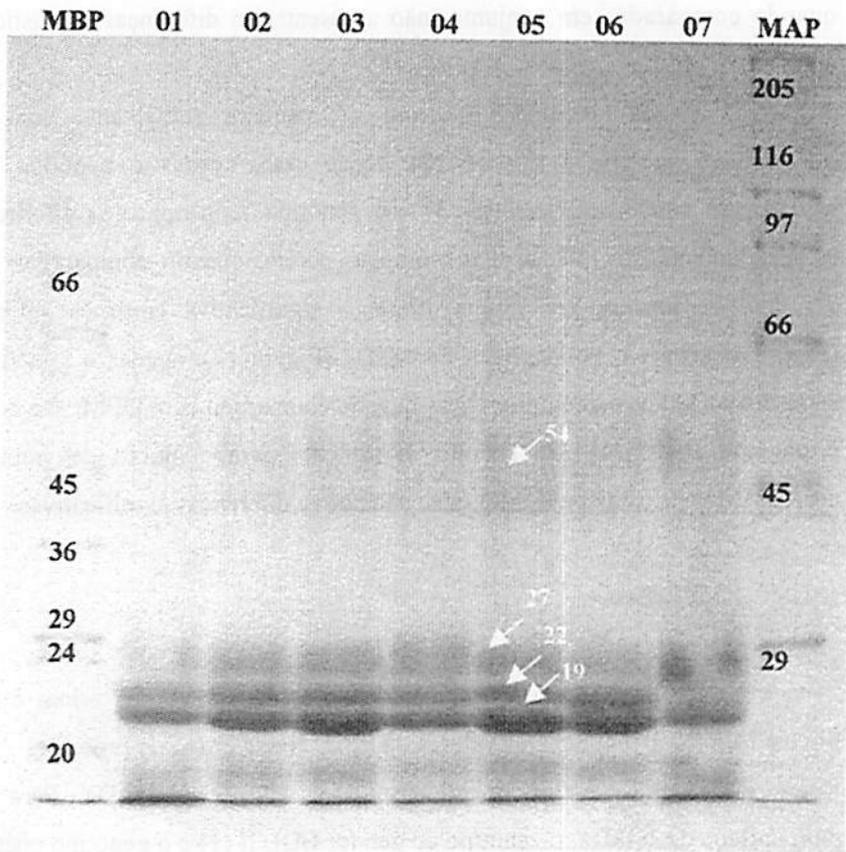


FIGURA 13.: Padrão eletroforético de zeínas em gel de poliacrilamida (gradiente 7,5% a 17,5%) com os genótipos dos progenitores da geração F₁ e os seus cruzamentos recíprocos: 1 - BOL II; 2 - BOL II X BR201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II; 4 - BR201, População segregante F₂ do cruzamento BR201HS(M) X BOL II; 05 - Grãos opacos; 06 - Grãos semi-opacos, 7 - BR451 (QPM). **MBP** corresponde a Marcador de Baixo Peso Molecular e **MAP** a Marcador de Alto Peso Molecular.

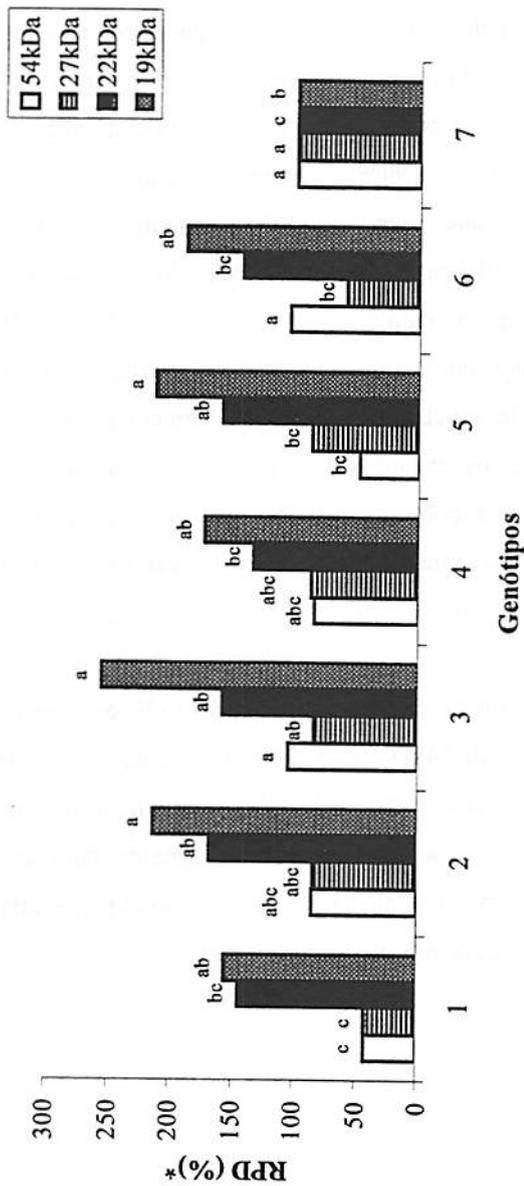


FIGURA 14.: Distribuição dos valores percentuais de RPD (zeínas) polipeptídeos: 54, 27, 22 e 19kDa, progenitores da geração F₁ e recíprocos: 1 - BOL II; 2 - BOL II X BR201 HS; 3 - BR201 HS X BOL II, 4 - BR201.. População segregante F₂: 05:-grãos opacos; 06:-grãos semi-opacos. Testemunha: 7 :-BR451 (QPM).

*Médias abrangidas com a mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

(Figura 14), permitiram distinguir basicamente dois grupos de médias. O genótipo QPM(7) apresentou o menor valor para a de 22kDa entre os genótipos analisados, seguido pelos genitores (1 e 4) e o genótipo segregante F_2 (6). Já os recíprocos F_1 (2 e 3) tiveram valores elevados e semelhantes para essa fração protéica. Para o polipeptídeo de peso 19kDa, apenas o QPM(7) apresentou um menor valor, dentre os valores avaliados.

É interessante observar que o genótipo QPM apresentou os maiores valores (com significância estatística) para as avaliações dos polipeptídeos das gerações iniciais, exceto apenas para as frações das alfas-zeínas de 19 e 22kDa. Este resultado sugere que, nesses genótipos de alta qualidade protéica, há uma diminuição dessas classes de proteínas. Em contrapartida, o parental BOL II apresentou os menores valores para a maioria dos polipeptídeos avaliados nas gerações iniciais, exceção feita às mesmas classes de 'zeínas' citadas anteriormente. Nesse caso, os valores em RPD apresentados pelo BOL II, de maneira geral, não diferiram estatisticamente dos demais genótipos.

Finalmente, o perfil protéico das 'zeínas' na geração F_2 demonstrou uma associação do polipeptídeo de 54kDa (provavelmente gama-zeína) com os fenótipos estudados para o endosperma, de tal modo que o fenótipo segregante semi-opaco gerou média significativamente maior para esse peptídeo. Em contrapartida, o polipeptídeo de 22kDa (provavelmente alfa-zeína) apresentou menor média para este mesmo fenótipo.

4.4 Geração segregante F_{2:3} – grãos opacos e grãos vítreos

4.4.1 Proteína total

O objetivo principal destes experimentos envolvendo a geração F_{2:3} foi verificar uma possível alteração no comportamento dos padrões protéicos encontrados até então, em função da fixação genótipos. Aqui, os genótipos foram dispostos de tal forma que possibilitassem a comparação apenas entre grupos de sementes para as características opacas e vítreas. Por isso não foi incluído o BR451 (QPM). Os valores em RPD dessa geração são percentuais.

O padrão eletroforético de proteína total da geração F_{2:3} do cruzamento entre o BR201 X BOL II é mostrado na Figura 15. Nesse gel foi possível visualizar diferenças marcantes entre os materiais segregantes para o fenótipo opaco, numa faixa de peso molecular compreendida entre 66 a 29kDa. Nesta faixa, foram escolhidos, para análise de densitometria, três polipeptídeos que apresentaram diferenças mais evidentes entre os materiais: 61, 56, e 34kDa (Figura 16). O polipeptídeo de 61kDa (Figura 16) apresentou valores distintos entre os materiais que compõe o fenótipo opaco (1 a 9), tendo esse grupo obtido valores médios superiores ao segundo grupo formado pelo fenótipo vítreo (10 a 18). Isso mostra uma tendência de agrupamento de médias separando os fenótipos. O segundo polipeptídeo marcado, 56kDa, apesar de apresentar valores de absorbância que permitem formar vários grupos de médias, não possibilita uma distinção capaz de diferenciar os materiais segregantes (Figura 16). O polipeptídeo de 34kDa, da mesma forma que o primeiro, apresentou uma tendência de valores que permitiu a divisão entre dois grupos principais de médias, consonantes com os fenótipos segregantes F_{2:3} (Figura 16). A única exceção foi para o indivíduo semi-opaco número 17, que apresentou valores semelhantes aos das maiores médias de opacos (1 a 9, Figura 16).

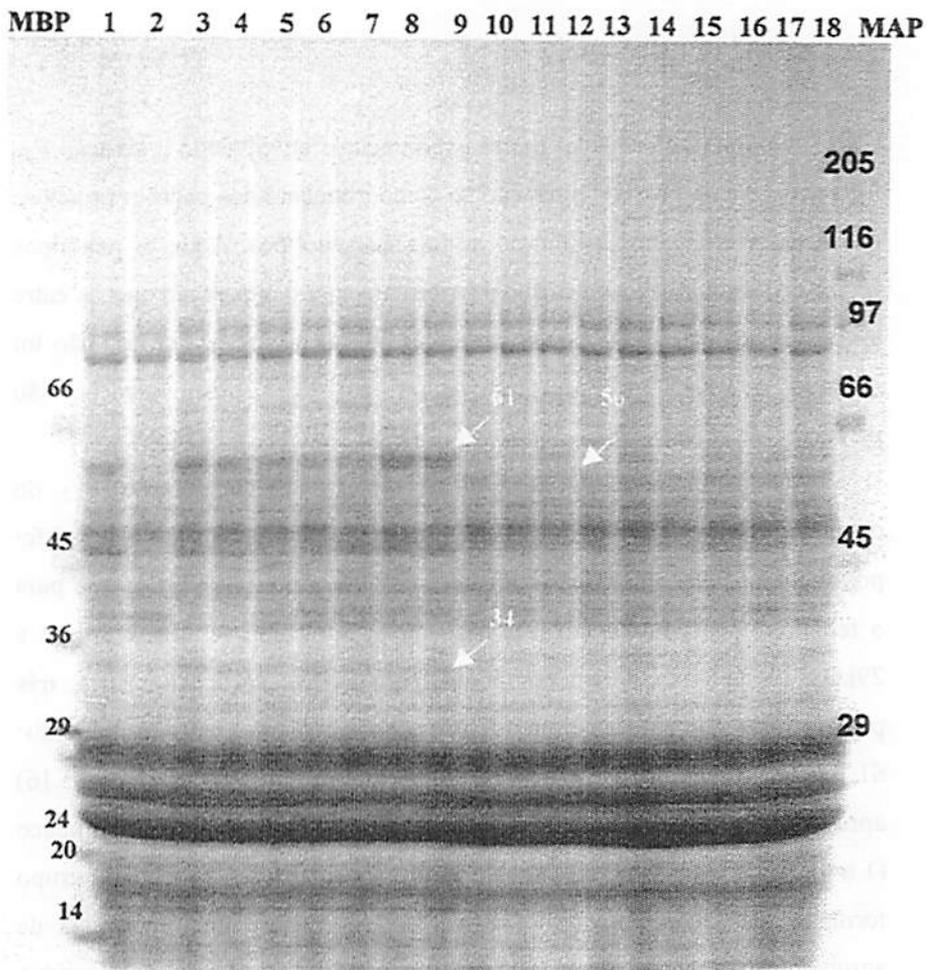


FIGURA 15.: Padrão eletroforético de proteína total em gel de poliacrilamida (gradiente 7,5% a 17,5%) com os genótipos dos indivíduos da geração F_{2,3}, 1 a 9 (grãos opacos), 10 a 18 (grãos vítreos). **MBP** corresponde a Marcador de Baixo Peso Molecular e **MAP** a Marcador de Alto Peso Molecular.

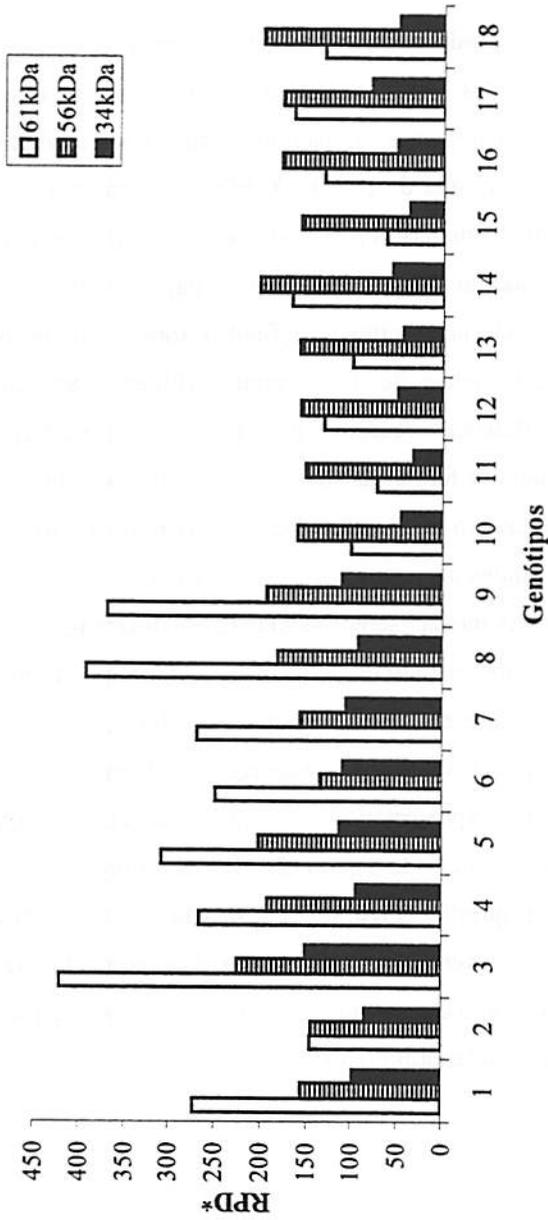


FIGURA 16.: Distribuição dos valores percentuais de RPD (proteína total) para os polipeptídeos de 61, 56, e 34kDa dos progenitores da geração da geração F_{2.3}: fenótipos opacos: (1 a 9); fenótipos vítreos: (10 a 18).

*Médias abrangidas com a mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey (Tabela 3).

4.4.2 'Não-zeínas'

Seguindo o critério adotado nas gerações anteriores, (F_1 e F_2), os mesmos polipeptídeos marcados nas análises de proteína total foram marcados para as análises de 'não-zeínas'. O padrão eletroforético da fração 'não-zeínas' da geração $F_{2,3}$, oriunda do BR201 X BOL II, é mostrado na Figura 17. As diferenças entre os materiais mais uma vez são confirmadas na mesma faixa de peso detectada no padrão eletroforético para proteína total, ou seja, entre 66 a 29kDa. Os polipeptídeos definidos foram novamente escolhidos e marcados para análise de densitometria (Figura 18), para verificação das possíveis diferenças causadas pelo processo de extração. Também nesse caso, os resultados foram, na sua maioria, muito semelhantes aos de proteínas totais (Figura 16 e 18), uma vez que o polipeptídeo de 61kDa apresentou valores comuns para a maioria dos indivíduos.

No entanto, apesar das médias serem semelhantes, observa-se uma tendência de agrupamento entre os indivíduos de mesmo fenótipo (Figura 18). O polipeptídeo de 56kDa apresentou vários grupos de valores, o que não permitiu associar esses grupos aos fenótipos segregantes (Figura 18). O polipeptídeo 34kDa foi o que apresentou um conjunto de valores bem distintos, favorecendo uma tendência de associação desses valores com as características fenotípicas em questão (Figura 18). Exceção ocorreu com o indivíduo de fenótipo opaco número 4 (Figura 18), o qual gerou valores abaixo dos demais dentro do grupo em questão, classificando-se no segundo grupo de médias que representa o fenótipo semi-opaco.

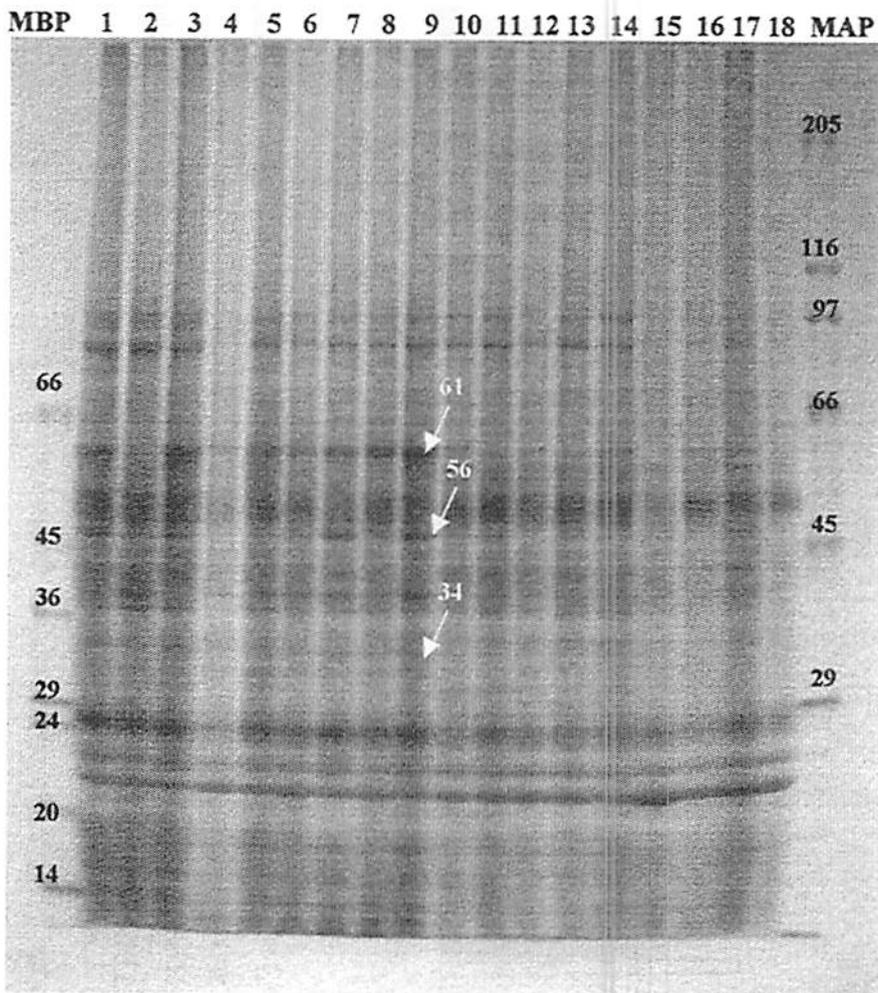


FIGURA 17.: Padrão eletroforético de não-neínas em gel de poliacrilamida (gradiente 7,5% a 17,5%) com os genótipos dos indivíduos da geração F₃, 1 a 9 (grãos opacos), 10 a 18 (grãos vítreos). MBP corresponde a Marcador de Baixo Peso Molecular e MAP a Marcador de Alto Peso Molecular.

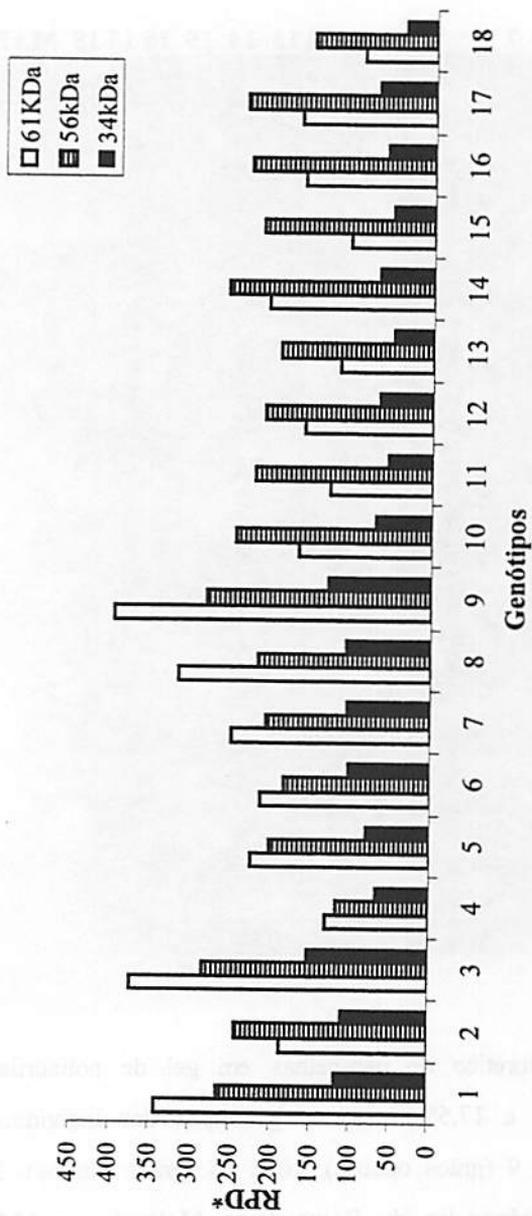


FIGURA 18.: Distribuição dos valores percentuais de RPD (não-zeínas) para os polipeptídeos de 61, 56, e 34kDa dos progenitores da geração da geração $F_{2,3}$: fenótipos opacos: (1 a 9); fenótipos vítreos: (10 a 18).

*Médias abrangidas com a mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey. (Tabela 3).

TABELA 3 - Valores médios de RPD da Geração F₂₃, em RPD*, para as frações proteína total e não-zeínas – grãos opacos (1 a 9) e vítreos (10 a 18) - (Figuras, 16 e 17)

Grãos	Proteína total			não-zeínas		
	61kDa	56kDa	34kDa	61kDa	56kDa	34kDa
1	bcd	bc	abcdef	abc	a	abc
2	def	c	bcdef	abcd	a	abcd
3	a	a	a	ab	a	a
4	bcde	abc	abcdef	cd	a	bcde
5	abc	ab	ab	abcd	a	bcde
6	cde	c	abcd	abcd	a	abcde
7	bcde	abc	abcde	abcd	a	abcde
8	ab	abc	abcdefg	abcd	a	abcd
9	abc	abc	abc	a	a	ab
10	f	abc	efg	bcd	a	bcde
11	f	c	g	cd	a	cde
12	ef	c	defg	bcd	a	bcde
13	f	c	fg	cd	a	de
14	cef	abc	bcdefg	abcd	a	bcde
15	f	c	fg	d	a	cde
16	df	abc	cdefg	bcd	a	cde
17	def	abc	bcdefg	abcd	a	bcde
18	ef	abc	defg	d	a	e

* Médias abrangidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, ao nível de 5%, pelo teste Tukey

4.4.3 Zeínas

O padrão protéico das zeínas nessa geração encontra-se na Figura 19. Neste caso específico, não foi possível individualizar adequadamente os polipeptídeos dessa classe, e estes resultados ficam restritos a uma avaliação mais subjetiva. Conforme detecção visual das bandas, estima-se que não houve diferenças entre os tratamentos, seguindo uma tendência já encontrada nas gerações anteriores. Considerando a dificuldade de se individualizar os polipeptídeos para uma análise densitométrica adequada, as análises estatísticas (dados não mostrados) não revelaram diferenças significativas para os tratamentos, o que pode ter sido consequência desse problema experimental.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

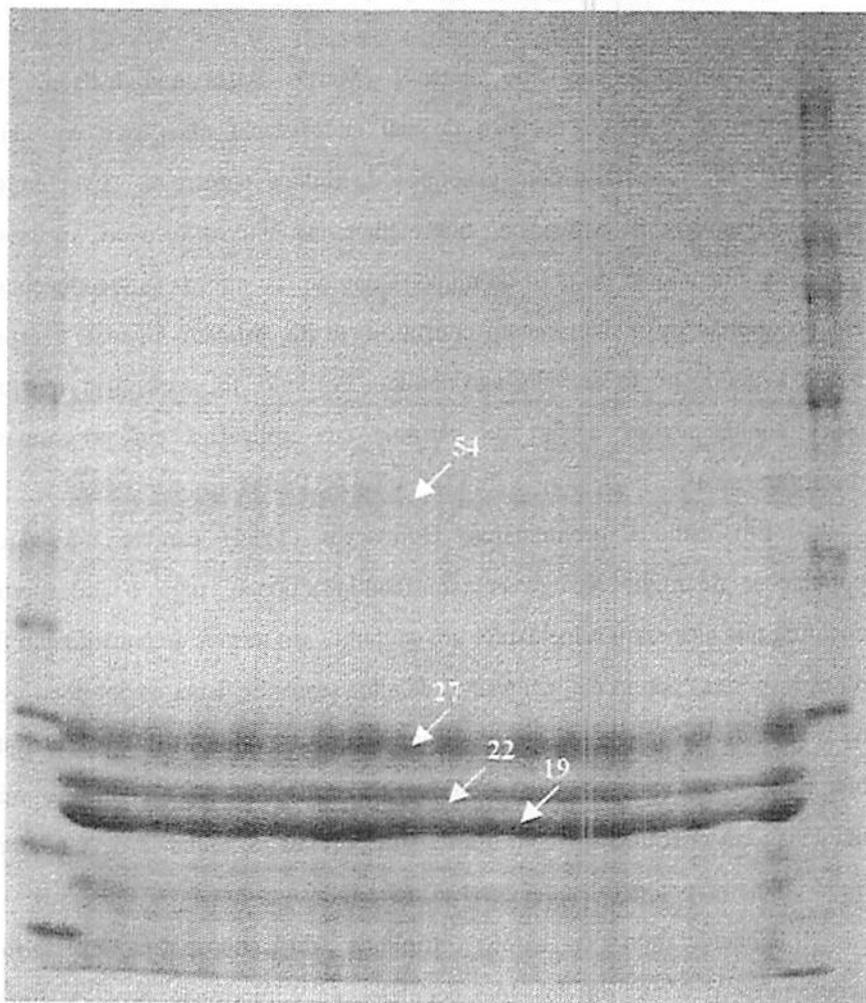
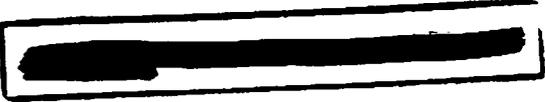


FIGURA 19.: Padrão eletroforético das zeínas em gel de poliacrilamida (gradiente 7,5% a 17,5%) com os genótipos dos indivíduos da geração $F_{2,3}$, 1 a 9 (grãos opacos), 10 a 18 (grãos vítreos).



5 DISCUSSÃO

Os mutantes do tipo opaco-2 (Mertz, Bates and Nelson, 1964), apresentam o conteúdo protéico de seu endosperma mais rico em lisina e triptofano se comparado com genótipos de milhos comerciais. Esta definição provocou um grande entusiasmo nos melhoristas interessados em aprimorar a qualidade nutricional do grão de milho. Contudo, ao aplicar tais conhecimentos em programas de melhoramento constatou-se que estavam ligadas a aspectos indesejáveis do ponto de vista agrônômico. Portanto, foi necessário aprofundar esses conhecimentos a fim de permitir sua aplicação em programas de melhoramento.

Em estudos preliminares, Guimarães (1994) caracterizou algumas populações de milhos indígenas com fenótipo 'opaco' para o endosperma e concluiu que eles eram semelhantes aos mutantes em termos de constituição física do endosperma, porém não em termos de altos teores de lisina e triptofano, isto é, na qualidade nutricional do grão. Assim sendo, a avaliação das características bioquímicas do endosperma, resultante da utilização de mutantes e milhos indígenas em cruzamentos com híbridos comerciais de milho, é de fundamental importância no contexto acima descrito.

Considerando o caráter triplóide do endosperma, procurou-se acompanhar o efeito da dosagem de alelos na composição protéica final do mesmo, usando para isso cruzamentos recíprocos entre o BR201(HS) de endosperma vítreo e o BOL II (milho indígena) de endosperma farináceo e fenótipo opaco. Como se observou, as sementes originadas do cruzamento entre esses materiais apresentaram o endosperma com a característica vítrea, sugerindo tratar-se de um caso típico de herança monogênica com dominância completa para esse fenótipo. Contudo, os resultados do teste de "qui-quadrado" para as

populações segregantes das gerações F_2 e $F_{2,3}$, a um nível de significância de 95% ($p < 0.05$), sugerem descartar a hipótese de herança monogênica. Nesse sentido, todavia, cautela nas conclusões seria recomendada, 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, devido à ação de possíveis genes modificadores e (iii) sementes com características fenotípicas opacas podem ter sido confundidas com semi-modificadas ou vice-versa, efeito este decorrente das limitações naturais da técnica disponível para avaliação dessa característica, isto é, uso da caixa de luz.

Na geração $F_{2,3}$, as proporções entre as famílias reforçam a hipótese de herança monogênica, tendo os resultados sido confirmados através do teste do 'qui-quadrado' (Tabela 2). Na avaliação dentro das famílias surgiram algumas diferenças proporcionais entre as segregações, que podem ser devidas a outros elementos não computados nesse estudo. Entretanto, pelo fato de a maioria ter apresentado uma segregação próxima de 3 vítreos ou intermediários:1 opaco, mais uma vez verifica-se a necessidade de cautela nas conclusões quanto ao tipo de herança para o caráter em questão na geração F_2 afim de evitar-se uma sumária eliminação da hipótese de herança monogênica sem considerar os aspectos acima mencionados.

Os valores observados para a densidade de endosperma na Figura 2 apresentaram resultados coerentes com o esperado, de um modo geral. O teste de médias permitiu diferenciar os materiais com características vítreas, sendo que as sementes das variedades comerciais de endosperma duro apresentaram os maiores valores para essa característica. Interessante notar que o genótipo resultante do cruzamento entre BOL II e BR201, apesar de apresentar característica vítrea, apresentou média inferior para essa característica, sugerindo que sua baixa densidade pode estar relacionada ao grau de modificação que se manifesta no

endosperma devido a diferente composição alélica. Nesse fenótipo, ficou evidenciado de forma clara o efeito da dosagem de alelos (Figura 2). O parental feminino (BOL II) contribuiu com dois alelos recessivos e a contribuição do alelo dominante do parental masculino não foi suficiente para alterar significativamente a densidade do endosperma.

Os resultados obtidos no cruzamento recíproco desse material confirmam o que acabou de ser discutido: nesse caso, sendo o parental feminino o BR201, as sementes, além de apresentarem característica vítrea, também demonstraram valores de densidades estatisticamente semelhantes às variedades comerciais anteriormente citadas. Os fenótipos vítreos da geração $F_{2:3}$ apresentaram um valor médio de densidade que permitiu a sua inclusão no grupo de médias mais altas para essa característica quando se considera todos os tratamentos e gerações investigados em conjunto.

Esses dados sugerem que nessa geração já existe um elevado grau de modificação do endosperma, o que também se evidencia na análise do fenótipo 9 da mesma geração, com endosperma opaco, ou seja, apesar de apresentar um valor médio inferior, quando comparado com as sementes vítreas (Figura 2), esse valor foi significativamente superior às demais sementes opacas que, por sua vez, não apresentaram diferenças estatísticas entre si, de um modo geral (Figura 2). Vale ressaltar também que as sementes da geração F_1 do cruzamento entre o BOL II X BR201, apesar de apresentarem fenótipo vítreo, não diferiram dos fenótipos opacos em termos de densidade, sugerindo que (i) nessa geração há um menor grau de modificação, e (ii) que tal efeito deve-se provavelmente ao efeito na dosagem de alelos ou uma maior contribuição materna de alelos que se manifesta no endosperma, pois nesse cruzamento, ele possui dois alelos recessivos do genitor feminino.

Considerando-se que 10% do peso seco do endosperma do milho é constituído de proteínas, procurou-se investigar uma possível associação mais direta entre as características físicas do endosperma com o seu padrão protéico. Neste contexto, o efeito da dosagem de alelos oferecido pelo sistema experimental "endosperma", pôde ser dissecado em termos de sua influência (ou sua ausência) nessa possível associação. Assim, foram confeccionados géis de poliacrilamida com gradiente variando entre 7,5 e 17,5%, com o objetivo de se estudar o padrão protéico dos materiais envolvidos nos cruzamentos e dos mutantes indígenas (MT II, PR I e P. Chileno). Procurou-se tratar os padrões eletroforéticos obtidos de forma quantitativa ao se proceder análise densitométrica dos mesmos.

Primeiramente, os genitores BR201 e BOL II foram analisados buscando-se encontrar algumas diferenças entre os padrões protéicos que estivessem em consonância com o aumento da dosagem de alelos responsáveis pela modificação do endosperma. Além disso, genótipos indígenas foram incluídos com o objetivo de verificar se entre os polipeptídeos selecionados haveria alguma relação entre as quantidades de proteínas detectadas pela análise densitométrica e os genótipos de endosperma farináceo. Considerando-se o padrão de proteína total entre os genótipos e os polipeptídeos de 72, 60 e 48kDa selecionados para análise (Figura 3), não foram observados, de uma maneira geral, diferenças significativas que atendessem ao propósito inicial de um incremento gradativo no padrão protéico que indicasse algum efeito da dosagem de alelos associados à conversão do endosperma para maior densidade. Para os três polipeptídeos marcados, as diferenças entre os tratamentos não apresentaram significância estatística. Uma possível distinção entre as médias (RPD) obtidas e avaliadas não foi detectada, apesar de o coeficiente de variação ter-se mostrado alto neste caso.

Com o mesmo objetivo descrito acima avaliou-se as frações protéicas de zeínas e não-zeínas. É importante citar que as 'não-zeínas' compõem uma fração bastante heterogênea e, por isso mesmo, bastante complexa (Lopes e Larkins, 1993). Tal complexidade provavelmente interferiu nas avaliações de densitometria, tanto que as análises estatísticas dessa fração, nas três gerações avaliadas, apresentaram maiores valores para o coeficiente de variação.

As Figuras 5 e 6 representam o padrão eletroforético da fração não-zeína e as médias dos valores de RPD, respectivamente. Da mesma forma que as proteínas totais, os valores avaliados não permitiram uma clara associação com o efeito da dosagem de alelos. Contudo, os valores em RPD observados para o polipeptídeo de 60kDa da fração 'não-zeínas' da geração F_1 sugerem um efeito típico de sobredominância, haja vista que nos valores observados entre os genitores e os cruzamentos recíprocos (2 e 3) (Figura 6), estes últimos apresentaram médias superiores ao genitor BOL II, de maior valor, reforçando a hipótese de sobredominância para o polipeptídeo em questão. As demais distinções entre outros valores médios de RPDs entre os genótipos foram provavelmente agravadas pelo valor do coeficiente de variação, de modo similar ao discutido acima. Contudo, a testemunha (QPM) foi a que apresentou, sistemática e significativamente, os maiores valores para os polipeptídeos avaliados (Figura 6). Como se trata de uma variedade QPM, esses valores provavelmente decorrem do aumento dessa fração, a qual está associada à qualidade protéica comum entre genótipos de maior qualidade nutricional.

As zeínas representam a maior fração protéica do endosperma do milho (60 - 70% do total) e sua extração é influenciada por uma série de fatores: tampão de extração, temperatura, conteúdo de lipídios, presença ou ausência de agentes redutores, entre outros (vide item 2.3). Nesse caso, a maior ou menor quantidade desses agentes pode exercer influências distintas nas frações

estudadas. Além disso, é importante frisar que estudos realizados por Abdelrahman e Hosney, (1984) sugerem que essa classe de proteínas está envolvida com a estrutura física do grão.

O padrão eletroforético da fração zeína aparece na Figura 7. Essa fração é também heterogênea, sendo composta de vários polipeptídeos. Embora existam outras subfrações, como a beta-zeína de 15kDa, e a delta-zeína de 10kDa, essas últimas não foram consideradas pela grande dificuldade de separá-las; em alguns géis preliminares (dados não mostrados) não foi possível obter uma boa resolução, o que dificultaria sobremaneira a individualização desses polipeptídeos para a densitometria.

Conforme observado para a gama-zeína de 27kDa (Figura 8), as médias dos recíprocos foram semelhantes aos demais genótipos indígenas. Porém, o fato de o parental BR201 ter apresentado a menor média, pode sugerir que um aumento nessa fração pode estar relacionado com a contribuição do parental BOL II. Entretanto, esse aumento não pareceu comportar-se de forma gradual, conforme demonstraram as médias obtidas. A única exceção ocorreu para o PR I, com uma média só superada pelo QPM. A gama-zeína de 27kDa tende a ser abundante no genótipo QPM (Wallace et al., 1990; Paiva, et al., 1991); em cruzamentos envolvendo o QPM com materiais que apresentam fenótipo opaco, a conversão do endosperma opaco em vítreo foi associada a um aumento na síntese de gama-zeína (Wallace et al., 1990; Lopes and Larkins, 1991; Paiva et al., 1991).

As avaliações entre o cruzamento recíproco do BR201 e o BOL II indicaram que não houve alterações no nível dessa proteína, suposição reforçada pelo fato de as médias para os genótipos dessa classe de mutantes estarem inseridas no mesmo grupo (Figura 8). Em termos comparativos, o BR201 apresentou um menor valor para essa proteína, sugerindo, portanto, que outros

fatores podem estar relacionados com a conversão do endosperma. Por exemplo, Geetha, Lending, e Lopes (1991), citam que a distribuição das zeínas no endosperma ocorre pela ação de genes modificadores. Segundo Lopes e Larkins (1991), tais genes parecem agir de maneira semi-dominante e independente do loco opaco-2.

Para a alfa-zeína de 19kDa, o genótipo indígena Preto Chileno apresentou uma maior quantidade dessa proteína (Figura 8); em contrapartida, o QPM utilizado como testemunha nesses estudos apresentou o menor valor de RPD. A diminuição dessa classe de proteínas é comum nos genótipos QPM, sendo o mesmo tipo de decréscimo também constatado para a alfa-zeína de 22kDa, indicando que provavelmente houve uma alteração também desta classe de proteína nos cruzamentos recíprocos. Não se pode afirmar, entretanto, que essa diminuição esteja relacionada com a dosagem de alelos relacionados à conversão do endosperma opaco em vítreo, visto que nos demais genótipos indígenas de endosperma opaco e de baixa densidade os valores foram intermediários e semelhantes (Figura 8).

Considerando-se os padrões eletroforéticos das frações 'proteína total' e 'não-zeínas' da geração F_2 (Figuras 9 e 11) e suas respectivas médias de RPD (Figuras 10 e 12), encontrou-se uma tendência semelhante à geração F_1 . Da mesma forma que nessa última geração, os padrões protéicos apresentados e as análises dos polipeptídeos marcados para a avaliação dos genótipos segregantes na geração F_2 (opacos e semi-opacos) não permitiram uma distinção nos grupos de médias que pudessem estar associadas a uma modificação do endosperma. Estes resultados, então, confirmariam a impossibilidade de se utilizar essas frações protéicas como indicativos de tendências à modificação do endosperma. Contudo, conforme veremos adiante, outros fatores podem ter interferido nesses resultados, mascarando uma possível associação.

Outra análise de padrões protéicos foi realizada para a fração 'zeína' da mesma população segregante F_2 do cruzamento entre o BR201 X BOL II (Figura 13). Os resultados obtidos para o polipeptídeo de 54kDa, entre os genótipos das sementes com características fenotípicas opacas (5) e semi-opacas (6) mostraram uma diferença entre as médias, indicando a provável existência de acúmulo dessa fração na modificação fenotípica do endosperma, haja vista o genótipo semi-opaco ter mostrado valores superiores para essa fração quando comparado com genótipo opaco. Os demais resultados foram semelhantes ao do progenitor BR201 de endosperma duro, exceto para o BOL II de fenótipo opaco e endosperma mole. Isso sugere que, aparentemente, há uma relação entre o acúmulo das proteínas de 54kDa e a qualidade física dos grãos, conforme análise estatística dos valores de RPD (Figura 14). Já para os fenótipos segregantes, a fração das alfa-zeínas (peptídeo de 22kDa) mostrou um ligeiro decréscimo, apesar de não diferirem estatisticamente. Conforme Lopes (1993), há a possibilidade de haver uma relação inversa entre o conteúdo dessa fração de 22kDa e o acúmulo da gama-zeína; contudo, experimentos posteriores são ainda necessários para confirmar tal hipótese.

Ainda estendendo-se as análises protéicas uma geração adiante, foram verificados o padrão eletroforético e as médias de densidade ótica característicos das 'proteínas totais' do endosperma do milho, da geração $F_{2,3}$, (Figuras 15 e 16). Interessantemente, para essa geração segregante foi encontrada alguma tendência de associação entre os grupos de médias e os fenótipos, como, por exemplo, para o polipeptídeo de 61kDa. Contudo, acredita-se que uma melhor distinção entre esses grupos teria sido possível se o coeficiente de variação para essa análise não tivesse apresentado valores altos. De qualquer modo, as diferenças apresentadas já permitiram concluir que esse polipeptídeo deve estar envolvido na modificação do endosperma.

Contudo, não se sabe a razão de tal associação não ter se manifestado nas gerações anteriores. Nesse sentido, poder-se-ia especular que, à medida que se avança com auto-fecundações nas gerações seguintes, estar-se-ia favorecendo a fixação (por homozigose) das características contrastantes. Considerando-se o peso molecular desse polipeptídeo, permite-se também especular que, provavelmente, trata-se da fração não-zeína; como nessa fração se concentram as proteínas de características diferentes das de reserva, seria plausível que seu acúmulo estivesse relacionado com o endosperma opaco. Semelhante tendência foi observada para o polipeptídeo de 34kDa, cujos valores de RPD sugerem o acúmulo dessa fração preferencialmente no fenótipo opaco (Figura 16). Também aqui, um inflacionamento do coeficiente de variação prejudicou um pouco a interpretação dos resultados. Para o polipeptídeo de 56kDa, em contraste, os valores médios mostraram-se semelhantes entre os dois fenótipos; não tendo sido encontrada, portanto, uma tendência de médias que permitisse uma associação com o fenótipo.

Considerando-se os polipeptídeos caracterizados anteriormente para a fração 'não-zeína' (Figura 17), as respectivas análises estatísticas apresentaram um coeficiente de variação alto, em todas as gerações avaliadas. Contudo os resultados confirmaram, para a geração $F_{2,3}$, a mesma tendência anteriormente descrita, em termos de RPD (Figura 18). Por se tratar de uma extração seqüencial, a fração 'não-zeína' não foi recuperada de forma uniforme. Assim, acredita-se que a intensidade de coloração desuniforme (obtida com o Coomassie) para algumas amostras, provavelmente influenciou de maneira negativa as avaliações através da densitometria. Cabe mencionar que esse problema refletiu fortemente na avaliação do polipeptídeo de 56kDa, influenciando provavelmente os tratamentos, não permitindo assim a execução do teste de médias.

De um modo geral, parece importante discutir-se que a não detecção de diferenças entre os polipeptídeos de algumas frações protéicas pode estar relacionada a um aumento no erro padrão das médias, o que, como consequência, teria um efeito imediato no coeficiente de variação (CV), elevando-o, conforme citado acima. Considerando-se os fatores que poderiam influenciar no aumento do CV das análises aqui realizadas, pode-se argumentar que, durante toda a marcha do processo analítico (desde a extração até a análise densitométrica), existem várias etapas sujeitas à variação experimental e/ou operacional que provavelmente contribuem de forma cumulativa, gerando um efeito final de acentuação na variação global dos experimentos. Há várias possíveis causas dessa variação. Por exemplo, variações indesejáveis (não-controláveis) de temperatura durante o processo de extração podem ter contribuído para uma relativa desuniformidade quantitativa do material (Tsai, 1983). Outros fatores como a interação entre proteínas, o conteúdo de lipídios e a quantidade de agentes redutores podem ter exercido uma influência direta no padrão protéico analisado.

A utilização de experimentos de focalização isoeétrica (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.

6 CONCLUSÕES

A avaliação de famílias segregantes dos cruzamentos recíprocos entre o BOL II X BR201 permitiu a identificação do efeito de dosagem de alelos na densidade do endosperma, baseada no conteúdo triplóide deste tecido.

O perfil das frações protéicas estudadas ('proteína total' e 'não-zeína') e a quantificação por densitometria dos polipeptídeos analisados para as gerações iniciais F_1 e F_2 , não permitiram uma associação entre o conteúdo de proteína e uma modificação na estrutura física do endosperma (vitresidade/opacidade).

As mesmas análises efetuadas para a geração $F_{2,3}$, ao contrário, permitiram a identificação de um padrão de polipeptídeos associado aos fenótipos opaco e vítreo, tanto para fração 'proteína total' quanto para a 'não-zeína'.

O perfil protéico das 'zeínas' na geração F_2 permitiu uma associação com os fenótipos estudados para o endosperma, de modo que um polipeptídeo de 54kDa (provavelmente gama-zeína) apresentou maior média para o fenótipo segregante semi-opaco, ao passo que o polipeptídeo de 22kDa (provavelmente alfa-zeína) apresentou menor média para este mesmo fenótipo.

O polipeptídeo de peso aparente de 60kDa mostrou uma relação de sobredominância, quando observados os resultados quantitativos (RPDs) dos genitores e dos recíprocos para a fração não-zeína da geração F_2 .

O mesmo polipeptídeo parece correlacionar-se com os grãos de fenótipo opacos, na geração $F_{2,3}$.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELRAHMAN, A. A. and HOSENEY, R. C., Basis for hardness in pearl millet, grain sorghom and corn. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 61, n. 3, p. 232 - 235, May/June 1984.
- AGROS, P.; PEDERSEN, K.; MARKS, M. D.; LARRKINS, B. A.; A Structural model for maize Zein proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 257, n. 17, p. 9984 - 9990, Sep. 1982.
- BURR, F. A. and BURR, B., Three mutations in *Zea mays* affecting zein accumulation: a comparison of zein polypeptides, *in vitro* synthesis and processing, mRNA levels, and genomic organization. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 94, p. 427-434, 1982.
- 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.
- CLORE, A M.; DANNENHOFFER, J. M. ; LARKINS, B. A. EF - 1 α is associated with a cytoskeletal network surrounding protein bodies in maize endosperm cells **The Plant Cell**, Rockville v. 8; n. 11, p. 2003 - 2014, Nov.1996.
- DI FONZO, N., FORNASARI, E., SALAMINI, F., REGGIANI, R., and SOAVE, C., Interaction of the mutants floury-2, and opaque-7 with opaque-2 in the synthesis of endosperm proteins. **Journal of Heredity**, Washington, v.71, n.6, p. 397-402, Nov/Dec.1979.
- 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.
- DUMAS, C. and MOGESEN, H. L. Gametes and fertilization: maize as a model system for experimental embriogenesis in flowering plants. **The Plant Cell**, Rockville, v.5, n. 10, p. 1337 - 1348, Oct. 1993.
- DURSO, N. A., and CYR, R. J. A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and higher plant homolog of elongation factor 1 α . **The Plant Cell**, Rockville, v..6, n. 4, p. 839-905, June 1993.

- ESSEN, A.; CONROY, I. M.; WANG, S. A simple and rapid dot immunobinding assay for zein and other prolamins. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 132, p. 462 - 467, 1983.
- ESSEN, A. Separation of alcohol soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. **Plant Physiology**, Maryland, v. 33, n. 6 p623 -627, Nov. 1986.
- FEIX, G. AND QUAYLE, T. Structure and expression of zein genes of maize. **Critical Review. Plant. Science** Dordrecht v.12, n. 1, p. 111 - 127, Feb. 1993.
- FONTES, E. B. P., SHANK, B. B., WROBEL, R. L., MOOSE, S. P., O'BRIAN, G. R., WURTZEL, E. T., and BOSTON, R. S. Characterization of immunoglobulin binding protein in the maize floury-2 endosperm mutant. **The Plant Cell**, Rockville, v.3, n. 4, p. 483-496, May 1991.
- GATENBY, A. A., VIITANEN and LORIMER, G. H. Chaperonin assisted polypeptide folding and assembly: implications for the production of functional proteins in bacteria. **Wilmington, TIBETECH**, Wilmington, v.8, p. 354-358, 1990.
- GEETHA, K B.; LENDING, C. R.; LOPES, M. A. Opaque-2 modifiers increase gamma zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. **The Plant Cell**, Rockville, v.3, n. 11, p. 1207 - 1219, Nov. 1991.
- GEORGOPULOS, C. The emergence of the chaperone machines. **Tibs**, Bloomington, v. 17, p. 295-299, 1992.
- GUIMARÃES, C. T. **Caracterização de populações de milho indígenas que apresentam grãos opacos** Viçosa: UFV, 69p. 1994 (Tese de Mestrado).
- HAGEN, G. and RUBENSTEIN, I. Complex organization of zein genes in maize. **Genetics**, Madison v. 113, n.3, p. 239-249, 1981.
- HABBen, J. E.; KIRLEIS, A. W.; LARKINS, B. A. The origin of lysine-containing proteins, in *opaque-2* maize endosperm. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 23, p. 825 - 838, 1993.

- HABBen, J. E.; MORO, L. G.; HUNTER, B. G.; HAMAKER, B. R.; LARKINS, B. A. Elongation factor 1 α concentration is highly correlated with the lisyne content of maize endosperm. **Agricultural Science in the Netherlands**, Wageningen, v. 92, p. 8640 - 8644, 1995.
- 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/Fev. 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.
- LARKINS, B. A.; Seed Storage Proteins: Characterization and biosynthesis. In: CONN, E.E. STUMPF, P. K. **The biochemistry of Plants. A Comprehensive treatise**, New York, Academic Press. v. 6, p. 449 - 489, 1981
- LARKINS, B. A.; WALLACE, J. C.; GALILI, G.; LENDING, C. R.; KAVATA, E. E. Structural analyses and modification of maize storage proteins. **Developments in Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 4, p. 203 - 209, 1989
- LARKINS, B. A.; CRAING, R. L.; BARROS, E. Assembly of maize storage protein into protein bodies in developing endosperm. In HERMANN, R. G.; LARKINS, B. A. **Plant molecular biology**. New York: Plenum Press, p. 619 - 625, 1991.
- LENDING, C. R.; KRIZ, A. L.; BRACKER, C. E.; LARKINS, B. A. Structure of maize protein bodies and immunocytochemical localization of zein. **Protoplasma**, Vienna, v. 143 p. 51-52, 1988.
- LENDING, C. R. & LARKINS, B. A. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 1, n. 9, p. 1011-1023, Sept. 1989.
- LOHMER, S.; MADDALONI, M.; MOTTO, M.; Di FONZO, M.; HARTINGS, H.; SALAMINI, F.; THOMPSON, R. D. The maize regulatory locus *Opaque-2* encodes a DNA-binding protein which activates the transcription of the *b-32* gene. **The EMBO Journal** v. 10, n. 3, p. 617 - 624, 1991.
- LOPES, M.A.; LARKINS, B. A. γ -zein content is related to endosperm modification in Quality Protein Maize (QPM). **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 6, p. 1655 - 1662, Nov/Dec. 1991.

- 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).**
- LOPES, M. A LARKINS, B. Endosperm Origin, development, and function. The plant Cell, Rockville v. 5, n. 10, p.1383 - 1399. Oct. 1993.**
- LOPES, M. A. COLEMAN, C. E. KODRZYCKI, R.; LENDING, C. R. LARKINS, B. A. Synthesis of an unusual α - zein protein is correlated with the phenotypic effects of the floury 2 mutation in maize. Molecular and General Genetics, Berlin, v. 245, p. 537 - 547, 1994.**
- MARROCO, A., SANTICCI, A., CEROLI, S., MOTTO, M., DIFONZO, N., TOMPSOM, R., SALAMINI, F. Three high-lysine mutations control the level of ATP - binding ASP -70 like proteins in the maize endosperm. The Plant Cell, Rockville, v. 3, n. 5, p.507-515, May, 1991.**
- MERTZ, E. T.; BATES, L. S.; NELSON, O. E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. Science, Washington, v. 176, n. 3629, p. 279 - 280, 1964.**
- MERTZ, E. T.; Genetic and biochemical control of grain protein synthesis in normal and high lysine cereals. Nutrition & Dietary, Reas Vegas, v. 48, p. 222 - 262, 1986.**
- MESSING, J.; The genes encoding seed storage proteins in higher plants. Genetic Engineering, New York, v.6, p.1 - 46, 1987.**
- MORO, G. L.; HABBEN, J. E.; HAMAKER, B. R.; and LARKINS, B. A. Characterization of the variability in lysine content for normal and opaque -2 maize endosperm. Crop. Science, v. 36, n. 6, p. 1651 - 1659, Nov. 1996.**
- MOTTO, M; DI FONZO, N; HARTINGS, H.; MADDALONI, M.; SALAMINI, P.; SOAVE, C.; THOMPSON, R.D. Regulatory genes affecting maize storage protein synthesis. The Plant Journal for Cell and Molecular Biology, Oxford, v.6, p. 87 - 114, 1989.**
- MUTHUKUMARAPPAN, K.; GUNASESKARAN, S. Moisture diffusivity of corn kernel components during adsorption. Part III: Soft and hard endosperms. Transactions of the ASAE, Michigan, v. 37, n.4, p. 1275 - 1280, July/Aug.1994.**

- NELSON, O. E., MERTZ, E. T., BATES, L. S. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. *Science*, Washington, v. 150, n. 3702, p. 1469-1470, Dec. 1965.
- NELSON, O. E., Genetic modification of protein quality in plants. *Advances in Agronomy*, New York, v. 21, p. 171-194, 1969.
- ORTEGA, E. I. & BATES, L. S. Biochemical and agronomic studies of two modified hard endosperm opaque-2 maize (*Zea mays*) populations. *Cereal Chemistry*, St. Paul, v.60, n. 2, p. 107 - 111, May/Apr. 1993.
- OSBORNE, T. B. & MENDEL, L. B. Nutritive properties of protein of maize kernel. *The Journal of Biology Chemistry*, Baltimore, v. 18, n. 1, p.1-16, 1914.
- PAIVA, E., KRIZ, A. L., PEIXOTO, M.J.V.D., WALLACE, J. D., LARKINS, B.A. Quantitation and distribution of gama-zein in the endosperm of maize kernels. *Cereal Chemistry*, St. Paul, v. 68, n. 3, p. 276-279, May/June, 1991.
- 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 *The journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 261, n.14, p. 6279 - 6284, 1986.
- RIGHETTI, P. G., GIANAZZA, E., VIOTTI, A., SOAVE, C. Heterogeneity of storage proteins in maize. *Planta*, New York, v. 136, n. 6, p. 115-123, 1977.
- 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.
- RUBENSTEIN, I.; GERAGHTY, D.E. The genetic organization of zein, I POMERANZ, Y. (ed) *Advances in Cereal Science and Technology*. St Paul, v.8, p. 297 -315. 1989.
- SHIINA, N., GOTOH, Y. KUBOMURA, N., IWAMATSU, A., and NISHIDA, E. Microtubule severing by elongation factor 1 α . *Science* Washington, v. 266, n. 5183, p. 282-285, Oct. 1994.
- SCHIMIDT, R. J. Opaque-2 and zein gene expression. In *Plant Genetic regulation* Verma. D. P. S. CRC Press, p. 337 -355, 1993.

- SHOTWELL, M. A., LARKINS, B. A. The Biochemistry and molecular biology of seed storage proteins, *The Chemistry of Plants*, New York:by Academic Press. Inc. v.15, p. 297 - 345, 1989.
- 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.; PIOLI, F.; VIOTTI, A.; SALAMINI, F.; RIGHETTI, P. G. Synthesis and heterogeneity of endosperm proteins in normal and opaque-2 maize. *Maydica*, Bergamo, v. 20, p. 83-94, 1975.
- SOAVE, C. & SALMINI, F. Organization and regulation of zein genes in maize *Phylogical Society Transations*, Oxford. v. 304, p. 341-347, 1984.
- THOMPSON, G. A. LARKINS, B. Sturctural elements regulating zein gene expression. *Bioessais*, Cambridge v. 10 n.4. p. 108 - 112, 1989.
- TSAI, C. Y. Genetics of storage protein in maize, In JANICK, J (ed) *Plant Breeding Reviews*, New York, v. 20, p. 83 - 94,.1983.
- VARAGONA, M. J. SCHINMIDT, R. J.; and RAIKHEL, N. V. Monocot regulatory protein opaque-2 is localized in the nucleus of maize endosperm and tobacco plants. *The plant Cell*, Rockville, vol. 3, n. 2, p. 105 - 113, Feb.1991.
- VITALE, A ; CERIOTTI, A ; DENECKE, J. The role of the endoplasmic reticulum in protein syntesis, modification and intracellular transport. *Journal of Experimental botany*, London, v. 14, n 266, p. 1417 - 1444, Sep. 1993.
- WALLACE, J. C.; GALILI, G.; KAVATA, E. E.; LENDING, C. R.; KRIZ, A L.; BRACKER, E. C.; LARKINS, B. A Location and interaction of the diferent Types of zeins in protein bodies, *Biochemistry Physiology Pflanzan*, v. 183, p. 107 - 115, 1988.
- 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.

- WILSON, C. M. SHEWRY, P. R.; MIFLIN, B. J. Maize endosperm proteins compared by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Cereal Chemistry*, St. Paul, v. 8, n. 4, p. 275 - 281, July/Aug. 1981.
- WILSON, D. R. & LARKINS, B. A. Zein gene organization in maize and related grasses. *Journal of Molecular Evolution*, New York, v. 20, p.330-340, 1984.
- WILSON, C. M. Serial analysis of zein by isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate gel electroforesis. *Plant Physiology Maryland*, v. 82, n. 1, p. 196 - 202, Sep. 1986.
- 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.
- WOLF, M. J., KHOO, U., SECKINGER, H. L. Subcellular structure of endosperm protein in high-lisine and normal corn. *Science*, Washington, v. 157, n. 3788, p. 556-557, Aug. 1967.
- ZHANG, F., and BOSTON R. S.. Increases in binding protein (BiP) accompany changes in protein body morphology in three high-lysine mutants in maize. *Protoplasma*. Vienna, v. 171, p. 142-152, 1992.

8 ANEXOS

8.1. Resumo dos quadros de análises de variância (ANAVA) geração F₁ incluindo genitores, cruzamentos recíprocos, genótipos indígenas e testemunha

8.1.1. ANAVA : Proteína total F₁ - Distribuição dos valores percentuais de RPD para os polipeptídeos de 72, 60 e 48kDa (FIGURA 4). Delineamento em blocos casualizados

Fonte de variação	G. L.	QUADRADO MÉDIO POLIPEPTÍDEOS		
		72kDa	60kDa	48kDa
Tratamento	7	3020.885**	31776.511**	9507.310**
Repetição	3	3300.661	9254.919	2471.152
Erro	21	593.203	3369.654	1059.097
Não-aditividade	1	2580.052	7324.837	1598.663
Residual	20	493.860	3171.895	1032.119
TOTAL	31			
C.V.		23.01%	19.56%	12.61%

8.1.2. ANAVA :- Não-zeínas F₁ - Distribuição dos valores percentuais de RPD (não zeínas), para os polipeptídeos de 72, 60 e 48kDa (FIGURA 6). Delineamento em blocos casualizados

Fonte de variação	G. L.	QUADRADO MÉDIO POLIPEPTÍDEOS		
		72kDa	60kDa	48kDa
Tratamento	7	224094.503**	136091.795**	179772.298**
Repetição	3	80678.025	13342.841	82860.868
Erro	21	15767.644	1764.923	3332.860
Não-aditividade	1	14495.953	1238.331	48451.518
Residual	20	15831.229	1791.253	1076.928
TOTAL	31			
C.V.		19.25%	12.40%	13.77%

8.1 - Resumo das ANAVAS (geração F₁) -- continuação

8.1.3. ANAVA 'Zeínas':F₁ - Distribuição dos valores percentuais de RPD (zeínas) para os polipeptídeos 54, e 27kDa, (FIGURA 8). Delineamento em blocos casualizados.

Fonte de variação	G. L.	QUADRADO MÉDIO POLIPEPTÍDEOS	
		54kDa	27kDa
Tratamento	7	3707.866**	249150.273**
Repetição	2	11654.669	331190.552
Erro	14	725.904	3021.605
Não-aditividade	1	2.917	172.871
Residual	13	781.518	3240.738
TOTAL	23		
C.V.		18.62%	4.56%

8.1.3. ANAVA 'Zeínas':F₁ - Distribuição dos valores percentuais de RPD (zeínas) para os polipeptídeos 22, e 19kDa, (FIGURA 8). Delineamento em blocos casualizados.

Fonte de variação	G. L.	QUADRADO MÉDIO POLIPEPTÍDEOS	
		22kDa	19kDa
Tratamento	7	915507.576**	935733.110**
Repetição	2	1045243.342	690707.650
Erro	14	106571.042	14782.918
Não-aditividade	1	418191.138	19855.175
Residual	13	82600.266	14392.744
TOTAL	23		
C.V.		20.90%	6.57%

8.1.2 Resumo dos quadros de análises de variância (ANAVA) geração F₂, incluindo genitores, cruzamentos recíprocos F₁ e genótipos segregantes (oapco e semi-opaco), e testemunha

8.1.2.1. ANAVA : Proteína total - Distribuição dos valores percentuais de RPD para os polipeptídeos de 61, 51 e 48kDa, (FIGURA 10). Delineamento em blocos casualizados.

Fonte de variação	G. L.	QUADRADO MÉDIO POLIPEPTÍDEOS		
		61kDa	51kDa	48kDa
Tratamento	6	43216.475**	39081.502**	56264.970**
Repetição	3	29795.751	32268.572	4584.188
Erro	18	6080.880	1467.429	6790.595
Não-Aditividade	1	58849.679	79.737	53737.236
Residual	17	2976.833	1549.058	4029.027
TOTAL	27			
C.V.		36.38%	10.25%	23.84%

8.1.2.2. ANAVA : Não-zéfnas, - Distribuição dos valores percentuais de RPD para os polipeptídeos de 61, 51 e 48kDa, (FIGURA 12). Delineamento em blocos casualizados.

Fonte de variação	G. L.	QUADRADO MÉDIO POLIPEPTÍDEOS		
		61kDa	51kDa	48kDa
Tratamento	6	328293.326**	177111.053**	45613.721**
Repetição	3	239962.096	6718.817	33995.873
Erro	18	49100.299	44063.873	11180.512
Não-aditividade	1	312098.083	1474.493	16980.187
Residual	17	33629.841	46569.131	10839.355
TOTAL	27			
C.V.		39.41%	33.44%	27.88%

8.1.2 -Resumo das ANAVAS (geração F₂) – continuação

8.1.2.3. ANAVA 'Zeínas' - Distribuição dos valores percentuais de RPD (zeínas) para os polipeptídeos 54, e 27kDa, (FIGURA 14). Delineamento em blocos casualizados.

Fonte de variação	G. L.	QUADRADO MÉDIO POLIPEPTÍDEOS	
		54kDa	27kDa
Tratamento	6	12736.76**	386181.999**
Repetição	2	1158.238	560736.315
Erro	12	2422.318	30111.471
Não-aditividade	1	4022.152	45634.799
Residual	11	2276.879	28700.260
TOTAL	20		
C.V.		24.62%	13.39%

8.1.2.3. ANAVA 'Zeínas' - Distribuição dos valores percentuais de RPD (zeínas) para os polipeptídeos 22, e 19kDa, (FIGURA 14). Delineamento em blocos casualizados.

Fonte de variação	G. L.	QUADRADO MÉDIO POLIPEPTÍDEOS	
		22kDa	19kDa
Tratamento	6	206656.172**	1941316.231**
Repetição	2	540997.792	418084.492
Erro	12	32954.074	187680.282
Não-aditividade	1	5930.377	76894.193
Residual	11	35410.774	197751.745
TOTAL	20		
C.V.		10.91%	14.46%

8.1.3. Resumo das ANOVAS (geração F_{2,3}) grãos opacos e grãos vítreos

8.1.3.1. ANAVA : Proteína total. - Distribuição dos valores percentuais de RPD para os polipeptídeos de 61, 56 e 34kDa, (FIGURA 16). Delineamento em blocos casualizados

Fonte de variação	G. L.	QUADRADO MÉDIO POLIPEPTÍDEOS		
		61kD	56kD	34kD
Tratamento	17	50597.982**	2747.222**	4427.473**
Repetição	3	22749.287	2708.827	3668.005
Erro	51	2825.255	600.974	539.810
Não-aditividade	1	15838.094	157.610	5682.260
Residual	50	2564.998	609.842	436.961
TOTAL	71			
C.V.		25.34%	15.18 %	29.29 %

8.1.3.2. ANOVA Não-zeínas, - Distribuição dos valores percentuais de RPD para os polipeptídeos de 61, 56 e 34kDa, (FIGURA 18). Delineamento em blocos casualizados

Fonte de variação	G. L.	QUADRADO MÉDIO POLIPEPTÍDEOS		
		61kD	56kD	34kD
Tratamento	17	34510.175**	7087.637n/s	4026.584**
Repetição	3	61622.081	41215.554	2183.824
Erro	51	7464.951	5559.049	639.139
Não-aditividade	1	111658.403	21866.860	8692.106
Residual	50	5381.082	5232.893	478.079
TOTAL	71			
C.V.		41.18%	33.57%	29.45%

8.1.4 - Resumo da ANOVA para densidade

Distribuição dos valores de densidade (g/ml) (FIGURA 1), das sementes dos progenitores da geração F1, genótipos indígenas e fenótipos opacos e semi-opacos da Geração F_{2,3}. Delineamento em blocos casualizados.

Fonte de variação	G. L.	QUADRADO MÉDIO
Tratamento	9	0.021111**
Repetição	2	0.004000
Erro	18	0.000555
Não-aditividade	1	0.000100
Residual	17	0.000588
TOTAL	29	
C.V.		1.49 %