

**RELAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS
ESTRUTURAIS E BIOQUÍMICAS E A
TEXTURA DO GRÃO DE MILHO**

ROSELAINÉ CRISTINA PEREIRA

2006

ROSELAINÉ CRISTINA PEREIRA

**RELAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS
ESTRUTURAIS E BIOQUÍMICAS E A TEXTURA DO
GRÃO DE MILHO**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

Lavras
Minas Gerais – Brasil
2006

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

Pereira, Roselaine Cristina

Relação entre características bioquímicas e estruturais e a textura do grão de milho / Roselaine Cristina Pereira. -- Lavras : UFLA, 2006.

-- p. : il.

Orientadora: Lisete Chamma Davide.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Milho. 2. Característica bioquímica. 3. Eletroforese. 4. Genética. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.1523

ROSELAINÉ CRISTINA PEREIRA

**RELAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E
BIOQUÍMICAS E A TEXTURA DO GRÃO DE MILHO**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 31 de março de 2006

Dra Édila Vilela Resende Von Pinho	UFLA
Dr Edílson Paiva	Embrapa Milho e Sorgo
Dra. Isabel Regina Prazeres de Souza	Embrapa Milho e Sorgo
Dr. Newton Portilho Carneiro	Embrapa Milho e Sorgo

Profa. Dra Lisete Chamma Davide
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela constante presença em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e pela excelência do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

Ao Departamento de Biologia, professores e funcionários, pela oportunidade e apoio.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À professora Dra. Lisete Chamma Davide e ao pesquisador Dr. Edilson Paiva, pela orientação, amizade, incentivo e suporte constante durante todo o curso de doutorado.

À Dra. Isabel Regina Prazeres de Souza e ao Dr. Newton Portilho Carneiro pela participação da banca e pelas sugestões apresentadas.

À professora Dra. Édila Vilela Resende Von Pinho pela participação da banca, pelo apoio e pelas sugestões apresentadas.

À professora Dra. Elaine Aparecida de Souza e Dra. Giovana Torres pela amizade e inúmeras contribuições.

Ao professor Dr. Eduardo Alves pelo apoio nas análises realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica.

Aos laboratoristas Soraya, Lamartini, Heloísa, Anderson, Tina, Sandra e Elenir pelo apoio e amizade.

Ao Miguel Reis, Laboratorista da Embrapa milho e sorgo, pela disponibilidade e suporte constante nas análises laboratoriais.

À secretária Elaine Ribeiro pela amizade e pelo apoio constante.

A todos colegas e professores da pós-graduação, pela boa convivência e pelos momentos de crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e do GEN pelo convívio sempre amigável.

Aos estagiários e alunos de iniciação científica dos Laboratórios de Citogenética e de Sementes pela ajuda nas diversas etapas deste trabalho.

Aos meus amigos pelo apoio, incentivo e amizade.

À minha família pelo incentivo, compreensão e paciência.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Formação, estrutura e composição do grão de milho.....	3
2.2 Estrutura, composição e desenvolvimento do endosperma.....	6
2.2.1 Proteínas do endosperma do milho.....	7
2.2.1.1 Teor de lisina e triptofano no grão de milho.....	10
2.3 Composição e organização do grânulo de amido.....	12
2.4 Arranjo do amido e proteína e a textura do grão de milho.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Condução do experimento.....	16
3.2 Material utilizado.....	16
3.3 Características avaliadas nos grãos de milho em desenvolvimento.....	17
3.3.1 Área do grânulo de amido e porcentagem de amido.....	17
3.3.2 Arranjo dos grânulos de amido e corpos protéicos no endosperma.....	18
3.3.3 Análise estatística.....	20
3.4 Características avaliadas nos grãos de milho maduro.....	20
3.4.1 Densidade do grão.....	20
3.4.2 Porcentagem de proteína.....	21
3.4.3 Teor de lisina e triptofano no grão.....	21
3.4.4 Análise estatística.....	22
3.4.5 Padrão eletroforético das proteínas do grão.....	22
3.4.5.1 Obtenção da proteína total.....	22
3.4.5.2 Obtenção das frações zeínas e não- zeínas.....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1.1 Área do grânulo de amido e porcentagem de amido.....	25
4.1.2 Arranjo dos grânulos de amido e corpos protéicos no endosperma.....	30
4.2 Padrão eletroforético das proteínas do grão de milho.....	36
4.3 Densidade, porcentagem de proteína total, triptofano e lisina no grão de milho.....	38
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

RESUMO

PEREIRA, Roselaine Cristina. **Relação entre características estruturais e bioquímicas e a textura do grão de milho.** 2006. 54 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A textura do grão de milho é fundamental para a indústria, produtores e beneficiadores de grãos. Visando conhecer melhor os mecanismos envolvidos com a dureza do grão foi feita uma descrição estrutural e bioquímica de cultivares contrastantes para essa característica e qualidade protéica. Foram utilizadas as cultivares Cateto L_{237/67} e QPM BR 451, que apresentam endosperma duro e semi-duro, baixo e alto valor protéico, respectivamente, e as cultivares Bolívia-2 e Opaco-2, de endosperma farináceo, com baixo e alto valor protéico. Foram feitas avaliações nos grãos de milho em desenvolvimento (10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias após a polinização) e nos grãos maduros. Nos grãos de milho em desenvolvimento, avaliaram-se a área do grânulo de amido, a porcentagem de amido e o arrançamento dos grânulos de amido e dos corpos protéicos no endosperma e, nos grãos de milho maduro, densidade, porcentagem de proteína total, conteúdo de lisina e triptofano e o padrão eletroforético das proteínas totais, zeínas e não zeínas. Os maiores valores de tamanho final e porcentagem de amido foram observados nas cultivares Cateto L_{237/67} e Bolívia-2, de endosperma duro e farináceo, respectivamente. Nas cultivares de endosperma duro e semi-duro, o empacotamento dos grânulos de amido no endosperma iniciou-se a partir dos 30 dias após a polinização, enquanto que, na cultivar Bolívia-2, ele teve início a partir dos 20 dias após a polinização. As cultivares Opaco-2 e QPM BR 451 apresentaram menores quantidades e tamanho de grânulos amido. Com relação à presença de corpos protéicos, estes foram abundantes nas cultivares de endosperma duro e semi-duro. Nessas cultivares, verificou-se, também, maior porcentagem de proteína total. O padrão de bandas das zeínas mostrou que as cultivares de baixo valor protéico apresentam todas as zeínas (27, 22, 19, 16, 14, 10kDa). Observou-se a maior síntese das zeínas de 27 e 16 kDa nas cultivares de endosperma duro e semi-duro, Cateto L_{237/67} e QPM BR 451. Nas cultivares com alto valor protéico observou-se uma redução das zeínas de 19 kDa e paralização das de 22 kDa. Portanto, o alto teor de proteína no grão, a alta síntese das zeínas de 27 kDa e 16 kDa e a presença de corpos protéico, permitem um melhor empacotamento dos componentes do endosperma o que pode estar associado com a maior dureza física do grão de milho.

*Comitê orientador: Lisete Chamma Davide-UFLA (Orientadora), Edilson Paiva-Embrapa Milho e sorgo (Co-orientador).

ABSTRACT

PEREIRA, Roselaine Cristina. **Relationship between structural and biochemical characteristics and texture of corn grain.** 2006. 54 p. Thesis (Doctorate in Agronomy- Plant Genetics and Breeding) – Federal University of Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Corn grain texture is fundamental to the industry, grain producers and processors. Aiming to know better the mechanisms involved with the grain hardness, a structural and biochemical characterization of contrasting cultivars for that characteristic and protein value. It was used the Cateto L_{237/67} and QPM BR 451 cultivars with hard and semi-hard endosperm, low and high protein quality, respectively and the Bolivia-2 and Opaque-2 cultivars have soft endosperm of low and high protein quality. Evaluations were made in the developing corn grain (10, 20, 30, 40, 50 and 60 days after pollination) and in the mature grain. In the developing corn grains, area of the starch granule, the percentage of starch and distribution of starch granules and protein bodies in the endosperm and, in mature corn grains, density, percentage of total protein, content of lysine and tryptophan and the band pattern of total proteins, zeins and non-zeins were evaluated. The greatest values of final size and percentage of starch were observed in the cultivars Cateto L_{237/67} and Bolivia-2, of hard and soft endosperm, respectively. In the cultivars of hard and semi-hard endosperm, starch granules packing in the endosperm started from the 30 days after pollination, while in the cultivar Bolivia-2, it began from the 20 days after pollination. The cultivars Opaque-2 and QPM BR 451 showed smaller amounts and size of starch granules. In relation to the presence of protein bodies, these were abundant in the cultivars of hard and semi-hard endosperms. In those cultivars, also, greater total protein content was found. The band pattern of zeins showed that low protein value cultivars present all zeins (27, 22,19, 16,14, 10kDa). The greatest synthesis of 27 e 16 kDa zeins was observed in cultivars of hard and semi-hard endosperm, Cateto L_{237/67} and QPM BR 451. In the cultivars of high protein value a reduction of the zein of 19 kDa and lack of these of the 22 kDa were observed. Therefore, the high protein content in the grain, the high synthesis of 27 kDa and 16 kDa zeins and the presence of protein bodies enable a better packing of the endosperm components which may be associated with increased hardness of corn grain.

* Guidance committee: Lisete Chamma Davide-UFLA (Adviser), Edilson Paiva - Embrapa Milho e sorgo (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

Os cereais constituem a principal fonte de alimentos para a maioria dos países em desenvolvimento. O milho é o principal cereal cultivado nas regiões tropicais e é consumido, basicamente, como fonte energética. Apesar de possuir teores protéicos relativamente elevados, cerca de 10% da matéria seca do grão, essa proteína é nutricionalmente inadequada para a alimentação de seres humanos e animais monogástricos, devido a sua deficiência em aminoácidos essenciais, especialmente lisina e triptofano (Nelson, 1969).

As mutações descobertas, conhecidas como *opaco* (Mertz et al., 1964) e *floury* (Nelson et al., 1965), mostraram-se capazes de modificar a qualidade protéica dos grãos de milho, promovendo o aumento do teor de lisina e triptofano. Essas mutações, *Opaco-2* e *floury-2*, limitam a síntese de zeínas, que são proteínas pobres em lisina e triptofano, aumentam a síntese de não-zeínas que têm um melhor valor nutricional por apresentarem níveis de lisina e triptofano elevados.

Entretanto, a utilização comercial desses genótipos tem sido limitada por uma série de características agronômicas indesejáveis, tais como redução do nível de proteínas de reserva no endosperma, menor densidade de grãos, maior susceptibilidade ao ataque de pragas e doenças e baixa produtividade (Ortega & Bates, 1983; Toro, 2001; Villegas et al., 1992).

Esse problema foi parcialmente solucionado por meio de melhoramento genético em que, por meio de retrocruzamentos e seleção recorrente, desenvolveram-se genótipos com alta qualidade protéica e textura favorável (Vasal et al., 1980). Esses genótipos foram denominados “Quality Protein Maize” ou QPM. Embora já existam algumas variedades de milho QPM sendo usadas comercialmente, há ainda muitas características nesses genótipos que precisam ser melhoradas, como, por exemplo, a instabilidade fenotípica do grão.

Essas mutações, que causam alterações na síntese das proteínas de reserva, geralmente alteram a estrutura física do endosperma (Mertz et al., 1964; Nelson et al., 1965). A dureza do endosperma do milho é um aspecto de fundamental importância para os produtores e beneficiadores de grãos, pois, é uma característica que está relacionada com densidade, suscetibilidade ao ataque de pragas e doenças, e quebra durante os processos de beneficiamento e armazenamento (Pomeraz et al., 1984). A estrutura física do endosperma é a característica mais limitante na produção de milho de alto valor nutricional (Lopes, 1989). Sabe-se que o endosperma dos grãos de milho contém uma complexa mistura de grãos de amido e corpos protéicos e, segundo Duvick (1961), a estrutura física do endosperma depende do tipo de interação entre estes componentes, tendo as proteínas de armazenamento um papel importante na estrutura física do grão maduro. O conhecimento de fatores bioquímicos e estruturais relacionados com a dureza do grão é importante em programas de melhoramento que visam à obtenção de genótipos com alto valor nutricional e textura favorável.

Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar, bioquímica e estruturalmente, grãos de cultivares de milho contrastantes para qualidade protéica e textura do endosperma e verificar a relação destas características com a dureza do grão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Formação, estrutura e composição do grão de milho

O milho é uma espécie monóica, isto é, possui os dois sexos na mesma planta, separados em inflorescências diferentes. As flores masculinas localizam-se na panícula terminal conhecida como “flecha” ou “pendão” e as femininas em espigas axiliares. A espiga é constituída por um eixo ou ráquis (sabugo), ao longo do qual se desenvolvem centenas de ovários, cada um com um saco embrionário. O milho é uma planta de polinização cruzada, sendo mínimas as taxas de autofecundação (Paterniani & Campos, 1990).

O grão de milho formado é um fruto composto de três partes principais: pericarpo, endosperma e embrião. O pericarpo é a parede celular do gametófito maduro e compreende as camadas celulares externas que envolvem o endosperma e o embrião. Esse tipo de fruto com semente única, em que o pericarpo não se abre na secagem para a liberação da semente, é característico de cereais e denominado de cariopse (Wolf et al., 1952). O endosperma representa cerca de 83% do peso do grão, o embrião, em média, 11% e o pericarpo, 5% (Mittelman, 2001). O endosperma e o embrião resultam da dupla-fertilização (Dumas & Mogesen, 1993). Tipicamente, o endosperma é constituído de 90% de amido e 10% de proteína (Gibbon & Larkins, 2005). Aproximadamente 70% das proteínas do endosperma são constituídas por várias classes de zeínas (Gibbon & Larkins, 2005). Por apresentarem a maior parte do grão maduro, os componentes do endosperma são essenciais na definição das qualidades físicas e estruturais (Guimarães, 1994).

O endosperma é constituído de quatro tipos de células: a região vizinha ao embrião, as células de transferência, o endosperma amiláceo e a camada de aleurona, conforme apresentado na Figura 1 .

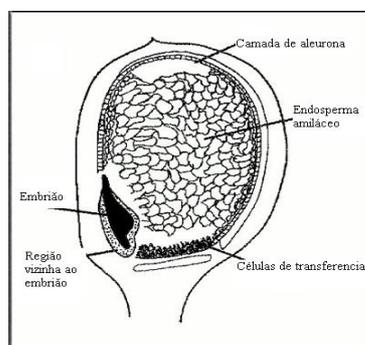


FIGURA 1- Corte longitudinal de um grão de milho mostrando os diferentes tipos de células do endosperma. Fonte: Olsen (2001).

A região vizinha ao embrião é constituída por uma linha de células que se distribuem na cavidade do endosperma, onde o embrião se desenvolve. Essas células são caracterizadas por apresentarem um citoplasma denso (Kowles & Phillips, 1988; Olsen 2001; Schell et al., 1984), com função de nutrir o embrião e formarem uma barreira física entre ele e o endosperma, durante o desenvolvimento da semente (Olsen, 2001).

As células de transferência estão na região basal do endosperma. Elas facilitam o transporte de metabólitos dentro do endosperma e fazem uma conexão direta com o tecido materno (Olsen, 2001). A maior parte da sacarose que chega na base do endosperma a partir das células maternas é clivada em glicose e frutose, que se movimentam, então, para outras partes do endosperma, onde a sacarose é ressintetizada e utilizada (Soave & Salamini, 1984). O amido é sintetizado a partir da sacarose, que é translocada para o endosperma em desenvolvimento. A sacarose é convertida em glicose-1-fosfato, que é incorporada em ADP-glicose e esta é, então, polimerizada em amilose e amilopectina (Soave & Salamini, 1984).

O endosperma amiláceo envolve o embrião e acumula grandes quantidades de substâncias de reserva, que são utilizadas durante a germinação da semente e nas fases iniciais da plântula. Essas reservas são depositadas em estruturas membranosas, no parênquima do endosperma amiláceo (Olsen et al., 1992). Além de amido e proteína, o endosperma acumula lipídeos, compostos orgânicos e inorgânicos em pequenas quantidades (Lopes & Larkins, 1993).

A camada de aleurona circunda todo o endosperma amiláceo, exceto a área adjacente ao embrião e contém um grande número de corpos protéicos pequenos, oleosos e antocianina (Becraft, 2000; Buttrose, 1963; Lopes & Larkins, 1993; Olsen et al., 1992; Olsen, 2001).

A principal fonte de armazenamento de carboidratos no endosperma é o amido, molécula composta de dois polímeros: amilose e amilopectina, que são empacotados como grânulos cristalinos nos amiloplastos (Lopes & Larkins, 1993).

Aproximadamente 10% do peso do grão de milho consistem de proteínas, e as proteínas de reserva constituem a maior porção desse componente. As proteínas de reserva não possuem atividade enzimática, sendo fontes de aminoácidos e energia para o embrião e para a plântula. As proteínas de reserva do grão de milho, ou prolaminas, são também denominadas de zeínas. As sementes acumulam grandes quantidades dessas proteínas de reserva entre 10 e 50 dias após a polinização (Rubenstein & Geraghty, 1989). As proteínas que não possuem função de reserva, denominadas não-zeínas, estão envolvidas em processos biológicos necessários para o desenvolvimento da semente e são proteínas de membranas, enzimas, estruturais, inibidoras de proteases entre outras (Habben et al., 1993).

Após a desidratação da semente, zeínas, não-zeínas e o restante dos componentes celulares formam uma matriz insolúvel, na qual os grânulos de

amido estão imersos. O arrançamento e a constituição desses componentes no grão podem estar relacionados com a textura do mesmo.

2.2 Estrutura, composição e desenvolvimento do endosperma

A origem do endosperma está ligada à dupla fertilização. Nesse processo, um núcleo espermático do grão de pólen funde-se com o óvulo, originando o embrião (2n) e o outro núcleo espermático funde-se com os dois núcleos polares haplóides do saco embrionário, originando o endosperma triploide (3x) (McClintock, 1978; Russel, 1992).

O desenvolvimento do endosperma de milho é caracterizado por grandes alterações no ciclo celular: mitose sem citocinese, alta atividade mitótica e endoreduplicação do DNA nuclear (Bommert & Werr, 2001; Schweizer et al., 1995). Nos estádios iniciais de desenvolvimento do endosperma do milho, as várias divisões nucleares, sem citocinese e sem formação de parede celular, resultam numa célula central multinucleada contendo 128 a 250 núcleos (Olsen et al., 1992). A localização desses núcleos não ocorre ao acaso; ela depende dos planos nos quais as primeiras duas ou três divisões ocorrem (Soave & Salamini, 1984). A citocinese inicia-se na região periférica em direção ao centro da célula multinucleada, até que essa se torne uninucleada (Lopes & Larkins, 1993; McClintock, 1978, Soave & Salamini, 1984).

Durante o desenvolvimento do endosperma, as células centrais aumentam em tamanho e a taxa de desenvolvimento é rápida, observando-se aumento no número e no tamanho das células e no tamanho dos núcleos. Normalmente, aos 12 dias após a polinização (DAP), o endosperma ocupa a cavidade a ele destinada no grão maduro e as células da camada mais externa diferenciam-se em aleurona (Kwoles & Phillips, 1988; McClintock, 1978).

À medida que decresce o índice mitótico, começa um aumento do conteúdo de DNA nuclear das células do endosperma, alcançando um pico maior entre 10 e 14 DAP (Kowles & Phillips, 1988). Este aumento é de 3C até 390C (Lopes & Larkins, 1993). A endorreducação no endosperma leva ao aumento de muitas atividades celulares, o que é evidenciado pelo aumento do peso seco, do conteúdo de proteínas totais, de corpos protéicos e de zeínas (Kowles & Phillips, 1988). Contudo, o significado da endorreducação no endosperma é um fato pouco esclarecido, pois, todo o genoma é duplicado e não somente os genes envolvidos na síntese de proteínas de reserva e carboidratos (DeMason, 1997 citado por Leblanc, 2002 ; Lopes & Larkins, 1993).

Portanto, o endosperma formado é constituído, basicamente, de proteínas e grânulos de amidos. Sugere-se que, de acordo com o arrançamento desses compostos no endosperma, os grãos de milho podem apresentar as características fenotípicas “opaco” e “vítrea”. Esses fenótipos referem-se à passagem de luz na semente madura, podem ser distinguidos a olho nú e estão relacionados com a textura do endosperma, que pode ser farinácea, no fenótipo opaco e dura, no vítreo. Indiretamente, esses fenótipos estão associados a outras características agrônômicas que são muito importantes para o melhoramento genético, como, por exemplo, a dureza, que, basicamente, descreve a resistência da semente a deformações externas e à quebra mecânica durante a colheita e o armazenamento.

2.2.1 Proteínas do endosperma do milho

O grão de milho contém de 8% a 11% de proteína e o endosperma contribui com, aproximadamente, 70% (FAO, 1993; Shewry & Halford, 2002). A qualidade da proteína do milho depende da quantidade e do balanço de aminoácidos essenciais, portanto, a composição de aminoácidos do grão inteiro reflete a composição das proteínas do endosperma, embora as proteínas do

embrião possuem um melhor balanço de aminoácidos (Mittelman, 2001). A qualidade da proteína do milho é semelhante à maioria dos cereais, em geral deficientes em alguns aminoácidos essenciais (Diaz, 2003; FAO, 1993).

As proteínas do endosperma de milho podem ser separadas seqüencialmente, de acordo com a sua solubilidade, em diferentes solventes em quatro frações: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas (Osborne & Mendel, 1914). As albuminas são solúveis em água, as globulinas em soluções salinas e as glutelinas são solúveis em soluções alcalinas. As prolaminas, chamadas de zeínas em milho, são solúveis em álcool e correspondem a, aproximadamente, 52% do nitrogênio dos grãos. As albuminas, globulinas e o nitrogênio não protéico representam, aproximadamente, 18% do nitrogênio total e as glutelinas, 25% (Boyer & Hannah, 2001).

As quatro classes de proteínas do endosperma podem ser divididas nas frações zeínas (prolaminas) e não-zeínas (albuminas, globulinas e glutelinas) que apresentam, respectivamente, baixo e alto teor de lisina e triptofano. A fração não-zeína apresenta funções estruturais, inibidoras de proteases, enzimáticas, proteção da semente contra patógenos e predadores, e biossintética; as frações zeínas apresentam função de reserva (Lopes & Larkins, 1993).

As zeínas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER) e estão localizadas no endosperma do grão de milho na forma de corpos protéicos. Correspondem a, aproximadamente 70%, da proteína total do milho e o padrão de sua síntese é o típico para a maioria dos cereais (Gibbon & Larkins, 2005). O início da síntese ocorre de 8 a 12 dias após a polinização (DAP); sua síntese é máxima entre 16 e 35 DAP e continua até 40 a 45 DAP (Tsai, 1979 a e b).

As zeínas compreendem quatro grupos estruturalmente distintos: alfa, beta, gama e delta-zeínas, que podem ser separadas com base no padrão eletroforético e no peso molecular (Coleman et al., 1996, Leite et al., 1999 citados por Shewry e Halford, 2002). A distribuição das diferentes classes de

zeínas dentro dos corpos protéicos foi sugerida por Lending & Larkins (1989), estudando o endosperma em desenvolvimento. Observou-se que os corpos protéicos apresentam diferentes tamanhos e composição. De modo geral, eles apresentam diâmetro variando entre 1 μm a 2 μm , estando a maioria entre 0,3 μm a 1,3 μm . Nas células mais próximas da aleuroma os corpos protéicos são pequenos e contêm somente beta e gama-zeínas. Eles representam os estágios iniciais do desenvolvimento de um corpo protéico com, aproximadamente, 0,2 μm de diâmetro. Os corpos protéicos maiores contêm alfa-zeínas e são encontrados nas camadas de células mais centrais do endosperma.

As alfas-zeínas começam a se acumular, como lóculos discretos, dentro de uma matriz de gama e beta-zeínas, nos corpos protéicos. Ocasionalmente, os lóculos de alfa-zeínas fundem-se e preenchem o centro do corpo protéico, expandindo este para um diâmetro de 1 μm a 2 μm (Lending & Larkins, 1989). Beta e gama-zeínas formam uma camada mais ou menos contínua na periferia, mas, manchas pequenas de beta e, mais comumente, de gama-zeínas permanecem no interior. As delta-zeínas são encontradas, principalmente, no centro dos corpos protéicos, junto com as alfa-zeínas, o que indica que nem todas as zeínas ricas em enxofre estão na periferia (Esen & Steller, 1992).

Os polipeptídeos das diferentes classes de zeínas variam, em tamanho, de 10 kDa a 27 kDa. As alfa-zeínas possuem pesos moleculares de 19 e 22 kDa, correspondendo a, aproximadamente, 70% da fração total de zeínas e apresentam deficiência em aminoácidos essenciais, como lisina e triptofano, alto teor de glutamina (25%), leucina (20%), alanina (15%) e prolina (11%) (Lopes, 1993; Nelson, 1969; Shotwell & Larkins, 1989).

As beta-zeínas são proteínas de 14kDa e correspondem a, aproximadamente, 15% da fração de zeína. A proteína madura tem 160 aminoácidos e apresenta menos glutamina (16%), leucina (10%) e prolina (9%)

do que as alfas-zeínas, mas, apresenta mais aminoácidos sulfurosos, metionina (11%) e cisteína (4%) (Pedersen et al., 1986).

As gama-zeínas apresentam peso molecular de 16 e 27 kDa, correspondendo a 20% das zeínas totais, podendo chegar até a 50%. Elas apresentam alto teor de aminoácidos sulfurados, sendo 23% de metionina e 4% de cisteína (Esen, 1986; Kirihara et al., 1988; Ortega & Bates, 1993). A zeína de 10 kDa, delta-zeína, é uma proteína pequena que apresenta 130 aminoácidos de comprimento (Kirihara et al, 1988).

2.2.1.1 Teor de lisina e triptofano no grão de milho

As proteínas do grão de milho apresentam deficiência de aminoácidos essenciais, especialmente lisina e triptofano (Nelson, 1969). Foi também detectada a deficiência de treonina e isoleucina, atribuída aos elevados teores de leucina, que prejudicam a sua absorção (Benton et al., 1955, 1956; Zarkadas et al., 1995 citados por Mittelman, 2001).

Os aminoácidos lisina e triptofano, são essenciais para a alimentação de humanos e animais monogástricos, no entanto, para a dieta tornar-se adequada, há necessidade de uma suplementação (Diaz, 2003). Na formulação de rações, é comum o milho ser misturado com farelo de soja, pois este é capaz de compensar as deficiências em lisina e triptofano (Mittelman, 2001).

A lisina é um aminoácido de grande importância no metabolismo do cálcio. Estudos mostraram que humanos e monogástricos, com dieta com níveis adequados de lisina, apresentam um aumento na absorção e assimilação do cálcio (Civitelli et al., 1992 citados, por Diaz, 2003). O cálcio também está envolvido na produção de colágeno, elastina e carnitina (Flodin, 1997, citado por Diaz, 2003).

O triptofano permite uma boa saúde física e mental do ser humano, uma vez que está relacionado com a produção da serotonina, que permite o funcionamento normal do sistema nervoso (Diaz, 2003).

Na década de 1960, foram descobertas mutações capazes de modificar a qualidade protéica dos grãos de milho, aumentando o teor de lisina e triptofano, conhecidas como *opaco* (Mertz et al., 1964) e *floury* (Nelson et al., 1965). Esse aumento foi consequência da reduzida expressão da fração zeína, que é nutricionalmente pobre, e um aumento da fração glutelina, que tem um melhor balanço de aminoácidos. Um aspecto positivo da utilização do gene *opaco-2* é o aumento do teor de lisina e triptofano e, também, a razão leucina/isoleucina (Mertz et al., 1964; Bressani, 1991). A lisina é o primeiro aminoácido limitante no milho e o triptofano o segundo (Diaz, 2003).

Os mutantes para alta lisina afetam adversamente várias características agrônomicas importantes, incluindo características do grão, o que limita seu uso. Estes mutantes apresentam baixo teor de zeínas, endosperma macio e farináceo, baixo acúmulo de matéria seca, refletido em menor produção, peso dos grãos e densidade dos grãos do que um grão normal. Outras características que são observadas nesses mutantes é uma maior susceptibilidade ao ataque de pragas e doenças, contaminação por aflotoxinas, pericarpo mais fino e uma baixa intensidade na coloração amarela (Paiva et al., 1991; Yau et al., 1999). Esses efeitos variam entre os mutantes e limitam a utilização comercial desses genótipos (Ortega & Bates, 1983; Toro, 2001; Vasal, 2001; Villegas et al., 1992).

Esse problema foi parcialmente solucionado por meio de melhoramento genético, onde, por meio de retrocruzamentos e seleção recorrente, desenvolveram-se genótipos com alta qualidade protéica e textura favorável, denominados “Quality Protein Maize” ou QPM (Paiva et al., 1991; Vasal, 2001 citados por Diaz, 2003). O milho normal tem sete vezes mais zeínas que o QPM,

mas, as frações não-zeínas, nos genótipos *Opaco-2*, *floury-2* e QPM, são maiores que no milho normal, o que reflete uma melhor qualidade protéica nesses genótipos (Diaz, 2003). Embora já existam variedades de milho QPM sendo comercializadas, estas ainda apresentam problemas de instabilidade fenotípica do grão.

2.3 Composição e organização do grânulo de amido

O amido é o carboidrato de reserva da maioria dos vegetais superiores, ocorrendo como grânulos insolúveis em água, cujo tamanho e forma variam de acordo com a espécie e a maturidade da planta (Franco, 1993). Essa macromolécula é depositada na forma de grânulos cristalinos em amiloplastos, os quais encontram-se imersos em uma matriz amorfa.

O amido compreende dois homopolímeros de D-glicose: a amilose e a amilopectina. A amilose é uma molécula essencialmente linear, constituída de unidades de D-glicose conectadas por ligações (α - 1,4). A amilopectina é o polímero mais abundante do amido e contém cadeias lineares de vários comprimentos apresentando ramificações. As ligações glicosídicas que unem os resíduos de glicose nas cadeias de amilopectina são (α - 1,4) e os pontos de ramificação (α - 1,6). Ela apresenta um alto grau de organização estrutural, que pode ser exemplificada pela distribuição não casual das cadeias lineares e pelas disposição das ramificações. As regiões ramificadas são alternadas com as regiões livres de ramificações, formando uma estrutura semelhante a uma dupla hélice (James et al., 2003). Esta arquitetura da amilopectina é responsável pela semicristalinidade dos grânulos de amido.

O alto grau de organização da amilopectina confere dois tipos de estrutura cristalina, tipo-A e tipo-B, que diferem de acordo com o grau de empacotamento de suas cadeias (Gallant et al., 1997; Imberty et al., 1991). Em

amido de cereais selvagens, a amilopectina é 100% do tipo A, na qual o arrançamento da dupla hélice é melhor.

A maioria das moléculas de amido de diferentes espécies contém de 15% a 30% de amilose. No milho normal, essa quantidade é de 25% a 30% de amilose e 75% de amilopectina. Contudo, a presença de mutações altera a qualidade e a quantidade de amido no endosperma de milho e, conseqüentemente, afeta a textura do grão (Banks & Greenwood, 1975; Strissel & Stiefel, 2002; Wang, et al., 1993). Em genótipos de milho denominados *ae* (amylose-extender), por exemplo, a maior parte do amido é amilose (50% a 80%); já em certas variedades de milho, sorgo, cevada e arroz, conhecidas como ceroso, o amido é constituído exclusivamente por amilopectina (Franco, 1993; Wang et al., 1993). Além disso, verificou-se que, quando se promove um aumento de 1 % a 2% em proteínas no grão, essa relação passa a ser 50% amilose e 50% amilopectina (Strissel & Stiefel, 2002).

Gibbon et al. (2003), estudando a mudança da textura farinácea do endosperma do mutante *o-2* em QPM, observou que a supressão do fenótipo farináceo no QPM está associada com as propriedades dos grânulos de amido, tendo a estrutura vítrea do QPM grande associação com o tipo de arrançamento das cadeias da amilopectina.

Portanto, a composição química dos grânulos de amido, bem como a organização estrutural de seus componentes, está relacionada com a cristalinidade do grânulo de amido (Gibbon et al., 2003; Gidley & Bocciek, 1985; French, 1984; James et al., 2003; Lineback, 1984) e, conseqüentemente, com a vitreosidade e ou dureza do grão.

2.4 Arrançamento do amido e proteína e a textura do grão de milho

Como mencionado anteriormnte, a textura do grão de milho é um aspecto de fundamental importância para os produtores e beneficiadores de

grãos, pois é uma característica que está relacionada com densidade, suscetibilidade ao ataque de pragas e doenças, digestibilidade e quebra durante os processos de beneficiamento e armazenamento (Correa et al., 2002; Johnson et al., 2002; Pomeranz et al., 1984). Dois termos são comumente utilizados para se referir à textura do grão de milho, vitreosidade e dureza, embora não designem a mesma propriedade. A vitreosidade está relacionada com a aparência do grão, enquanto que a dureza refere-se a uma propriedade física (Shull, 1988).

O endosperma dos grãos de milho contém uma complexa mistura de grãos de amido e corpos protéicos, e, segundo Duvick (1961), sua estrutura física depende do tipo de interação entre estes componentes, tendo as proteínas de armazenamento um papel importante na estrutura física do grão maduro. Variações na estrutura física do grão têm sido associadas a variações no grau de compactação de componentes celulares, à espessura da parede celular, ao tamanho das células do parênquima de reserva do endosperma, à espessura da matriz protéica em contato com os grânulos de amido e à força de adesão entre a matriz protéica e os grânulos de amido (Abdelraman & Hosney, 1984; Kriz, 1987; Simmonds et al., 1973).

Em estudos realizados com trigo, foi observado que a substância cimentante entre os grânulos de amido é constituída por carboidratos e proteínas, sendo que o endosperma duro contém mais proteína de reserva do que o endosperma farináceo e menores espaços intercelulares (Glenn et al., 1991; Simmonds et al., 1973;). Em grãos de sorgo, milho e milheto, as proteínas de reserva são as responsáveis pela ligação entre o amido e as proteínas da matriz do endosperma, influenciando, portanto, a dureza do grão (Dombrink-Kurtzman e Bietz, 1993; Abdelrahman e Hosney, 1984; Hosney, 1987).

A composição e o arranjo das proteínas de reserva do endosperma alteram a sua textura e, conseqüentemente, sua estrutura física (Dombrink-Kurtzman e Bietz, 1993). Estudos mostraram que as regiões de endosperma

duro do grão de milho possuem maior conteúdo de alfa-zeínas e gama-zeínas (Dombrink-Kurtzman e Bietz , 1993; Paiva et al., 1991). Também foi observado que a gama zeína de 27 kDa tem grande participação na formação do endosperma vítreo, uma vez que se observa o aumento dessa zeína nos genótipos QPM (vítreos) comparados aos farináceos Opaco-2 (Wallace et al., 1990). Esse aumento das zeínas nos corpos protéicos leva a um aumento no diâmetro destes, o que, provavelmente, proporciona uma melhor compactação dos grânulos de amido no endosperma do QPM (Dannenhoffer et al., 1995). Foi também observado que grãos de milho de textura farinácea apresentam grânulos de amido maiores e corpos protéicos menores do que nos grãos vítreos (Kriz,1987).

Esse padrão também é observado em sorgo, no qual verificou-se que no endosperma vítreo há maior conteúdo de proteína e os grânulos de amido são menores que os do endosperma farináceo (Cagampang et al., 1985).

Em estudos de microscopia eletrônica com milho constatou-se que os grânulos de amido de endosperma de milho normal duro apresentam um melhor empacotamento e forma poligonal e os de endosperma farináceo têm espaços intergranulares maiores e forma arredondada (Robutti et al., 1974; Wall & Bietz, 1987). Gibbon & Larkins (2005) observaram que, em genótipos de QPM, os grânulos de amido apresentam um perfeito empacotamento com os espaços entre eles perfeitamente preenchidos, enquanto que, no mutante Opaco-2, não se observa esse comportamento.

Considerando a importância da dureza do grão de milho, estudos que busquem esclarecer os fatores que afetam essa característica utilizando genótipos nacionais, são importantes para os programas de melhoramento que visam ao desenvolvimento de cultivares com grãos com alto valor protéico e textura favorável.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condução do experimento

Os experimentos de campo foram conduzidos na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na região sul do estado de Minas Gerais, a 910 metros de altitude, 21^o45'S de latitude e 45^o00'W de longitude. As análises microscópicas e bioquímicas foram realizadas nos Laboratórios de Citogenética, de Microscopia Eletrônica, Tecnologia de Produtos Vegetais e Sementes, sediados nos Departamentos de Biologia, Fitopatologia, Ciências dos Alimentos e Agricultura da Universidade Federal de Lavras e no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo.

3.2 Material utilizado

Foram utilizados materiais genéticos contrastantes para a qualidade protéica e textura do endosperma, oriundos do Banco de Germoplasma do Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo/EMBRAPA, localizado em Sete Lagoas, MG. As cultivares avaliadas foram Cateto L_{237/67}, QPM BR-451, Bolívia-2 e Opaco-2.

A cultivar Cateto é um híbrido simples, de baixo valor protéico (Cateto AL 237-67/ Cateto Col), originado de duas linhagens derivadas da raça cateto que se caracteriza por produzir grãos "Flint" de alta dureza. Cateto AL 237/67 é uma linhagem obtida da variedade Cateto Água Limpa IPEACO/1967. A segunda linhagem Cateto Col. foi obtida da variedade Cateto Colombia IPEACO 1971. As duas linhagens pertencem ao Programa de Melhoramento da EMBRAPA Milho e Sorgo.

A cultivar QPM BR-451 é uma variedade de alta qualidade protéica, de grãos brancos e semi-duros, que contém o gene opaco-2 com modificadores de endosperma e foi lançada em 1990, pelo Programa de Melhoramento da EMBRAPA Milho e Sorgo.

A cultivar Bolívia-2 é uma população de milho indígena do grupo farináceo que apresenta baixa qualidade protéica e a cultivar Opaco-2 é uma população de milho farináceo de alta qualidade protéica. As duas cultivares de endosperma farináceo fazem parte do Banco de Germoplasma da EMBRAPA Milho e Sorgo.

3.3 Características avaliadas nos grãos de milho em desenvolvimento

3.3.1 Área dos grânulos de amido e porcentagem de amido

Foram coletados grãos de milho da região mediana de 5 espigas, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer até a utilização. As coletas foram feitas aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias após a polinização-DAP.

Para a determinação da área granular, foi preparada uma suspensão de amido por meio da maceração de amostras de endosperma, a partir da qual foram montadas lâminas provisórias. A coloração foi feita com o corante lugol (1g de iodo e 3g de iodeto de potássio qsp 300 mL de água destilada). Foram consideradas 3 repetições e analisadas 5 lâminas por repetição, avaliando-se um total de 100 grânulos de amido por repetição. As avaliações foram feitas em fotomicroscópio Olympus BX60 e as imagens obtidas foram capturadas por meio de uma microcâmera Optronics[®] conectada ao fotomicroscópio e transferidas para um microcomputador, utilizando o software Optronics[®]. As medições da área dos grânulos de amido foram realizadas utilizando-se o software Jandel Sigma Scan[®] Pro v. 2,0.

Para a determinação da porcentagem de amido no endosperma em desenvolvimento foi utilizada a metodologia de Smogyi-Nelson, proposta por Nelson (1944). Foram consideradas 4 repetições.

As avaliações de microscopia foram realizadas no Laboratório de Citogenética, localizado no Departamento de Biologia e a determinação da porcentagem de amido no Laboratório de Tecnologia de Produtos Vegetais do Departamento de Biologia e de Ciências dos Alimentos, ambos da Universidade Federal de Lavras.

3.3.2 Arranjo dos grânulos de amido e corpos protéicos no endosperma

Para a avaliação do arranjo dos grânulos de amido e dos corpos protéicos, após a coleta, os grãos de milho foram imediatamente fixados em glutaraldeído 2,5% e formaldeído 4%, preparados em tampão fosfato 50 mM e pH 7,2, conforme metodologia sugerida por Lending & Larkins (1989) e armazenados em geladeira para posterior avaliação.

Na confecção de lâminas destinadas à observação da distribuição dos grânulos de amido e dos corpos protéicos em microscopia de luz, as amostras de endosperma fixadas foram inicialmente desidratadas em uma série cetônica crescente (25%, 50%, 70%, 90% e 100%) permanecendo cerca de 10 minutos em cada concentração. Na concentração de 100%, foram realizadas 3 trocas de 10 minutos cada. Em seguida, realizou-se a infiltração em resina de acordo com a metodologia proposta por Lending & Larkins (1989). Posteriormente, foram realizados cortes transversais em micrótomo com 2 µm de espessura para a avaliação do arranjo dos grânulos de amido e dos corpos protéicos no endosperma. Para visualizar a distribuição dos grânulos de amido no endosperma, os cortes foram corados com fucsina básica 0,05%, preparada em

25mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH =7,0 e contendo 5% de etanol, por 60 segundos. Foram montadas lâminas permanentes com Entellan®.

Para a distinção dos corpos protéicos e grânulos de amido foi utilizada dupla coloração, sendo uma azul (0,13% azul de metileno; 0,02% de azure II; 10% de glicerol; 10% de álcool metílico preparados em água destilada) e outra arroxeadada (solução aquosa de fucsina básica 0,05%). Os cortes foram corados por 60 segundos com o corante azul. Em seguida, foi adicionada uma gota de hidróxido de sódio 1% por 10 segundos, as lâminas foram lavadas e adicionou-se uma gota de fucsina básica 0,05%, por 60 segundos. Após a coloração, as lâminas foram montadas em resina e avaliadas em microscopia de luz.

As imagens obtidas nessas avaliações foram capturadas por meio de uma microcâmera Optronics® conectada ao fotomicroscópio Olympus BX60 e transferidas para um microcomputador, utilizando-se o software Optronics® ou fotografadas na objetiva de 40X.

Para a avaliação do arranjo e formato dos grânulos de amido no endosperma utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), os grãos de milho foram coletados e fixados como citado anteriormente. Para o arranjo dos grânulos de amido no endosperma, após a fixação, o endosperma foi pós-fixado por 2 horas em tetróxido de ósmio 2% , desidratado em uma série de acetona (10%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, esta última por três vezes) e, em seguida, levadas ao aparelho de ponto crítico (BAL-TEC CPD 030). Posteriormente, as amostras foram fixados em suportes de alumínio (*stubs*), por meio de uma fita de carbono dupla face e submetido a uma cobertura com ouro (evaporador de ouro BAL- TEC SCD 050).

Para a avaliação do formato dos grânulos de amido foram preparadas suspensões alcoólicas de amido. Em seguida, colocou-se uma gota sobre *stubs*, procedeu-se secagem ao ponto crítico e, posteriormente, fez-se a cobertura com ouro. As amostras foram, então, avaliadas em microscópio eletrônico de

varredura (LEO Evo 40 XVP) e as imagens foram registradas em microcomputador. As atividades citadas nesse item foram realizadas no Laboratório Citogenética do Departamento de Biologia e no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

3.3.3 Análise estatística

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado no esquema de parcela subdividida no tempo, com o número de repetições variando de acordo com a característica avaliada. Nas parcelas avaliou-se o efeito das 4 cultivares (Bolívia-2, Cateto L_{237/67}, Opaco-2 e QPM BR451) e, nas subparcelas, o efeito de épocas de desenvolvimento do endosperma (10, 20, 30, 40, 50 e 60 DAP). As características avaliadas foram área do grânulo de amido (μm^2) e porcentagem de amido no grão (%). As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SISVAR, desenvolvido por Ferreira (2000).

3.4 Características avaliadas nos grãos de milho maduro

3.4.1 Densidade do grão

A densidade dos grãos maduros foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Kniep & Mason (1989), que consiste em colocar uma amostra de 50 grãos de milho em uma proveta de 50 mL e completar o volume com álcool etílico, registrando-se o peso antes e após a complementação do volume. Foram consideradas 5 repetições.

No cálculo da densidade dos grãos, foi utilizada a seguinte equação:

$$D = (m_1) / [50 - (m_2 - m_1) / d_{\text{álcool}}]$$

em que:

D= densidade da amostra

m1= peso dos grãos de milho na proveta de 50 mL

m2= peso dos grãos de milho na proveta de 50 mL + álcool

dálcool= densidade do álcool

3.4.2 Porcentagem de proteína

A análise da porcentagem de proteína foi realizada pelo método Kjeldahl, proposto pela Associação Oficial de Análise Química (AOAC, 1990). Este método consiste de três etapas: digestão, na qual o nitrogênio é transformado em amônia; destilação, em que a amônia é separada e recolhida em solução receptora; e titulação, que corresponde à determinação quantitativa da amônia contida na solução receptora.

3.4.3 Teor de lisina e triptofano no grão

A determinação de triptofano e lisina foi realizada de acordo com o método colorimétrico para análise rápida de triptofano, descrito por Opienska-Blsauth et al. (1963) e modificado por Hernandez & Bates (1969). Para estas avaliações, pesaram-se 80mg de amostra triturada em moinho, que foram transferidas para tubos de hidrólise, no qual adicionaram-se 4,0mL de solução de 0,1M de acetato de sódio pH 7,0 + papaína (4mg de papaína/mL de acetato de sódio) e procedeu-se a homogeneização em vortex. A mistura foi incubada a $63^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16 h, homogeneizando em vortex de 30' em 30' (de 3 a 4X). Após este período, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugada a 2.500 rpm, por 5 minutos. Pipetou-se 1 mL do hidrolisado para tubo de ensaio e adicionou-se 4mL do Reagente C, que consiste de uma mistura volume por volume do Reagente A (270mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 500 μL de H_2O /1.000 mL de ácido acético glacial) + Reagente B (ácido sulfúrico 30N). Esta mistura foi homogeneizada vigorosamente em vortex e incubada a $63^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 15 minutos, para o desenvolvimento da coloração. A mistura foi

resfriada à temperatura ambiente e procedeu-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 560nm, sendo o aparelho primeiramente calibrado com uma solução (branco) que continha todos os reagentes exceto a amostra. Foram consideradas 4 repetições. O conteúdo de triptofano (TRY) e lisina (LYS) foi calculado a partir das seguintes fórmulas:

$$\text{TRY} = \frac{(50,00 \times \text{Abs.}) - 0,018}{\% \text{ de proteína}}$$

$$\text{LYS} = 0,3601 + (4,075 \times \text{TRY})$$

3.4.4 Análise estatística

Para todas as características avaliadas no grão maduro, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições para densidade e 4 repetições para as demais características. As análises de variância foram feitas utilizando-se o programa estatístico SISVAR, desenvolvido por Ferreira (2000). Para as correlações entre as características densidade com teor de proteína, lisina, triptofano, tamanho e porcentagem de amido, utilizou-se o programa GENE (Cruz, 1997).

3.4.5 Padrão eletroforético das proteínas do grão

A análise eletroforética das proteínas do grão maduro foi feita por meio de extrações das proteínas totais, zeínas e não zeínas, semelhante à metodologia utilizada por Coelho (1997), com modificações.

3.4.5.1 Obtenção da proteína total

Para a extração da proteína total adicionou-se 1 mL de tampão borato (12,5 mM borato de sódio, pH=10,0, 1% de SDS e 2% de 2-βMercaptoetanol) a 50 mg do endosperma moído. Em seguida, homogeneizou-se em vortex para

ressuspender o tecido e a mistura foi vigorosamente agitada de um dia para o outro, à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 15 minutos e o sobrenadante contendo as proteínas totais solubilizadas foi transferido para outro microtubo para posterior utilização. Para a aplicação no gel, foram utilizados 50 µL do sobrenadante e 40 µL de tampão da amostra (62,5 mM de TRIS, pH=6,8; 2% de SDS; 10% de glicerol; 5% de 2-βmercaptoetanol; 0,5% de azul de bromofenol). Esta mistura foi fervida antes de ser aplicada em gel de poliacrilamida. A corrida foi feita em cuba vertical, com tampão de corrida contendo Tris-glicina + SDS pH=8,9, sob voltagem de 150v por 4 horas. A coloração foi feita com Coumassie Brilliant Blue a 0,05% por 12 horas e a descoloração, para a visualização das proteínas, com uma solução contendo 5% de etanol e 10% de ácido acético.

3.4.5.2 Obtenção das frações zeínas e não-zeínas

Para a obtenção das zeínas e não-zeínas, foram pipetados 300 µL do sobrenadante (proteína total) obtido no item anterior, adicionando-se 700 µL de etanol. Essa mistura foi homogeneizada em vortex e incubada a 37 °C, por 1 hora. Após este período, foi feita centrifugação dessas amostras a 14.000rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a análise das zeínas e o pellet foi utilizado para a análise das não zeínas.

Para a análise das zeínas, foram pipetados 200 µL do sobrenadante em microtubo, no qual adicionaram-se 1.200 µL de acetona, a -20 °C. A mistura foi incubada em gelo, por 30 minutos. Posteriormente, foi feita uma centrifugação a 14.000 rpm, por 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e secou-se o pellet (por inversão). O pellet foi ressuspensionado em 50 µL de tampão da amostra e fervido por 5 minutos para a solubilização das proteínas. Aplicou-se o equivalente a 3 mg do endosperma (33 µL da amostra) em gel de poliacrilamida com gradiente de 7,5% a 18% e a corrida conforme citado anteriormente.

Para a análise das não-zeínas o pellet foi ressuspenso em 50 µL de tampão da amostra (62,5 mM de TRIS, pH=6,8; 2,0% de SDS; 10% de glicerol; 5% de 2-β mercaptoetanol 5%; 0,5% de azul de bromofenol) e fervido por 5 minutos, para solubilização das proteínas. Foi aplicado o equivalente a 7 mg do endosperma (25 µL da amostra) em gel gradiente de 7,5% a 18%.

As atividades citadas no item 3.4 foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo, localizado em Sete Lagoas, MG e no Laboratório de Eletroforese, do Setor de Sementes, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

4 RESULTADOS

4.1.1 Área dos grânulos de amido e porcentagem de amido

Os dados sobre a área do grânulo de amido e a porcentagem de amido foram submetidos a análises de variância, procurando-se verificar o efeito das diferentes cultivares (C), dos diferentes estádios de desenvolvimento (E) e da interação entre cultivares e estádios de desenvolvimento (CxE). Constataram-se diferenças significativas entre cultivares, estádios de desenvolvimento e da interação CxE ($P \leq 0,01$), conforme se observa na Tabela 1. Nestas avaliações, foram obtidos valores baixos para o coeficiente de variação (CV=15,66 e 12,66 e 8,26 e 8,13), indicando boa precisão experimental.

TABELA 1 Resumo da análise de variância das características área do grânulo de amido (μm^2) e porcentagem de amido do endosperma de milho, em diferentes estágios de desenvolvimento (10, 20, 30, 40, 50 e 60 DAP), para as quatro cultivares avaliadas. UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

FV	Área (μm^2)		% amido	
	GL	QM	GL	QM
Cultivar (C)	3	75,34**	3	2315,59**
Erro1	8	3,17	12	12,83
Época (E)	5	194,49**	5	8732,06**
C*É	15	5,28**	15	243,60**
Erro2	40	1,94	60	12,37
CV1 (%)	15,66		8,27	
CV2 (%)	12,66		8,13	
Média geral	11,37		43,29	

** significativo a 1% de probabilidade, pelo Teste F.

Os resultados médios de todos os estádios de desenvolvimento para a característica área do grânulo de amido, apresentados na Tabela 2, mostraram que a cultivar Cateto L_{237/67}, de endosperma duro, apresenta a área do grânulo de amido estatisticamente superior a das demais cultivares. As cultivares Opaco-2 e QPM BR451, por sua vez, apresentaram os menores valores de área, não diferindo estatisticamente entre si. Contudo, é interessante verificar o comportamento das diferentes cultivares em cada estágio de desenvolvimento. Com 10 DAP e 60 DAP, a cultivar Cateto L_{237/67} foi a que apresentou maior área dos grânulos de amido, mas, aos 30, 40 e 50 DAP, os valores obtidos não diferenciaram estatisticamente da cultivar Bolívia-2. Aos 20 DAP, a maior área do grânulo de amido foi observada na cultivar Bolívia-2 e as demais cultivares tiveram a menor área, não diferindo estatisticamente entre si. É importante ressaltar que, nessa cultivar, o aumento da área do grânulo de amido foi bem pronunciado na passagem do estágio de 10 DAP para o de 20 DAP, sendo esse aumento de aproximadamente 3,29 vezes. Nos estádios de 30 a 50 DAP, foram formadas duas classes distintas, as cultivares Bolívia-2 e Cateto L_{237/67}, com as maiores áreas dos grânulos de amido e as cultivares Opaco-2 e QPM BR451 com os menores valores da área. Aos 60 DAP, a cultivar Cateto L_{237/67} foi a que apresentou a maior área do grânulo de amido, seguida da cultivar Bolívia-2 e as cultivares Opaco-2 e QPM BR451 tiveram o mesmo comportamento, com menor área.

De acordo com os resultados obtidos na análise de variância da área do grânulo de amido, foi feita a análise de regressão para cada cultivar. Para todas as cultivares, adotou-se o modelo linear, uma vez que esse explicou, em todos os casos, mais de 80% da variação (Figura 2).

TABELA 2 Valores médios da área dos grânulos de amido (μm^2) das cultivares de milho Bolívia -2, Cateto L_{237/67}, Opaco-2 e QPM BR 451, em diferentes estágios de desenvolvimento do endosperma (10, 20, 30, 40, 50 e 60 DAP). UFLA, LAVRAS, MG, 2006

Cultivares	Dias após a polinização (DAP)						
	10	20	30	40	50	60	Média
Bolívia -2	3,46 b	11,39 a	11,82 a	14,80 a	14,17 a	16,91 b	12,09 b
Cateto L _{237/67}	6,76 a	9,30 b	13,44 a	16,89 a	16,44 a	20,77 a	13,94 a
Opaco-2	4,34 b	8,67 b	10,60 b	10,72 b	11,60 b	13,53 c	9,91 c
QPM Br 451	3,81 b	7,71 b	9,90 b	11,60 b	11,12 b	13,14 c	9,55 c

*Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

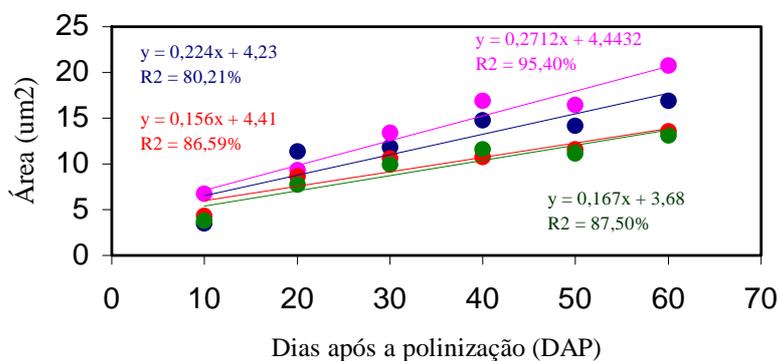


FIGURA 2 Modelos de regressão para a área do grânulo de amido (μm^2) das cultivares Bolívia-2 (●), Cateto L_{237/67} (●), Opaco-2 (●) e QPM BR 451 (●), em diferentes estágios de desenvolvimento do endosperma (10, 20, 30, 40, 50 e 60 DAP). UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

De acordo com esse modelo, o aumento da área do grânulo de amido ao longo do desenvolvimento foi maior na cultivar Cateto L_{237/67} e Bolívia-2. A cada 10 dias após a polinização houve um aumento na área do grânulo de amido de aproximadamente 2,71 μm^2 na cultivar Cateto L_{237/67} e de 2,24 μm^2 na cultivar Bolívia-2. Nas cultivares Opaco-2 e QPM BR 451, o aumento da área do grânulo de amido, ao longo do desenvolvimento, foi menor, 1,56 μm^2 e 1,67 μm^2 , respectivamente.

Com relação à porcentagem de amido, também avaliou-se o comportamento das cultivares em cada estágio de desenvolvimento (Tabela 3) e de cada cultivar ao longo dos estágios de desenvolvimento do grão de milho (Figura 3).

Observando-se os dados médios da porcentagem de amido apresentados na Tabela 3, verifica-se que, aos 10 DAP, as cultivares Cateto L_{237/67} e QPM BR 451, de endosperma duro, foram as que apresentaram as maiores porcentagens de amido e as cultivares de endosperma farináceo, Bolívia-2 e Opaco-2, apresentaram as menores porcentagens, não diferindo estatisticamente entre si. Do segundo estágio de desenvolvimento (20 DAP) até o último estágio, a cultivar Bolívia-2 foi a que apresentou maior porcentagem de amido, seguida da cultivar Cateto L_{237/67}. As cultivares Opaco-2 e QPM BR451 foram as que apresentaram as menores porcentagem de amido no segundo e terceiro estágios de desenvolvimento do grão. Nos estágios finais de desenvolvimento (40, 50 e 60 DAP), a menor porcentagem de amido foi observada na cultivar QPM BR 451.

TABELA 3 Valores médios da porcentagem de amido das cultivares de milho Bolívia -2, Cateto L_{237/67}, Opaco-2 e QPM BR-451, em diferentes estágios de desenvolvimento do endosperma (10, 20, 30, 40, 50 e 60 DAP). Dados médios obtidos de quatro repetições. UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

Cultivares	Dias após a polinização (DAP)						Média
	10	20	30	40	50	60	
Bolívia -2	6,95 b	33,96 a	58,13 a	67,81 a	68,77 a	92,24 a	54,64 a
Cateto L _{237/67}	13,02 a	24,80 b	48,48 b	58,61 b	62,59 b	77,27 b	47,46 b
Opaco-2	8,35 b	20,74 c	35,58 c	42,73 c	52,75 c	73,47 c	38,94 c
QPM BR-451	11,42 a	21,18 c	32,64 c	33,96 d	37,49 d	65,03 d	33,62 d

*Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott (P≤0,05).

Quando foi avaliado o comportamento da porcentagem de amido de cada cultivar ao longo do desenvolvimento, por meio da análise de regressão, adotou-se o modelo de regressão linear para todas as cultivares avaliadas (Figura 3).

A cultivar Bolívia-2 foi a que apresentou maior porcentagem de amido no grão e também um maior aumento da porcentagem de amido ao longo do desenvolvimento do grão (Figura 3). Nessa cultivar, a cada 10 dias após a polinização, houve um aumento de aproximadamente 15,4% na porcentagem de amido. Já na cultivar Cateto L_{237/67}, esse aumento foi de 12,7%. Nas cultivares Opaco-2 e QPM BR 451, esse aumento foi de, aproximadamente, 12,2 % e de 9,10 %, respectivamente.

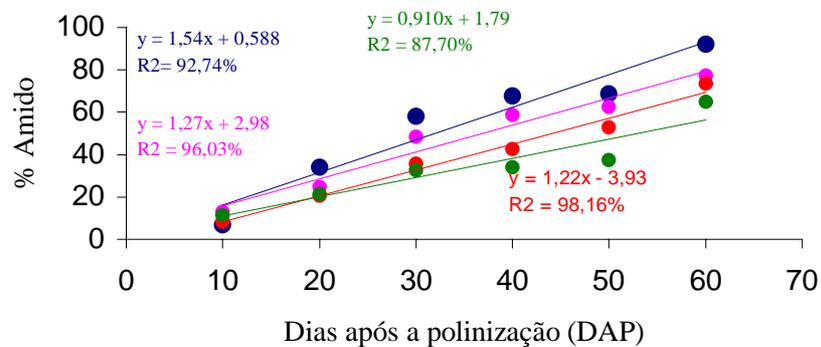


FIGURA 3 Modelos de regressão para o porcentagem de amido (%) das cultivares Bolívia-2 (●), Cateto L_{237/67} (●), Opaco-2 (●) e QPM BR 451 (●) em diferentes estágios de desenvolvimento do endospermas (10, 20, 30, 40, 50 e 60 DAP). UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

4.1.2 Arranjo dos grânulos de amido e corpos protéicos no endosperma

As morfologia e época de empacotamento dos grânulos de amido das cultivares de milho avaliadas em microscopia de luz estão apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4 Morfologia e estágio de empacotamento dos grânulos de amido dos endospermas das cultivares Bolívia-II, Cateto, Opaco-2 e QPM, nos diferentes estágios de desenvolvimento dos grãos de milho. UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

Cultivar	Formato do grânulo de amido	Empacotamento	Organização
Cateto L_{237/67}	poligonal	A partir dos 30 DAP	Presente
QPM BR-451	poligonal	A partir dos 30 DAP	Presente
Opaco-2	arredondados	Ausente	Ausente
Bolívia-II	irregular	A partir dos 20 DAP	Ausente

No endosperma farináceo, dependendo da cultivar e do estágio de desenvolvimento do grão de milho, os grânulos de amido podem permanecer individualizados, com grandes espaços vazios entre si (Opaco-2) ou, ainda, sofrer um empacotamento (Bolívia-2), no qual esses grânulos se encontram aderidos uns aos outros, ocupando todo o espaço do endosperma.

Nas cultivares de endosperma duro, Cateto L_{237/67} e QPM BR-451, o empacotamento ocorreu com perfeito encaixe dos grânulos de amido, o qual iniciou-se a partir dos 30 dias após a polinização (Figura 4E e Figura 4K), permanecendo assim até o estágio final de desenvolvimento do grão (Figura 4F e Figura 4L). Já na cultivar Bolívia-II, o empacotamento também ocorreu e teve início aos 20 DAP, e os grânulos de amido encontravam-se arranjados no endosperma de forma desorganizada (Figura 4B e Figura 4C).

Ao contrário do que foi observado nas demais cultivares, na Opaco-2, durante todo o desenvolvimento do grão, observaram-se grandes espaços vazios entre os grânulos de amido (Figura 4G, H e I), os quais tinham formato mais arredondado, e as células que os acumulam, de aspecto mais frouxo.

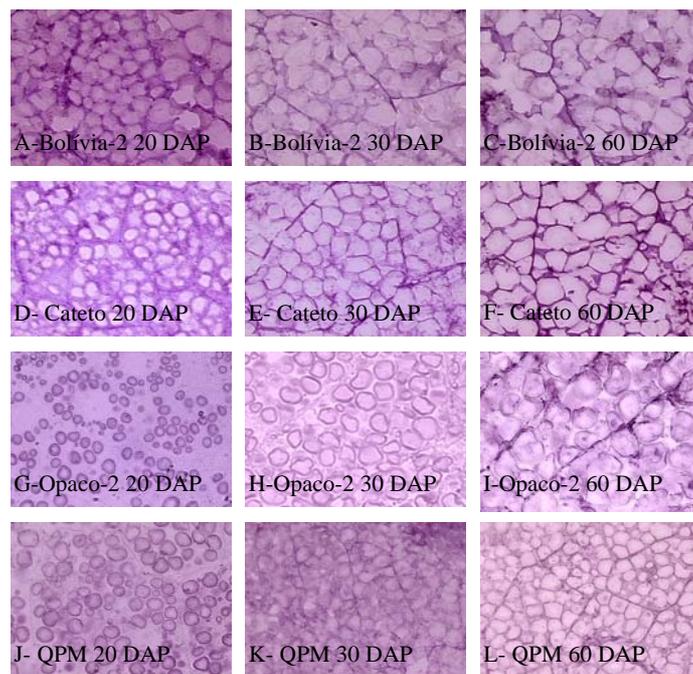


FIGURA 4 Microscopia de luz mostrando o arranjo dos grânulos de amido no endosperma em desenvolvimento. UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

Com relação aos corpos protéicos no endosperma em desenvolvimento, observou-se, que aos 10 DAP, em todas as cultivares, há deposição dos mesmos na aleurona. Contudo, a partir do segundo estágio de desenvolvimento observaram-se corpos protéicos no endosperma. Na cultivar Cateto $L_{237/67}$, esses foram abundantes e organizados (Figura 5). Nas cultivares Bolívia-2 e Opaco-2, eles não foram visualizados de forma organizada, como na cultivar Cateto $L_{237/67}$,

mas, a intensa coloração indicou a sua presença. Já na cultivar QPM BR-451, os corpos protéicos são organizados como na cultivar Cateto L_{237/67} mas, são menores e menos abundantes (Figura 5).

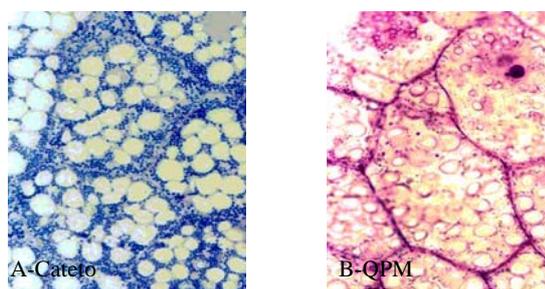


FIGURA 5 Microscopia de luz mostrando o arranjo dos corpos protéicos no endosperma em desenvolvimento das cultivares de endosperma duro Cateto (A) e semi-duro QPM BR 451 (B). UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

Sob microscopia eletrônica de varredura, o formato dos grânulos de amido das cultivares de endosperma duro, Cateto L_{237/67} e QPM BR 451, apresentou formas poligonais (Figura 6 B e D), enquanto nas cultivares de endosperma farináceo, Bolívia-2 e Opaco-2, as formas foram mais arredondadas (Figura 6 A e 6 C).

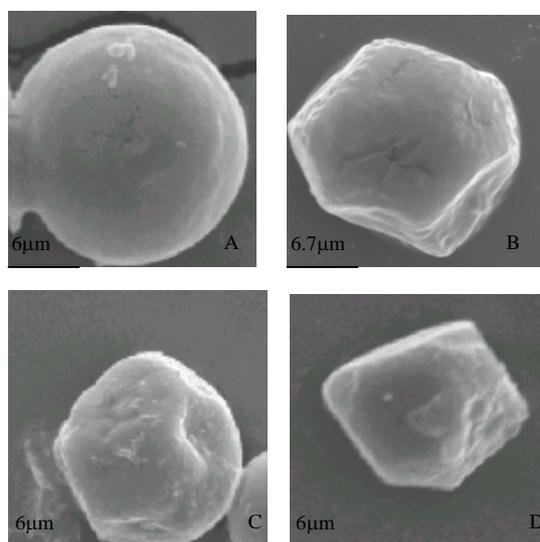


FIGURA 6 Microscopia eletrônica mostrando o formato dos grânulos de amido das cultivares Bolívia-2 (A), Cateto_{L237/67}(B) , Opaco-2 (C) e QPM BR 451 (D). UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

Quando se observa o arrançamento dos grânulos de amido em microscopia eletrônica de varredura, nota-se que o comportamento é semelhante ao observado nas avaliações feitas em microscopia de luz. Na cultivar Bolívia-2, aos 20 DAP, observa-se uma grande quantidade de grânulos de amido, o que permite o empacotamento dos mesmos a partir deste estágio (Figura 7). Nas cultivares Cateto _{L237/67} e QPM BR 451, o início do empacotamento é observado aos 30 DAP, permanecendo até o estágio final. Contudo, percebe-se que, na cultivar QPM BR 451, este empacotamento não é tão perfeito como na cultivar Cateto _{L237/67}. A cultivar Opaco-2 não apresenta organização dos grânulos de amido no endosperma (Figura 7). É ainda importante comentar que as células no endosperma duro apresentam, desde o início do desenvolvimento, parede celular

com aspecto mais firme, permitindo um perfeito empacotamento dos grânulos de amido (Figura 8).

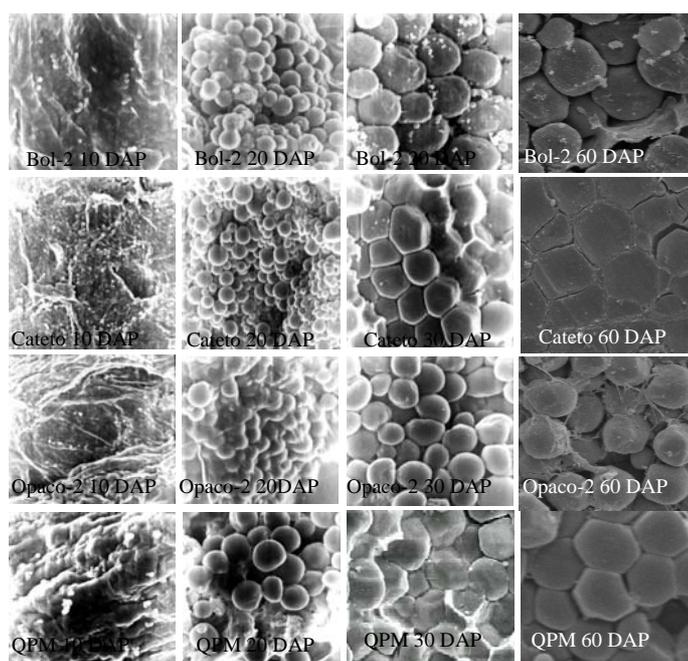


FIGURA 7 Microscopia eletrônica de varredura, mostrando o arranjo dos grânulos de amido Bolívia-2, Cateto L_{237/67}, Opaco-2 e QPM BR 451 aos 10, 20, 30 e 60 DAP. UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

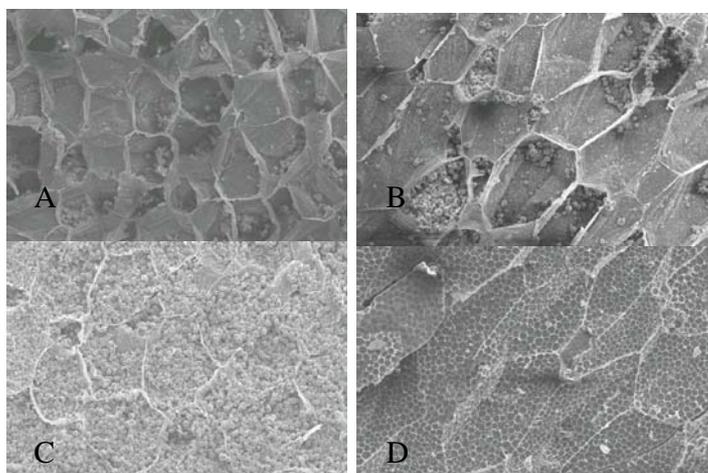


FIGURA 8 Microscopia eletrônica mostrando o aspecto das células em endosperma farináceo (A e B) e duro (C e D), no início (A e C) e final (B e D) do desenvolvimento do grão. UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

4.2 Padrão eletroforético das proteínas do grão de milho

O padrão eletroforético das proteínas totais, zeínas e não-zeínas está apresentado na Figura 9 A, 9 B e 9 C. O padrão de bandas das proteínas totais, bem como das não-zeínas, foi distinto entre as diferentes cultivares (Figura 9 A e 9 B). Observa-se também que a quantidade das proteínas totais e não variou entre as cultivares, mas, isso não é possível de ser quantificado em géis de SDS.

Quando se observa o padrão de bandas das zeínas (Figura 9 C), verifica-se que as cultivares Bolívia-2 e CatetoL_{237/67}, que apresentam endosperma farináceo e duro, respectivamente, e apresentam baixo qualidade protéica, possuem as zeínas de 27kDa, 22 kDa, 19 kDa, 16Da, 14kDa e 10kDa, e essas, como já comentado anteriormente, apresentam baixo qualidade protéica.

Contudo, observa-se que as zeínas de 16 e 27 kDa apresenta uma maior síntese nas cultivares de endosperma duro e semi-duro.

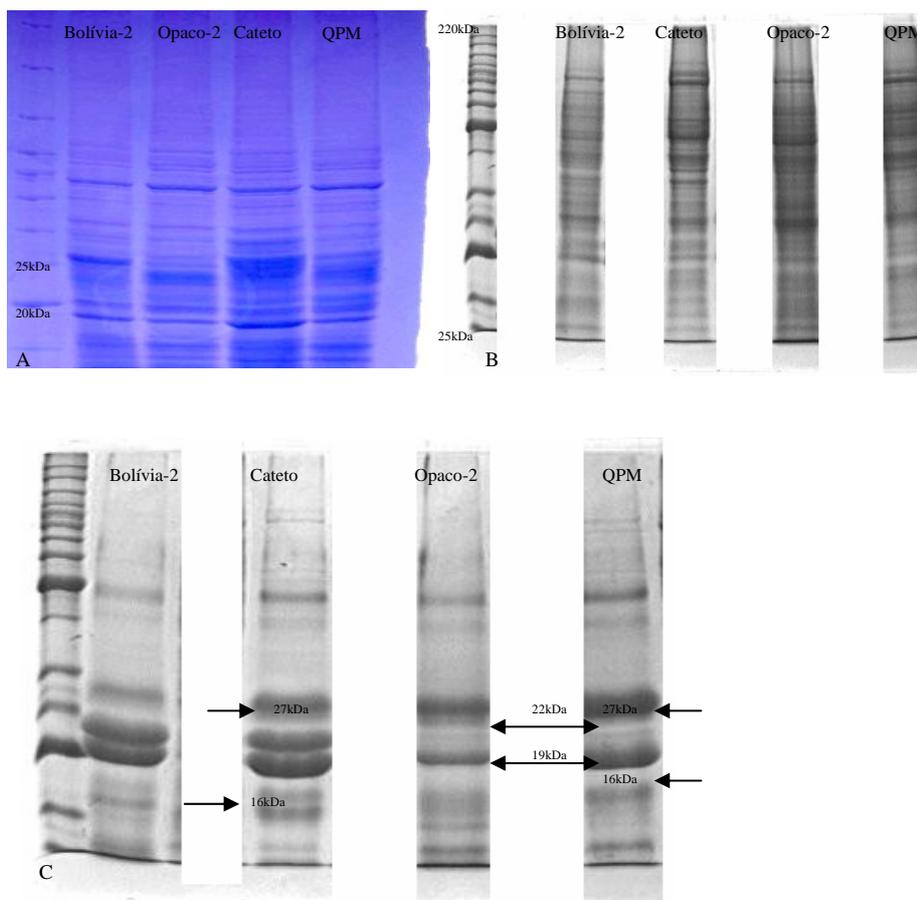


FIGURA 9 Padrão eletroforético das proteínas totais (A), não-zeínas (B) e zeínas (C) para as cultivares Bolívia-2, Cateto $L_{237/67}$, Opaco-2 e QPM BR 451, em gel de poliacrilamida com SDS. UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

Observando-se o padrão de bandas obtido nas cultivares Opaco-2 e QPM BR 451, pode-se inferir que a alta qualidade protéica dessas cultivares está relacionada com a paralisação na síntese de zeína de 22 kDa e uma diminuição drástica na síntese da zeína de 19 kDa (Figura 9C). Também existe variação nas quantidades totais de zeínas (Figura 9 C).

4.3 Densidade, porcentagem de proteína total, triptofano e lisina no grão de milho

O resumo da análise de variância encontra-se na Tabela 5. Nos grãos de milho maduros, avaliaram-se a densidade do grão, as porcentagens de proteína, lisina e triptofano, além das características discutidas no item anterior 4.1. Observaram-se diferenças significativas ($P \leq 0.01$) para todas as características avaliadas.

Os valores médios para todas as características avaliadas são apresentados na Tabela 6. As maiores médias para a densidade dos grãos foram encontradas para as cultivares Cateto L_{237/67} e QPM BR-45, sendo de 1,32 e 1,19 g/ml, respectivamente, e os menores valores para as cultivares de endosperma farináceo (Tabela 6).

TABELA 5 Resumo da análise de variância para as características densidade (D), porcentagem de proteína (PT), conteúdo de triptofano (TRP) e lisina (LIS) no grãos de milhos das cultivares avaliadas. UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

FV	GL		D	PT	QM	
	Densidade	PT/TR/LIS			TRP	LIS
Cultivar	3	3	0.074**	10.096**	0.178*	2.931**
Erro	16	12				
CV(%)			3.78	2.20	4.46	3.90
Média Geral			1.161	9.76	0.621	2.89

** significativo , a 1% de probabilidade, de acordo com teste F.

TABELA 6 Valores médios para características densidade (D), porcentagem de proteína (PT), conteúdo de triptofano (TRP) e lisina (LIS) nos grãos de milhos das cultivares avaliadas. UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

Cultivar	Densidade	PT	TRP	LIS
Bolívia-2	1,07 c	9,31 c	0,52 c	2,49 c
Cateto L _{237/67}	1,32 a	11,75 a	0,38 d	1,91 d
Opaco-2	1,06 c	7,94 d	0,85 a	3,83 a
QPM BR 451	1,19 b	10,06 b	0,73 b	3,34 b

* Médias, na coluna, seguidas de letras distintas diferem estatisticamente, pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$)

Com relação à porcentagem de proteína no grão de milho, as cultivares que apresentam endosperma duro, Cateto L_{237/67} e QPM BR 451, e com baixo e alto valor protéico, respectivamente, foram as que apresentaram as maiores quantidade de proteína no grão. É importante comentar que a cultivar Opaco-2, que apresenta alto valor protéico, foi a cultivar com menor porcentagem de proteína total (Tabela 6). Contudo, quando se analisa o conteúdo de lisina e triptofano, para essa cultivar foram observados os maiores valores; já para a cultivar Cateto L_{237/67}, foram verificados os menores valores.

Na Tabela 7 são apresentados os valores da correlação genética e fenotípica entre a densidade do grão de milho e as características tamanho e porcentagem de amido, teor de proteína, lisina e triptofano. Observa-se uma correlação alta e positiva entre a densidade do grão de milho com o teor de proteína total ($r_{G=0,9545}$) e também com o tamanho do grânulo de amido ($r_{G=0,7031}$). As demais características correlacionadas com a densidade apresentaram valores menores e negativos (Tabela 7). Observou-se também um padrão semelhante de resultado para a correlação fenotípica, indicando que essas características são pouco influenciadas pelo ambiente.

TABELA 7 Valores da correlação genética e fenotípica entre a densidade dos grãos de milho com as características porcentagem de proteína (PT), conteúdo de triptofano (TRP) e lisina (LIS), no grãos de milhos da cultivares avaliadas. UFLA, LAVRAS, MG, 2006.

Característica correlacionada com a densidade do grão	r_F	r_G
Teor de proteína total	0,9385	0.9545
Teor de lisina	-0,6028	-0.616
Teor triptofano	-0,6058	-0.619
Porcentagem de amido	-0,3661	-0.378
Área do grânulo de amido	0,6835	0.7031

5 DISCUSSÃO

O grão de milho, conforme comentado, é composto, basicamente, de proteína e amido, portanto, a quantidade e o arranjo desses componentes no endosperma, assim como a espessura da parede celular, da camada de proteínas entre os grânulos de amido, a presença de espaços intercelulares e o grau de compactação desses componentes estão associados com a dureza do grão de milho (Abdelraman & Hosene, 1984; Dombrink-Kurtzman & Bietz, 1993; Hosene, 1987; Kriz, 1987; Simmonds et al., 1973). No presente trabalho, as cultivares de endosperma duro e semi-duro, Cateto L_{237/67} e QPM BR451, foram as que apresentaram os maiores valores de densidade. Essas cultivares apresentaram também um melhor empacotamento dos grânulos de amido, parede celular com aspecto mais firme e os grânulos de amido com formato poligonal.

Esse comportamento é semelhante ao observado em diversos trabalhos, nos quais endospermas de grãos de milho normais duros apresentam alto grau de compactação dos grânulos de amido e corpos protéicos e ausência de espaços intergranulares, o que poderia explicar uma maior densidade encontrada nesses materiais (Gibbon & Larkins, 2005; Robutti et al., 1974; Wall & Bietz, 1987).

Considerando-se as informações acima, neste trabalho, procurou-se associar características dos grânulos de amido e corpos protéicos com o grau de empacotamento destes componentes no endosperma e com a dureza do grão de milho. Acreditava-se que o endosperma de grãos de milho duro e semi-duro apresentasse maior quantidade e menor tamanho dos grânulos de amido, o que permitiria um melhor empacotamento e maior resistência física do grão. Na literatura há relatos de que os grânulos de amido de milho e sorgo, com endosperma farináceo, são maiores que os de endosperma vítreo, e os corpos

proteicos são menores e raros (Cagampang et al., 1985; Kriz,1987). Contudo, no presente trabalho, o padrão esperado não foi obtido, pois, a cultivar de endosperma duro, Cateto L 237/67, foi a que apresentou maior área, seguida da cultivar de endosperma farináceo Bolívia-2. Essas duas cultivares foram as que apresentaram também as maiores porcentagens de amido. É válido ressaltar que a alta porcentagem de amido e o tamanho dos grânulos de amido na cultivar Bolívia-2 permitiram um certo grau de empacotamento destes componentes no grão de milho. Contudo, é importante ressaltar que este empacotamento não foi perfeito, como o observado nas cultivares de endosperma duro e semi-duro, devido, provavelmente, ao formato dos grânulos de amido, à presença de raros e pequenos corpos protéicos e a parede celular irregular que promoveram espaços entre os componentes do endosperma desta cultivar e, conseqüentemente, um empacotamento mais frouxo e menor densidade do grão.

As cultivares de endosperma farináceo Opaco-2 e a de endosperma semi-duro QPM BR 451, que apresentam alto valor protéico, apresentaram as menores porcentagem de amido e de tamanho grânulo de amido. Contudo, na cultivar QPM BR 451, houve um empacotamento dos grânulos de amido e observou-se a presença de corpos protéicos. Embora, nessa cultivar, tenham sido observados grânulos de amido e corpos protéicos, com menor tamanho e quantidade, estes estão bem arranjados no endosperma, preenchendo todos os espaços entre os grânulos de amido, contribuindo, assim, para maior densidade e dureza do grão de milho. Além disso, observou-se que as cultivares de endosperma duro e semi-duro apresentaram maior síntese das zeínas de 16 kDa e de 27 kDa (Figura 9), o que, provavelmente, proporciona um maior número e diâmetro dos corpos protéicos nessas cultivares, permitindo um melhor empacotamento dos componentes do endosperma e conseqüentemente, uma maior dureza do mesmo (Dannenheffer et al., 1995; Wallace et al., 1990).

Gibbon et al. (2003) relatam que a supressão da textura farinácea observada nos genótipo QPM está associada ao arrançamento dos componentes do endosperma, bem como à composição química dos mesmos. Por outro lado, na cultivar Opaco-2, que também apresenta os menores valores de tamanho e porcentagem de amido, não se observa o empacotamento dos grânulos de amido no endosperma, o que contribui para sua menor densidade.

É importante ressaltar que este comportamento do tamanho dos grânulos de amido é diferente dos relatos encontrados na literatura, nos quais comenta-se o maior diâmetro e o formato desses não permitem um arrançamento organizado no endosperma, contribuindo, assim, para sua menor resistência física (Cagampang et al., 1985; Kriz,1987). Além disso, a ausência de empacotamento dos grânulos de amido na cultivar Opaco-2 pode ser atribuída à menor quantidade e tamanho do amido, bem como ao formato arredondado do amido e à presença de espaços intergranulares, não sendo observado corpos protéicos abundantes e íntegros como nas cultivares de endosperma duro e semi-duro.

Observou-se também que as cultivares de endosperma farináceo apresentam baixa síntese de gama zeína, o que, provavelmente, contribui para uma menor dureza do grão. Contudo, quando se observam as cultivares que apresentam alto valor protéico, Opaco-2 e QPM BR 451, constatam-se menor síntese da zeína de 19 kDa e paralização da zeína de 22 kDa, demonstrando a influência destas na textura do grão.

A associação da dureza do grão com o teor de proteína total foi alta, isso, provavelmente, porque a maior parte da proteína total, cerca de 70%, é de zeínas e estas, como já comentado, têm grande importância para a estrutura física do grão (Dombrink-kurtzman & Bietz, 1993). É importante ressaltar que o aumento no valor protéico do grão de milho diminui a dureza do mesmo, por alterar a síntese das zeínas (Tabela 6 e Figura 10). Além disso, a redução na

síntese da gama-zeína e alfa-zeína parece influenciar a estrutura e ou tamanho dos corpos protéicos, pois, nas cultivares de endosperma farináceo, que apresentam baixa síntese de gama-zeínas, não foi observado corpos protéicos de forma organizada. Na cultivar QPM BR 451, que apresenta baixa síntese de alfa-zeínas, os corpos protéicos são bem organizados e pequenos e aparecem preenchendo todos os espaços entre os grânulos de amido. Este fato mostra a importância dessas classes de zeínas para a organização dos corpos protéicos e para a estrutura física do grão de milho (Paiva et al., 1991).

É importante ressaltar que, além das características avaliadas no grânulo de amido, informações sobre a composição química e estrutura dos componentes do endosperma, tais como porcentagem de amilose e de amilopectina, organização estrutural dessas moléculas e dos corpos protéicos, seriam informações importantes para um melhor esclarecimento dos fatores associados à dureza do grão de milho.

6 CONCLUSÕES

A porcentagem de amido e o tamanho dos grânulos de amido não interferem no perfeito empacotamento dos grânulos de amido no grão de milho.

A quantidade de corpos protéicos, independente de seu tamanho, permite o perfeito arranjo dos grânulos de amido no endosperma de milho.

A alta síntese das zeínas de 16 e 27kDa interfere na dureza do grão de milho.

A redução da zeína de 19 kDa e a paralização da zeína de 22kDa está associada com o maior valor protéico do grão de milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAHMAN, A. A.; HOSENEY, R. C. Basics for hardness in pearl millet, grain sorghum and corn. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 61, n. 3, p. 232-235, May/June 1984.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Methods of analysis of the association of official analytical chemistry**. 15. ed. Arlington, 2000. 2v.

BANKS, W.; GREENWOOD, C. T. Studies on starches of high amylose content. **Starch**, Deerfield Beach, v. 26, p. 289, 1975.

BECRAFT, P. W.; BROWN, R. C.; LEMMON, B. E.; OLSEN, O. A.; OPSAHL-FERSATAD, H. G. Endosperm development. In: BHOJWANI, S. S. (Ed.). **Current trends in the embryology of angiosperms**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, 2000. p. 353-374.

BOMMERT, P.; WERR, W. Gene expression pattern in the maize caryopsis: clues to decisions in embryo and endosperm development. **Gene**, Amsterdam, v. 271, n. 2, p. 131-142, June 2001.

BOYER, C. D.; HANNAH, L. C. Kernel mutants of corn. In: HALLAUER, A. (Ed.). **Specialty corns**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC, 2001. p. 1-32.

BRESSANI, R. Protein quality of high-lysine maize for humans. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 36, n. 9, p. 806-811, Sept. 1991.

BUTTROSE, M. Ultrastructure of the developing aleurone cells of wheat grain. **Australian Journal of Biology Science**, East Melbourne, v. 16, p. 768-774, 1963.

CAGAMPANG, G. B.; GREEK, M. I. B.; KIRLEIS, A. W. Properties of starches isolated from Sorghum flourey and corneous endosperm. **Starch**, Deerfield Beach, v. 37, n. 8, p. 253-257, Aug. 1985.

CIVITELLI, R.; VILLAREAL, D. T.; AGNUSDEI, D.; NARDI, P.; AVIOLI, L. V.; GENNARI, C. Dietary L-Lysine and calcium metabolism in humans. **Nutrition**, London, v. 8, n. 6, p. 400-405, Nov./Dec. 1992.

COELHO, C. M. **Caracterização das proteínas do endosperma do milho visando alteração das frações que controlam a qualidade nutricional.** 1997. 139 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

COLEMAN, C. E.; HERMAN, E. M.; TAKASAKI, K.; LARKINS, B. A.; The maize γ -zeins sequestres α -zeins and stabilizes its accumulation in protein bodies of transgenic tobacco endosperm. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 12, p. 2335-2345, Dec. 1996.

CORREA, C. E. S.; SHAVER, R. D.; PEREIRA, M. N.; LAUER, J. G.; KOHN. Relationship between corn vitrouness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 11, p. 3008-3012, Nov. 2002.

CRUZ, C. D. **Programa genes:** aplicativo computacional em Genética e estatística. Viçosa: UFV, 1997. 442 p.

DANNENHOFFER, J. M.; BOSTWICK, D. E.; OR, E.; LARKINS, B. A. Opaque-15, maize mutation with properties of defective opaque-2 modifier. **Proceedings of the National Academy Science of the United State America**, Washington, v. 92, n. 6, p. 1931-1935, Mar. 1995.

DEMASON, D. A. Endosperm structure and development. In: LARKINS, B. A.; VASAL, I. K. (Ed.). **Cellular and molecular biology of plant seed**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishes, 1997. p. 73-116.

DIAZ, A. M. L. **Food quality and properties of quality protein maize.** Monterrey, México: Texas A & M University, 2003. 150 p.

DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; BIETZ, J. A. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 70, n. 1, p. 105-108, Jan./Feb. 1993.

DUMAS, C.; MOGESEN, H. L. Gametes and fertilization: maize as a model system for experimental embriogenesis in flowring plants. **The plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1337-1348, Oct. 1993.

DUVICK, D. N. Protein granules of maize endosperm cells. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 38, n. 4, p. 374-384, July/Aug. 1961.

ESEN, A.; STETLER, D. A. Immunocytochemical localization if delta-zein in the protein bodies of maize endosperm cells. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 79, n. 3, p. 243-248, Mar. 1992.

FAO, **El maize em la nutrición humana**. Roma, 1993. 110 p. (Estudio de alimentacion y nutrición, 35/1).

FERREIRA, Daniel Furtado. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows® versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programas e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FLODIN, N. The metabolic roles, pharmacology, and toxicology of lysine. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 16, n. 1, p. 7-21, Feb. 1997.

FRANCO, C. M. L. **Contribuição ao estudo da estrutura do grânulo de amido de milho: tratamento térmico, hidrólise enzimática e permeação em gel**. Campinas, 1993. 137 p.

FRENCH, D. Organization of starch granule. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHAL, E. F. **Starch: chemistry and Tecnology**. 2. ed. London: Academic Press, 1984. cap. 7, p. 183-247.

GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 32, n. 3-4, p. 177-191, Apr. 1997.

GIBBON, B.; LARKINS, B. A. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. **Trends in Genetics**, London, v. 21, n. 4, p. 227-233, Apr. 2005.

GIBBON, B. C.; WANG, X.; LARKINS, B. Altered starch structure is associated with endosperm modification. **Proceedings of the National Academy of Science United States of America**, Washington, n. 26, p. 15329-15334, Dec. 2003.

GIDLEY, M. J.; BOCIEK, S. M. Molecular organization in starches. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 107, n. 24, p. 7044, Dec. 1985.

GLENN, G. M.; YOUNCE, F. L.; PITTS, M. J. Fundamental physical properties characterizing the hardness of wheat endosperm. **Journal Cereal Science**, London, v. 13, n. 2, p. 179-194, Mar./Apr. 1991.

GUIMARÃES, C. T. **Caracterização de populações de milho indígenas que apresentam grãos opacos.** 1994. 69 p. 1994 (Tese de Mestrado) – Universidade Federal de viçosa, viçosa, MG.

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, n. 4, p. 825-838, Nov. 1993.

HERNANDEZ, H. H.; BATES, L. S. **A modified method for a rapid tryptophan analysis in maize.** Mexico: International maize and wheat improvement center, 1969. 7 p (Research Bulletin,13).

HOSENEY, R. C. Wheat hardness. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 32, n. 4, p. 320-322, July/Aug. 1987.

IMBERTY, A.; BULEON, A.; TRAN, V.; PERZ, S. Recent advances in knowledge of starch structure. **Starch**, Deerfield Beach, v. 43, n. 10, p. 375-384, Oct. 1991.

JAMES, M. G.; DENYER, K.; MYERS, A. M. Starch synthesis in the cereal endosperm. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, n. 3, p. 215-222, June 2003.

JOHNSON, L. M.; HARRISON, J. H.; DAVIDSON, D.; ROBUTTI, J. L.; SWIFT, M. Corn silage management I: effects of hybrid, maturity and mechanical processing on chemical and physical characteristics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 4, p. 833-853, Apr. 2002.

KIRIHARA, J. A.; HUNSPERGER, J. P.; MAHONY, W. C.; MESSING, J. W. Differential expression of a gene for a methionine-rich storage protein in maize. **Molecular General Genetics**, New York, v. 211, n. 3, p. 477-487, Mar. 1988.

KNIEP, K. R.; MASON, S. C. Kernel breakage and density of normal and *opaque-2* maize grain as influenced by irrigation and nitrogen. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 1., p. 159-163, Jan./Fev. 1989.

KOWLES, R. V.; PHILLIPS, R. L. Endosperm development in maize. **International Review Cytology**, New York, v. 112, n. 1, p. 97-136, 1988.

KRIZ, A. L. **Evaluation of genetic factors that affect kernel hardness in maize.** Urbana-Champaign: University of Illinois, 1987. 12 p.

LEBLANC, O.; POINTE, C.; HERNANDEZ, M. Cell cycle progression during endosperm development in *Zea mays* depends on parental dosage effects. **The Plant Journal**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 1057-1066, Dec. 2002.

LEITE, A.; NETO, G. C.; VETTORRE, A. L.; YUNES, J. A.; ARRUDA, P. The prolamins of sorghum, *Coix* and millets. In: SHEWRY, P. R.; CASEY, R. (Ed.) **Seed protein**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 141-157.

LENDING, C. R.; LARKINS, B. A. Changes in the zein composition of protein bodies during of maize development. **The plant cell**, Rockville, v. 1, n. 10, p. 1011-1023, Oct. 1989.

LINEBACK, D. R. The starch granule: organization and properties. **Bakers Digest**, Chicago, v. 58, n. 2, p. 16-21, 1984

LOPES, M. A. **Genetic and biochemical characterization of the maize mutants floury-2 and modified opaque-2**. 1989. 269 p. (Tese Doutorado) - University of Arizona, Tucson.

LOPES, M. A. LARKINS, B. Endosperm Origin, development, and function. **The plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1383-1399, Oct. 1993.

MANNER, D. H. Recent development in our understanding of amylopectin structure. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v, 11, n. 1, p. 87-112, 1989.

McCLINTOCK, B. Development of maize endosperm as revealed by clones. In: SUBTELNY, S.; SUSSEX, I. M. (Ed.). **The clonal basis of development**. London: Academic, 1978. p. 217-237.

MERTZ, E. T.; BATES, L. S.; NELSON, O. E. Mutant genes that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. **Science**, Washington, v. 145, n. 3629, p. 279-280, July 1964.

MITTELMAN, A. **Variação genética para qualidade nutricional em milho com endosperma normal**. 2001. 93 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

NELSON, N. A. Phtometric adaptation of Smogyi-Method for determination of glucose. **Journal of Biology Chemistry**, Baltimore, v. 135, n. 1, p. 375, 1944.

NELSON, O. E. Genetic modification of protein quality in plants. **Advance in Agronomy**, London, v. 21, p. 171-194, 1969.

NELSON, O. E.; MERTZ, E. T.; BATES, L. S. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. **Science**, Washington, v. 150, n. 3702, p. 1469-1470, 1965.

OLSEN, O. A.; POTTER, R. A.; KALLA, R. Histo-differentiation and molecular biology of developing cereal endosperm. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 2, n. 2, p. 117-131, June 1992.

OLSEN, O. A. Endosperm development: cellularization and cell fate specification. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 233-267, 2001.

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, Mar./Apr. 1983.

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.; PEIXOTO, M. J. V. V. D.; WALLACE, J. C.; and LARKINS, B. A. . Quantitation and distribution of γ -zein in the endosperm of maize kernels. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 68, n. 3, p. 276-279, May/June 1991.

PATERNIANE, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG, 1990. 817 p.

PEDERSEN, K.; ARGOS, P.; NARAYANA, S. L. V.; LARKINS, B. A. Sequence analysis and characterization of a maize gene encoding a high sulphur zein protein of Mr 15,000. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 261, n. 14, p. 62779-6284, Oct. 1986.

POMERANZ, Y.; MARTIN, C. R.; TRAYLOR, D. D.; LAI, F. S. Corn hardness determination. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 61, n. 2, p. 147-150, Mar./Apr. 1984.

ROBUTTI, J. L.; HOSENEY, R. C.; WASSOM, C. E. Modified *opaque-2* corn endosperms. II Structure viewed with a scanning electron microscope. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 51, n. 2, p. 173-179, Mar./Apr. 1974.

RUBENSTEIN, I.; GERAGHTY, D. E. The genetic organization of zein. In: POMERANZ, Y. (Ed.) **Advances in cereal science and technology**. St. Paul, 1989. v. 8, p. 297-315.

RUSSEL, S. D. Double fertilization. **International Review Cytology**, New York, v. 140. p. 357-388, 1992.

SCHELL, J. H. N.; KIEFT, H.; VAN LAMMEREN, A. A. M. Interactions between embryo and endosperm during early developmental stages of maize caryopses (*Zea mays*). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, n. 12, p. 2842-2853, 1984.

SCHWEIZ, L.; YERK-DAVIS, G. L.; PHILLIPS, R. L.; SRIENC, F.; JONES, R. J. Dynamics of maize endosperm development and endoreduplication. **Proceedings of the National Academy Science of the United State of America**, Washington, v. 92, n. 15, p. 7070-7074, July 1995.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 947-958, Apr. 2002.

SHOTWELL, M. A.; LARKINS, B. A. The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. In: MARCUS, A. (Ed.). **The biochemistry of plant: a comprehensive treatise**. San Diego: Academic, 1989. v. 15, p. 296-345.

SHULL, J. M. **Developmental study of a hard, intermediate and soft variety of sorghum**. 1988. 85 p. Dissertation (Masters) - West Laffayette, Purdue University.

SIMMONDS, D. H.; BARLOW, K. K.; WRIGLEY, C. W. The biochemical basis of grain hardness in wheat. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 50, n. 5, p. 553-562, Sept./Oct. 1973.

SOAVE, C.; SALMINI, F. Organization and regulation of zein genes in maize. **Phylogical Transactions of ht Society of London**, Oxford, v. 304, n. 1120, p. 341-347, 1984.

STRISSEL J. F.; STIEFEL, M. Potential benefits of using a white corn hybrid in tortilla and chip application. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 47, n. 2, p. 56-69, Mar./Apr. 2002.

TORO, A. A. **Quantificação de aminoácidos solúveis em mutantes de endosperma de milho.** 2001. 88 p. 2001. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

TSAI, C. Y. Early termination of zein accumulation in *opaque-2* maize mutant. **Maydica**, Bergamo, v. 24, n. 3, p. 1290-140, 1979a.

TSAI, C. Y. Tissue-specific zein synthesis in maize kernel. **Biochemical Genetics**, New York, v. 17, n. 11, p. 1109-1119, 1979b.

VASAL, S. K.; VILLEGAS, E.; BJARNASON, M.; GELAW, B.; GOERTZ, P. Genetic modifiers and breeding strategies in developing hard endosperm *opaque-2* materials. In: POLLMER, W. G.; PHILLIPS, R. H. (Ed.). **Improvement of quality traits of maize grain and silage use.** London: Martinus Nijhoff, 1980. p. 37-73.

VASAL, S. K. High quality protein corn. In: HALLAUER, A. (Ed.). **Specialty corns.** 2. ed. Boca Raton, FL: CRC, 2001. p. 85-129.

VILLEGAS, E.; VASAL, S. K.; BJARNASON, M. Quality protein maize: What is it and how was it developed. In: MERTZ, E. T. (Ed.). **Quality protein maize.** American Association of Cereal Chemists, 1992. p. 27-48.

WALL, J. S.; BIETZ, J. A. Differences in corn endosperm proteins in developing seeds of normal and *opaque-2* corn. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 64, n. 4, p. 275-280, July/Aug. 1987.

WALLACE, J. C.; LOPES, M. A.; PAIVA, E.; LARKINS, B. A. New methods for extraction and quantification of zeins reveal a high content of gamma zein in modified *opaque-2* maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, n. 1, p. 191-196, Jan. 1990.

WANG, Y. J.; WHITE, P.; POLLAK, L.; JANE, J. Characterization of structures of 17 maize endosperm mutant genotype with oh 43 inbred line background. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 70, n. 2, p. 171-179, Mar./Apr. 1993

WOLF, M. J.; BUZAN, C. L.; MAC MASTERS, M. M.; RIST, C. E. Structure of the mature corn kernel. I. Gross anatomy and structure relationship. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 29, n. 5, p. 321-333, 1952.

YAU, J. C.; BOCKHOLT, A. J.; SMITH, J. D.; ROONEY, L. W.; WANISKA, R. D. Maize endosperm proteins that contribute to endosperm lysine content. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 76, n. 5, p. 668-672, Sept.Oct. 1999.

ZARKADAS, C. G.; YU, Z.; HAMILTON, R. I.; PATTISON, P. L.; ROSE, N. G. W. Comparison between the protein quality of nor then adapted cultivars of common maize and quality protein maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 1, p. 84-93, Jan. 1995.