

CÍNTIA MARQUES COELHO

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO ENDOSPERMA DO MILHO
VISANDO ALTERAÇÃO DAS FRAÇÕES QUE CONTROLAM
QUALIDADE NUTRICIONAL**

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

Orientador
Dr. Maurício Antônio Lopes

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1997

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

Coelho, Cintia Marques.

**Caracterização das proteínas do endosperma do milho visando alteração
das frações que controlam qualidade nutricional / Cintia Marques Coelho. –
Lavras : UFLA, 1997.**

139 P. : il.

Orientador: Maurício Antônio Lopes.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

**1. Milho - Qualidade nutricional 2. Milho opaco-2. 3. Proteína. 4.
Endosperma. 5 .IHP - Illinois High Protein. 6. Eletroforese. 7. Melhoramento
genético. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

CDD-633.15

-633.1523

CÍNTIA MARQUES COELHO

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO ENDOSPERMA DO MILHO
VISANDO ALTERAÇÃO DAS FRAÇÕES QUE CONTROLAM
QUALIDADE NUTRICIONAL**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Curso de Pós Graduação em
Agronomia, área de concentração
Genética e Melhoramento de
Plantas, para obtenção do título
de “Mestre”.**

APROVADA em 21/08/97



Prof. Magno Antônio Patto Ramalho



Prof. João Bosco dos Santos



**Dr. Mauricio Antônio Lopes
Orientador**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade de realização do curso de mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo. Ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS/EMBRAPA, pela abertura e apoio oferecidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Curso de Genética e Melhoramento de Plantas da UFLA pela formação profissional de alta qualidade que me propiciaram.

Ao meu orientador, Maurício Antônio Lopes, pela orientação, apoio, estímulo e ensinamentos transmitidos.

Ao pesquisador Paulo Evaristo Guimarães que forneceu contribuições valiosas para a realização deste trabalho, ao pesquisador Antônio Carlos de Oliveira pelo auxílio nas análises estatísticas e a pesquisadora Elizabeth de Oliveira pelas valiosas contribuições.

À Edna Patto Pacheco de Pinho, por sua dedicação, disponibilidade, paciência e especialmente por sua amizade que tornou a minha passagem pelo Núcleo de Biologia Molecular realmente um período de aprendizagem.

Aos funcionários e estagiários do CNPMS, que me auxiliaram em várias etapas do meu trabalho, tornando possível a sua realização.

A todos os amigos do curso de Genética e Melhoramento de Plantas: Juscélio, Jaime, Flávia França, Flávia Avelar, Hélia, Ângela, Patrícia, Leonardo, Gustavo, Renata, João, Gabriela, Glauber, Oswaldo, Pedro Hélio e demais colegas pelo convívio e amizade que certamente muito contribuíram para o sucesso desta etapa da minha vida.

À Patrícia Pitta (Patica) pela amizade e por todas as boas gargalhadas que compartilhamos e que, certamente, tornaram a minha vida feliz, alegre e contente. À Giovanna Augusta Torres pelas valiosas sugestões.

À Ana Claudia e a Clécia, por terem me incentivado nos momentos de difíceis e por terem compartilhado comigo os momentos de alegria. À Verinha, Silvana e Ana Célia por terem suportado as fitas do TOEFL, as conversas sobre milho, e principalmente por terem me ensinado a arte da caminhada.

À minha família, pelo incentivo, compreensão e paciência. Ao Marcos pelo carinho, incentivo, paciência, apoio, estímulo, enfim por ter estado ao meu lado em todos os momentos.

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

E a Deus, por tudo.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	5
2.1 Proteínas do endosperma do milho.....	5
2.1.1. Zeínas, proteínas de reserva do grão do milho.....	8
2.1.1.1. Síntese e deposição das zeínas em corpos protéicos.....	11
2.1.1.2. Organização e estrutura dos genes que codificam as zeínas...	14
2.1.1.3. Mutantes que alteram a síntese de zeínas.....	16
2.1.2. Não-Zeínas, as proteínas nutricionalmente ricas do endosperma do milho.....	20
2.2 Genótipos <i>opaco-2</i> modificados.....	21
2.3 Genótipos com alta concentração de proteína.....	23
2.4 Relação entre qualidade nutricional e produtividade.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Material genético.....	27
3.2 Caracterização bioquímica e genética das proteínas do endosperma.....	30
3.2.1. Extração e fracionamento das proteínas do endosperma.....	30
3.2.1.1. Obteção das frações zeína e não-zeína.....	30
3.2.2. Eletroforese das frações protéicas em gel de poliacrilamida.....	31
3.2.3. Delineamento estatístico.....	32
3.2.4. Imunoblots ("Western blots") com anticorpos específicos para zeínas.....	32
3.2.5. Análises das sequências gênicas que codificam as proteínas de reserva, alfa-, beta- e delta-zeínas.....	34
3.2.5.1. Origem e manutenção das sondas.....	34
3.2.5.2. Marcação das sondas.....	34
3.2.5.3. Obtenção do tecido vegetal.....	35

3.2.5.4. Extração do DNA genômico.....	35
3.2.5.5. Quantificação e diluição das amostras de DNA.....	36
3.2.5.6. Digestão do DNA com enzimas de restrição e eletroforese.....	37
3.2.5.7. Transferência do DNA para membranas de náilon.....	37
3.2.5.8. Pré-hibridação, hibridação e detecção do sinal.....	38
3.3 Seleção de genótipos de alta qualidade nutricional baseada no conteúdo de proteínas do endosperma.....	39
3.3.1. Análise espectrofotométrica das proteínas do endosperma	39
3.3.1.2. Análise espectrofotométrica da proteína total do endosperma...	39
3.3.1.3. Análise espectrofotométrica da fração não-zeína do endosperma.....	40
3.3.1.4. Obtenção do conteúdo de albuminas e globulinas presentes no endosperma.....	42
3.3.1.5. Análise espectrofotométrica da fração composta de albuminas e globulinas do endosperma.....	42
3.3.2. Determinação do nitrogênio total presente nas proteínas do endosperma.....	43
a) Análise de Injeção de Fluxo.....	43
b) Método Micro-Kjeldahl.....	44
3.3.3. Determinação da percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma.....	44
3.3.4. Eficiência de seleção.....	45
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Caracterização bioquímica e genética das proteínas do endosperma do milho	47
4.1.1. Análise das frações zeína e não-zeína do endosperma do milho.....	47
4.1.2. Percentagem de proteína e triptofano nas proteínas do endosperma.....	64
4.1.3. Análise das variações em famílias gênicas que codificam as proteínas de reserva alfa-, beta- e delta-zeínas.....	75
4.2 Seleção de genótipos de alta qualidade baseada no conteúdo de proteínas do endosperma.....	75
4.2.1. Desenvolvimento de um método rápido para avaliação de qualidade nutricional.....	75
4.2.2. Correlação entre os métodos avaliados.....	80
4.2.3. Eficiência de seleção.....	83
5 DISCUSSÃO.....	84
6 CONCLUSÕES.....	98
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXO A.....	109

ANEXO B.....

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Resumo da análise de variância dos valores de absorvância do teor total de zeína, obtidos por densitometria à laser, utilizando delineamento em blocos aumentados.....	49
2	Resumo da análise de variância dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração zeína (54, 27, 22 e 19 kD), obtidos por densitometria à laser, utilizando delineamento em blocos aumentados.....	49
3	Resumo da análise de variância dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração zeína (16, 15, 12 e 10 kD), obtidos por densitometria à laser, utilizando delineamento em blocos aumentados.....	50
4	Coefficiente de correlação (r) obtidos considerando modelo linear para os bulks 1,4,6 e 9 da geração F ₂ e famílias S ₁	81
5	Dados percentuais de eficiência de seleção dos bulks 1, 4, 6 e 9 da geração F ₂ e famílias S ₁	81

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Seleção visual de 20 grãos de cada amostra F_2 , sendo 10 grãos de fenótipo semi-opaco (a direita) e 10 grãos de fenótipo normal (a esquerda).....	29
2	Esquema ilustrativo da precipitação do conteúdo de proteína total presente no endosperma do milho, com a utilização de TCA 70%, para posterior análise espectrofotométrica.....	41
3	Distribuição dos valores de absorbância do teor total de zeína (obtidos em densitômetro à laser) presentes no endosperma dos bulks 1 (A) e 4 (B) da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	52
4	Distribuição dos valores de absorbância do teor total de zeína (obtidos em densitômetro à laser) presentes no endosperma dos bulks 6 (C) e 9 (D) da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	53
5	Distribuição dos valores de absorbância do teor total de zeína (obtidos em densitômetro à laser) presentes no endosperma do bulk 10 (E) da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	54
6	Distribuição dos valores percentuais de absorbância dos polipeptídeos da fração zeína (obtidos por densitometria a laser) presentes no endosperma dos bulks 1 (A) e 4 (B) da geração F_2 , resultantes do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	55

7	Distribuição dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração zeína (obtidos por densitometria a laser) presentes no endosperma dos bulks 6 (C) e 9 (D) da geração F ₂ , resultantes do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	56
8	Distribuição dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração zeína (obtidos por densitometria a laser) presentes no endosperma dos bulks 10 (E) da geração F ₂ , resultantes do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	57
9	Distribuição dos valores de absorvância do teor total de não-zeína (obtidos em densitômetro à laser) presentes no endosperma dos bulks 1 (A) e 4 (B) da geração F ₂ , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	58
10	Distribuição dos valores de absorvância do teor total de não-zeína (obtidos em densitômetro à laser) presentes no endosperma dos bulks 6 (C) e 9 (D) da geração F ₂ , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	59
11	Distribuição dos valores de absorvância do teor total de zeína (obtidos em densitômetro à laser) presentes no endosperma do bulk 10 (E) da geração F ₂ , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	60
12	Distribuição dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração não-zeína (obtidos por densitometria a laser) presentes no endosperma dos bulks 1 (A) e 4 (B) da geração F ₂ , resultantes do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	61
13	Distribuição dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração não-zeína (obtidos por densitometria a laser) presentes no endosperma dos bulks 6 (C) e 9 (D) da geração F ₂ , resultantes do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	62
14	Distribuição dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração não-zeína (obtidos por densitometria a laser) presentes no endosperma dos bulks 10 (E) da geração F ₂ , resultantes do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	63
15	Immunoblot com anticorpo específico para alfa-zeínas. Primeiramente, foram detectadas alfa-zeínas de 22kD, seguidas pelas alfa-zeínas de 19kD e por último foram também detectadas as delta-zeínas de 10kD. Essa análise foi realizada para os dois genitores CMS52 e IHP. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular.....	65
16	Immunoblot com anticorpo específico para gama-zeínas. Primeiramente, foram detectadas gama-zeínas de 54kD, seguidas pelas gama-zeínas de 27kD e por último foram detectadas as gama-zeínas de 16kD. Essa análise foi realizada para os dois genitores CMS52 e IHP. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular.....	66

17	Immunoblot com anticorpo específico para beta-zeínas de 15kD.. Essa análise foi realizada para os dois genitores CMS52 e IHP. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular.....	67
18	Distribuição dos valores de percentagem de proteína total presentes no endosperma dos bulks 1 (A) e 4 (B) da geração F ₂ , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	68
19	Distribuição dos valores de percentagem de proteína total presentes no endosperma dos bulks 6 (C) e 9 (D) da geração F ₂ , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	69
20	Distribuição dos valores de percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma dos bulks 1 (A) e 4 (B) da geração F ₂ , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	71
21	Distribuição dos valores de percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma dos bulks 6 (C) e 9 (D) da geração F ₂ , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.....	72
22	Distribuição dos valores de percentagem de proteína presente no endosperma das 231 famílias S ₁ , resultantes da autofecundação da população CMS475. CMS52 e IHP correspondem aos indivíduos 1 e 232.....	73
23	Distribuição dos valores de percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma das 231 famílias S ₁ , resultantes da autofecundação da população CMS475. CMS52 e IHP correspondem aos indivíduos 1 e 232.....	74
24	Southern blot realizado para os dois genitores, CMS52 e IHP, utilizando três enzimas de restrição diferentes (Bam HI, Eco RI e Hind III), hibridadas com sonda específica para alfa-zeínas de 22 kD. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular, as linhas 1 corespondem ao CMS52 e as linhas 2 correspondem ao IHP.....	76
25	Southern blot realizado para os dois genitores, CMS52 e IHP, utilizando três enzimas de restrição diferentes (Bam HI, Eco RI e Hind III), hibridadas com sonda específica para alfa-zeínas de 19 kD. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular, as linhas 1 corespondem ao CMS52 e as linhas 2 correspondem ao IHP.....	77
26	Southern blot realizado para os dois genitores, CMS52 e IHP, utilizando três enzimas de restrição diferentes (Bam HI, Eco RI e Hind III), hibridadas com sonda específica para beta-zeínas . A linha M corresponde ao marcador de peso molecular, as linhas 1 corespondem ao CMS52 e as linhas 2 correspondem ao IHP.....	78
27	Southern blot realizado para os dois genitores, CMS52 e IHP, utilizando três enzimas de restrição diferentes (Bam HI, Eco RI e Hind III), hibridadas com sonda específica para delta-zeínas. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular, as linhas 1 corespondem ao CMS52 e as linhas 2 correspondem ao IHP.....	79

RESUMO

COELHO, Cíntia Marques. Caracterização das proteínas do endosperma do milho visando alteração das frações que controlam qualidade nutricional. Lavras: UFLA, 1997.139p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas)*

A melhoria da qualidade nutricional do milho tem sido um importante objetivo de vários programas de melhoramento genético nos últimos 30 anos, visto que o grão deste cereal apresenta baixa quantidade e qualidade de proteína. Proteínas perfazem cerca de 10% da matéria seca do endosperma do milho, sendo que as mesmas são nutricionalmente inadequadas para humanos e animais monogástricos, devido à deficiência em alguns aminoácidos essenciais, principalmente lisina e triptofano. Em função da grande importância do milho como alimento energético e protéico, tem havido grande interesse no desenvolvimento de genótipos que apresentem alto valor nutricional aliado a altos conteúdos de proteína. A caracterização das alterações quantitativas e qualitativas das frações protéicas do grão e a identificação de mecanismos genéticos capazes de promover tais alterações, bem como o desenvolvimento de métodos rápidos de screening que permitam eficiente identificação de genótipos nutricionalmente mais desejáveis, foram os principais objetivos deste trabalho. Os materiais genéticos utilizados foram desenvolvidos pelo programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo e consistiram de gerações segregantes resultantes do cruzamento entre a população de alta qualidade protéica CMS52 - QPM ("Quality Protein Maize") e a população Illinois High Protein -

* Orientador: Maurício Antônio Lopes. Membros da banca: João Bosco dos Santos e Magno Antônio Patto Ramalho.

IHP, selecionada para acumular altos níveis de proteína no grão. Foram também utilizadas duzentas e trinta e uma famílias S_1 obtidas da população CMS475, resultante da introgressão de 25% do genoma de IHP em CMS52 QPM. Amostras de grãos dos genitores (CMS52 e IHP), de bulks F_2 foram caracterizadas para acúmulo das frações protéicas do endosperma (zeínas e não-zeínas), percentagem de proteína total e percentagem de triptofano na proteína. Os genitores também foram avaliados com relação à complexidade dos genes que codificam as proteínas de reserva alfa-, beta- e delta-zeínas. Amostras da geração F_2 e famílias S_1 foram também utilizadas para desenvolvimento de um método de seleção rápida ("screening") de materiais superiores capazes de acumular altas quantidades de proteína de melhor qualidade no endosperma. Os resultados obtidos indicam a dificuldade de se combinar as duas características de interesse presentes nos genitores, apesar de que alguns indivíduos apresentaram níveis intermediários promissores, indicando possibilidades de se melhorar quantitativa e qualitativamente a proteína do endosperma do milho através de seleção. O método rápido de "screening", desenvolvido para avaliar materiais de acordo com o conteúdo de proteínas presente no endosperma mostrou-se eficiente para seleção de genótipos com alta quantidade de proteína. No entanto, os métodos desenvolvidos para avaliar a relação existente entre os conteúdos de frações protéicas específicas (não-zeína, albuminas e globulinas) e a percentagem de triptofano presente na proteína total do endosperma mostraram-se ineficientes para seleção de genótipos de alta qualidade.

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF PROTEINS PRESENT IN THE ENDOSPERM OF MAIZE, WITH THE OBJECTIVE OF ALTERING THE PROTEIN FRACTIONS THAT DETERMINE NUTRITIONAL VALUE.

The improvement of the nutritional value of maize has been an important goal over the last 30 years, to which a number of genetic development programs have been dedicated as the maize grain has a low content of protein and is of low nutritional value. Proteins account for only about 10% of the maize kernel's dry, and these proteins are of poor nutritional value to humans and monogastric animals because of their low content of essential amino acids, such as lysine and tryptophan. Given the great importance of maize as a staple food, there has been considerable interest in the development of genotypes which offer high content of proteins and high nutritional value. The main objectives of this project were to characterize the desired quantitative and qualitative alterations of the protein fractions of the grain, to identify the genetic mechanisms that bring about these alterations, and to develop fast screening techniques that would permit the effective identification of genotypes with high nutritional value. The genetic materials used were developed through a maize improvement program of *Embrapa Milho e Sorgo*. They consisted of F₂ generations resulting from crossbreeding among a high grade protein population (CMS52-QPM, Quality Protein Maize) and a high protein content population (IHP, Illinois High Protein). In addition, 231 S₁ strains were used, obtained from a CMS475 population resulting from the introgression of 25% of IHP genome in CMS52-QPM. Samples of progenitor kernels (CMS52 and IHP) as well as of F₂ progenies were characterized with regard to composition of protein content in the

endosperm (zeins and nonzeins), percentage of total protein, and the percentage of tryptophan contained in the total protein. The parents were also evaluated as to complexity of the genes encoding the alpha-, beta-, and delta-zein storage proteins. Furthermore, F2 samples and S1 families were used to develop a method of fast screening for superior material, containing larger amounts of higher grade protein in the endosperm. The results obtained indicate the difficulty of merging the attractive characteristics present, separately, in the parents. Some of the progenies, however, did show promising intermediate levels, suggesting the possibility of improving the protein content of the endosperm in terms of quantity and quality, through a selection process. The screening method developed to evaluate materials with regard to the protein content of the endosperm proved to be effective for the selection of genotypes containing a high quantity level of protein. However, the methods developed to evaluate the ratio between specific protein fractions (nonzeins, albumins, and globulins), and the percentage of tryptophan present in the total protein of the endosperm, the methods developed turned out to be ineffective for the selection of high quality genotypes.

1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais importantes no mundo moderno. No Brasil esta cultura é produzida e utilizada em todas as regiões, ocupando 61% da área de plantio de cereais e produzindo mais de 30 milhões de toneladas de grãos anualmente. O milho é um dos cereais mais utilizados como fonte de energia e proteína para alimentação humana e animal, embora o seu grão apresente baixa quantidade e qualidade de proteína. As proteínas correspondem a aproximadamente 10% da matéria seca do endosperma, enquanto, em soja, por exemplo, o conteúdo de proteína é de 38% da matéria seca. Adicionalmente à baixa quantidade, algumas frações protéicas do endosperma são nutricionalmente inadequadas para humanos e animais monogástricos, devido à sua deficiência em alguns aminoácidos essenciais (Nelson, 1969). Essa deficiência pode levar a sérios problemas nutricionais quando se faz uso de milho como a principal fonte de proteínas, havendo, então, a necessidade de se complementar alimentos e rações com aminoácidos sintéticos ou outras fontes mais caras de proteínas que contenham esses aminoácidos. Sendo assim, existe grande interesse no desenvolvimento de genótipos que apresentem alto valor nutricional aliado a maiores conteúdos protéicos.

A caracterização do mutante *opaco-2* por Mertz, Bates e Nelson (1964) despertou grande interesse por parte dos melhoristas de milho, pois esse mutante não só apresentava níveis do aminoácido essencial lisina duas vezes mais elevados do que os genótipos normais, como também maiores níveis de triptofano. Por outro lado, apesar de seu alto valor nutricional, o grão desse mutante é opaco e farináceo sendo inadequado para armazenagem e uso industrial. Ademais os efeitos pleiotrópicos da mutação levam a diversos problemas agrônômicos como produção de grãos 8 a 15%

inferior àquela obtida por variedades tradicionais. Essas características agronômicas indesejáveis impediam a ampla comercialização de cultivares contendo a mutação.

Através de um longo processo de retrocruzamento e seleção recorrente, melhoristas do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) no México combinaram a mutação *opaco-2* com modificadores do endosperma que reverteram diversos efeitos indesejáveis da mutação (Vasal et al., 1980). Os genótipos *opaco-2* modificados derivados desse trabalho combinam excelente valor nutricional com características de grão similares às daquelas de grãos normais. Esses genótipos foram denominados "Quality Protein Maize" (QPM). O desenvolvimento de QPM representou um importante avanço e pode representar um recurso para auxiliar os países em desenvolvimento a ajustar sistemas de produção mais condizentes com as necessidades atuais de desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável. No Brasil, a substituição gradual de cultivares de milho normal por QPM poderia gerar grandes benefícios, especialmente para famílias de baixa renda que poderiam consumi-lo direta ou indiretamente como consequência do aumento da disponibilidade de suínos, aves e peixes resultante do seu uso como complemento alimentar animal. Além disso, a disponibilização de híbridos QPM de alto desempenho poderia permitir redução de custos na indústria de rações alimentares, uma vez que se reduziria a necessidade por utilização de suplementos.

A alta qualidade nutricional dos genótipos QPM está relacionada a diminuição de uma das frações da proteína total do endosperma. Essa fração corresponde às proteínas de reserva do endosperma do milho, conhecidas como zeínas ou prolaminas. As zeínas não contêm aminoácidos essenciais e correspondem aproximadamente 60 a 70% da proteína total do endosperma de genótipos normais, enquanto o genótipo mutante modificado apresenta uma redução de aproximadamente 50% no acúmulo dessa fração. A outra fração da proteína total do endosperma, conhecida como não-zeína, acumula a maioria da lisina e triptofano do grão, e apresenta-se aumentada nos indivíduos com mais alto valor nutricional devido à ação da mutação *opaco-2*. Desta maneira, a proporção de zeína/não-zeína na proteína total do grão define a qualidade nutricional do milho (Habben, Kirleis e Larkins, 1993;

Lopes, 1993). Genótipos de milho de alta qualidade nutricional têm uma baixa relação zeína/não-zeína na proteína total do grão, enquanto milhos normais apresentam altas quantidades de proteínas de reserva e, conseqüentemente, uma alta relação zeína/não-zeína. Sendo assim, a mais alta concentração de lisina tanto em *opaco-2* quanto em *opaco-2* modificado é uma conseqüência da redução do acúmulo de zeínas e aumento da síntese de proteínas da fração não-zeína que contem lisina. Porém os mecanismos responsáveis por esse aumento permanecem desconhecidos (Habben, Kirleis e Larkins, 1993).

Ao lado da baixa qualidade protéica, o milho normalmente acumula baixa quantidade de proteína no grão. O grão deste cereal contém em média apenas 10% de proteína comparado com as sementes de legumes, tais como, feijão (23%), amendoim (26%) ou soja (38%), existindo, assim, grande interesse em aumentar o seu conteúdo de proteína. Já foi demonstrado que é possível aumentar o percentual de proteínas no grão do milho através do melhoramento genético. A população Illinois High Protein (IHP) foi selecionada para acumular altos conteúdos de proteína no endosperma e após setenta ciclos de seleção teve o conteúdo de proteína no grão aumentado de 10,9% para 26,6% (Dudley, Lambert e Alexander, 1974). Esta população tem sido avaliada como fonte de genes capazes de promover aumentos no acúmulo de proteína em materiais elite do programa de melhoramento do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo/EMBRAPA

Uma vez demonstrada a existência de variabilidade genética no milho para aumentar a quantidade de proteína acumulada no endosperma e melhorar a qualidade protéica deste cereal, seria de grande interesse o desenvolvimento de genótipos que apresentassem grandes quantidades de proteínas ricas em aminoácidos essenciais, reunindo, assim, essas duas características. Contudo, o progresso feito no sentido de aumentar o conteúdo de proteína acumulada no endosperma e melhorar a qualidade nutricional do milho tem sido limitado devido a existência de correlações negativas entre produção de grãos, acúmulo de proteína no endosperma e qualidade nutricional.

O presente trabalho buscou caracterizar as alterações quantitativas e qualitativas nas frações protéicas do endosperma do milho que contribuem para

qualidade nutricional do grão, visando associar variações quantitativas a variações em qualidade nutricional. Adicionalmente, buscou-se identificar mecanismos para melhoramento quantitativo e qualitativo das proteínas do grão, bem como o desenvolvimento de métodos rápidos de “screening” para identificação de genótipos de alta qualidade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os cereais fornecem a maior porção das calorias e proteínas na dieta humana e de animais monogástricos, sendo seus grãos uma das mais ricas fontes de proteínas da planta. Na maioria dos cereais, as sementes contêm 10 a 50% de proteínas (Shotwell e Larkins, 1989), que normalmente são pobres em qualidade nutricional devido ao baixo nível de aminoácidos essenciais, principalmente lisina e triptofano. Sob esse ponto de vista, a melhoria da qualidade nutricional do milho tem sido um importante objetivo de vários programas de melhoramento genético nos últimos 30 anos.

2.1 Proteínas do endosperma do milho

As proteínas de reserva do milho servem como reserva de nitrogênio para o embrião durante a germinação. A composição desta reserva também é responsável pela determinação da qualidade nutricional do grão com relação a alimentação humana e de animais monogástricos.

As proteínas do endosperma do milho podem ser sequencialmente separadas em quatro frações maiores de acordo com a solubilidade (Osborne e Mendel, 1914). As proteínas solúveis em água são chamadas de albuminas, enquanto as proteínas extraídas com soluções salinas do resíduo remanescente seguido da extração em água são referidas como globulinas. Subsequente extração do resíduo com álcool produz as prolaminas. Prolamina é a maior proteína de reserva em grãos de cereais. Esta proteína freqüentemente é referida com um nome derivado do gênero do cereal, por exemplo em milho (*Zea mays* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), aveia (*Avena sativa* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.), as prolaminas são designadas como zeínas, hordeínas,

aveninas e orisinas, respectivamente. O resto que permanece insolúvel em solventes são referidas como glutelinas e podem ser extraídas em soluções aquosas ácidas e alcalinas.

O endosperma corresponde a aproximadamente 85% do total do peso seco do grão na maturidade e contém aproximadamente 70% de sua proteína total. As quatro frações protéicas albuminas, globulinas, zeínas e glutelinas constituem aproximadamente 3%, 3%, 60% e 34%, respectivamente, do total das proteínas do endosperma, quando as plantas crescem sob níveis altos de fertilizante nitrogenado. Diferentemente da proteína do endosperma, a proteína do embrião está predominantemente na forma de albumina (mais do que 60% da proteína do embrião é albumina), contudo o embrião contém também uma quantidade mensurável de proteínas solúveis em álcool . No embrião maduro as proteínas solúveis em álcool podem atingir de 5% a 10% da proteína total (Schneider, Earley e DeTurk, 1952; Tsai, 1979a).

Albuminas e globulinas provavelmente representam as enzimas e são sintetizadas em estágios iniciais do desenvolvimento (Misra, Mertz e Glover, 1975; Murphy e Dalby, 1971; Tsai, 1979b). Glutelinas são heterogêneas e difíceis para definir bioquimicamente. Acredita-se que quando o embrião desseca, esta fração forme uma matriz insolúvel na qual os grânulos de amido estão embebidos (Wolf, Khoo e Seckinger, 1967). Uma porção das glutelinas representam proteínas de membrana ou proteínas estruturais. As prolaminas, por outro lado, estão depositadas em corpos protéicos (Christianson et al., 1969; Duvick, 1961; Wolf, Khoo e Seckinger, 1967), e não têm atividade catalítica. Prolaminas são as proteínas mais abundantes no endosperma e contém alta concentração dos aminoácidos prolina e glutamina, daí o nome de prolaminas.

Um grande número de procedimentos de fracionamento das proteínas do endosperma estão descritos na literatura (Landry e Moreaux, 1970; Wilson, Shewry e Mifflin, 1981; Esen, 1986). O método mais comumente usado foi descrito por Landry e Moreaux (1970) e com esse procedimento cinco frações protéicas são obtidas por extração sequencial de amostras de endosperma pulverizado com diferentes solventes:

Fração I - composta de albuminas e globulinas extraídas conjuntamente com 0.5M NaCl, Fração II - zeína, extraída com 70% de isopropanol, Fração III - zeína reduzida, extraída com 70% de isopropanol e 0,6% do agente redutor 2-mercaptoetanol, Fração IV - glutelina reduzida, extraída em tampão borato, pH 10 com 0.6% de 2-mercaptoetanol e Fração V - glutelina reduzida e desnaturada, extraída em tampão borato, pH 10 contendo 0.6% de 2-mercaptoetanol e 0.5% do detergente SDS. Vários outros procedimentos tem sido descritos e utilizados para extração sequencial das proteínas do endosperma (Wilson, Shewry e Miflin, 1981; Esen, 1986).

Como consequência da multiplicidade de métodos, solventes e condições de extração, tem sido difícil comparar os dados obtidos através desses métodos de fracionamento. Ludevid et al. (1984) e Wallace et al. (1990) argumentaram que os métodos tradicionais de fracionamento de proteínas têm pouco significado quantitativo, especialmente quando aplicados a frações protéicas que requerem redução de pontes dissulfeto para serem solubilizadas. Em geral, estes métodos têm duas limitações sérias: a extração de vários tipos de proteína de reserva é incompleta com um único solvente, e assim, essas proteínas acabam por aparecer em múltiplas frações. Por outro lado, a depender da ausência ou presença de agentes redutores, várias proteínas podem ou não ser extraídas pelo mesmo solvente. Todos esses fatos levaram a uma complexa e confusa descrição e nomenclatura para as várias classes de proteínas do endosperma do milho.

Recentemente, um novo e eficiente método que permite extração quantitativa das proteínas do endosperma foi descrito por Wallace et al. (1990). Este procedimento além de menos laborioso, permite obter e fracionar num menor período de tempo e com menor número de etapas as duas principais frações protéicas do endosperma: zeína total (proteínas de reserva) e não-zeína (restante das proteínas do endosperma). Este procedimento envolve solubilização de todas as proteínas do endosperma em um tampão alcalino contendo o detergente SDS e um agente redutor 2-mercaptoetanol. Subsequentemente as não-zeínas são precipitadas pela adição de etanol ao extrato até que a concentração alcoólica atinja 70%. Apenas as zeínas são solúveis em 70% de etanol, e desta maneira são separadas das não-zeínas que precipitam. Sendo

assim, as proteínas do endosperma podem ser obtidas em apenas duas frações distintas: as proteínas de reserva (zeínas) e as outras proteínas que não tem função de reserva (não-zeínas), conseqüentemente sua análise e quantificação são sensivelmente simplificadas.

As proteínas de reserva são hidrolisadas durante a germinação para suprir nitrogênio, enxofre e esqueletos de carbono ao embrião e à plântula durante as fases iniciais de desenvolvimento, enquanto, as proteínas restantes, albuminas, globulinas e glutelinas, são responsáveis por funções "housekeeping" e outras funções específicas necessárias para o desenvolvimento do endosperma. Entre as não-zeínas estão proteínas estruturais, inibidores de proteases, enzimas, etc. Este grupo diverso de proteínas pode atuar secundariamente como reserva, mas suas funções primárias são estruturais, de proteção da semente contra patógenos e predadores e de biossíntese. Diferentemente das não-zeínas a síntese das zeínas é muito dinâmica em resposta a fertilização nitrogenada (Tsai, Huber e Warren, 1980).

2.1.1. Zeínas, proteínas de reserva do grão do milho

As prolaminas em milho, zeínas, correspondem aproximadamente 50% a 60% da proteína total do endosperma. O padrão de síntese de zeína é típico na maioria dos cereais. Ela é pela primeira vez detectada entre 8 a 12 dias após a polinização (DAP) sua síntese atinge o máximo entre 16 e 35 DAP e continua até 40 a 45 DAP (Tsai e Dalby, 1974, Tsai, Huber e Warren, 1978, Oaks et al., 1979). Contudo, em mutantes com baixo conteúdo de prolamina tais como *opaco-2*, a síntese de zeína é atrasada e acumula aproximadamente um terço do nível normal (Larkins, 1981 e Kodrzycki, Boston e Larkins, 1989).

Análise das zeínas por fracionamento em géis de poliacrilamida revelou uma mistura de polipeptídeos que variam em tamanho de 27 a 10kD. Apesar do padrão de separação ser reproduzível em vários laboratórios, os pesos moleculares não são. Isto é uma consequência de estruturas não usuais dessas proteínas, o que causa sua migração mais ou menos rápida dependendo do seu peso molecular predito. Além

disso, as diferenças em solubilidade das zeínas em soluções alcoólicas causam sua separação em várias frações dependendo da natureza do solvente. Esses fatores têm tornado a nomenclatura das zeínas bastante complexa (Esen, 1987; Rubenstein e Geraghty, 1989). Assim, foi sugerido um sistema de classificação baseado na estrutura da proteína (Larkins et al., 1989), ao invés de na diferença de mobilidade em géis de poliacrilamida (Wilson, 1991) ou solubilidade (Esen, 1986). Com este sistema de classificação as proteínas de 22 e 19kD são chamadas de alfa-zeínas, as proteínas de 15kD são chamadas de beta-zeínas, as de 16 e 27kD são chamadas de gama-zeínas, e as proteínas de 10kD são as delta-zeínas. As alfa-zeínas são proteínas solúveis em álcool apenas, já as demais zeínas necessitam de um agente redutor.

As alfa-zeínas que correspondem a aproximadamente 70% da fração total de zeína, são estruturalmente similares umas às outras e podem ser separadas em vários polipeptídeos diferentemente carregados, por análise de focalização isoeletrica (IEF) (Hastings et al., 1984). A heterogeneidade é genótipo-específico e é herdada codominantemente em um padrão mendeliano simples (Righetti et al., 1977). A heterogeneidade tem sido usada como "fingerprinting" para distinguir genótipos do milho. (Hastings et al., 1984).

As alfa-zeínas são feitas como pré-proteínas com um peptídeo sinal 20 ou 21 aminoácidos no terminal amino (Geraghty et al., 1981; Marks e Larkins, 1982). O comprimento da proteína madura varia entre 210 a 245 aminoácidos. Todas as alfa-zeínas tem alto conteúdo de glutamina(25%), leucina(20%). alanina (15%) e prolina(11%) e nenhuma foi identificada como contendo lisina. As alfa-zeínas podem ser divididas em quatro segmentos básicos: um peptídeo sinal, uma região de dobra no terminal amino, nove sequências repetidas flanqueadas por glutaminas e a região do terminal carboxila. Dentre essas sequências uma fração distinguível nas alfa-zeínas é a presença de peptídeos repetidos em sequência de aproximadamente 20 aminoácidos na região central da proteína (Geraghty et al., 1981; Pedersen et al., 1982; Spena, Viotti e Pirrotta, 1983). Esses peptídeos repetidos variam ligeiramente em comprimento, mas pode-se verificar uma sequência de peptídeo de consenso repetida (Pedersen et al., 1982). Foi proposto que os peptídeos repetidos formem α -hlices

antiparalelas e adjacentes que interagem através de pontes de hidrogênio para dobrar as proteínas em moléculas globulares que apresentam forma cilíndrica. Pontes de hidrogênio de aminoácidos polares na superfície de peptídeos repetidos, assim como entre glutaminas nos finais dos peptídeos repetidos, podem contribuir para agregação de alfa-zeínas dentro de corpos protéicos (Argos et al., 1982).

As beta-zeínas são proteínas de 15kD que correspondem a aproximadamente 15% da fração de zeína. Esses polipeptídeos mostram menor heterogeneidade de carga do que as alfa-zeínas nas análises de focalização isoeétrica (Hurkman et al. 1981; Marks, Lindell e Larkins, 1985), cada componente é composto de somente um ou dois polipeptídeos. A proteína madura apresenta 160 aminoácidos. Esta proteína tem menos glutamina (16%), leucina (10%) e prolina (9%) do que as alfa-zeínas, mas contem significativamente mais aminoácidos sulfurados, metionina (11%) e cisteína (4%) (Pedersen et al. 1986). Diferentemente das alfa-zeínas, as beta-zeínas não contêm peptídeos repetidos. As proteínas tem muito pouco de α -helice e são compostas principalmente de domínios do tipo folhas β (Pedersen et al., 1986).

A gama-zeína é uma proteína de 180 aminoácidos, também referida como as proteínas solúveis reduzidas (Wilson, Shewry e Mifflin, 1981), glutelinas reduzidas solúveis em álcool (Paulis e Wall, 1971) ou glutelinas-2 (Prat, Cortadas e Puigdomenech, 1985). Geralmente correspondem a 20% do total de zeína (Esen, 1986), apesar de poder consistir 50% do conteúdo total de zeína (Ortega e Bates, 1983). Além de ser solúvel em álcool, as gama-zeínas são solúveis em soluções salinas, e isto contribui para sua extração em diferentes frações protéicas. Apesar de variantes de gama-zeínas terem sido isolados (Esen et al., 1982), as proteínas parecem ser primariamente uma simples espécie (Prat, Cortadas e Puigdomenech, 1985; Wang e Esen, 1986). Prat, Cortadas e Puigdomenech, (1985) reconheceu cinco regiões consecutivas distintas na sequência de 180 aminoácidos da proteína: um segmento de 11 aminoácidos no terminal amino, uma região composta de 8 cópias repetidas sequencialmente do hexapeptídeo Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu, uma sequência alternante Pro-X entre resíduos 70 e 91, e o -terminal carboxila rico em glutamina que pode ser dividido em duas partes. As gama-zeínas tem duas regiões de homologia

interna com a beta-zeínas: existe pareamentos de 10 resíduos cada entre 34 a 49 aminoácidos da beta-zeína e 112 a 125 das gama-zeínas, e entre 61 a 73 aminoácidos de beta-zeína e 130 a 141 de gama-zeínas. O fato de que elas migram mais devagar em géis de poliacrilamida do que as alfa-zeínas maiores, pode ser um reflexo de uma estrutura secundária não usual associado ao alto conteúdo de prolina (25%).

As zeínas de 10kD apresentam alta proporção de aminoácidos sulfurados, contendo aproximadamente 22% de metionina e 4% de cisteína. Esta proteína tem uma composição aminoacídica semelhante à beta-zeína (Gianazza et al., 1977). Contudo elas diferem de alguma forma das beta-zeínas devido à sua solubilidade em álcool (Esen, 1986). A delta-zeína é uma proteína pequena que apresenta 130 aminoácidos de comprimento (Kirihaara et al., 1988). Alto nível desta proteína tem sido encontrado na linhagem americana BSSS53, o que parece ter sido causado por um fator transcricional presente no cromossomo 4 (Feix e Quayle, 1993).

2.1.1.1. Síntese e deposição das zeínas em corpos protéicos

A semente de cereal é um simples fruto chamado cariopse, e é composto predominantemente de endosperma e embrião, que correspondem a aproximadamente 90% e 5%, respectivamente do peso seco da semente. Estas duas estruturas são envolvidas pela testa e pericarpo.

O desenvolvimento da semente começa com a dupla fertilização no óvulo envolvendo dois núcleos espermáticos vindos do tubo polínico e três núcleos presentes no óvulo. Um núcleo espermático se funde com o oócito e forma o zigoto diplóide (2n). O outro núcleo funde-se com os dois núcleos polares e forma o endosperma triplóide (3n). O endosperma se desenvolve mais rapidamente do que o embrião a partir do núcleo triploíde que inicia uma série de divisões. O endosperma torna-se celular por um processo de citocinese que inicia nas regiões periféricas e progride em direção ao centro do tecido. Aos 12-14 dias após a polinização, a formação da parede celular esta completa, o que é seguido por um aumento no volume celular e a síntese de grande quantidade de amido e proteína.

O endosperma não se desenvolve como um tecido homogêneo. A camada de células mais externas se diferencia em um tecido de parede fina chamado aleurona. Esta camada tem o mais alto conteúdo de proteínas solúveis do que o restante do endosperma e contém grãos de amido e corpos protéicos menores.

Amido e proteínas são os componentes mais abundantes do endosperma, sendo lipídeos e outros compostos orgânicos e inorgânicos acumulados em pequenas quantidades. As proteínas de reserva, zeínas, são sintetizadas por polissomos ligados ou envolvidos por membrana e são cotraducionalmente transportadas dentro do lúmen do retículo endoplasmático rugoso, aonde se agregam em massas insolúveis chamadas de corpos protéicos que atingem um diâmetro de 1 a 2 μm , nos genótipos normais. O amido é depositado na forma de grânulos cristalinos em amiloplastos, os quais encontram-se imersos em uma matriz amorfa.

Técnicas imunológicas têm sido utilizadas para determinar a distribuição dos vários tipos de zeínas no interior dos corpos protéicos (Ludevid et al., 1984, Lending e Larkins, 1989), bem como para verificar a distribuição dos vários tipos de corpos protéicos nas diversas regiões do endosperma em desenvolvimento (Lending e Larkins, 1989). Os corpos protéicos apresentam diferente tamanho e composição que estão associados aos diferentes estágios de maturação do endosperma. As células mais próximas à aleurona são mais jovens e meristemáticas, enquanto as mais distantes são mais maduras. Os corpos protéicos pequenos, bem próximos à aleurona, contêm somente beta- e gama-zeínas e representam os estágios iniciais do desenvolvimento de um corpo protéico apresentando, aproximadamente, 0,2 μm de diâmetro. Os corpos protéicos maiores contêm alfa-zeínas e são encontradas nas camadas de células mais centrais do endosperma. As alfa-zeínas começam a se acumular como lóculos discretos dentro de uma matriz de gama- e beta-zeínas, nos corpos protéicos. Eventualmente, os lóculos de alfa-zeínas fundem-se e preenchem o centro do corpo protéico expandindo este para um diâmetro de 1 a 2 μm (Lending e 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 e Stetler, 1992).

Segundo Coleman et al. (1996) as mudanças temporal e espacial na distribuição de zeínas nos corpos protéicos de células em desenvolvimento no endosperma, sugeriram que essas proteínas têm propriedades intrínsecas que causam sua retenção no retículo endoplasmático e que direcionam sua organização dentro dos corpos protéicos. Como a gama-zeína. é uma proteína rica em prolina (25%) devido em parte a uma serie de hexapeptídeos no terminal amino (Prat, Cortadas e Puigdomenech, 1985), e nem a gama-zeína nem qualquer outra zeína tem peptídeos HDEL ou KDEL de retenção no retículo endoplasmático (RE), então é possível que esses repetidos ricos em prolina das gama-zeínas sejam os responsáveis por sua retenção no RE. Já que as gama-zeínas estão localizadas na superfície dos corpos protéicos os hexapeptídeos repetidos também podem fornecer o mecanismo para retenção do complexo inteiro de corpo protéico, indicando que existe uma interação entre gama-zeínas e alfa-zeínas que promove a retenção de alfa-zeínas dentro de corpos protéicos.

Pouco é sabido a respeito das estruturas secundárias e terciárias das zeínas ricas em enxofre. Essas proteínas são ligadas por pontes dissulfeto, mas não está claro se existe ligação cruzada uma com a outra.

Nas sementes do milho que estão germinando, assim como em outros cereais, proteases são sintetizadas e secretadas dentro do endosperma para degradar as proteínas de reserva, assim seu nitrogênio, enxofre e esqueleto de carbono podem ser utilizados durante o desenvolvimento do embrião. As enzimas iniciais, identificadas como proteinase A¹⁴, são proteases sulfidril que clivam pontes internas de peptídeos e fazem as moléculas susceptíveis a outras proteases, incluindo carboxipeptidases, amino e dipeptidases. Segundo Barros, e Larkins (1990), existe um grupo de proteases cisteicas, denominadas A₁, A₂, A₃ e A₄, que estão envolvidas nos primeiros passos de degradação de proteínas de reserva. Estas enzimas são tipicamente ativas no período da germinação.

As proteases que degradam as zeínas são conduzidas a partir da aleurona para dentro do endosperma durante os estágios iniciais de germinação. Através de técnicas imunocitoquímicas Torrent, Geli e Ludevid (1989) demonstraram que por volta de dois dias após germinação existe uma redução notável na quantidade de gama- e beta-zeína, e em torno do oitavo dia após a germinação a maior parte dessas proteínas já foram degradadas. Como os corpos protéicos apresentam a maior parte de gama- e beta-zeínas próximas à superfície do grão seria esperado detectar rápido e preferencialmente desaparecimento dessas proteínas. Em contraste com as proteínas ricas em enxofre, as alfa-zeínas parecem ser hidrolizadas mais devagar nas sementes em germinação. Isso ocorre porque essas proteínas estão localizadas mais centralmente nos corpos protéicos e são muito menos solúveis do que as gama- e beta-zeínas (Larkins, Lending e Barros, 1991).

2.1.1.2. Organização e estrutura dos genes que codificam as zeínas

Apesar da análise das zeínas nos géis de poliacrilamida indicar que esta fração solúvel em álcool é composta de uns poucos componentes, a separação por focalização isoeletrica (IEF) mostra que existe heterogeneidade de carga dentro de cada um dos componentes fracionados em gel de poliacrilamida (Righetti et al., 1977; Soave et al., 1975). As zeínas podem ser separadas em tanto quanto 25 componentes dependendo do genótipo do milho (Hagen e Rubstein, 1981; Righetti et al., 1977). A microheterogeneidade encontrada nas zeínas indica que alguns polipeptídeos dentro dos dois maiores componentes fracionados em gel de poliacrilamida são consequência da heterogeneidade genética mais do que de artefatos de preparação.

A complexidade entre as alfa-zeínas demonstrada por análises de focalização isoeletrica tem sido demonstrada também entre os genes. Os clones de c-DNA hibridam com múltiplas sequências codificadoras no genoma, deixando uma estimativa de 75-150 genes (Hagen e Rubenstein, 1981; Wilson e Larkins, 1984). Contudo, parece existir uma ou duas cópias de genes que codificam gama- e beta-zeínas (Wilson e Larkins, 1984; Boronat et al., 1986).

Os genes que codificam as alfa-zeínas estão localizados nos cromossomos 4, 7 e 10. Sete genes que correspondem às alfa-zeínas de 19 e 22kD estão mapeados no braço curto do cromossomo 7. Um conjunto de nove genes que correspondem às alfa-zeínas de 19 e 22kD estão mapeados nos braços curto e longo do cromossomo 4. Um terceiro loco correspondendo a zeína de 22kD está no braço longo do cromossomo 10 (revisado por Shotwell e Larkins, 1989). A comparação dessas sequências indica que as duas maiores classes de genes de alfa-zeínas provavelmente originaram-se de um gene ancestral comum que divergiu por deleções, substituição de bases, inserções e duplicações internas resultando em subfamílias distintas de genes de alfa-zeínas (Marks, Lindell e Larkins, 1985).

Existem evidências de ligação entre alguns dos genes das alfa-zeínas. Vários clones genômicos têm sido isolados que contêm múltiplos genes espaçados dentro de poucos pares de Kilobases (revisado por Shotwell e Larkins, 1989). Esses genes estão arranjados em série de 5' para 3', e as sequências de DNA flanqueiam regiões codificadoras conservadas. Fora dessas regiões conservadas existem regiões que são de moderadamente a altamente repetitivas. As regiões conservadas que flanqueiam os genes contêm promotores eucarióticos e sequências de poliadenilação. As sequências que codificam as zeínas não contêm íntrons. A família multigênica das zeínas é dividida em subfamílias de genes fortemente relacionados e seus correspondentes mRNAs e proteínas. Os genes (e proteínas) membros de uma subfamília são mais relacionados com relação a sua sequência de nucleotídeos (aminoácidos) com os outros membros da sua própria subfamília (Park, Lewes e Rubenstein, 1980). A divisão da família multigênica de zeínas em subfamílias de mRNAs e seus genes correspondentes pode ser feita com base no relacionamento de sua sequência nucleotídica.

Para as classes de zeínas, 10, 15, 16 e 27kD, têm sido identificados um ou poucos genes para cada proteína. O gene que corresponde a delta-zeína de 10kD foi mapeado no cromossomo 9 (Berner et al., 1989). Análise de RFLP foi utilizada para localizar os genes correspondentes a beta-zeína de 15kD e gama-zeína de 27kD nos cromossomos 6 e 7, respectivamente (Murray et al., 1988). O gene da zeína de 27kD, rica em prolina, está presente em uma cópia ou como uma duplicação em tandem de

12kb com dois genes funcionais chamados A e B, dependendo da variedade de milho (Das e Messing, 1987; Das et al., 1991). Algumas linhagens contêm ainda um gene A rearranjado (gene Ra) que parece ser gerado de um evento de recombinação que conduziu à excisão do gene B. O gene posicionado a jusante da duplicação fornece maior acúmulo de mRNA do que o primeiro. Uma pequena diferença na parte 3' dos dois genes foi proposta como sendo a causadora da diferença na atividade do gene. O gene A contém três sítios Pst1 e o gene B apenas dois. A proteína 27kD também ocorre como uma proteína truncada de 16kD. O gene que codifica para essa proteína é quase homólogo ao que codifica a proteína regular de 27kD, mas as regiões flangeadoras apresentam homologia moderada. É interessante notar que os locos que codificam a delta-zeína de 10kD, a beta-zeína de 15kD e a gama-zeína de 27kD foram todos mapeados na região centromérica dos seus respectivos grupos de ligação.

Comparação de sequências que flanqueiam as várias zeínas revelaram que elas não apresentam homologia significativa. Com exceção de uma sequência de 15 nucleotídeos que começa na posição -331 nos genes que codificam as zeínas de 19kD e na posição -340 nos genes que codificam as zeínas de 22kD, a qual é comum para todos os genes de alfa-zeínas. Ainda dentro desta região existe uma sequência altamente conservada de 7 nucleotídeos chamada de elemento -300, sendo a mesma comum nas regiões que flanqueiam os genes que codificam gama- e beta-zeínas e nos promotores que correspondem aos genes das prolaminas do trigo e cevada. A presença desta sequência em um certo número de genes cuja a expressão ocorre no endosperma sugere que, este elemento pode ser importante para a expressão endosperma-específico (revisado por Thompson e Larkins, 1989 e Feix e Quayle, 1993).

2.1.1.3. Mutantes que alteram a síntese de zeínas

A mutação *opaco-2* (*o2*) em milho foi primeiro identificado por Singleton e Jones durante a década de 30 (Emerson, Beadle e Frazer, 1935). O efeito desta mutação no acúmulo de proteínas no grão foi estabelecida quase 30 anos mais tarde

por Mertz, Bates e Nelson (1964). Esses autores demonstraram que a mutação *o2* tinha o efeito de gerar um melhor balanço de aminoácidos na proteína do grão. Mais notável foi o aumento na percentagem de lisina comparado ao encontrado no milho normal. Este aumento foi uma consequência da expressão reduzida da fração de prolaminas (zeínas), que é deficiente nos aminoácidos lisina e triptofano (Mertz, 1976).

Desde que foi descoberto o mutante *o2*, vários outros mutantes foram encontrados que reduzem o conteúdo de zeína, como: *opaco-5*, *opaco-6*, *opaco-7*, *floury-2*, *floury-3*, *B-30 defectivo* e *mucronato* (Nelson, Mertz e Bates, 1965; Misra et al., 1972; McWhirter, 1971; Dalby e Tsai, 1975; Ma e Nelson, 1975; Salamini et al., 1979; Salamini et al., 1983). Estes são coletivamente denominados como mutantes de alta lisina. Algumas dessas mutações alteram a síntese de certos grupos de polipeptídeos mais do que de outros (Di Fonzo et al., 1991), entretanto, em todas a quantidade total de zeína sintetizada é bastante reduzida (Pedersen et al., 1982). Nenhum desses genes mutante é um gene estrutural para um polipeptídeo zeína porque cada uma dessas mutações afeta a síntese de mais do que uma proteína. Por esta razão, eles são considerados regulatórios (Di Fonzo et al., 1980; Ma e Nelson, 1975; Nelson, 1969). Com exceção dos mutantes *floury-2*, *floury-3* e *mucronato* que tem efeito de dosagem na opacidade do grão e conteúdo de zeína e do *defectivo B-30* que é dominante (Jones, 1978; Soave et al., 1978; Salamini et al., 1979, 1983), todos os locos são recessivos em afetar a síntese de zeína e a opacidade do grão.

As mutações *opaco-2* e *defectivo* estão localizadas no cromossomo 7, enquanto, as mutações *B-30*, *floury-2* e *opaco-7* encontram-se nos cromossomos, 4, 10, respectivamente. As mutações *opaco-2* e *defectivo B-30* afetam primariamente as alfa-zeínas de 22kD (Lee et al., 1976). As mutações *opaco-6* e *floury-2* reduzem os níveis de todas as zeínas. E o mutante recessivo *opaco-7* reduz preferencialmente a alfa-zeína de 19kD.

Nas combinações de duplos mutantes envolvendo somente mutantes com alta lisina *opaco-2* e *opaco-7* são epistáticos ao *floury-2*, mas são aparentemente sinérgico com o *mucronato* em suprimir a síntese de zeínas. *Opaco-2* e *opaco-7* atuam de uma maneira aditiva para inibir a síntese de zeína. Esses mutantes mostram

taxa de acumulação de zeína mais baixa durante o desenvolvimento, enquanto *floury-2* mostra níveis intermediários entre o normal e *opaco-2*.

Os mutantes para alta lisina afetam adversamente várias características agrônômicas importantes, incluindo características do grão. Além do baixo conteúdo de zeínas, esses mutantes tem vários fatores em comum como: endosperma macio e farináceo e redução no acúmulo da matéria seca produzida o que é refletido em menor produção, peso de grão e densidade de grão do que no indivíduo normal.

Dentre os mutantes anteriormente mencionados, o mais conhecido e estudado, ao nível molecular é o *opaco-2*. Estudos de síntese de zeínas durante o desenvolvimento do endosperma indicaram que os mutantes *o2* tem baixo índice de acúmulo de zeínas quando comparados com genótipos normais. Tais mutantes acumulam pouca quantidade de zeína depois de 35 dias da polinização, em contraste com os genótipos normais que continuam acumulando zeínas durante as fases posteriores do desenvolvimento do grão (Tsai e Dalby, 1974; Dalby e Tsai, 1975). Kodrzycki, Boston e Larkins (1989) mostraram que a síntese de zeínas em genótipos *o2* é atrasada ou reduzida em relação aos genótipos isogênicos normais. A alfa-zeína de 19kD não é detectada até os 14 dias após a polinização (DAP), enquanto a alfa-zeína de 22kD é encontrada em quantidades bastante reduzidas no endosperma mutante. A beta-zeína de 15kD e as gama-zeínas de 16 e 27kD são detectáveis por volta de 12 DAP, e seu acúmulo não é drasticamente afetada pela mutação *o2*. Análises ultraestruturais mostraram que a drástica redução em síntese de alfa-zeínas leva a redução no diâmetro dos corpos protéicos. Geralmente, os corpos protéicos apresentam diâmetro entre 0,1 e 0,3 μm no endosperma mutante em desenvolvimento (18-22 DAP), enquanto no genótipo normal o diâmetro dessas estruturas está em torno de 1 a 2 μm .

Análises imunocitoquímicas revelaram que os corpos protéicos no endosperma mutante contêm primariamente beta- e gama-zeínas, com pequenos glóbulos de alfa-zeínas imersos na matriz protéica (Lending e Larkins, 1989; Geetha et al., 1991).

O milho *opaco-2* tem mais alto conteúdo de lisina do que o normal porque contem uma proporção mais elevada de albuminas, globulinas e glutelinas e menos da

fração zeína, que constitui aproximadamente 50% da proteína total do endosperma do milho normal e não contem quase nenhuma lisina e triptofano. O efeito da mutação na síntese de zeína e não-zeína não é uniforme nos diferentes genótipos. Esta diferença pode ser resultado de diferentes "backgrounds" genéticos, diferença nos alelos, ou pela ação de outros genes ou por ambos (Moro et al., 1996).

O gene *Opaco-2* contem 5 íntrons e 6 éxons e codifica uma proteína que contem de 437 a 460 aminoácidos e compartilha sequência similar com o domínio zíper de leucina que parecia-se com o DNA. Este domínio é característico de vários oncogenes de mamíferos e fatores que ativam a transcrição nos fungos. Este domínio é bipartido, consistindo de uma repetição periódica de leucina a cada sete aminoácidos, que corresponde ao zíper, e um domínio adjacente de carga positiva correspondendo ao domínio básico que é o responsável pelo reconhecimento da sequência específica do DNA. Essa proteína é capaz de se ligar a sequências específicas localizadas na região promotora dos genes da alfa-zeína de 22kD (Schmidt et al., 1992), atuando como um transativador transcricional positivo para os genes das zeínas (Schmidt, Burr e Burr, 1987; Schmidt et al., 1992; Ueda et al., 1992). Vários estudos mostraram que a redução de zeínas no endosperma mutante está correlacionada com a redução nas concentrações dos mRNAs correspondentes (Pedersen et al., 1980; Burr e Burr, 1982; Marks, Lindell e Larkins, 1985). Através de estudos de pareamento com o DNA foi mostrado que a proteína O2 ou um fragmento desta proteína que contem o domínio zíper de leucina parecia-se especificamente com uma região próxima ao elemento -300 (Schmidt et al., 1990; Aukerman et al., 1991). O alvo regulatório do O2 está situado aproximadamente 20 bp a jusante do elemento -300 (Schmidt et al., 1992).

Além das zeínas o O2 também regula a expressão de uma proteína solúvel em água (albumina) de 32kD, chamada de b-32. Esta proteína também é afetada pelas mutações no loco *opaco-6* e é uma proteína que inativa o ribossomo (RIP). As RIPs são um grupo de proteínas tóxicas que funcionam como N-glycosidases para remover uma adenina específica do rRNA 28S, requerido para a ligação do fator de alongação 1α , conduzindo, assim, ao bloqueio da tradução (Endo e Tsurugi 1987), o que sugere

um possível envolvimento desta proteína como um agente de defesa contra ataque de patógeno (Bass et al., 1992).

O grão do *opaco-2* é macio e farináceo. Outros efeitos secundários inclui pericarpo mais fino, secagem mais demorada depois de maturidade fisiológica do grão, mudança em intensidade de cor (especialmente nos materiais amarelos) e maior susceptibilidade a pragas de grãos armazenados.

2.1.2. Não-zeínas, as proteínas nutricionalmente ricas do endosperma do milho

A percentagem de aminoácidos essenciais lisina e triptofano no endosperma do milho é influenciada por dois componentes principais: a quantidade de aminoácidos livres no endosperma e acúmulo de não-zeína. Somente 5% da lisina do endosperma é de origem não protéica (Mehta et al., 1979), fazendo com que a contribuição do pool de aminoácidos livres seja pequena. Na verdade, a maioria da lisina e triptofano acumulados no endosperma se originam da fração não-zeína, que é composta de albuminas (proteínas solúveis em água), globulinas (proteínas solúveis em soluções salinas) e glutelinas (proteínas solúveis em detergentes) (Murphy e Dalby, 1971; Wallace et al., 1990; Habben, Kirleis e Larkins, 1993). Estas proteínas, que em média contêm 5% de lisina perfazem funções metabólicas e estruturais no endosperma, como discutido anteriormente.

Tradicionalmente, a fração não-zeína do endosperma tem sido caracterizada pelas suas propriedades físico-químicas (Doll, 1977). No entanto, para melhor entender sua contribuição para determinação da qualidade do grão, e para alterar sua acumulação visando melhoria nutricional, é importante que se determine sua origem celular e função dos componentes individuais que contribuem com quantidades razoáveis de aminoácidos essenciais para o endosperma.

A mutação *opaco-2* em milho tem se tornado uma das ferramentas mais valiosas no estudo da fração não-zeína do endosperma. Mertz, Bates e Nelson (1964) determinaram que grãos mutantes, que têm fenótipo mole e farináceo, acumulam duas vezes mais lisina e triptofano, quando comparadas com grãos de milho normal. O alelo

opaco-2 codifica um ativador de transcrição que regula expressão dos genes da alfa-zeína de 22kD (Schmidt et al., 1992). Drástica redução no acúmulo de zeínas no mutante está associada a aumentos significativos no acúmulo de não-zeínas, sendo esta a causa da sua melhor composição nutricional (Lopes, 1993; Habben, Kirleis e Larkins, 1993). Apesar do reduzido acúmulo de zeínas no mutante ser esperado, o aumento na síntese de mRNAs e proteínas da fração não-zeína não é facilmente explicado, com base no que se sabe a respeito da função transativador *opaco-2*.

Mertz (1976) sugeriu que o aumento no acúmulo de não-zeínas no mutante *opaco-2* pode ser consequência da canalização do nitrogênio não utilizado na produção de alfa-zeínas para produção de outras frações protéicas. No entanto, se esta hipótese é verdadeira, espera-se que todos os polipeptídeos que compõem a fração não-zeína aumentem coordenadamente no mutante. Habben, Kirleis e Larkins (1993) demonstrou que este não é o caso, uma vez que apenas um grupo de polipeptídeos da fração não-zeína é significativamente afetado pela mutação. Este resultado sugere que o efeito pleiotrópico desta mutação é específico para genes que codificam um grupo exclusivo de proteínas do endosperma. Resultados semelhantes foram encontrados em um mutante de cevada com alta qualidade nutricional, onde apenas 4 proteínas são responsáveis por 17% da lisina do grão (inibidores de quimiotripsina CI-1 e CI-2, beta-amilase e proteína Z) (Hejgaard e Boisen, 1980). É possível que proteínas relacionadas ou semelhantes em milho também contribuam com significativas quantidades de lisina para o grão.

2.2 Genótipos *opaco-2* modificados

Os efeitos indesejados correlacionados com a mutação *opaco-2* podem ser alterados com o auxílio de modificadores genéticos. Genes conhecidos como modificadores de *o2* alteram o fenótipo destes mutantes levando ao desenvolvimento de endosperma vítreo e duro. Os modificadores de *opaco-2* tem sido usados para desenvolver milho de alta-lisina com melhor qualidade de proteína na semente (Vasal et al., 1980). Estudos de mutantes *opaco-2* modificados indicaram que a conversão do

Uma importante consideração na modificação genética do grão é o seu efeito na qualidade e quantidade de proteína. Vasal (1975), Vasal et al. (1980,) e Glover e Mertz (1987) relataram que o conteúdo de proteína aumenta com o aumento da modificação do grão. Grãos parcialmente modificados tendem a ter maior conteúdo de proteína, com a fração vítrea tendo maior conteúdo de proteína do que a macia fração opaca. O efeito na qualidade de proteína pode variar dependendo da extensão de modificação do grão e do "background" genético do material. Gentinetta, Maggiore e Salamini (1975) relatou a não existência de diferenças na qualidade de grãos opacos não-modificados e modificados. Vasal (1975) e Ortega e Bates (1983), contudo, relataram uma correlação negativa entre o fenótipo vítreo do grão e qualidade nutricional. Variação na relação existe entre populações e entre famílias na mesma população. Experimentos de melhoramento de qualidade realizados no CIMMYT indicam que durante a seleção recorrente para modificação do grão a qualidade deve ser constantemente monitorada para se obter progressos com a seleção.

O peso do grão e a densidade dos grãos modificados também podem ser afetados pelos modificadores (Vasal et al., 1980), existindo variação entre e dentro da populações. A seleção contínua para aumento da modificação do grão e peso do grão em homozigotos sintéticos *opaco-2* ou populações conduzem a populações que quase se igualam a populações de endosperma normal na produção (revisado por Bjarnason e Vasal, 1992). Lopes e Larkins (1995) mostraram que a densidade da semente e o conteúdo de zeína total são positivamente relacionados com um valor de R^2 de 0,30 ($P < 0,01$); porém a densidade da semente é muito melhor correlacionada com o acúmulo de gama-zeína no endosperma ($R^2 = 0,82$ $P < 0,01$), e inversamente correlacionada com o acúmulo de não-zeína ($R^2 = 0,42$ $P < 0,01$).

Apesar do conhecimento do mecanismo molecular da mutação *opaco-2*, as bases do aumento pleiotrópico do conteúdo de lisina no grão ainda não é entendido. O conteúdo de lisina no endosperma é primariamente dependente da quantidade de não-zeínas, mas isto também é influenciado pela concentração de lisina na fração não-zeína, sugerindo que proteínas específicas nesta fração tem um impacto maior no conteúdo de lisina. Moro et al. (1996) encontraram que o fator de alongação 1α (EF-

1 α) como sendo uma das várias proteínas significativamente aumentada no endosperma o2. Esta proteína tem uma correlação considerável com o conteúdo de lisina, sendo esta relação verdadeira também para outros cereais. Entretanto, estudos mostraram que a EF-1 α contem apenas 2-3% do total da lisina do endosperma, logo a alta correlação encontrada deve refletir um agrupamento entre EF-1 α e outras proteínas ricas em lisina. Clore, Dannenhoffer e Larkins (1996) sugeriram que EF-1 α e actina estão associados nas células do endosperma do milho e isso pode explicar a base da correlação encontrada entre a concentração de EF-1 α e o conteúdo de lisina.

2.3 Genótipos com alta concentração de proteína

O experimento de seleção divergente clássica para alto e baixo conteúdo de proteína em grão de milho conduzido na Estação Experimental de Agricultura de Illinois tem fornecido valiosas informações sobre as possibilidades e limitações de seleção recorrente para simples caracteres poligênicos. A seleção foi iniciada em 1896 através de avaliação de 163 espigas de polinização aberta da variedade Burr's White para percentagem de óleo e percentagem de proteína. Vinte quatro espigas com percentagem de proteína mais elevada (IHP) e doze espigas com mais baixa percentagem de proteína foram selecionadas (ILP), juntamente com vinte quatro espigas e doze espigas que apresentavam níveis de óleo mais alto (IHO) e mais baixo (ILO), respectivamente. Posteriormente, o processo seletivo foi dividido em quatro segmentos: no primeiro segmento houve apenas seleção massal baseada na composição química das espigas; no segundo segmento foi realizada seleção espiga por fileira; e nos terceiro e quarto segmentos procederam a seleção recorrente recíproca. Na geração 48, foi iniciada uma seleção reversa para cada população, originando: RHP e RLP, seleção reversa para alta e baixa percentagem de proteína; e RHO e RLO, seleção reversa para alta e baixa percentagem de óleo, respectivamente.

Segundo Dudley, Lambert e Alexander (1974), após 70 gerações de seleção, o conteúdo de proteína tinha aumentado de 10,9% na população original para 26,6% no Illinois high protein (IHP). Depois de 76 gerações de seleção, Dudley (1977) concluiu

que os limites teóricos para a seleção não tinham sido alcançados e que a frequência do alelo favorável para percentagem de proteína, na população original, seria menor do que 0.37 e que o número de locos diferenciando IHP e ILP era igual a 122 locos. Após 90 gerações de seleção, Dudley e Lambert (1991) concluíram que os limites teóricos de seleção só tinham sido atingidos para duas populações (ILP e ILO) e estimaram que a frequência do alelo favorável na população original era igual a 0,32, ligeiramente menor do que o calculado após 76 gerações de seleção. Além disso, também foi estimado por esses autores que o número de locos diferenciando IHP e ILP era igual a 173 locos, ligeiramente maior do que o calculado anteriormente para 76 gerações de seleção. Nesse trabalho foi observado que existia uma correlação negativa entre percentagem de amido e percentagem de proteína no grão da população IHP, o aumento de um ponto percentual de proteína correspondia ao decréscimo de 1,50 pontos percentuais em amido. Logo, existia correlação negativa entre produção de grãos e percentagem de proteína na população IHP.

2.4 Relação entre qualidade nutricional e produtividade

O progresso feito visando aumentar o potencial genético do milho para melhorar a concentração de proteínas na semente e a qualidade nutricional tem sido limitado devido a existência de correlações negativas entre produção de grãos, concentração de proteína e qualidade nutricional. Como o amido é o maior componente da semente, esta relação adversa é, então, uma associação essencialmente negativa entre os conteúdos de amido e de proteína que são os reservatórios primários de carbono e nitrogênio no tecido do endosperma. A proporção relativa de amido e proteínas no endosperma, como por exemplo a relação C/N, é determinada pela fonte de nitrogênio, demanda de reserva e a interação entre eles (Axtell, 1981).

Existe uma correlação positiva entre o acúmulo de zeína e a produção em grão, sendo assim em níveis altos de fertilização de nitrogênio a síntese de zeína é muito maior no genótipo normal do que em genótipos *opaco-2*. As diferenças na produção de grão entre esses dois genótipos torna-se maior com o aumento de nitrogênio, enquanto

a fração não-zeína aumentou em taxa similar em ambos os genótipos (revisado por Tsai, 1979a).

A correlação positiva entre conteúdo de zeína, peso do grão e produção de grãos pode ser explicada da seguinte maneira: Os íons de nitrato e amônio são absorvidos pela raiz, porém a assimilação de amônia e sua subsequente interconvenção em N orgânico, durante o desenvolvimento do grão, requer a disponibilidade de ácidos orgânicos como por exemplo o ácido alfa-cetoglutárico que é derivado da sacarose. E em resposta às altas concentrações de amônia uma maior quantidade de sacarose é translocada a partir das folhas para fornecer energia e esqueletos de carbono essenciais para assimilação de amônia e interconvenções em N orgânico. Assim, o movimento de sacarose para os tecidos ricos em N pode aumentar a fixação de CO₂ nas folhas. O aumento na eficiência fotossintética, e a translocação de compostos nitrogenados e sacarose para dentro do reservatório do grão, que é considerado um reservatório para fotossintatos deveria promover a síntese de amido e, logo, aumento da produção. Já que, o nitrato diferente de amônia pode ser acumulado sem assimilação, a mistura de íons de amônio e nitrato pode funcionar como um tampão otimizando a utilização de N. A amônia aumenta o movimento imediato de sacarose das folhas e aumenta a eficiência fotossintética, enquanto o nitrato funciona como uma reserva de nitrogênio para ser reduzida mais tarde pela nitrato e nitrito redutase antes da assimilação. Esses componentes nitrogenados são estocados temporariamente nas folhas durante o período de crescimento vegetativo. Aproximadamente 60% do N final presente no grão esta armazenado nas folhas e 40% é obtido do solo. Apenas uma pequena quantidade de N no grão pode resultar de aminoácidos livres, o que gera um potencial osmótico a favor da água, mas reduz o movimento de soluto dentro do grão. Então, a resposta da produção de grão a fertilização nitrogenada é aumentada pela presença de um grande reservatório de nitrogênio no grão. Como as zeínas e glutelinas constituem aproximadamente 80% das proteínas do grão elas são consideradas o maior reservatório de nitrogênio. No entanto, ao contrário das glutelinas, a zeína é a maior proteína de reserva e sua síntese pode ser manipulada prontamente pela fertilização nitrogenada, sendo esta ultima positivamente relacionada com a produção de grãos (revisado por Tsai, Huber e Warren, 1978).

Como zeína é deficiente em lisina e triptofano, aminoácidos essenciais na dieta de humanos e animais monogástricos, a síntese de uma quantidade máxima de zeína sob altos níveis de fertilizante pode aumentar a produção de grãos, mas reduzir a qualidade nutricional. Segundo Tsai, Huber e Warren (1980), em grãos normais, esses dois aminoácidos essenciais, assim como a percentagem de proteína, decresceram com o aumento do nível de fertilizante. O decréscimo na qualidade nutricional com fertilização nitrogenada foi um resultado da síntese preferencial de zeína no endosperma normal. O mutante *opaco-2*, por outro lado, falhou em depositar nitrogênio adicional nas zeínas, logo os aminoácidos na percentagem de proteína básica permaneceram constantes indiferentes ao nível de nitrogênio. Apesar de genótipos mutantes conterem mais lisina e triptofano do que o normal em base de percentagem, a produção desses aminoácidos em base de área(Kg/ha) eram comparáveis.

Por outro lado, a seleção meramente baseada em indivíduos que acumulam grandes quantidades de zeína em um dado nível de fertilizante nitrogenado pode não maximizar o potencial de produção de grãos. A percentagem de zeína pode ser negativamente correlacionada com a produção de grãos entre os híbridos (revisado por Tsai, Huber e Warren, 1980). O cultivar Illinois High Protein que contém aproximadamente 27% de proteína, com a zeína sendo o principal componente (Dudley, Lambert e Alexander, 1974), é um bom exemplo, pois a síntese de uma grande quantidade de proteína neste cultivar levou à diminuição no acúmulo de amido resultando em produção reduzida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético

Neste estudo foram utilizados indivíduos F₂ do cruzamento entre CMS52-QPM ("Quality Protein Maize") x IHP ("Illinois High Protein"). A população experimental CMS52 é uma variedade sintética precoce, semi-dentada e amarela que foi originada do intercruzamento de 12 linhagens QPM elite desenvolvidas pelo programa de melhoramento de milho de alta qualidade nutricional do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, EMBRAPA - Sete Lagoas, MG. Esta população contém a mutação *opaco-2*, que eleva a qualidade nutricional do grão do milho (Mertz, Bates e Nelson, 1964), e genes modificadores que mantêm a qualidade física do endosperma (Lopes, 1993). A população IHP foi originada de um processo seletivo iniciado em 1896 pela análise de 163 espigas da variedade de polinização aberta "Burr's White" para aumento da quantidade de proteína total no endosperma do grão do milho (Dudley, 1977).

Uma vez que o fenótipo do endosperma pode ser afetado por condições de fertilidade do solo, optou-se por plantio no verão em área homogênea de solo aluvial fértil. Adubação de base e de cobertura foram realizadas de acordo com resultados de análise de solo visando proporcionar condições ótimas para o desenvolvimento das plantas. Três fileiras de cinco metros foram plantadas com as sementes do híbrido interpopulacional, sendo covas espaçadas em 20cm e uma semente depositada em cada uma.

Sementes do híbrido F1 obtido do cruzamento entre CMS52-QPM ("Quality Protein Maize") x IHP ("Illinois High Protein") foram semeadas. O plantio foi realizado

em área experimental do CNPMS/EMBRAPA em Setembro de 1995. Cada planta F_1 foi autofecundada e espigas individuais F_2 foram colhidas em janeiro de 1996. Sementes acerca de 2cm da base e da ponta de cada espiga F_2 foram descartadas por serem, normalmente, não representativas da população. Para este estudo, cinco espigas F_2 , bem formadas, foram selecionadas com o objetivo de obter uma amostra representativa da variabilidade genética presente em toda população de indivíduos F_2 . Essas espigas segregavam para o fenótipo *opaco-2* (contribuição do genitor CMS52 QPM) na proporção de 3 grãos vítreos: 1 grão semi-opaco. É importante ressaltar que, devido ao fato do genitor CMS52 QPM conter genes modificadores que levam à produção de endosperma vítreo em mutantes *opaco-2*, as progênies F_2 de fenótipo *opaco-2* também segregam para modificação do endosperma (Lopes, 1993). De cada espiga F_2 selecionada, vinte grãos foram selecionados para análise, sendo dez grãos semi-opacos e dez grãos normais (Figura 1). Assim foram constituídos cinco bulks F_2 diferentes, cada um contendo uma mistura de vinte sementes, dez de fenótipo semi-opaco e dez de fenótipo normal. Os bulks F_2 foram identificados como, 1, 4, 6, 9 e 10 mantendo a numeração dada no momento da colheita. Para o preparo das amostras utilizou-se um bisturi a fim de remover o embrião e escutelo dos grãos individuais. A maceração do endosperma e todas as análises posteriores foram feitas grão a grão, pois na geração F_2 os indivíduos são geneticamente diferentes entre si.

Para este estudo foi também utilizada a população experimental de polinização aberta CMS475 QPM, uma população precoce originada da introgressão de 25% da população Illinois High Protein (IHP) na população CMS52 QPM (75%). A população resultante foi selecionada para apresentar, dentre outras características agrônômicas desejáveis, grãos amarelos do tipo semidente. CMS475 QPM foi sintetizada com o objetivo de se desenvolver genótipos de alta qualidade nutricional com capacidade de acúmulo de elevadas quantidades de proteína no endosperma. Esta população oferece também a oportunidade de se estudar fatores que controlam acúmulo de proteínas de alto valor nutritivo no endosperma do milho.

Duzentas e trinta e uma famílias S1 foram obtidas por autofecundação da população CMS475 QPM. De cada família S1 foram selecionados vinte grãos semi-

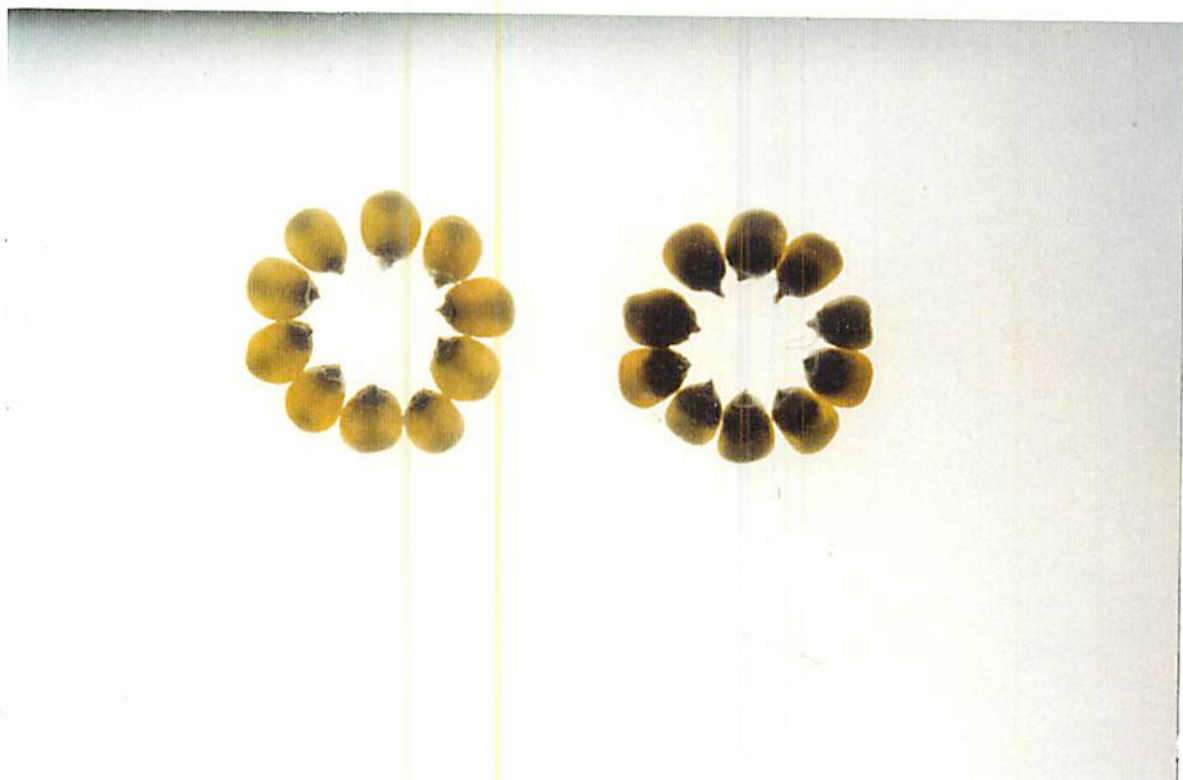


Figura 1 – Seleção visual de vinte grãos de cada amostra F_2 , sendo dez grãos de fenótipo semi-opaco (à direita) e dez grãos de fenótipo normal (à esquerda).

opacos, dos quais se retirou o embrião e escutelo, conforme anteriormente descrito. Os endospermas dos vinte grãos selecionados foram posteriormente moídos em moinho tipo ciclone e o pó obtido foi armazenado à temperatura ambiente.

3.2 Caracterização bioquímica das proteínas do endosperma

3.2.1. Extração e fracionamento das proteínas do endosperma

3.2.1.1. Obtenção das frações zeína e não-zeína

Pesaram-se 50 mg do endosperma moído e adicionou-se às amostras 1 ml de tampão borato (Borato 12,5 mM pH 10,0; 1% SDS; 2% 2-mercaptoetanol). A seguir, as amostras foram homogeneizadas em vortex (Genie 2) para ressuspender o tecido no tampão de extração e foram agitadas vigorosamente durante a noite, à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g em microcentrífuga (Eppendorf modelo 5415) por 15 minutos. Do sobrenadante, composto de proteínas totais do endosperma, foram pipetados 300µl para microtubos eppendorf de 1,5 ml e adicionou-se 700µl de isopropanol. Após homogeneização em vortex (Genie 2), as amostras foram incubadas a 37°C, em banho-maria, por uma hora, para promover a precipitação da fração não-zeína, de acordo com Wallace et al. (1990). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g em microcentrífuga (Eppendorf modelo 5415) por 15 minutos. O sobrenadante, com volume final de 1000 µL representado pelas zeínas, foi transferido para outro microtubo e seco em centrífuga a vácuo (HETO Equipments) por aproximadamente 5 horas. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em 50 µl de tampão da amostra 1X (Tris 62,5 mM, pH 6,8; SDS 2,0%; glicerol 10%; 2-βmercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,5%) e fervidas por 5 minutos para solubilizar as proteínas. O precipitado, representado pelas não-zeínas, foi seco à temperatura ambiente, ressuspensado em 50 µl de tampão da amostra 1X e as amostras foram fervidas por 5 minutos.

3.2.2. Eletroforese das frações protéicas em gel de poliacrilamida

Os polipeptídeos que constituem as frações zeína e não-zeína dos genitores CMS52 e IHP e dos indivíduos F₂ foram separados eletroforeticamente em géis gradiente de poliacrilamida. A distribuição dos indivíduos F₂ e dos genitores nos géis de poliacrilamida está apresentada nas Figuras 1A a 20A. É válido ressaltar que, os genitores foram analisados junto a cada bulk F₂, sendo os mesmos considerados como padrão.

Os géis de poliacrilamida foram preparados em sistema desnaturante descontínuo (Laemmli, 1970) consistindo de dois sistemas, o gel empilhador e o gel separador. O primeiro continha Tris 0,125M pH 6,8, SDS 0,1% e acrilamida 6%, enquanto o segundo continha Tris 0,375M pH 8,8, SDS 0,1% e gradiente de acrilamida de 7,5 a 18%. A separação eletroforética foi realizada em cuba vertical Bio-Rad em tampão de corrida (Tris 0,5M, pH 8,8; glicina 1,92M, pH 8,3 e SDS 0,1%) com voltagem inicial de 100 volts até que o azul de bromofenol penetrasse no gel separador e, posteriormente, a 40 volts para as zeínas e 50 volts para não-zeínas, durante a noite. Aplicou-se o equivalente a 2,4mg de endosperma (8µl) das amostras de zeínas e para as não-zeínas aplicou-se o equivalente a 7,5mg de endosperma (25µl da amostra).

Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,15% p/v; etanol 50%; ácido acético 10%) durante o dia e descorados em solução contendo etanol 5% e ácido acético 10%, para visualização das bandas.

Os polipeptídeos das frações protéicas do endosperma separados eletroforeticamente em géis gradiente de poliacrilamida, foram analisados através de varredura em densitômetro a laser (Personal Densitometer SI - Molecular Dynamics). Cada polipeptídeo das frações zeína e não-zeína foi devidamente numerado para facilitar análise comparativa entre indivíduos da geração segregante. Esta análise está baseada na intensidade de coloração por Coomassie blue brilhante. Tal intensidade de coloração é equivalente à concentração de cada polipeptídeo e, por isso os valores de absorbância, obtidos com o auxílio do Image Quant Program (Personal

Densitometer SI - Molecular Dynamics), foram utilizados para o cálculo do percentual de cada polipeptídeo pertencente às frações zeína e não-zeína.


3.2.3. Delineamento estatístico

Para analisar os valores de absorvância (obtidos por densitometria a laser) das frações protéicas (zeína e não-zeína) presentes no endosperma dos genitores CMS52 e IHP e dos indivíduos F_2 , foi utilizado o delineamento em blocos aumentados. Esse delineamento foi escolhido porque a pequena quantidade de material obtido de cada indivíduo F_2 impediu a repetição dos tratamentos e, ele permitia análise de tratamentos não repetidos, apesar de ocorrer aumento no erro padrão das médias, diminuindo a precisão da análise. Os tratamentos não repetidos são chamados de regulares (indivíduos F_2) e os tratamentos repetidos são denominados de comuns (genitores).

A análise de variância em blocos aumentados foi realizada com o auxílio do programa MAPGEN, desenvolvido pelo professor da Universidade Federal de Lavras, Daniel Furtado Ferreira.

3.2.4. Imunoblots ("Western blots") com anticorpos específicos para zeínas

Esta técnica foi utilizada para confirmar as diferenças observadas nos géis de poliacrilamida, entre os genitores (CMS52 e IHP), no que se refere as proteínas de reserva alfa-, beta- e gama-zeínas. Os polipeptídeos da fração zeína foram separados em quatro géis de acrilamida 12,5% contendo SDS, como descrito anteriormente (Laemmli, 1970). A extração de zeínas foi realizada como descrito anteriormente. Em cada canaleta do gel de acrilamida foram aplicados 1 μ l do extrato de zeína, que é proteína de reserva equivalente a 0,6mg do endosperma. Em cada gel, os genótipos foram repetidos quatro vezes. A separação eletroforética foi feita em cuba vertical Bio-Rad a 100V durante aproximadamente 2 horas.



As zeínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose usando os sistemas de transferência semi-seco e submarino para mini-géis (BioRad). Primeiramente, 6 folhas de papel Whatmann 3M e a membrana de nitrocelulose foram cortadas do mesmo tamanho do gel e incubadas em solução TGM 1X (0,25M Tris, 1,92M glicina e 20% metanol). O gel de acrilamida foi incubado em solução de TGM 1x sob agitação durante aproximadamente 10 minutos. Para montagem do blot de transferência foram colocadas 3 folhas de papel Whatmann 3M no aparato e, sobre elas, foi colocada a membrana de nitrocelulose. O gel foi colocado sobre a membrana de nitrocelulose, tomando-se o cuidado para se evitar fricção excessiva da membrana com o gel, o que leva a transferência irregular de proteínas. Foram colocadas 3 folhas de papel Whatmann 3M sobre a membrana e a transferência foi realizada durante 1 hora a 200 mA, conforme instruções do fabricante.

Após a transferência as membranas foram incubadas sob agitação com solução TBS - Skin -Milk 5% (0,50M Tris, 1,50M NaCl, pH 7,5 e 5% de leite desnatado), suficiente apenas para cobri-las, durante 5 minutos. Este processo foi repetido 3 vezes. Cada membrana foi incubada com o anticorpo primário respectivo (alfa, gama ou beta-zeína) durante uma noite, na diluição de 1:1000 (10 μ l de anticorpo, 10 ml de solução TBS - Skin - Milk). Após incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com solução TBS pH 7,5, durante 5 minutos, por três vezes, sendo posteriormente incubadas com o anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase) diluído 1:3000, durante aproximadamente 1 hora. Em seguida as membranas foram lavadas três vezes com solução TBS pH 7,5 durante 15 minutos cada. Na última etapa foi adicionado o reagente de coloração, substrato para a enzima peroxidase (60mg 4-cloro-1-naftol, 20ml de metanol, 60 μ l de peróxido de hidrogênio e 100ml TTBS pH 7,5). As membranas foram incubadas até o desenvolvimento completo de cor, e o processo foi interrompido com adição de água destilada sobre as membranas.

A transferência no sistema submarino foi realizada em cuba Mini trans blot eletrophoretic transfer cell Bio Rad e para o sistema semi-seco foi utilizado o aparato Trans Blot SD semi-dry eletrophoretic transfer cell Bio Rad.

3.2.5. Análises das sequências gênicas que codificam as proteínas de reserva, alfa-, beta- e delta-zeínas

As possíveis diferenças entre sequências de DNA que codificam as proteínas de reserva alfa-, beta- e delta-zeínas nos genótipos, IHP e CMS52 QPM foram analisadas através da técnica de "Southern blot". As análises foram feitas utilizando os protocolos descritos por Brondani (1993), com algumas modificações.

3.2.5.1. Origem e Manutenção das Sondas de DNA

As sondas de cDNA utilizadas neste estudo correspondem a clones de alfa-zeínas de 22, 19, 14 e 10 kD, os quais foram obtidas dos bancos de sondas do "Maize Genome Database - MaizeDB" da Universidade de Missouri, EUA. Os cDNAs clonados em plasmídeos são mantidos em *Escherichia Coli* preservada em estoques de glicerol, acondicionados a -80°C . Para marcação das sondas, são utilizados plasmídeos preparados a partir de cultura de células transformadas ou a partir da introdução da bactéria transformada diretamente na reação de marcação.

3.2.5.2. Marcação das Sondas

A marcação das sondas foi realizada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR ("Polymerase Chain Reaction") por incorporação de desoxinucleotídeos dUTPs marcados com digoxigenina. Cada reação (100 μl) foi composta de tampão PCR 1X (Tris-HCl 100mM, pH 8,6; KCl 500mM, 1mM de MgCl_2 , 0,15 de gelatina), 50 μM de cada um dos desoxirribonucleotídeos fosfato (dATP, dCTP, dGTP); 48,75 μM de dTTP; 1,25 μM de Dig-dUTP; 1,6 unidades de Taq polimerase; 0,2 μM dos oligonucleotídeos iniciadores ("primers"), 100 ηg do plasmídeo contendo o inserto (ou 1 μl da bactéria transformada). As reações foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer Cetus modelo 9600, utilizando um ciclo de desnaturaç

inicial a 94°C por um minuto, seguido de 25 ciclos sucessivos, sendo que cada ciclo compreendia uma etapa de desnaturação do DNA (um minuto a 94°C), uma etapa para o pareamento do iniciador (dois minutos a 55°C) e uma etapa de alongamento (dois minutos a 72°C). Após os 25 ciclos, era efetuada uma etapa de um minuto a 72°C para o alongamento final. As amplificações foram confirmadas por eletroforese a partir de 1 a 5 µl das amostras resultantes. Nos casos em que não se obteve produto, novas amplificações foram realizadas alterando-se o tempo de polimerização (72°C) e/ou as concentrações de MgCl₂.

3.2.5.3. Obtenção do Tecido Vegetal

Para fins de extração de DNA, foram coletadas folhas tenras de pelo menos 25 plantas de cada material a ser analisado. Os materiais foram acondicionados em sacos plásticos imediatamente após a colheita, identificados e transportados sob gelo até o laboratório, onde foram congelados em nitrogênio líquido, liofilizados e armazenados a - 85°C até o momento do uso.

3.2.5.4. Extração do DNA Genômico

Aproximadamente 700mg do material vegetal foram macerados em nitrogênio líquido sendo o DNA extraído pelo método do CTAB, segundo metodologia desenvolvida por Saghai-Marroof et al.(1984) e modificada pelo Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada do CNPMS. A modificação introduzida constitui-se da extração do DNA do tecido macerado em tampão CTAB duas vezes concentrado (Tris-HCL 200mM, pH 8,0 contendo NaCl 1,4M ; EDTA 20mM, pH 8,0; CTAB 2% p/v e 2-mercaptoetanol 2% v/v). O tecido macerado foi homogeneizado com 10 ml de tampão em tubos de polipropileno com 50ml de capacidade e incubado durante uma hora à 65°C, com cuidadosa agitação por inversão a cada 10-15 minutos. Após esse período, o homogenato foi resfriado à temperatura ambiente e 10ml de clorofórmio:octanol (24:1) foram adicionados. A mistura foi homogeneizada por

inversão durante 10 minutos e centrifugada durante 15 minutos a 6000 x g. A fase aquosa foi pipetada para tubos de vidro com tampa e 0,6 volumes de isopropanol a -20°C foram adicionados. A solução foi homogeneizada por cuidadosa inversão até ocorrer precipitação do DNA. O DNA precipitado foi coletado com anzol de vidro para tubos de ensaio contendo 3ml de TE pH 8,0 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM), sendo armazenado a 4°C durante a noite. Após uma noite foi adicionado a solução 150µL de NaCl 5M e 3ml de etanol para promover nova precipitação do DNA. O DNA precipitado foi removido com anzol de vidro e foi transferido para outro tubo contendo 2ml de 75% de etanol e acetato de sódio 0,2M e incubado por, pelo menos 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, o DNA foi lavado durante alguns segundos em 1ml de 75% etanol e acetato de amônio 10mM e transferido para microtubos contendo 500 µl de tampão TE pH 8,0. O DNA foi ressuscitado durante uma noite, a 4°C, antes do uso. As amostras foram armazenadas a 4°C e, a cada uso, centrifugadas a 16000 x g, a 4°C, durante 10 minutos, sendo utilizadas apenas as alíquotas pipetadas da superfície.

3.2.5.5. Quantificação e Diluição das Amostras de DNA

As amostras foram diluídas 100x com TE pH 8,0 e quantificadas em espectrofotômetro (Hitachi U 1100), nos comprimentos de ondas 260 e 280nm. Os cálculos de concentração foram realizados como na fórmula abaixo, considerando-se uma unidade de densidade óptica igual a 50 mg/ml. Em função da diluição utilizada, a concentração em mg/ml reduziu-se à leitura de 260 nm. O grau de pureza foi calculado pela razão A_{260}/A_{280} . Ambos os cálculos foram realizados segundo manual do CIMMYT (1994). Após quantificação, todas as amostras do mesmo lote foram diluídas com TE para a concentração da amostra menos concentrada.

$$\mu\text{g} / \mu\text{l} = \frac{\text{leitura a } 260\text{nm} \times \text{fator de diluição} \times 50\mu\text{g} / \mu\text{l}}{1000 \times 5}$$

Além disso, também foi avaliado o grau de pureza através da seguinte fórmula:

$$\text{grau de pureza} = \frac{\text{leitura a 260nm}}{\text{leitura a 280nm}}$$

3.2.5.6. Digestão do DNA com Enzimas de Restrição e Eletroforese

Cerca de 30 µg de DNA de cada material foi digerido com as enzimas de restrição Bam HI , Eco RI e Hind III, utilizando-se 2,5 unidades de enzima por µg de DNA. A digestão foi realizada por pelo menos 16 horas a 37°C. O material digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% submerso em tampão TAE (Tris-acetato 0,04M; EDTA 1mM) por uma noite, a 20mA. Para visualização das bandas de DNA após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio. Depois de corados, os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados.

3.2.5.7. Transferência do DNA para Membranas de Náilon

Após eletroforese, o gel foi incubado por uma hora, sob agitação, em solução de desnaturação (NaOH 0,4M; NaCl 0.6M) e, em seguida, em solução de neutralização pH 7,5 (Tris 0,5M, NaCl 1.5M) por um período de uma hora. As membranas de náilon (MSI Corporation) foram incubadas em água destilada por 5 minutos e depois em solução 2X SSC (NaCl 3M, citrato de sódio 0.3M) por 5 minutos. O DNA foi transferido do gel para membrana por meio de fluxo capilar na presença do tampão de transferência (acetato de amônio 1M, NaOH 20mM). Numa bandeja, de vidro do tipo "Pirex", nivelada na bancada e cheia pela metade com solução de transferência, foi colocada uma esponja com dimensões iguais ao comprimento do gel e maiores que sua largura. Sobre esta esponja, foi apoiada uma folha de papel 3MM com as mesmas dimensões do gel. O gel foi colocado sobre esta esponja em posição longitudinal e com a superfície superior voltada para baixo. A membrana, das mesmas

dimensões do gel, foi posicionada sobre o mesmo de uma única vez. Sobre a membrana, foi colocada uma folha de papel 3MM com as mesmas dimensões do gel e da membrana. As bolhas de ar foram expulsas rolando-se uma pipeta sobre o conjunto. Finalmente foi colocada sobre todo o conjunto uma pilha de papel absorvente, cortado nas dimensões anteriores, que garantiam o fluxo capilar ascendente. Após cerca de 24 horas a membrana foi lavada em 2x SSC (3 M NaCl; 0,3 M citrato de sódio) durante 5 minutos. O DNA foi, então, imobilizado na membrana por 3 horas, a 95°C, em estufa. Após fixação, as membranas foram mantidas entre folhas de papel de filtro 3MM secas, colocadas em sacos plásticos e armazenadas a 4°C ou imediatamente utilizadas para hibridação.

3.2.5.8. Pré-hibridação, Hibridação e Detecção do Sinal.

As membranas foram pré-hibridadas em solução de hibridação (SSC 5X, 0,1% do reagente de bloqueio, sarcosil 0,1%, SDS 10%) em forno de hibridação (Techne Hybridiser HB - 1D) a 65°C. Após duas horas, as membranas foram incubadas em nova solução de hibridação, agora contendo 80 ng/ml de sonda previamente desnaturada, marcada com digoxigenina. A hibridação foi realizada a 65°C por 18 horas em forno de hibridação conforme descrito para a pré-hibridação. Após a hibridação as membranas passaram por um processo sucessivo de lavagens tal como segue:

- duas vezes em solução 0,15 X SSC; SDS 0,1% por 5 minutos, à temperatura ambiente (TA);
- duas vezes em solução 0,15X SSC; SDS 0,1%, por 30 minutos, a 65°C;
- uma vez em tampão 1 (Tris-HCl 0,05 M pH 7,5; NaCl 0,15 M) por 5 minutos à TA;
- uma vez em tampão 2 (Tris-HCl 0,05 M pH 7,5; NaCl 0,15 M; 0,2% de reagente de bloqueio) por 30 minutos à TA;

- uma vez em tampão 2 contendo o anticorpo contra digoxigenina, conjugado com fosfatase alcalina (Boheringer Mannheim), na concentração de 1 μ l para 15 ml de tampão 2, por 30 minutos, à TA;
- três vezes em tampão 2, por 10 minutos, à TA;
- duas vezes em tampão 1, por 15 minutos, à TA;
- uma vez em tampão 3 (Tris-HCl 0,05M pH 9,5; NaCl 0,1M; MgCl₂ 0,05M), por 5 minutos, à TA.

Após as lavagens aplicou-se à superfície das membranas 1ml da solução do substrato AMPPD (Tropix Co), na concentração de 10 μ l/ml de tampão 3. As membranas foram previamente colocadas em *folders* próprios para sistemas de detecção de DNA (Gibco BRL). Estes *folders* foram colocados em contato com filme de raio-X em câmara escura por 18 horas: Após esse período, os filmes foram imersos em solução de revelação (Kodak GBX developer); em solução fixadora (Kodak GBX fixer), enxaguados em água destilada e secos à TA, obtendo-se assim as autoradiografias com os padrões de bandas de RFLP para análise.

Após a revelação do filme, a sonda contida na membrana foi removida com tratamento em 2X SSC por 15 minutos à TA, seguido de tratamento em solução NaOH 0,2M, SDS 0,1%, a 37°C, por 15 minutos e, finalmente, em TE por 5 minutos. Quando não utilizadas imediatamente após a remoção das sondas, as membranas foram armazenadas em TE a 4°C.

3.3 Seleção de genótipos de alta qualidade nutricional baseada no conteúdo de proteínas do endosperma.

3.3.1. Análise Espectrofotométrica das Proteínas do Endosperma

3.3.1.2. Análise espectrofotométrica da proteína total do endosperma.

Para análise espectrofotométrica em placas de Elisa, proteínas totais do endosperma foram extraídas conforme descrito em 3.2.1.1. Primeiramente, colocou-se

100ul de tampão borato em todas as canaletas, sendo em seguida adicionados 50ul de ácido tricloroacético (TCA) 70%. Adição de TCA promoveu a precipitação das proteínas resultando na formação de um coágulo leitoso. Em seguida, adicionou-se 150ul do extrato de proteína total apenas na primeira canaleta. A mistura foi então homogeneizada e 150ul de cada amostra foram sequencialmente transferidos para as canaletas seguintes, gerando diluições em série. Ao final, 150ul da última canaleta foi descartado de forma que todas as canaletas apresentaram um volume final igual a 150ul (Figura 2). Os valores de absorvância das amostras foram obtidos em espectrofotômetro modelo Labsystem Multiskan MS tipo 352 a 605nm. Neste tipo de análise, o valor de absorvância aumenta com a quantidade de proteínas coaguladas, e por esta razão é um indicador indireto da quantidade total de proteínas no extrato.

3.3.1.3. Análise espectrofotométrica da fração não-zeína do endosperma.

Para análise espectrofotométrica de não-zeínas em placas de Elisa, proteínas totais do endosperma foram extraídas conforme descrito em 3.2.1.1. Inicialmente, adicionou-se 210ul de etanol 95% e 90ul do extrato de proteína total apenas nas primeiras canaletas da placa de elisa, incubando-se a mistura à temperatura de 37°C por 30 minutos. Em seguida adicionou-se 210ul de etanol 95% a todas as canaletas restantes da placa de elisa.

Após homogeneização da mistura das primeiras canaletas, 90ul de cada uma dessas amostras foram transferidas para as canaletas subsequentes. Esse processo foi sucessivamente repetido, sendo descartada a alíquota de 90ul restante da última canaleta. Ao final do processo de diluição, todas as canaletas continham 210ul.

Os valores de absorvância das amostras foram obtidos em espectrofotômetro modelo Labsystem multiskan MS tipo 352 a 605nm e, semelhantemente ao descrito no item 3.3.1.2, o valor de absorvância aumenta com a quantidade de não-zeínas coaguladas, e por esta razão é um indicador indireto da quantidade dessa fração protéica no extrato.

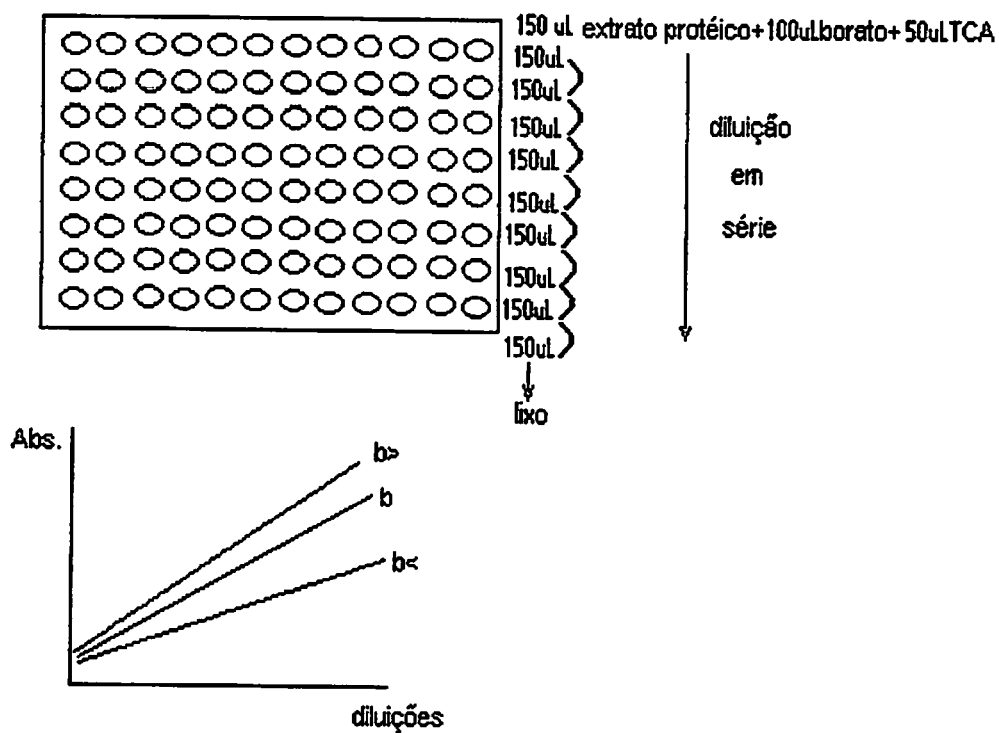


Figura 2 – Esquema ilustrativo da precipitação do conteúdo de proteína total presente no endosperma do milho, com a utilização de TCA 70%, para posterior análise espectrofotométrica.

3.3.1.4. Obtenção do conteúdo de albuminas e globulinas presentes no endosperma.

Foram pesados 50mg de endosperma finamente moído o qual foi colocado em tubo eppendorf de 1,5ml, e a este foi adicionado 500 μ l de solução de extração (NaCl 0,5M). As amostras foram homogeneizadas rapidamente em vortex (Genie 2). Então, a mistura foi colocada a 4°C sob agitação durante uma hora, sendo posteriormente centrifugada a 16.000 x g em microcentrífuga (Eppendorf modelo 5415) por 10 minutos. O sobrenadante, que continha as albuminas e globulinas, foi transferido para outro tubo eppendorf e ao pellet restante foi adicionado 250 μ l de solução de extração. As amostras foram novamente homogeneizadas e colocadas sob agitação a 4°C por mais uma hora. Depois foram centrifugadas como descrito anteriormente e o sobrenadante foi transferido para o tubo de eppendorf que armazenou a extração anterior.

3.3.1.5. Análise espectrofotométrica da fração composta de albuminas e globulinas do endosperma.

A precipitação desta fração protéica foi realizada em placa de elisa. Inicialmente foram adicionados 100 μ l de TCA 70% e 200 μ l do extrato de albuminas e globulinas apenas nas primeiras canaletas da placa de elisa. Em seguida, adicionou-se 200 μ l de ácido tricloroacético 70% a todas as canaletas restantes da placa de elisa e após homogeneização da mistura presente nas primeiras canaletas, 200 μ l de cada uma dessas amostras foram transferidas para as canaletas subsequentes. Esse processo foi sucessivamente repetido, sendo descartado alíquota de 200 μ l da última canaleta, dessa forma todas as canaletas apresentavam 100 μ l. Os valores de absorbância das amostras foram obtidos em espectrofotômetro modelo Labsystem multiskan MS tipo 352 a 492nm, e, semelhantemente ao descrito no item 3.3.1.2, este valor aumenta com a quantidade de albuminas e globulinas coaguladas, e por esta razão é um indicador indireto da quantidade dessas proteínas no extrato.

3.3.2. Determinação do nitrogênio total presente nas proteínas do endosperma

A determinação do nitrogênio total contido no endosperma de grãos F₂ obtidos do cruzamento CMS52 X IHP e para metade das amostras de endosperma das famílias S₁ obtidas da população CMS475 QPM foi realizada via Análise de Injeção de Fluxo - FIA descrito por Stewart et al. (1976). Análise das amostras de endosperma das famílias S₁ restantes foi realizada pelo método Kjeldahl em função de problemas de ordem técnica. Em ambos os métodos, o nitrogênio da amostra é quantitativamente transformado em amônio por meio de digestão ácida.

a) Análise de Injeção de Fluxo

Pesaram-se 100mg da amostra triturada para tubos digestores de 100ml, onde adicionou-se aproximadamente 1,300g de catalisador, que corresponde a 500g de sulfato de potássio e 5g de selênio (100:1) e 3ml de ácido sulfúrico concentrado. Ao final desta etapa forma-se sulfato de amônio na reação. O processo de digestão foi realizado em bloco digestor no interior de uma capela a 370°C durante aproximadamente 1 hora. Depois que as amostras atingiram temperatura ambiente seu volume foi completado e as amostras foram homogeneizadas. Neste momento foi adicionado às amostras fenol, hidróxido de sódio 4M, nitroprussiato de sódio e hipoclorito de sódio. O amônio é determinado através da reação de Bertholet com espectrofotometria do composto indofenol azul. Nitroprussiato atua como catalizador. O valores de absorbância foram obtidos em espectrofotômetro Spectronic 21 modelo DV a 630nm. Anteriormente a esta leitura o aparelho foi calibrado com uma solução que continha todos os reagentes, exceto a amostra. A percentagem de proteína foi obtida de acordo com a formula descrita abaixo:

$\%N = (\text{ml de HCl do branco}) \times \text{normalidade do HCl} \times 14.007 \times 100 / \text{mg da amostra}$

$$\%P = \%N \times 6,25$$

b) Método Micro-Kjeldahl

Esta análise é dividida em 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.

A digestão foi realizada seguindo os mesmos passos do método anterior. Na destilação, o sulfato de amônio que foi formado durante a digestão foi tratado com hidróxido de sódio 10M ocorrendo liberação de amônio que foi recebido em Erlenmeyer contendo 1ml de ácido bórico concentrado. A titulação que corresponde à última fase foi realizada com ácido sulfúrico 0,02N em pH 7,0. O aparelho foi calibrado com uma amostra que continha todos os reagentes exceto a amostra. A percentagem de proteína da amostra foi obtida com base na seguinte fórmula:

$$\%N = F(B - S) / \text{mg da amostra}$$

onde:

F: fator de diluição;

B: percentagem de transmitância do branco;

S: percentagem de transmitância da amostra

$$\%P = \%N \times 6,25$$

3.3.3. Determinação da percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma

A determinação do triptofano foi realizada de acordo com o método colorimétrico para análise rápida de triptofano, descrito por Opienska-Bisauth et al. (1963) e modificado por Hernandez e Bates (1969). Este método é baseado na reação

Hopkins-Cole, no qual uma molécula de ácido glioxílico e duas moléculas de triptofano formam um componente colorido com absorção máxima a 560nm.

Pesaram-se 40mg de endospermas finamente moídos que foram colocados em tubos de hidrólise, onde se adicionou 2ml de 0,1M de acetato de sódio pH 7,0 e papaína. A mistura foi incubada em estufa a 63°C por 16 horas, homogeneizando-se em vortex (Genie 2) de três a quatro vezes. O hidrolisado foi retirado da estufa, deixado resfriar a temperatura ambiente e centrifugado a 2.500 rpm por 5 minutos em microcentrifuga Eppendorf modelo 5415C. Pipetou-se 1ml do hidrolisado para um tubo de ensaio, adicionando-se a este 4 ml do reagente C, que consiste de uma mistura volume por volume do reagente A (270mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em 500ul H_2O e diluído para 1L com ácido acético glacial) e do reagente B (ácido sulfúrico 30N). Esta mistura foi homogeneizada vigorosamente em vortex (Genie 2) e incubada novamente a 67°C por 15 minutos para desenvolvimento da coloração. Os valores de absorbância das amostras foram obtidos em espectrofotômetro Spectronic 21 modelo DV a 560nm, sendo o aparelho primeiramente calibrado com uma solução (branco) que continha todos os reagentes exceto a amostra. O conteúdo de triptofano foi obtido a partir da seguinte fórmula:

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

3.3.4. Eficiência de seleção

Como o objetivo de verificar a coincidência de seleção existente entre o método proposto nesse trabalho, e os métodos normalmente utilizados, para determinar a quantidade de proteína acumulada no endosperma e a qualidade nutricional dos materiais avaliados, a eficiência de seleção foi calculada utilizando a expressão descrita abaixo, considerando intensidade de seleção igual a 20%.

$$E.S. = \frac{A - C}{B - C} \times 100$$

onde:

A - número de genótipos comuns às duas seleções;

B - número de genótipos selecionados em cada método;

C - número de genótipos em comum nas duas seleções, unicamente devido ao acaso, ou seja, 10% de B.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização bioquímica e genética das proteínas do endosperma do milho

4.1.1. Análise das frações zeína e não-zeína do endosperma do milho.

Os polipeptídeos das frações protéicas zeína e não-zeína de cada um dos cinco bulks da geração F_2 , resultantes do cruzamento entre CMS52 e IHP, foram separados eletroforéticamente em géis gradiente de poliacrilamida e analisados através de densitometria à laser. Os géis de poliacrilamida contendo os polipeptídeos devidamente tabulados para análise em densitômetro à laser estão apresentados nas Figuras 1A a 20A. Os dois genitores foram analisados juntamente com cada bulk, como referência para avaliação do conteúdo relativo de cada fração protéica e polipeptídeos individuais.

Os valores de absorvância para cada polipeptídeo das frações zeína e não-zeína, obtidos com o auxílio do Image Quant Program (Molecular Dynamics), foram utilizados para o cálculo percentual de cada polipeptídeo em relação a fração total de zeína e não-zeína. Os valores totais de absorvância para cada fração protéica (zeína e não-zeína) foram calculados a partir da soma dos valores de absorvância individuais dos polipeptídeos pertencentes a cada uma das duas frações protéicas do endosperma. Posteriormente, valores relativos foram obtidos a partir dos valores totais de absorvância de cada fração protéica do endosperma considerando arbitrariamente o genitor CMS52 como padrão 100. Os valores totais de absorvância das frações zeína e não-zeína, e os seus valores relativos, calculados considerando CMS52 como padrão 100, para cada indivíduo da geração F_2 encontram-se na Tabela 1B.

Em termos de valores relativos, foram observadas as seguintes amplitudes de variação, na média das progênies: zeínas, de 75,92 a 227,07 para amostras de fenótipo semi-opaco e de 99,90 a 401,02 para amostras de fenótipo normal; não-zeínas, de 82,16 a 189,31 para amostras de fenótipo semi-opaco e de 43,23 a 146,76, para amostras de fenótipo normal. Em média, os genitores apresentaram os seguintes valores: zeínas, de 100 e 252,69; não-zeínas, 100 e 96,76 para CMS52 e IHP respectivamente.

No que se refere ao teor total de zeína, a análise de variância em blocos aumentados indicou que existe diferença significativa entre os genitores CMS52 e IHP ($P < 0,01$). No entanto, para os indivíduos da geração F_2 não foi detectada nenhuma diferença significativa através dessa análise. O resumo da análise de variância em blocos aumentados para teor total de zeína está apresentada na Tabela 1.

Com relação aos polipeptídeos que compõem a fração zeína, a análise de variância em blocos aumentados indicou a existência de diferença significativa entre CMS52 e IHP para todas as classes de zeína, com exceção apenas para a classe de 12 kD ($P < 0,05$). Para os indivíduos da geração segregante, esta análise mostrou que existe diferença significativa apenas para as classes de 54, 14, 12 e 10 kD ($P < 0,05$). Foi observado que essas classes de zeína foram as que apresentaram menor coeficiente de variação (C.V.) comparado às demais classes que compõem essa fração. Os resumos das análises de variância para cada classe de zeína encontra-se nas Tabelas 2 e 3.

No referente ao teor total da fração não-zeína, a análise de variância em blocos aumentados não detectou diferença significativa entre os genitores (CMS52 e IHP) e entre os indivíduos da geração F_2 . O mesmo resultado descrito acima para teor total da fração não-zeína foi observado para os polipeptídeos que compõem esta fração. Os resumos das análises de variância em blocos aumentados, para teor total de não-zeína e para os polipeptídeos presentes nessa fração, não foram apresentados, já que nenhuma destas análises mostrou diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 1 - Resumo da análise de variância dos valores de absorvância do teor total de zeína, obtidos por densitometria à laser, utilizando delimitamento em blocos aumentados.

Fonte de variação (F.V.)	Grau de Liberdade (G.L.)	Quadrado médio (Q.M.)
Blocos	4	171.451.579,4255
Tratamento ajustado	101	6.910.315,9331
Regulares dentro do bloco	95	5.024.450,3277
Testemunha	1	194.498.022,9719 *
Testemunha vs Regulares dentro do bloco	5	5.224.221,0266
Erro intrabloco	4	12.886.907,6426
C.V.34,6302		

Tabela 2 -Resumo da análise de variância dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração zeína (54, 27, 22 e 19 kD) obtidos por densitometria à laser, utilizando delineamento em blocos aumentados.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Quadrado Médio			
		54 kD	27 kD	22 kD	19 kD
Blocos	4	5,5595	2278,937	83,1988	1900,9352
Tratamentos ajustados	101	1,4473	22,8979	30,2558	34,0406
Regulares dentro do bloco	95	1,2580**	15,1648	26,3769	26,1204
Testemunhas	1	13,5211**	681,8084*	345,0396**	647,2578**
Testemunhas vs. Regulares dentro do bloco	5	2,6282	38,0451	40,9974	61,8794
Erro intrabloco	4	0,0855	53,6563	15,8825	5,2243
C.V.		7,8672	42,2890	28,1026	5,0769

Tabela 3 - Resumo da análise de variância dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração zeína (16, 14, 12 e 10 kD) obtidos por densitometria à laser, utilizando delineamento em blocos aumentados.

Fonte de Variação	Grau de		Quadrado Médio		
	Liberdade	16 kD	14 kD	12 kD	10 kD
Blocos	4	12,4637	57,8385	52,5419	127,5757
Tratamentos ajustados	101	0,7806	1,7125	5,9915	5,2268
Regulares dentro do bloco	95	0,7069	1,6158*	5,9209**	5,4202**
Testemunhas	1	7,6665*	3,4974*	0,0019	3,5521**
Testemunhas vs. Regulares dentro do bloco	5	0,8032	3,1931	8,5307	1,8866
Erro intrabloco	4	0,6074	0,1941	0,2740	0,1584
C.V.		22,7971	7,5994	8,8604	8,5869

Além da análise quantitativa, os valores absolutos de absorvância das frações zeína e não-zeína dos genitores e dos indivíduos F_2 , obtidos por densitometria à laser, foram distribuídos graficamente para que os resultados obtidos fossem comparados qualitativamente. Para melhor visualização dos dados, os gráficos foram construídos considerando cada bulk F_2 individualmente. Apesar do fato de todos os indivíduos F_2 serem resultantes do cruzamento entre as populações CMS52 e IHP e, portanto, pertencerem a uma só população segregante.

Com relação ao teor total de zeína (Figuras 3, 4 e 5) observou-se que a maioria dos indivíduos segregantes apresentaram valores superiores ao genitor CMS52 (QPM), que corresponde ao genótipo de menor valor. Também foi observado que alguns indivíduos F_2 , tanto para indivíduos de fenótipo normal como para aqueles de fenótipo semi-opaco, apresentaram teores de zeína superiores àqueles detectados para o genitor de maior valor (IHP).

A distribuição percentual dos polipeptídeos que compõem a fração zeína está apresentada nas Figuras 6, 7 e 8. Observou-se que, para a maioria dos indivíduos de fenótipo semi-opaco, esta distribuição foi semelhante à distribuição do genitor QPM. Tal fato foi evidente principalmente para as classes de gama-zeína de 27kD e alfa-zeína de 22kD, apesar da análise de variância em blocos aumentados não ter indicado diferença significativa entre os indivíduos F_2 para nenhuma das duas classes.

Com relação ao teor total de não-zeína (Figuras 9, 10 e 11), foi observado que a maioria dos indivíduos de fenótipo semi-opaco apresentaram valores dessa fração protéica superiores aos indivíduos de fenótipo normal e aos genitores IHP e CMS52. Analisando a distribuição percentual dos polipeptídeos que compõem esta fração, não foi possível detectar diferenças marcantes entre os indivíduos da geração segregante (Figuras 12, 13 e 14).

Como na análise de variância em blocos aumentados ocorre aumento no erro padrão das médias, diminuindo sua precisão, as pequenas diferenças entre os tratamentos avaliados geralmente não são detectadas através dessa análise. Sendo assim, para melhor caracterizar o perfil polipeptídico dos genitores, utilizou-se a técnica do imunoblot ("western blot"), que permite detecção mais precisa de

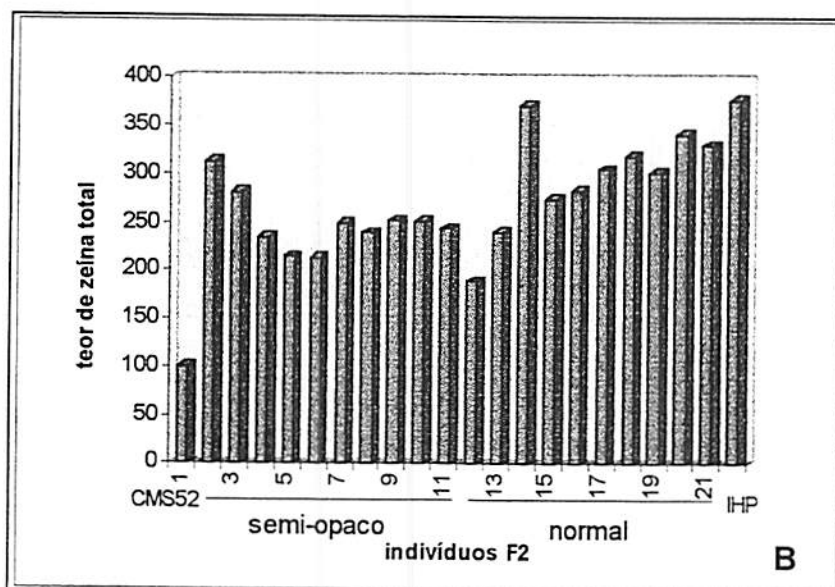
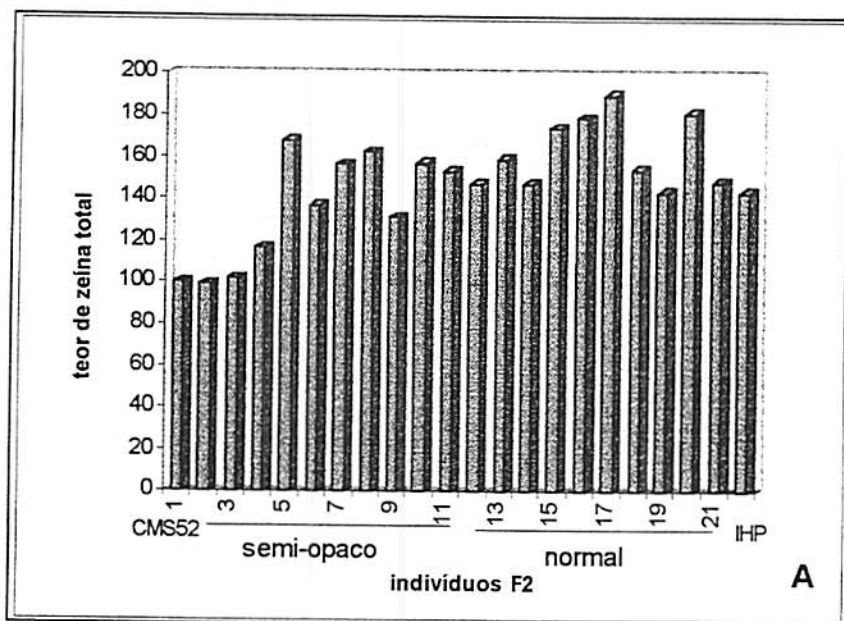


Figura 3 - Distribuição dos valores de absorvância do teor total de zeína (obtidos em densitômetro à laser) presentes no endosperma dos bulks 1 (A) e 4 (B) da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.

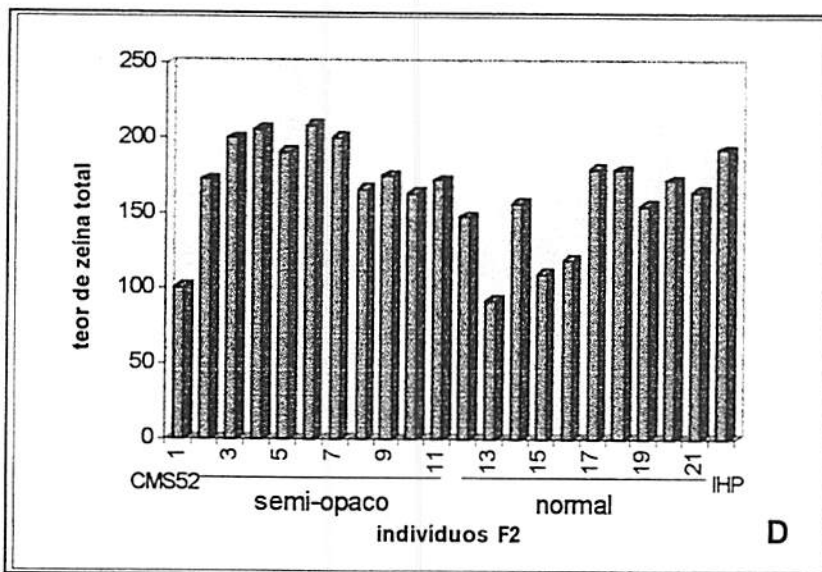
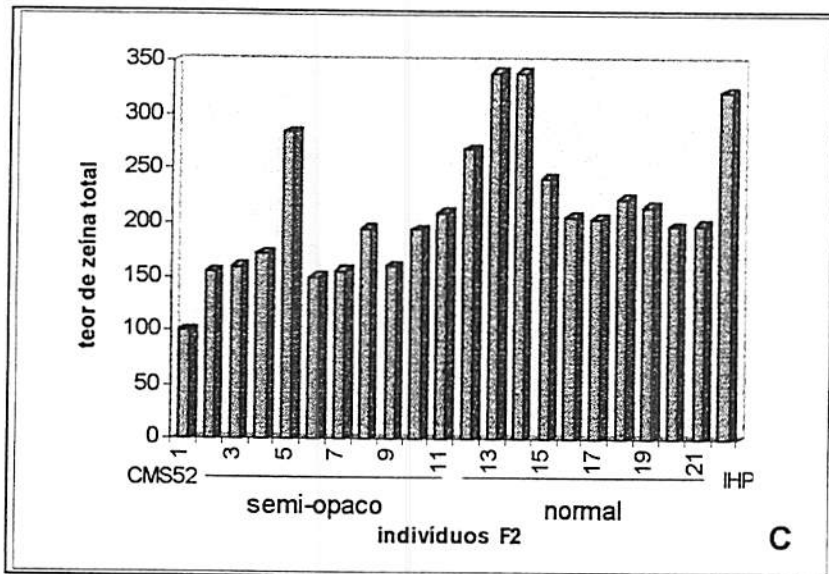


Figura 4 - Distribuição dos valores de absorvância do teor total de zeína (obtidos em densitômetro à laser) presentes no endosperma dos bulks 6 (C) e 9 (D) da geração F₂, resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.

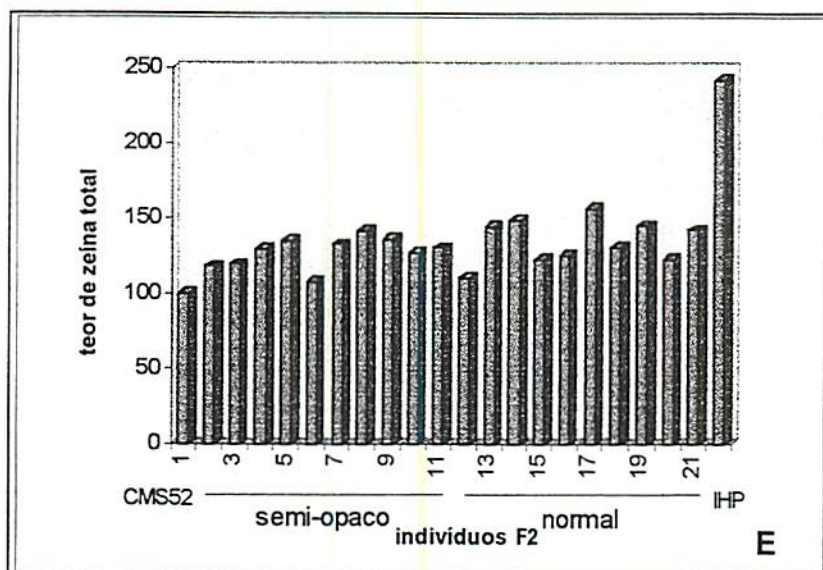


Figura 5 - Distribuição dos valores de absorbância do teor total de zeína (obtidos em densitômetro à laser) presentes no endosperma do bulk 10 (E) da geração F₂, resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.

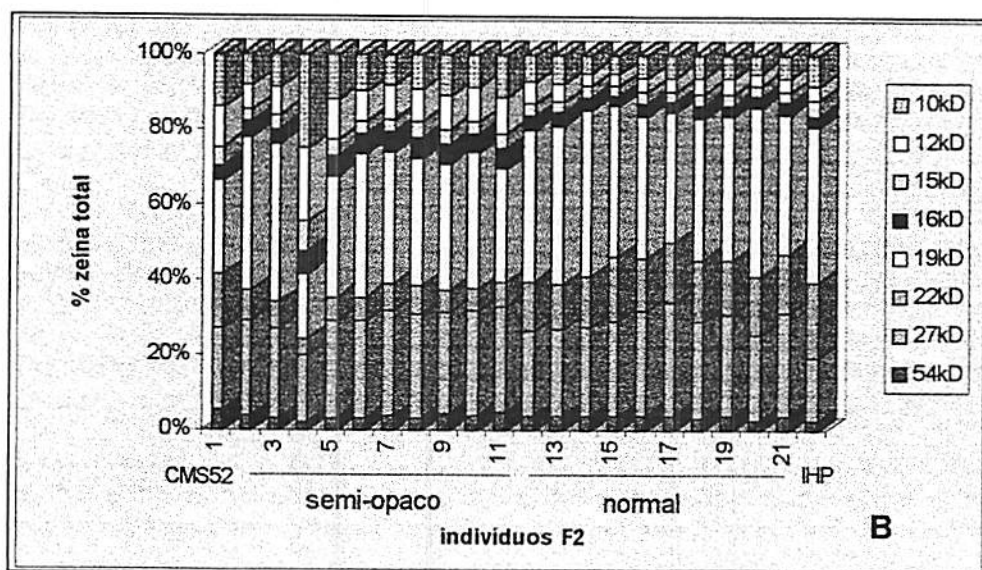
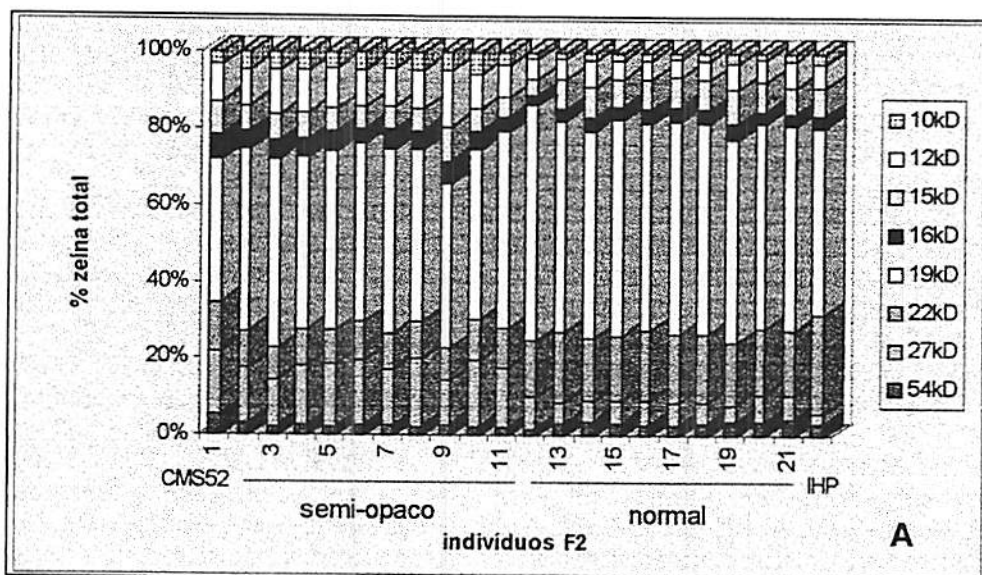


Figura 6 - Distribuição dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração zeína (obtidos por densitometria a laser) presentes no endosperma dos bulks 1 (A) e 4 (B) da geração F_2 , resultantes do cruzamento entre CMS52 e IHP.

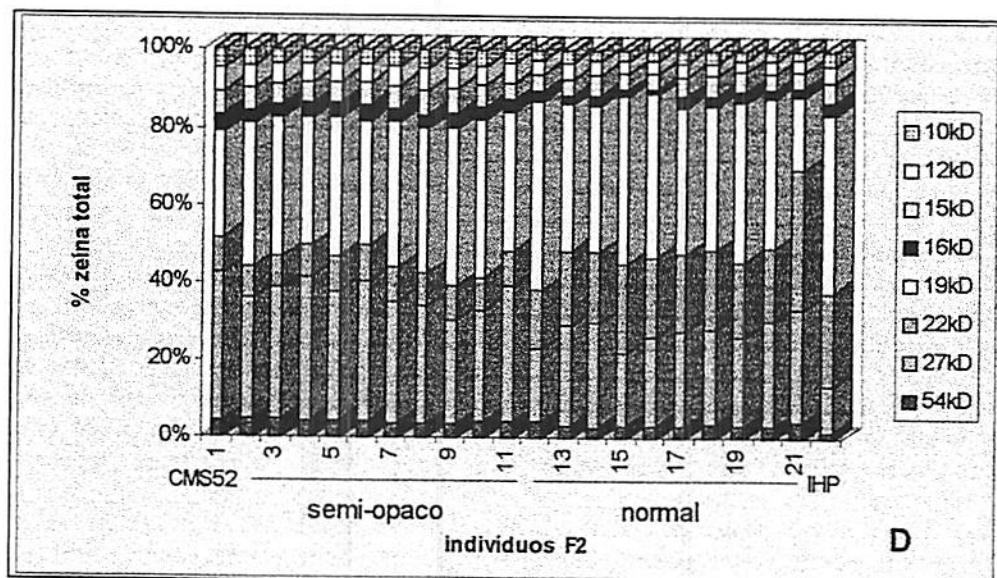
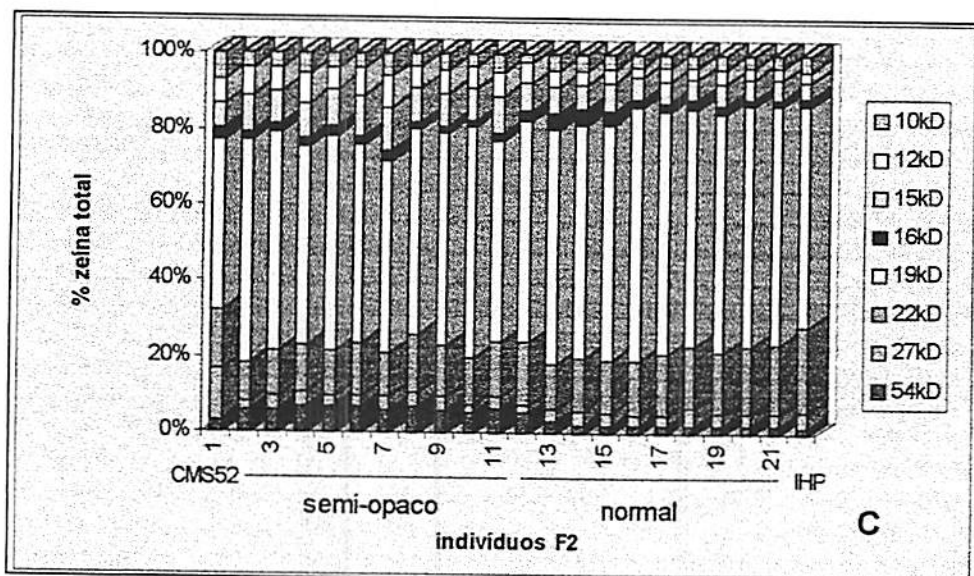


Figura 7 - Distribuição dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração zeína (obtidos por densitometria a laser) presentes no endosperma dos bulks 6 (C) e 9 (D) da geração F₂, resultantes do cruzamento entre CMS52 e IHP.

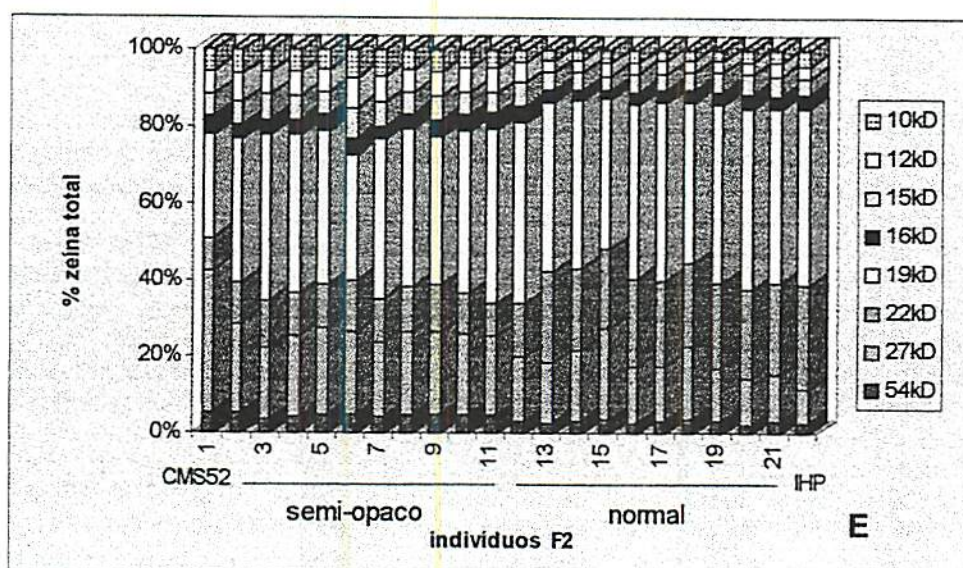
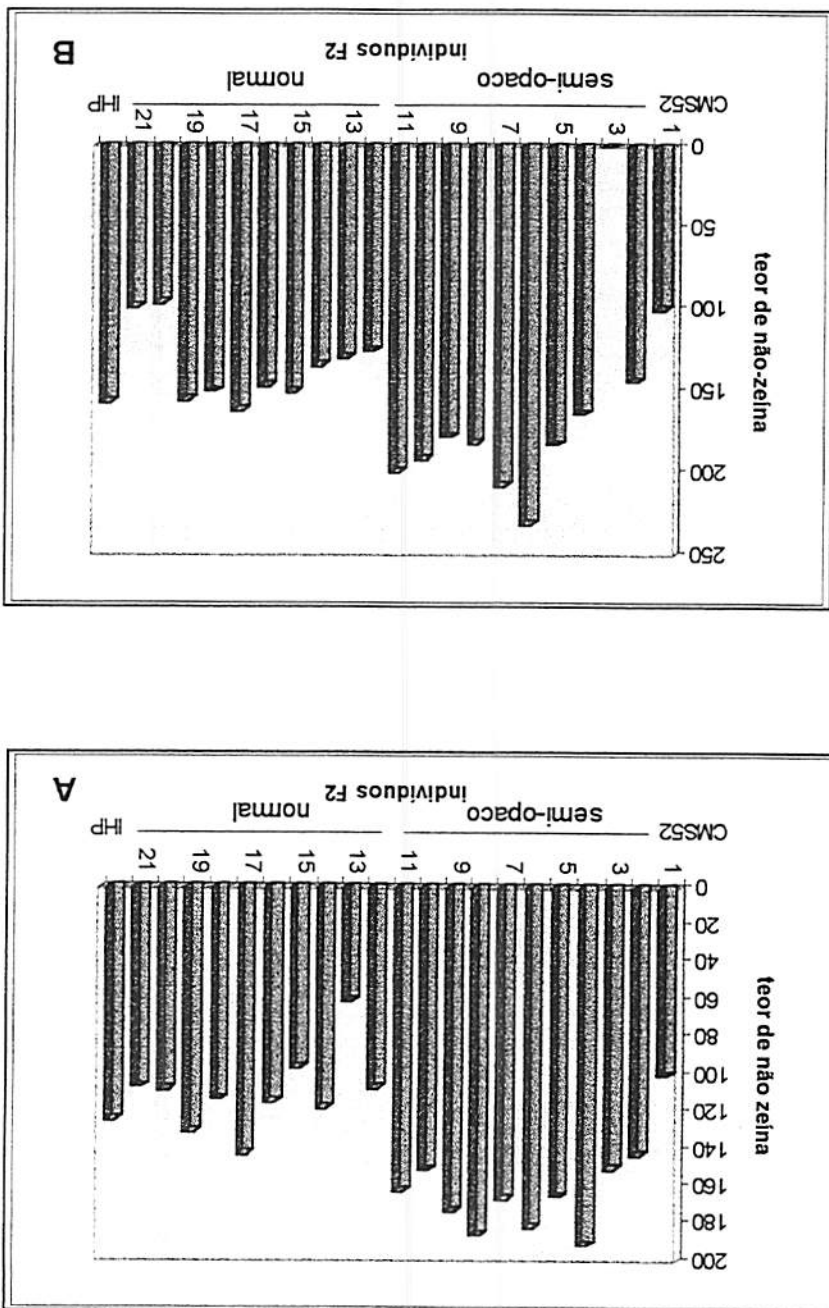


Figura 8 - Distribuição dos valores percentuais de absorbância dos polipeptídeos da fração zeína (obtidos por densitometria a laser) presentes no endosperma dos bulk 10 (E) da geração F₂, resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.

Figura 9 - Distribuição dos valores de absorbância do teor total de não-zeína (obtidos em densitômetro à laser) presentes no endosperma dos bulks 1 (A) e 4 (B) da geração F₂, resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.



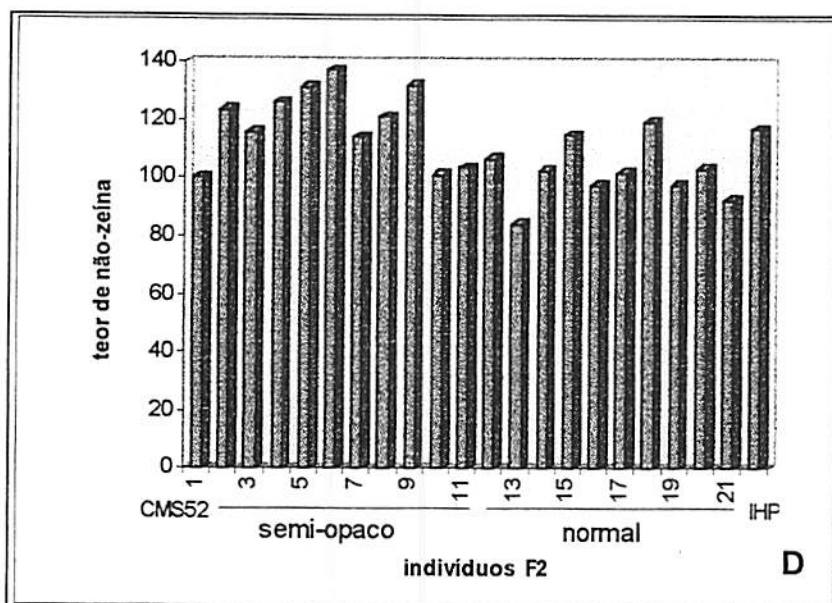
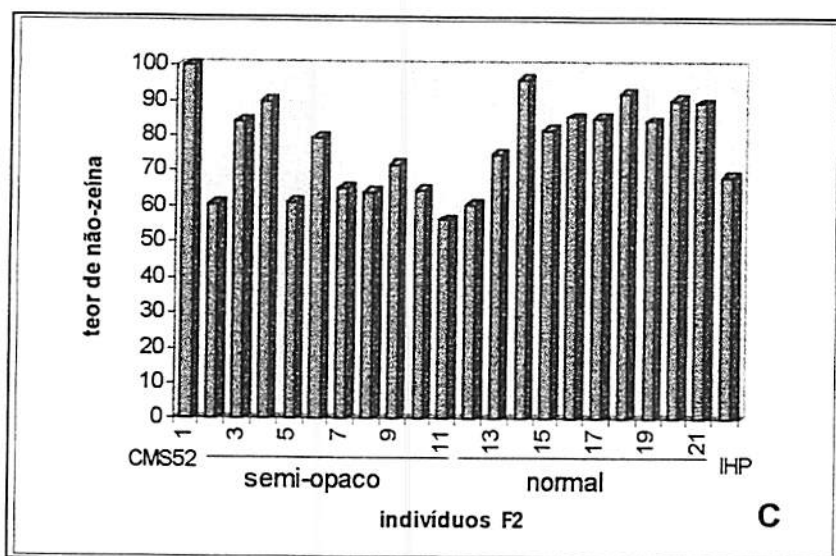


Figura 10 - Distribuição dos valores de absorbância do teor total de não-zeína (obtidos em densitômetro à laser) presentes no endosperma dos bulks 6 (C) e 9 (D) da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.

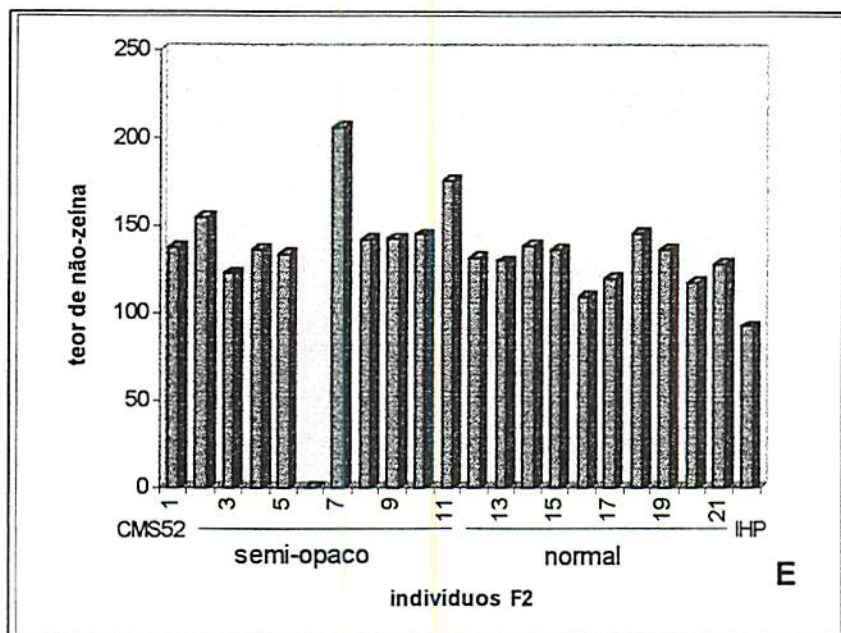


Figura 11 - Distribuição dos valores de absorvância do teor total de não-zeína (obtidos em densitômetro à laser) presentes no endosperma do bulk 10 (E) da geração F₂, resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.

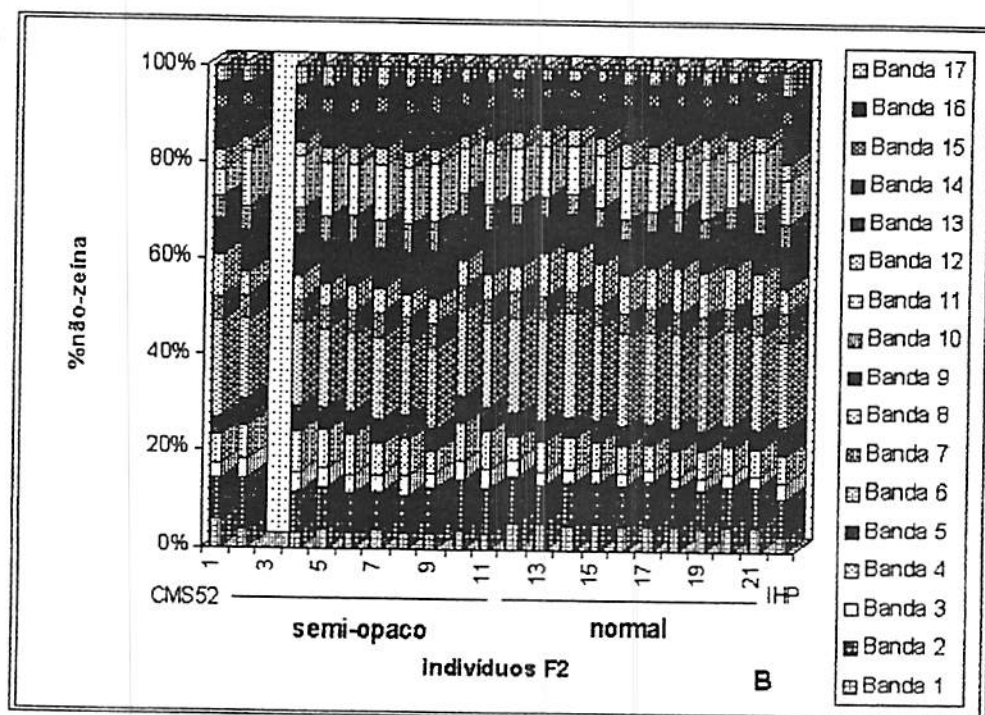
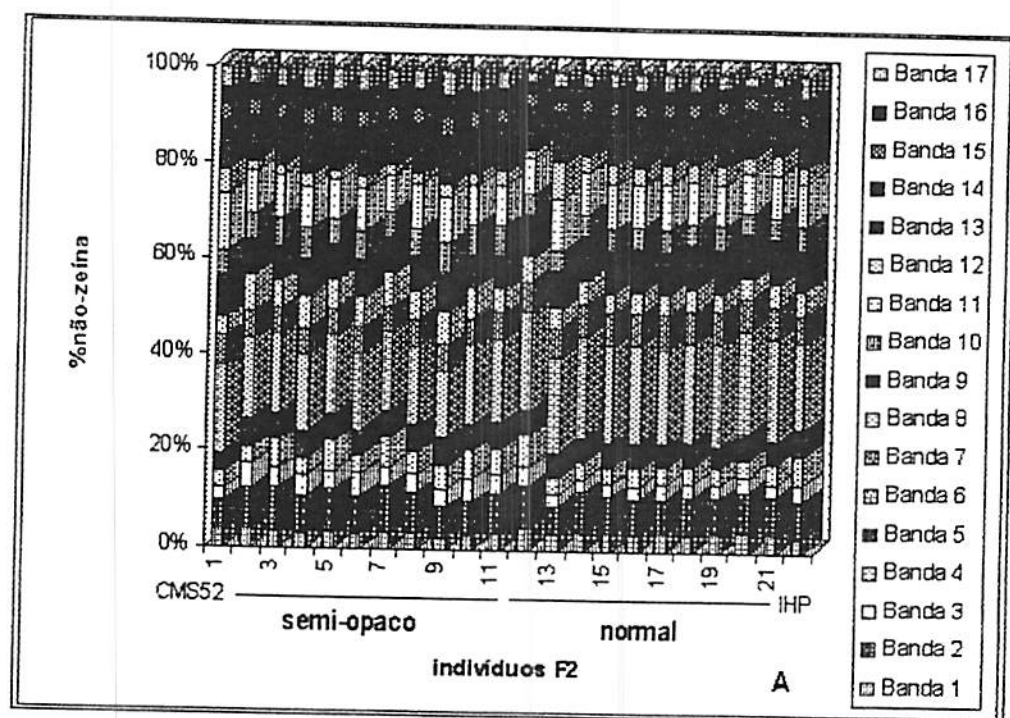


Figura 12 - Distribuição dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração não-zeína (obtidos em densitometro a laser) presentes no endosperma dos bulks 1 (A) e 4 (B) da geração F₂, resultantes do cruzamento entre CMS52 e IHP.

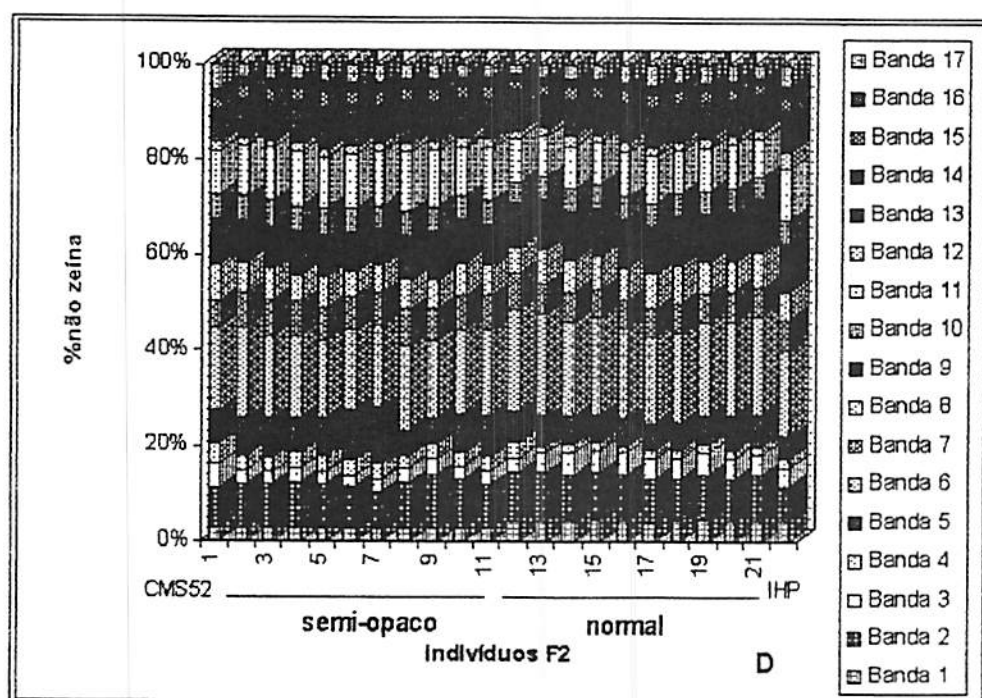
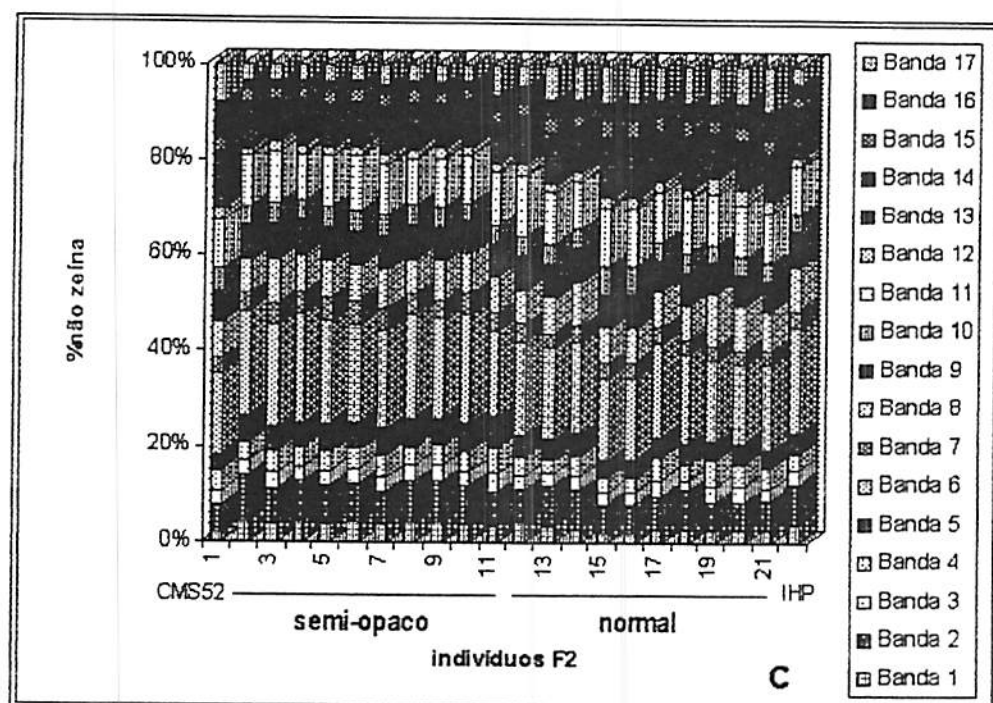


Figura 13 - Distribuição dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração não-zeína (obtidos em densitometro a laser) presentes no endosperma dos bulks 6 (C) e 9 (D) da geração F₂, resultantes do cruzamento entre CMS52 e IHP.

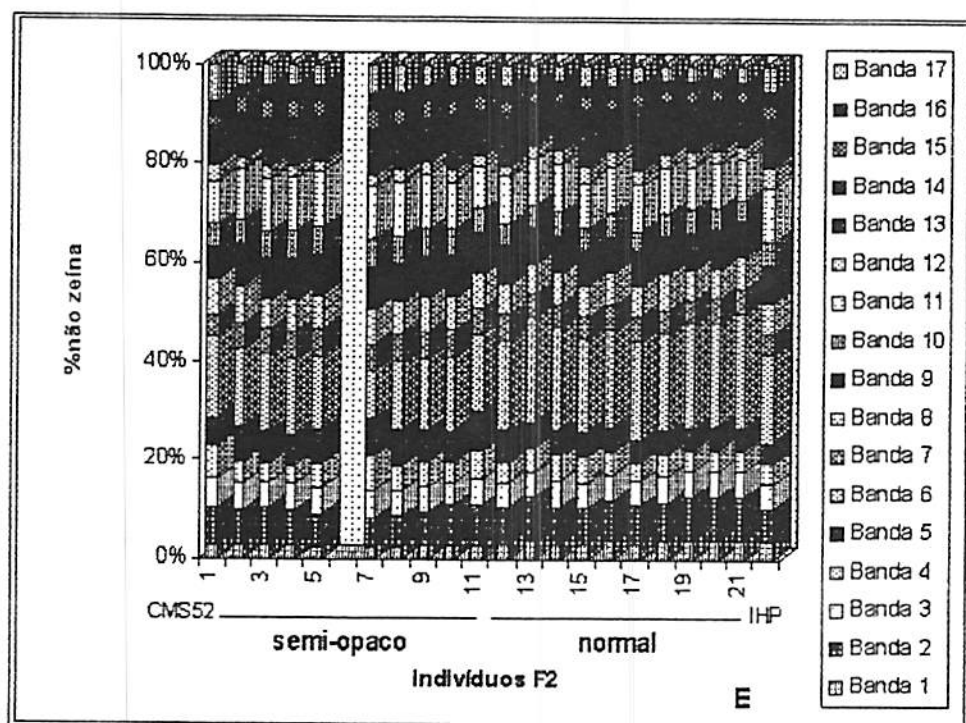


Figura 14 - Distribuição dos valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos da fração não-zeína (obtidos em densitometro a laser) presentes no endosperma do bulk 10 (E) da geração F₂, resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.

polipeptídeos através do uso de anticorpos específicos. Esta análise mostrou um aumento acentuado das alfa-zeínas de 22 e 19 kD para o genitor IHP em relação ao QPM (Figura 15). Também foi observado um aumento acentuado da fração delta-zeína no genitor IHP, quando foi utilizado anticorpo específico para alfa-zeínas. Por último, observou-se aumento da fração gama-zeína no genitor CMS52 em relação ao IHP (Figura 16). Com relação à beta-zeína nenhuma diferença marcante foi observada (Figura 17).

4.1.2. Percentagem de proteína e triptofano nas proteínas do endosperma

A percentagem de proteína total e a percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma foram avaliadas para quatro dos cinco bulks F_2 estudados. A ausência de um deles justifica-se devido à pouca quantidade de material disponível.

Considerando os quatro bulks avaliados, foram observadas as seguintes amplitudes de variação: percentagem de proteína, 8,83% a 18,02%; e percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma, 0,14% a 0,74%. Para os genitores foram observados os seguintes valores: percentagem de proteína, 8,75% e 22,14%; e percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma, 1,34% e 0,30% para CMS52 e IHP, respectivamente. Os dados para cada bulk individual estão relacionados na Tabela 2B.

Foi observado que a percentagem de proteína total presente no endosperma da geração segregante (Figuras 18 e 19) foi superior àquela do genitor de menor valor (CMS52), contudo, nenhum dos indivíduos analisados mostrou valores superiores ao genitor IHP.

Para percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma (Tabela 2B), observou-se que alguns indivíduos normais apresentaram menor conteúdo deste aminoácido essencial em relação ao IHP, genitor de menor valor (0,30%). Os indivíduos de fenótipo semi-opaco apresentaram valores próximos ao genitor IHP, sendo, portanto, muito inferiores ao indivíduo QPM, genitor de maior valor (1,34%). Foram raros os indivíduos que apresentaram percentagens de triptofano

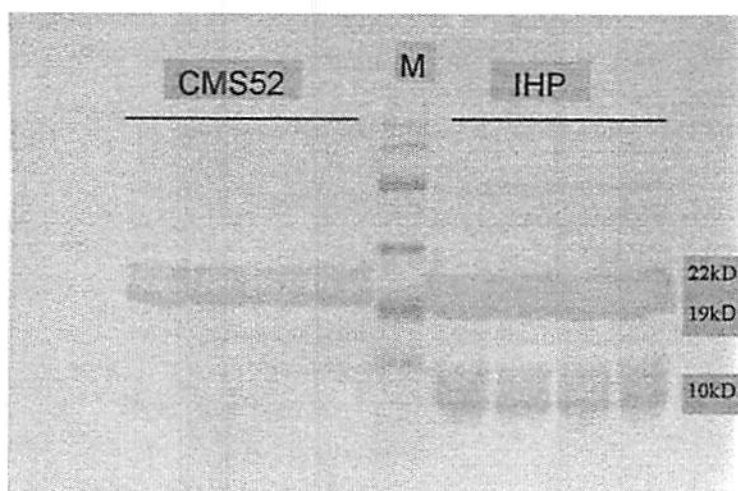


Figura 15 - Immunoblot com anticorpo específico para alfa-zeínas. Primeiramente foram detectadas alfa-zeínas de 22kD, seguidas pelas alfa-zeínas de 19kD e por último foram também detectadas as delta-zeínas de 10kD. Essa análise foi realizada para os dois genitores CMS52 e IHP. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular.

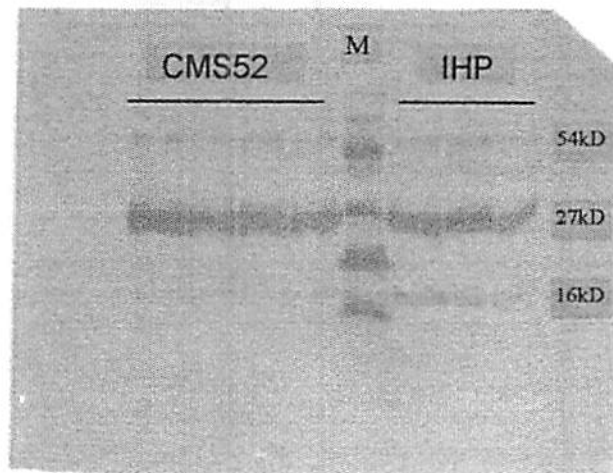


Figura 16 - Immunoblot com anticorpo específico para gama-zeínas. Primeiramente foram detectadas gama-zeínas de 54kD, seguidas pelas gama-zeínas de 27kD e por último foram detectadas as gama-zeínas de 16kD. Essa análise foi realizada para os dois genitores CMS52 e IHP. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular.

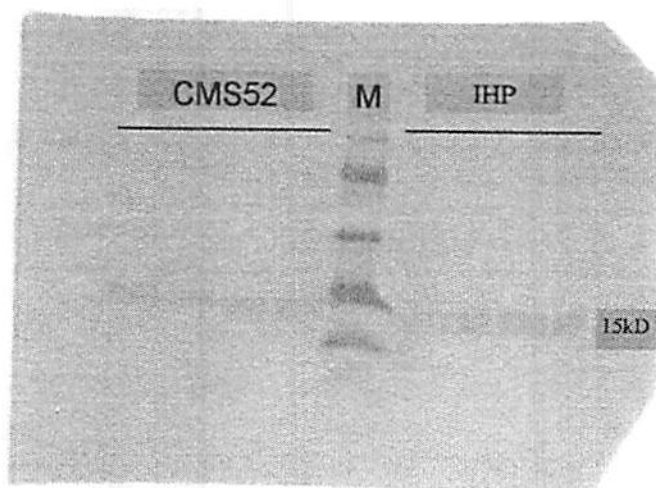


Figura 17 - Immunoblot com anticorpo específico para beta-zeínas de 15kD. Essa análise foi realizada para os dois genitores CMS52 e IHP. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular.

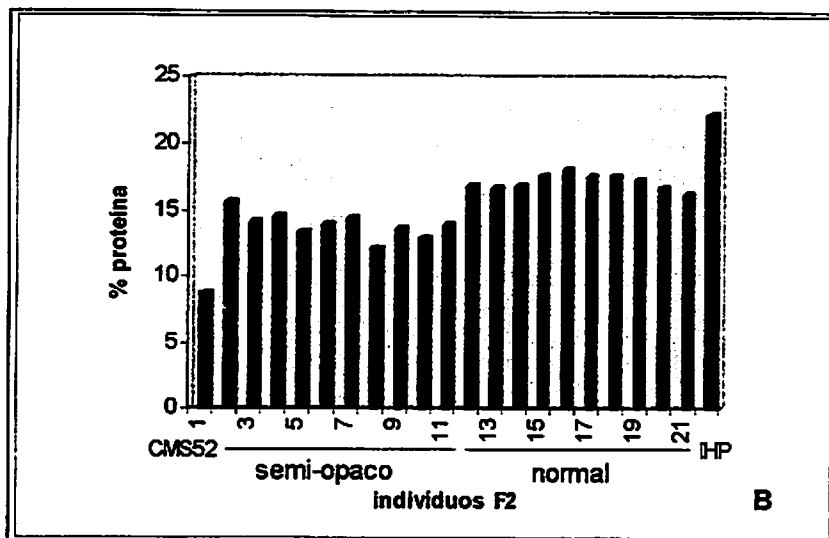
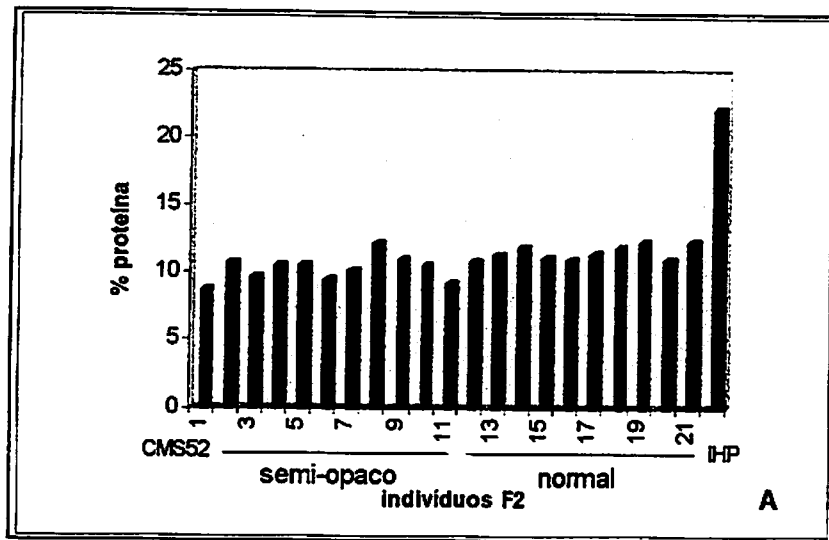


Figura 18 - Distribuição dos valores de percentagem de proteína total presentes no endosperma dos bulks 1 (A) e 4 (B) da geração F₂, resultante do cruzamento entre CMS e IHP.

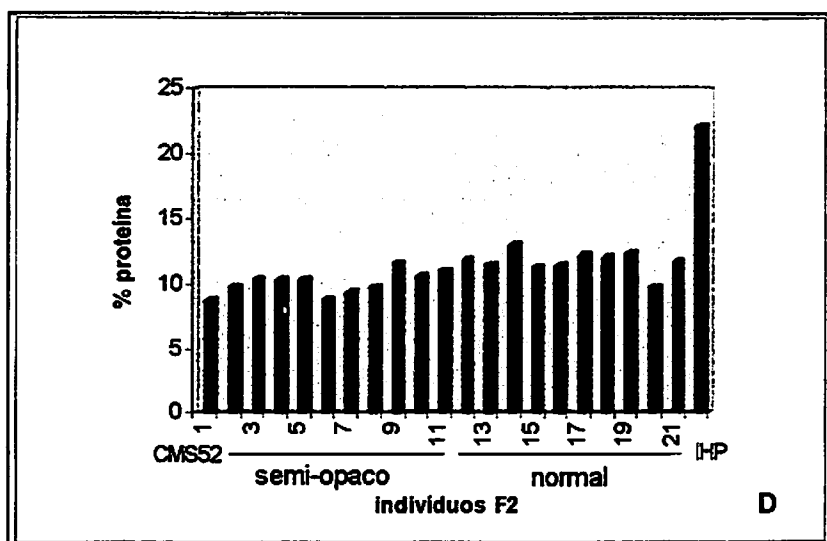
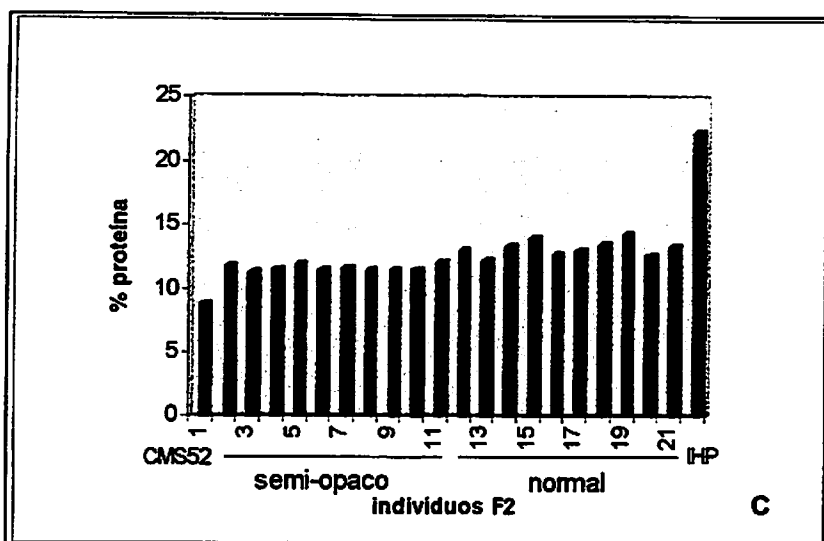


Figura 19 - Distribuição dos valores de percentagem de proteína total presentes no endosperma dos bulks 6 (C) e 9 (D) da geração F₂, resultante do cruzamento entre CMS e IHP.

presente nas proteínas do endosperma significativamente superiores àquelas do genitor IHP, contudo, esses valores ainda são muito inferiores ao observado para o CMS52 (Figuras 20 e 21).

Para este estudo foi também utilizada a população experimental de polinização aberta CMS475 QPM, resultante da introgressão de 25% da população Illinois High Protein (IHP) na população CMS52 QPM (75%). CMS475 QPM foi sintetizada com o objetivo de se desenvolver genótipos de alta qualidade nutricional com capacidade de acúmulo de elevadas quantidades de proteína no endosperma. Duzentas e trinta e uma famílias S₁ da população CMS475 QPM foram obtidas por autofecundação e analisadas semelhantemente ao descrito acima para os bulks F₂.

As percentagens de proteína total e triptofano presente nas proteínas do endosperma foram avaliadas para as 231 famílias S₁ e os dados são apresentados na Tabela 3B. As amplitudes de variação observadas foram: percentagem de proteína, 6,96% a 13,30%, e percentagem de triptofano, 0,34% a 1,20%.

Observou-se que os valores de percentagem de proteína foram inferiores àqueles encontrados nos bulks F₂, sendo que o maior valor encontrado foi igual a 13,30%, que é muito inferior ao genitor IHP e ao maior valor encontrado para os bulks F₂ (18,02%). Os dados de percentagem de proteína presente no endosperma das famílias S₁ foram apresentados graficamente para melhor visualização de sua distribuição (Figura 22).

Com relação à percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma, observou-se que todas as famílias S₁ (Figura 23) apresentaram valores superiores ao indivíduo IHP (genótipo de menor valor), sendo que algumas poderiam ser consideradas materiais de alta qualidade nutricional devido à alta percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma.

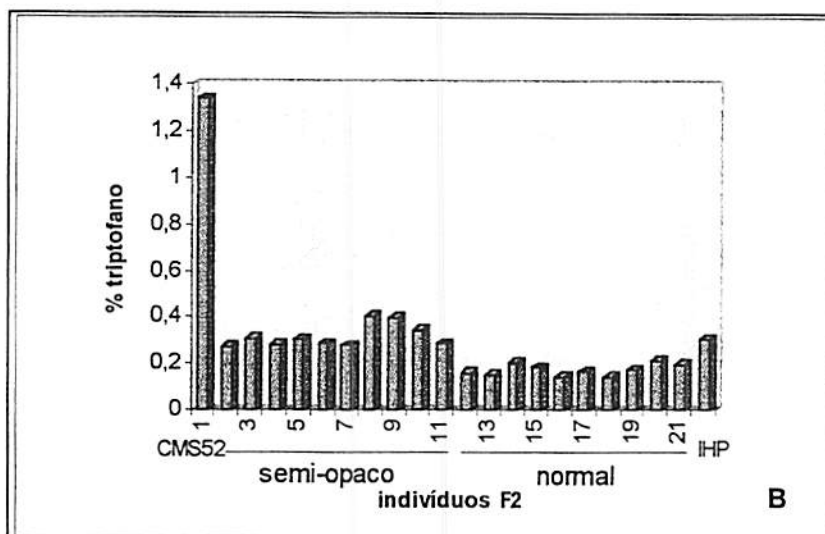
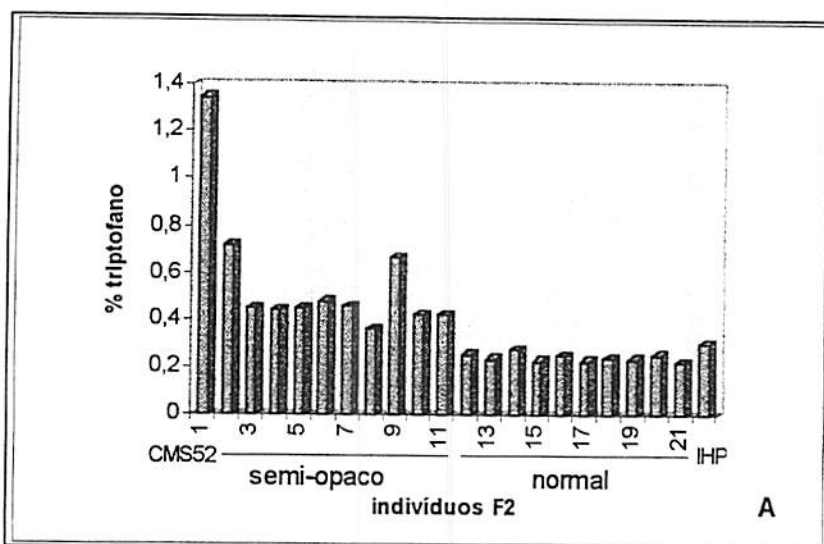


Figura 20 - Distribuição dos valores de percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma dos bulks 1 (A) e 4 (B) da geração F₂, resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.

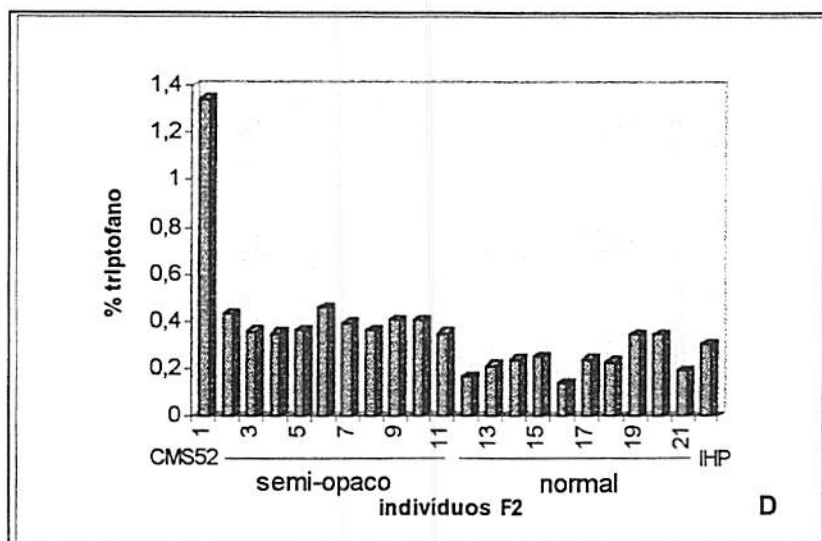
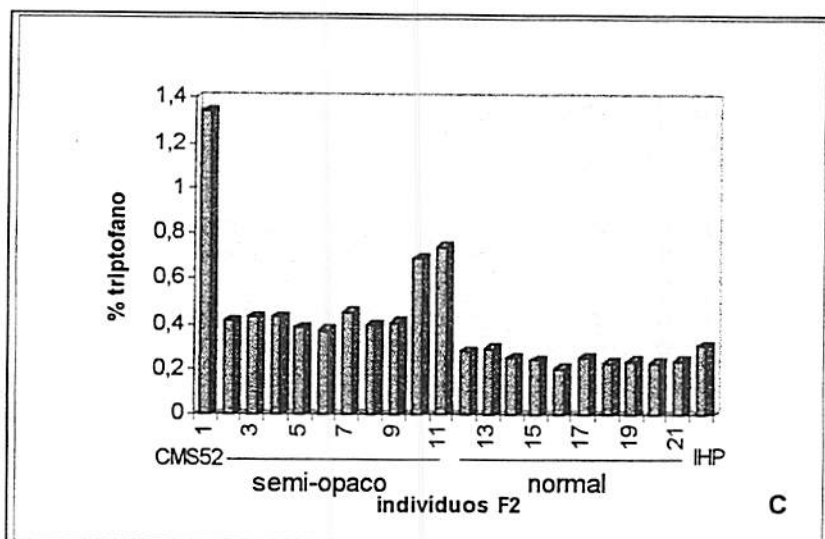


Figura 21 - Distribuição dos valores de percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma dos bulks 6 (C) e 9 (D) da geração F₂, resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.

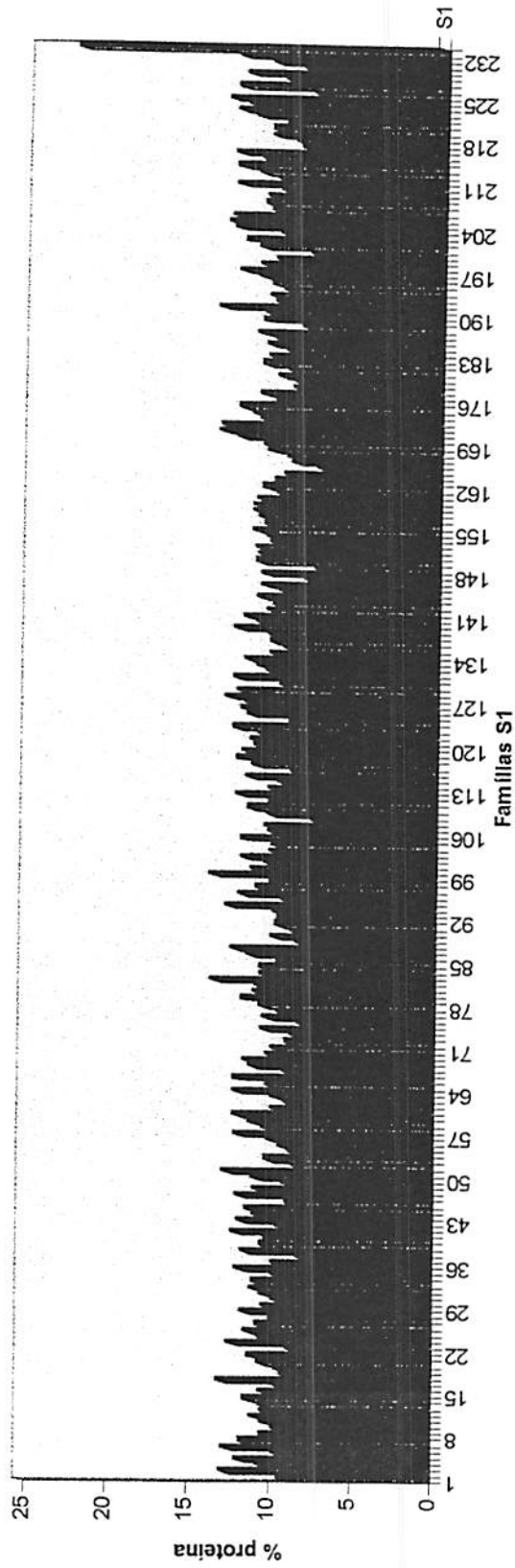


Figura 22 - Distribuição dos valores de percentagem de proteina presente no endosperma das 231 famílias S₁, resultantes da autofecundação da população CMS475. CMS52 e IHP correspondem aos indivíduos 1 e 232.

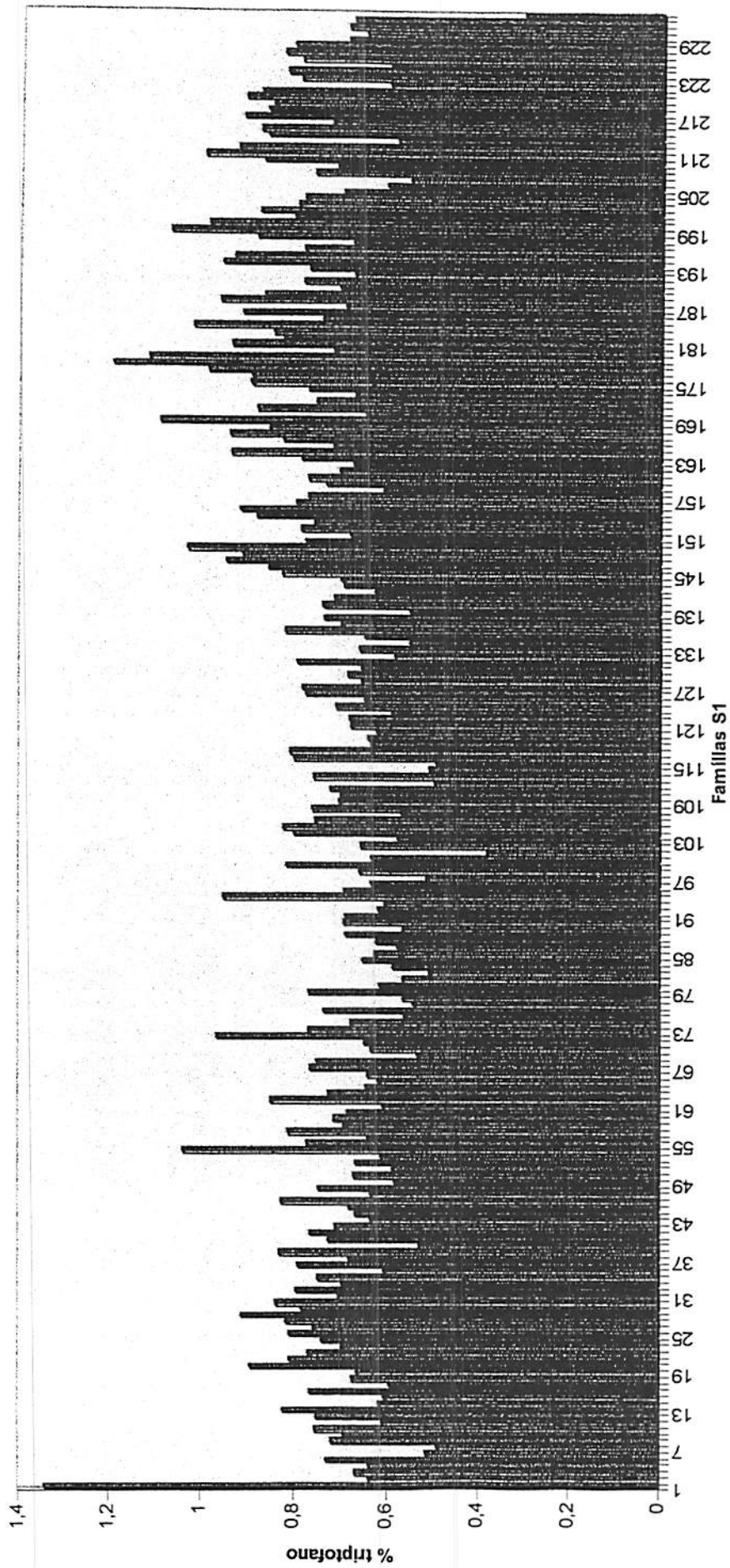


Figura 23 - Distribuição dos valores de percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma das 231 famílias S₁ resultantes da autofecundação da população CMS475. CMS52 e IHP correspondem aos indivíduos 1 e 232.

4.1.3. Análise das variações em famílias gênicas que codificam as proteínas de reserva, alfa-, beta- e delta-zeínas.

A técnica de Southern blot foi utilizada com a finalidade de avaliar possíveis diferenças entre sequências de DNA que codificam as proteínas de reserva alfa-, beta- e delta-zeínas nos dois genótipos utilizados no presente estudo, Illinois High Protein (IHP) e CMS52 QPM.

Por meio dessa análise, não foi possível observar polimorfismos entre as sequências de DNA que codificam essas classes de zeínas entre os dois genótipos genitores. Esses resultados estão demonstrados nas Figuras 24, 25, 26 e 27.

4.2 Seleção de genótipos de alta qualidade baseada no conteúdo de proteínas do endosperma.

4.2.1. Desenvolvimento de um método rápido para avaliação de qualidade nutricional.

Visando o desenvolvimento de um método alternativo e de menor custo, para avaliação rápida de qualidade nutricional em programas de seleção, avaliou-se a possibilidade de se estimar quantidade de proteína de uma amostra através de precipitação seguida de análise espectrofotométrica.

As frações proteína total e não-zeína, presentes no endosperma, foram extraídas e precipitadas pela adição de ácido tricloroacético, TCA (70%) e etanol (95%), gerando diluições em série (Figura 2). Para proteína total, as amostras foram diluídas de 2 a 256 vezes enquanto que para não-zeínas as amostras foram diluídas de 3,3 a 14.064,1 vezes. Após leitura espectrofotométrica foram obtidos valores de absorbância relativos a cada concentração gerada pela diluição em série. Em seguida, foram feitas análises de regressão para cada uma das amostras, considerando-se as diferentes concentrações como variável independente e os valores de absorbância obtidos em cada uma das concentrações como variável dependente. Os coeficientes de regressão linear (b) obtidos para cada amostra, foram considerados

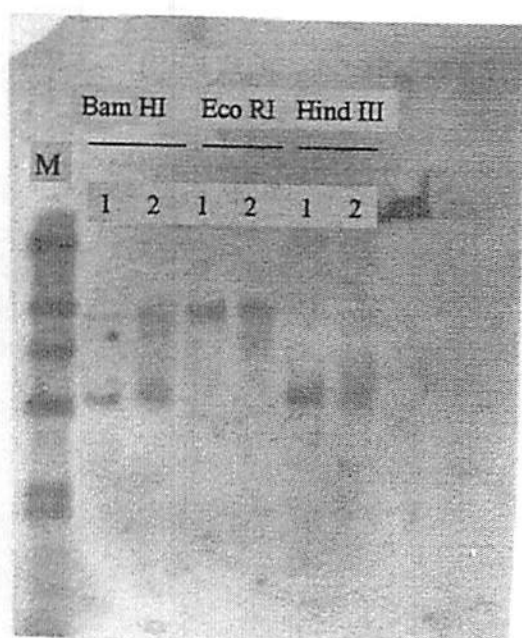


Figura 24 - Southern blot realizado para os dois genitores, CMS52 e IHP, utilizando três enzimas de restrição diferentes (Bam HI, Eco RI e Hind III), hibridados com sonda específica para alfa-zeínas de 22 kD. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular, as linhas 1 correspondem ao CMS52 e as linhas 2 correspondem ao IHP.

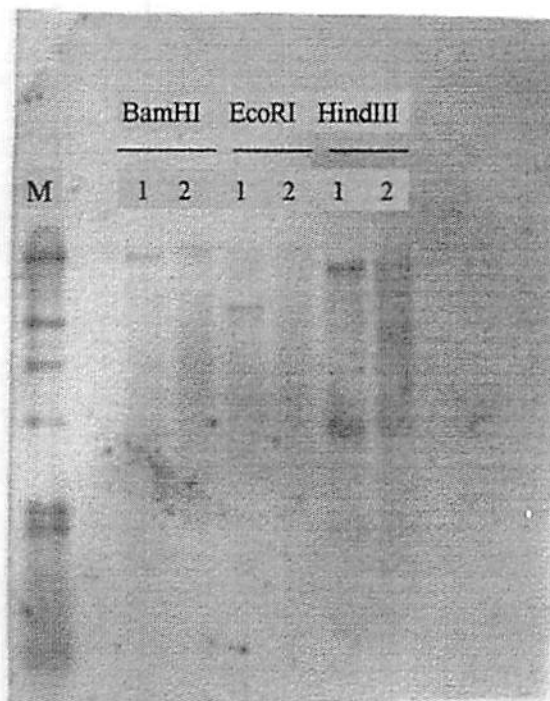


Figura 25 - Southern blot realizado para os dois genitores, CMS52 e IHP, utilizando três enzimas de restrição diferentes (Bam HI, Eco RI e Hind III), hibridados com sonda específica para alfa-zeínas de 19 kD. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular, as linhas 1 correspondem ao CMS52 e as linhas 2 correspondem ao IHP.

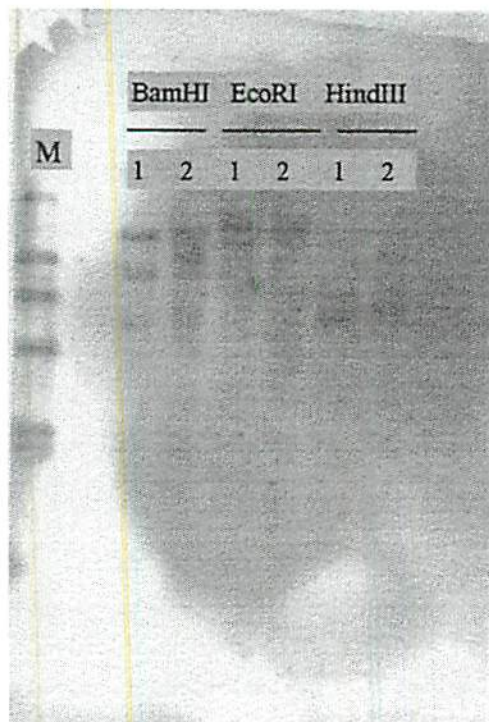


Figura 26 - Southern blot realizado para os dois genitores, CMS52 e IHP, utilizando três enzimas de restrição diferentes (Bam HI, Eco RI e Hind III), hibridados com sonda específica para beta-zeínas. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular, as linhas 1 correspondem ao CMS52 e as linhas 2 correspondem ao IHP.

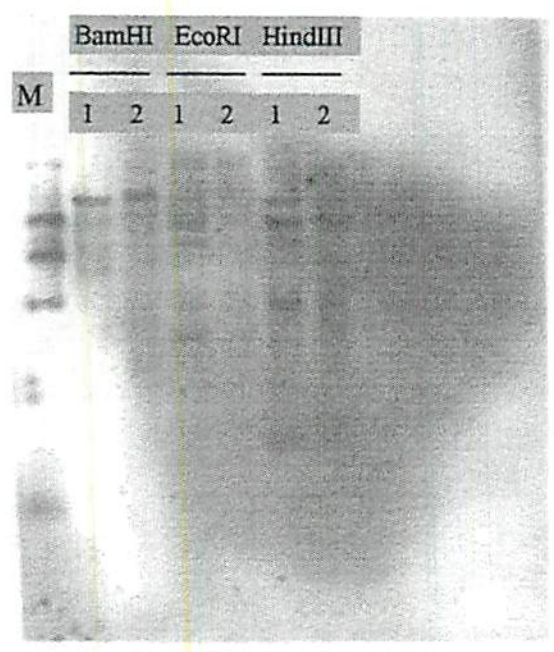


Figura 27 - Southern blot realizado para os dois genitores, CMS52 e IHP, utilizando três enzimas de restrição diferentes (Bam HI, Eco RI e Hind III), hibridados com sonda específica para delta-zeínas. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular, as linhas 1 correspondem ao CMS52 e as linhas 2 correspondem ao IHP.

estimadores indiretos dos conteúdos de proteína total e não-zeína, uma vez que quanto maior for a inclinação da reta (b) maior será o conteúdo de proteína total e não-zeína da amostra.

4.2.2. Correlação entre os métodos avaliados

Para verificar a correlação entre os resultados obtidos pelo método desenvolvido neste trabalho e os métodos normalmente usados para avaliação de qualidade, foram analisadas as seguintes variáveis: percentagem de proteína e estimador de proteína (coeficiente de regressão), percentagem de triptofano e estimador de não-zeína (coeficiente de regressão), estimadores de proteína e não-zeína e percentagem de proteína e percentagem de triptofano, presentes no grão. Os coeficientes de correlação (r) obtidos, para os quatro bulks da geração F_2 e para as famílias S_1 , estão apresentados na Tabela 4.

A análise dos indivíduos da geração F_2 indicou ampla variação para as características avaliadas. Os valores relativos foram obtidos dividindo-se os valores absolutos encontrados para os estimadores de não-zeína (b) e proteína total (b) nos indivíduos dos bulks F_2 pelo menor valor encontrado, arbitrariamente considerado 100. Os valores absolutos dos estimadores de não-zeína (b) e proteína total (b) estão apresentados na Tabela 2B. Em termos de valores relativos, foram observadas as seguintes amplitudes de variação: estimador de proteína total 100-193,57; percentagem de proteína 100-204,08; estimador de não-zeína 100-537,5; e percentagem de triptofano 100-535,50. Esses resultados indicaram que em termos de amplitude de variação, os dois métodos tem resolução semelhante.

Quando se considera as famílias S_1 (Tabela 3B), foram observadas as seguintes variações: estimador de proteína total 100-465,03; percentagem de proteína 100-191,09; estimador de não-zeína 100-1797,93; e percentagem de triptofano 100-180,14. Os dados indicaram que houve divergência entre os métodos quando os materiais avaliados foram famílias S_1 .

Tabela 4 - Coeficientes de correlação (r) obtidos considerando modelo linear para os bulks 1, 4, 6 e 9 da geração F₂ e famílias S₁.

Características Avaliadas	Bulks				Famílias
	1	4	6	9	S ₁
%proteína/proteína	0,5599 P<0,01	0,4993 P<0,05	0,4569 P<0,05	0,7055 P<0,01	0,6161 P<0,01
%triptofano/não zeína	0,4050 P<0,10	0,5768 P<0,01	0,4804 P<0,05	0,4365 P<0,05	0,1539 P<0,05
%proteína/%triptofano	-0,5331 P<0,01	-0,9432 P<0,01	-0,6513 P<0,01	-0,6887 P<0,01	0,2372 P<0,01
proteína/não zeína	-0,2399 N,S,	-0,1450 N,S,	-0,5030 N,S,	-0,3451 N,S,	0,1409 P<0,05
%triptofano/albuminas e globulinas	-----	-----	-----	-----	0,2692 P<0,01

N.S. não significativo.

Tabela 5 - Dados percentuais de eficiência de seleção dos bulks 1, 4, 6 e 9 da geração F₂ e famílias S₁.

Características avaliadas	Bulks				Famílias
	1	4	6	9	S ₁
%proteína/proteína	62,96%	62,96%	62,96%	44,44%	58,94%
%triptofano/não-zeína	25,92%	44,44%	44,44%	44,44%	25,12%
%triptofano/albuminas e globulinas	-----	-----	-----	-----	4%

Os coeficientes de correlação (r) para percentagem de proteína e estimador de proteína (b) e para percentagem de triptofano e estimador de não-zeína (b) na média das quatro amostras são 0,5554 ($P < 0,05$) e 0,4747 ($P < 0,10$), respectivamente (Tabela 4). Isto indicou que a percentagem de proteína obtida pela análise de injeção de fluxo (FIA) e o estimador de proteína total (b), obtido pela precipitação com TCA (ácido tricloroacético) são correlacionados positivamente e que esta correlação corresponde a aproximadamente 50%. Resultado semelhante foi encontrado para a percentagem de triptofano, obtida pela hidrólise enzimática, e o estimador de não-zeína, obtido pela precipitação com isopropanol. Para as famílias S_1 , os coeficientes de correlação para as características mencionadas acima são 0,6161 ($P < 0,01$) e 0,1539 ($P < 0,05$), respectivamente (Tabela 4). Esses resultados mostraram que os dois métodos são correlacionados positivamente para percentagem de proteína e estimador de proteína (b). Para percentagem de triptofano e estimador de não-zeína (b) os dois métodos são pouco correlacionados.

Considerando a baixa correlação existente entre percentagem de triptofano e estimador de não-zeína (b) nas famílias S_1 , foi calculada a correlação existente entre percentagem de triptofano e estimador de albuminas e globulinas (b), que correspondem a proteínas da fração não-zeína. Observou-se que as duas variáveis também estão pouco correlacionadas, apresentando coeficiente de correlação igual a 0,2692 ($P < 0,01$). Os dados estão apresentados na Tabela 4.

De acordo com os resultados obtidos observou-se que existe uma correlação negativa entre percentagem de proteína e percentagem de triptofano para os quatro bulks F_2 que foram avaliados. A correlação entre os estimadores de proteína (b) e não-zeína (b) foi não significativa, com tendência a ser negativa para materiais avaliados. Considerando as famílias S_1 , as variáveis descritas acima são pouco correlacionadas. Os coeficientes de correlação (r) estão apresentados na Tabela 4.

4.2.3. Eficiência de seleção

A eficiência de seleção determinou a percentagem de indivíduos que foram selecionados através dos dois métodos avaliados. Com relação à percentagem de triptofano e estimador de não-zeína foi verificado que 39,81% dos indivíduos selecionados foram coincidentes nos dois métodos, na média dos bulks de indivíduos F_2 . Quando se considerou as famílias S_1 , apenas 25,12% foram coincidentes para os dois métodos. Para percentagem de proteína e estimador de proteína total foi observado que em média a coincidência foi igual a 58,33% para os bulks da geração F_2 e igual a 58,94% para as famílias S_1 .

Os dados de eficiência de seleção para cada bulk F_2 e para as famílias S_1 estão demonstrados na Tabela 5.

5 DISCUSSÃO

O milho, apesar de amplamente utilizado na alimentação humana e animal, apresenta baixa qualidade e quantidade de proteína acumulada no endosperma. As proteínas acumuladas no endosperma perfazem cerca de 10% da matéria seca e são, em sua maioria, pobres em aminoácidos essenciais, tendo lisina e triptofano como os mais limitantes.

A caracterização do mutante *opaco-2*, realizada por Mertz, Bates e Nelson (1964), despertou grande interesse dos melhoristas, pois esse mutante apresentava os conteúdos de lisina e triptofano superiores àqueles presentes no milho normal. Porém, ao lado de sua alta qualidade nutricional, o mutante *opaco-2* apresentava algumas características agrônomicas indesejáveis, como endosperma opaco e farináceo, produção de grãos inferior ao normal, dentre outras. Após vários anos de seleção recorrente e retrocruzamento, pesquisadores do CIMMYT, conseguiram combinar a alta qualidade nutricional e características agrônomicas desejáveis, desenvolvendo um milho chamado Quality Protein Maize (QPM).

Vários estudos têm mostrado que a alta qualidade nutricional, decorrente da mutação *opaco-2*, está relacionada a diminuição de duas classes da fração protéica zeína (alfa-zeínas de 22 e 19kD) e aumento de um grupo de polipeptídeos da fração não-zeína (Habben, Kirleis e Larkins, 1993; Lopes, 1993). Como o aumento da fração não-zeína não compensa a diminuição sofrida pelas zeínas, os indivíduos que apresentam alta qualidade nutricional apresentam conteúdo de proteína total do endosperma reduzido. Sendo assim, existe uma correlação negativa entre qualidade nutricional e quantidade de proteína acumulada no endosperma. Visando aumentar a quantidade de proteína acumulada, mantendo elevada qualidade nutricional, foram realizados cruzamentos entre uma população de elevada qualidade nutricional

(CMS52 - "Quality Protein Maize") e outra capaz de acumular altas quantidades de proteína no grão ("Illinois High Protein - IHP").

Os indivíduos da geração segregante, resultante do cruzamento descrito acima, foram caracterizados com relação às alterações quantitativas e qualitativas presentes nas frações protéicas do endosperma, com o objetivo de se avaliar a possibilidade de obtenção de genótipos que apresentem maiores quantidades de proteínas ricas em aminoácidos essenciais, e de identificar os polipeptídeos que contribuem para a qualidade nutricional. Concomitantemente, métodos rápidos de screening foram desenvolvidos para auxiliar o melhorista no processo de seleção desses materiais em programas de melhoramento.

Primeiramente, os genitores CMS52-QPM e IHP foram analisados buscando caracterizar as diferenças existentes entre eles com relação às duas características de interesse (alta qualidade e quantidade protéica). De acordo com os resultados obtidos (Tabela 2B), verificou-se que esses genótipos contrastam com relação a percentagem de proteína acumulada no endosperma. Isto está de acordo com o fato, citado anteriormente, de que o genitor CMS52-QPM, apresenta conteúdo total de proteína acumulada reduzido devido à drástica diminuição na fração zeína, decorrente da mutação *opaco-2*, apresentando, assim, valores inferiores de percentagem de proteína acumulada em relação ao IHP. Essa diferença, provavelmente, foi acentuada em decorrência do processo seletivo sofrido pelo genitor IHP, que conduziu a um aumento da percentagem de proteína acumulada de 10,9% para 26,6%, após setenta ciclos de seleção (Dudley, Lambert e Alexander, 1974).

As diferenças observadas entre os genitores para percentagem de proteína acumulada no endosperma, têm reflexo primário no teor da fração protéica zeína. De acordo com a análise quantitativa dos valores de absorvância do teor total de zeína, os genitores CMS52 e IHP diferem significativamente para essa fração. Os resultados obtidos mostraram que o genitor IHP apresentou valores desta fração superiores duas vezes ao CMS52 (Tabela 1B), o que, provavelmente, causou pelo menos parte do aumento observado nesse genótipo para conteúdo total de proteína.

O aumento desta fração protéica na população IHP pode ser relacionado com a abundância de zeínas em genótipos normais. Nos genótipos normais a fração zeína corresponde a cerca de 60% das proteínas do endosperma, e isto sugere que os mecanismos relacionados com o aumento desta fração seriam manipulados mais facilmente pela seleção, o que explica o fato dos genótipos IHP apresentarem esta fração muito aumentada.

Dentre os polipeptídeos que compõem a fração zeína, a análise quantitativa dos seus valores de absorvância indicou que existe diferença significativa para todas as classes de zeínas, excetuando a classe de 12 kD (Tabela 1). De acordo com a técnica de immunoblots, que por utilizar anticorpos específicos permite detecção mais precisa dos polipeptídeos, as diferenças observadas entre os genitores concentram-se, principalmente, em três classes: alfa-, gama- e delta-zeínas. Já para a classe das beta-zeínas não foi observada diferença marcante entre os genitores. Os mesmos resultados descritos para a técnica de immunoblots, foram observados com a distribuição gráfica dos valores relativos de absorvância dos polipeptídeos da fração zeína (Figuras 6, 7 e 8).

Estas diferenças podem ser atribuídas, primeiro, à mutação *opaco-2*, que conduz a um decréscimo significativo nas alfa-zeínas (Figura 15), principalmente as de 22kD, (Pedersen et al., 1980; Burr e Burr, 1982), acarretando, assim, uma redução do conteúdo total de zeína no genitor CMS52 (QPM). Este efeito ocorre devido ao decréscimo na transcrição dos genes que codificam para esta classe de zeína (Kodrzycki, Boston e Larkins, 1989), pois o gene *opaco-2* atua como ativador dos genes das zeínas de 22 kD ao nível de transcrição (Schmidt et al., 1992). As diferenças observadas entre os genitores no que se refere ao conteúdo de alfa-zeínas não estão apenas relacionadas com a mutação *opaco-2*, mas o processo seletivo sofrido pelo genótipo IHP também pode ser levado em consideração para explicar essas diferenças. Pois, o aumento da quantidade total de proteína acumulada no grão conduziu a um aumento marcante desta fração protéica no genitor IHP.

Além do aumento no conteúdo de alfa-zeínas observado no genótipo IHP, os resultados mostraram aumento na fração protéica de delta-zeínas (Figura 15). As delta-

zeínas, de peso molecular aproximado de 10 kD, correspondem a uma pequena fração da proteína de reserva, que contém alta proporção de aminoácidos sulfurados (22% de metionina e 4% de cisteína) (Kiriara et al., 1988). Como esta proteína apresenta alto conteúdo de metionina, um dos aminoácidos essenciais limitantes no milho, seria de grande interesse aumentar a sua quantidade visando a melhoria da qualidade nutricional.

Por último, estudos de mutantes *opaco-2* modificados indicaram que a conversão do endosperma farináceo a vítreo está associada ao aumento da proteína de reserva gama-zeína (Wallace et al., 1990, Lopes, 1993). Isto explica porque os indivíduos CMS52 (QPM) tiveram o conteúdo desta proteína superior ao genitor IHP (Figura 16).

Apesar do processo seletivo que conduziu ao desenvolvimento de uma população com grandes quantidades de proteína (IHP) ter sido iniciado no século passado (1893) existe pouco conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares relacionados com alta quantidade de proteína acumulada no endosperma da população IHP. Sendo assim, as diferenças observadas entre os genitores CMS52 e IHP com relação as alfa- e delta-zeínas, que tiveram seu conteúdo aumentado no genitor IHP, poderiam ter ocorrido devido a eventos de recombinação que conduziram à amplificação das famílias gênicas que codificam as proteínas de reserva ou poderiam ter ocorrido devido a alteração de mecanismos de regulação da expressão gênica dessas proteínas.

As alfa-zeínas são proteínas de reserva codificadas por uma família multigênica que apresenta de 75 a 150 genes (Hagen e Rubenstein, 1981, Wilson e Larkins, 1984), sendo que a maioria deles são considerados pseudogenes. As delta-zeínas são normalmente codificadas por apenas um único gene. Através da análise de Southern blot com sondas específicas para alfa- e delta-zeínas (Figuras 24, 25, e 27) verificou-se a inexistência de maiores diferenças entre os dois genitores com relação às sequências gênicas que codificam essas proteínas. Portanto, as diferenças observadas entre eles podem ser resultado da modificação de mecanismos regulatórios que

conduzem ao aumento da expressão desses genes. Resultado semelhante foi descrito para beta-zeína (Figura 26).

Com relação ao teor total de não-zeína não foram observadas diferenças significativas entre os genitores (Tabela 1B). É provável que, a semelhança observada entre CMS52 e IHP resulte do aumento sofrido por esta fração nos dois genitores. O genitor CMS52 apresenta esta fração protéica aumentada para compensar a drástica redução sofrida pelas zeínas devido à mutação *opaco-2* (Lopes, 1993 e Habben, Kirleis e Larkins, 1993). De acordo com os resultados observados, o genitor IHP apresentou aumento no conteúdo desta fração, provavelmente, em decorrência do processo seletivo sofrido por este genótipo para aumentar o acúmulo de proteína total no grão.

As proteínas da fração não-zeína são as que contém a maioria dos aminoácidos essenciais limitantes no milho, lisina e triptofano (Murphy e Dalby, 1971; Wallace et al., 1990; Habben, Kirleis e Larkins, 1993). Segundo Habben, Kirleis e Larkins (1993), apenas um grupo de polipeptídeos da fração não-zeína é significativamente afetado pela mutação *opaco-2*, existindo uma correlação positiva entre conteúdo de não-zeína e qualidade nutricional. Sendo assim, seria de grande interesse a comparação do genitor IHP, que apresenta fenótipo normal, com o genitor CMS52, que corresponde ao milho de alta qualidade nutricional, buscando identificar os polipeptídeos que impactam a qualidade nutricional. No entanto, nesse trabalho não foi possível detectar diferenças significativas entre o genótipo que apresenta alta qualidade nutricional (CMS52) e aquele que corresponde ao milho normal (IHP) com relação a nenhum dos polipeptídeos que constituem a fração não-zeína.

A não detecção de diferenças entre os polipeptídeos da fração não-zeína pode ser relacionada ao fato de que no delineamento em blocos aumentados, que foi utilizado para analisar os valores de absorbância obtidos por densitometria a laser, ocorre aumento no erro padrão das médias. O aumento no erro padrão das médias, aumenta o coeficiente de variação dessa análise, o que diminui a sua precisão. Assim, a depender da magnitude das diferenças existentes entre os tratamentos, essas não são detectadas.

Outro fato que também poderia ser considerado como um inflacionador do coeficiente de variação, refere-se a variação dos valores de absorvância dos genitores, obtidos nos diferentes géis de poliacrilamida. Essas variações resultariam em aumento do erro intrabloco (uma das fontes de variação da análise em blocos aumentados) e, conseqüentemente, aumento do coeficiente de variação. Isto teria como efeito principal a não detecção de pequenas diferenças que podem existir entre os tratamentos avaliados.

Como o genitor IHP apresentou o conteúdo da fração não-zeína aumentado, o que provavelmente é resultante de um aumento uniforme dos polipeptídeos presentes nessa fração, as diferenças existentes entre os genótipos QPM e normal para os polipeptídeos da fração não-zeína tornaram-se muito pequenas e não puderam ser detectadas pela análise empregada. A complexidade da fração não-zeína também afeta a detecção das possíveis diferenças existentes entre os tratamentos avaliados, pois o grande número de polipeptídeos pertencentes a essa fração dificulta a sua identificação para posterior análise em densitômetro a laser.

Para amenizar a variação dos valores de absorvância, obtidos nos diferentes géis de poliacrilamida, observada nesse estudo e, conseqüentemente, reduzir os altos coeficientes de variação encontrados nessa análise, seria recomendável que a extração das proteínas do endosperma, o seu fracionamento e a separação eletroforética dos polipeptídeos pertencentes as diferentes frações protéicas sejam realizadas ao mesmo tempo para todos os tratamentos a serem analisados.

Além do conteúdo total da fração não-zeína que é considerado indicador da qualidade nutricional, devido à correlação positiva existente entre eles, a percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma também está relacionada com a qualidade nutricional. Isto ocorre porque o triptofano é um dos aminoácidos essenciais limitantes nas proteínas presentes no endosperma do grão do milho e, este apresenta seu conteúdo aumentado nos mutantes *opaco-2*. De acordo com os resultados, foi observado que a percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma do genitor IHP é muito inferior àquela encontrada no CMS52 (Tabela 2B). Esses resultados mostram que os genitores diferem com relação a qualidade nutricional, mas

devido ao aumento do conteúdo de não-zeína apresentado pelo genitor IHP as diferenças entre esse e o genitor CMS52 tornaram-se muito pequenas e não foram detectadas pela análise quantitativa.

É válido ressaltar que, parte da diferença observada entre os genitores para percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma, pode ser explicada porque, como esta variável é calculada em função do conteúdo de proteína total, e o genótipo IHP apresenta este conteúdo elevado, a percentagem obtida deste aminoácido poderia estar subestimada nesses indivíduos.

Após a caracterização dos dois genitores, com relação às alterações presentes nas frações protéicas que estão relacionadas com a qualidade nutricional e com o aumento da quantidade de proteína acumulada no grão, a geração segregante resultante do cruzamento entre eles foi avaliada com o objetivo de verificar se as diferenças encontradas nos genitores estariam presentes nesses indivíduos de forma combinada. Ou seja, se os indivíduos da geração F_2 apresentariam elevada qualidade nutricional associada à alta quantidade de proteína acumulada no grão.

Observou-se que a geração segregante acompanhou o comportamento do genitor IHP para percentagem de proteína acumulada no endosperma, apresentando valores superiores ao CMS52-QPM (Figuras 18 e 19). Mesmo entre os indivíduos de fenótipo semi-opaco, que por apresentar a mutação *opaco-2* têm conteúdo de proteína inferior aos indivíduos de fenótipo normal, existem alguns que apresentam este valor aumentado de forma significativa. Isto indica que o cruzamento da população QPM (CMS52) com IHP atendeu a um dos objetivos desse estudo, produzindo indivíduos F_2 que apresentam o conteúdo de proteína total, presente no endosperma, aumentado (Tabela 2B).

Através da análise quantitativa empregada não foi possível detectar diferenças significativas entre os indivíduos F_2 para teor total de zeína (Tabela 1). É provável que, esse resultado tenha sido obtido devido ao alto coeficiente de variação observado nessa análise (34,63%). Como comentado anteriormente, o alto valor do coeficiente de variação pode estar relacionado às limitações presentes no delineamento em blocos

aumentados e/ou ao alto valor do erro intrabloco decorrente das flutuações dos valores de absorvância dos genitores nos diferentes géis de poliacrilamida.

Quando os valores de absorvância do teor total de zeína, obtidos por densitometria a laser, foram distribuídos graficamente (Figuras 3, 4 e 5) foi possível observar que tanto os indivíduos de fenótipo semi-opaco quanto os de fenótipo normal apresentaram conteúdo dessa fração superior aquele presente no genitor CMS52. Sendo assim, parte do aumento observado na geração segregante para percentagem de proteína pode ser atribuído ao aumento do conteúdo da fração zeína.

Diferenças estatísticas entre os indivíduos F_2 com relação a distribuição percentual dos polipeptídeos da fração zeína, foram observadas para as classes de 54, 14, 12 e 10 kD (Tabelas 2 e 3). É válido ressaltar que os coeficientes de variação, indicadores da precisão do experimento, obtidos para as demais classes de zeína (exceto para a classe de zeína de 19 kD) foram considerados altos (superiores a 20%), o que afeta a detecção de diferenças entre os tratamentos avaliados.

Quando os valores de absorvância dos polipeptídeos da fração zeína, obtidos por densitometria a laser, foram distribuídos graficamente (Figuras 6, 7 e 8), foi possível observar que a maioria dos indivíduos de fenótipo semi-opaco apresentaram os conteúdos das classes de 22 kD (alfa-zeína) e 27 kD (gama-zeína) aumentados em relação ao genitor CMS52 e que o conteúdo da fração gama-zeína foi muito superior ao de alfa-zeína nesses indivíduos. A superioridade do conteúdo de gama-zeína em relação ao de alfa-zeína, verificado nos indivíduos de fenótipo semi-opaco, deve-se a presença da mutação *opaco-2*, que reduz o conteúdo de alfa-zeínas; e da ação dos genes modificadores, que aumenta o conteúdo de gama-zeínas. Estes resultados indicaram que é possível aumentar o conteúdo de zeína total e, conseqüentemente, aumentar o conteúdo de proteína presente no endosperma, mantendo a proporcionalidade dos polipeptídeos da fração zeína, característica dos genótipos de alta qualidade nutricional (QPM).

Com relação ao teor total de não-zeína, não foi possível detectar diferença significativa entre os indivíduos F_2 através da análise quantitativa que foi realizada.

A partir da distribuição gráfica dos valores de absorvância da fração não-zeína (Figuras 9, 10 e 11) foi verificado que, além do aumento observado para o teor total de zeína, também foi observado aumento do teor total de não-zeína para os indivíduos F_2 . Alguns indivíduos de fenótipo semi-opaco apresentaram valores da fração não-zeína superiores ao genitor CMS52, que era o genótipo de maior valor. Portanto, o aumento observado para percentagem de proteína foi resultado de um aumento conjunto em ambas as frações protéicas do endosperma do milho (zeína e não-zeína).

Com relação à distribuição dos polipeptídeos da fração não-zeína não foi possível detectar diferenças significativas entre os indivíduos F_2 analisados. Esses resultados podem ser relacionados aos altos coeficientes de variação obtidos nessa análise, já que quanto mais alto for o coeficiente de variação menor é a probabilidade de que pequenas diferenças existente entre os tratamentos sejam detectadas. Resultado semelhante foi encontrado quando os valores percentuais de absorvância dos polipeptídeos dessa fração foram distribuídos graficamente (Figuras 12, 13 e 14)

Como o descrito anteriormente, o teor total de não-zeína e os valores de percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma podem ser considerados indicadores de qualidade nutricional. Portanto, a ausência de diferenças marcantes observada entre os indivíduos da geração F_2 no que se refere a distribuição dos polipeptídeos da fração não-zeína também pode ser relacionado ao fato de que não houve diferenças marcantes para a maioria dos indivíduos F_2 no referente aos valores de percentagem de triptofano. Para a maioria desses indivíduos, os valores de percentagem de triptofano, mantiveram-se próximos ao genitor de menor valor IHP (Figuras 20 e 21), sendo esses valores muito inferiores aos apresentados pelo genitor de alta qualidade nutricional, CMS52.

Assim, é provável que, o aumento observado nos indivíduos F_2 para conteúdo total de não-zeína tenha sido resultante de um aumento uniforme dos polipeptídeos presentes nessa fração e, portanto, o grupo de polipeptídeos da fração não-zeína que apresentam-se aumentados nos genótipos de alta qualidade nutricional (Lopes, 1993 e Habben, Kirleis e Larkins, 1993), não sofreu aumento significativo capaz de conduzir à alta qualidade nutricional na população avaliada. Esses resultados sugeriram que o

aumento observado nos indivíduos F_2 para conteúdo de zeínas e não-zeína não foi aliado ao aumento da qualidade nutricional, o que foi indicado pelos baixos valores de percentagem de triptofano.

Também deve ser considerado que, de forma semelhante ao já descrito para o genitor IHP, os valores de percentagem de triptofano presentes nos indivíduos F_2 poderiam estar subestimados, já que esses valores são calculados em função do conteúdo de proteína total, e os indivíduos F_2 apresentam esse conteúdo elevado.

Apesar da maioria dos indivíduos F_2 terem apresentado valores de percentagem de triptofano próximos ao IHP, foi possível observar que alguns indivíduos de fenótipo semi-opaco apresentaram valores de percentagem de triptofano e percentagem de proteína intermediários em relação àqueles apresentados pelos genitores, sendo estes indivíduos considerados promissores.

Além dos bulks F_2 , também foram avaliadas famílias S_1 resultantes de autofecundação da população CMS475 que apresentam o seu conjunto genômico constituído de 25% da população Illinois High Protein (IHP) na população CMS52 QPM (75%). CMS475 QPM foi sintetizada com o objetivo de se desenvolver genótipos de alta qualidade nutricional com capacidade de acúmulo de elevadas quantidades de proteína no endosperma.

Os resultados mostraram que os valores de percentagem de proteína das famílias S_1 foram inferiores àqueles encontrados para os indivíduos F_2 e para o genitor IHP (Tabela 3B). Com relação à percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma, observou-se que todas as famílias S_1 apresentaram valores superiores ao indivíduo IHP, genótipo de menor valor (Tabela 3B). Os resultados obtidos mostraram que existe correlação negativa entre percentagem de proteína e percentagem de triptofano presentes nas proteínas do endosperma, já que nas famílias S_1 foi observada redução do conteúdo de proteína total e simultâneo aumento do conteúdo de triptofano presente nas proteínas do endosperma, comparado aos bulks F_2 . Esses resultados podem ser explicados porque as famílias S_1 apresentaram 75% do seu genoma correspondente ao CMS52, que apresenta menor valor de conteúdo de proteína acumulada no grão e maior conteúdo de triptofano presente nas proteínas do

endosperma comparado aos genótipos de milho normais, devido a mutação *opaco-2*. A existência de correlação negativa entre concentração de proteína e qualidade nutricional já havia sido descrita por Axtell (1981).

A despeito da correlação negativa existente entre quantidade de proteína acumulada no endosperma e qualidade nutricional, algumas famílias apresentaram valores de percentagem de proteína acumulada no endosperma, relativamente altos quando comparados aos valores encontrados nos genótipos normais, ao lado de elevados valores de percentagem de triptofano. Observou-se que algumas famílias S₁ que apresentaram valores de percentagem de triptofano 3 vezes maior do que o valor encontrado no IHP (Tabela 3B).

Apesar de existir variabilidade genética no milho para o acúmulo de proteína e para melhoria da qualidade nutricional, a falta de conhecimento a respeito dos mecanismos de regulação da expressão gênica relacionados com essas características e a existência de correlação negativa entre produção de grãos, acúmulo de proteína no endosperma e qualidade nutricional, tem limitado o progresso no sentido do desenvolvimento de genótipos que apresentam alta quantidade de proteína acumulada no endosperma associada a alta qualidade nutricional. Além disso, dependendo do número de locos envolvidos com a manifestação dessas características e dos seus mecanismos de herança seria necessário um grande número de indivíduos F₂ para a obtenção de genótipos com altas quantidades de proteína e alta quantidade dos aminoácidos essenciais limitantes no milho.

Nesse estudo foi observado que, os indivíduos da geração segregante, resultante do cruzamento entre IHP e CMS52, apesar de terem apresentado aumento nas frações protéicas zeína e não-zeína, e conseqüentemente aumento do conteúdo de proteína total acumulada no grão, apresentaram valores de percentagem de triptofano muito inferiores ao CMS52 (QPM). Ou seja, estes indivíduos em sua maioria apresentaram alta quantidade de proteína acumulada, porém baixa qualidade nutricional. No entanto, alguns indivíduos apresentaram níveis intermediários promissores, indicando possibilidades de se melhorar quantitativa e qualitativamente a proteína do endosperma do milho.

A seleção de genótipos que apresentam alta qualidade nutricional, ou seja, alto conteúdo de aminoácidos essenciais está, na maioria das vezes, baseada na determinação da percentagem de triptofano existente nas proteínas do endosperma do grão do milho, de acordo com o método proposto por Hernandez e Bates (1969). Porém, este método apresenta algumas limitações como custo e laboriosidade, portanto, o desenvolvimento de um método de fácil e rápida execução seria de grande interesse para programas de melhoramento que visam detectar materiais de alta qualidade.

Mais recentemente Moro et al. (1996) propuseram outro método para seleção de genótipos com alto conteúdo de aminoácidos essenciais através da correlação existente entre lisina e uma proteína de 54 kD (EF-1alfa). Contudo este ainda é um método laborioso, caro e que exige mão-de-obra especializada. Além disso, a relação existente entre a proteína EF-1alfa e a qualidade nutricional ainda não foi completamente esclarecida. Portanto, a elaboração de um método mais fácil e rápido é ainda justificável.

Métodos de rápido screening foram desenvolvidos visando facilitar o monitoramento de qualidade nutricional em programas de melhoramento genético. Como a alta qualidade nutricional está relacionada ao aumento de um grupo de polipeptídeos da fração não-zeína (Lopes, 1993; Habben, Kirleis e Larkins, 1993), a precipitação desta fração poderia ser um método indireto para seleção de genótipos com alto conteúdo dos aminoácidos de interesse. O método proposto foi, então, baseado na precipitação e análise espectrofotométrica da fração não-zeína com a utilização de etanol, o que resulta na formação de um coágulo leitoso cuja absorbância foi obtida em espectrofotômetro.

O estimador de não-zeína (b) avaliado indiretamente pelo método proposto neste trabalho não mostrou alta correlação desta fração com a percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma, determinada pelo método proposto por Hernandez e Bates em 1969 (Tabela 4). Este método não poderia ser utilizado para selecionar indivíduos que apresentam alta percentagem de triptofano e, conseqüentemente, alta qualidade nutricional. A pouca eficiência do método

desenvolvido nesse estudo pode ser explicada, primeiro, porque os indivíduos da geração segregante resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP apresentaram valores de percentagem de triptofano presente nas proteínas do endosperma baixos, mas alto conteúdo total de não-zeína, logo a relação existente entre alto conteúdo de não-zeína e alta percentagem de triptofano não foi verificada nesta população. A segunda hipótese para explicar a baixa correlação seria a falta de eficiência do método para precipitação total da fração não-zeína, já que esta é uma fração complexa composta de albuminas (proteínas solúveis em água e soluções salinas), globulinas (proteínas solúveis em soluções salinas) e glutelinas (proteínas solúveis em detergentes) (Murphy e Dalby, 1971; Wallace et al., 1990; Habben, Kirleis e Larkins, 1993). Esta correlação também foi baixa quando avaliou-se as famílias S₁.

Como a correlação entre percentagem de triptofano e estimador de não-zeína (b) foi baixa, buscou-se verificar a correlação existente entre percentagem de triptofano e estimador do conteúdo de albuminas e globulinas (b). Esta análise foi realizada apenas para as famílias S₁, devido à ausência de material para realizar essa análise também na população F₂. Contudo, os resultados obtidos mostraram que existe baixa correlação entre as duas variáveis (Tabela 4) e, portanto, este método não poderia ser utilizado com método indireto para selecionar indivíduos que apresentam alta percentagem de triptofano.

Além da qualidade nutricional, o aumento da quantidade de proteína que é acumulada no endosperma do milho foi interesse desse estudo, já que apenas 10% do grão do milho corresponde a proteína. Então, também foi proposto um método que permitisse rápida avaliação do conteúdo de proteína presente no endosperma, pois os dois métodos comumente utilizados, método Kjeldahl e de Análise de Injeção de Fluxo (FIA) proposto por Stewart et al., 1976, são laboriosos e exigem mão-de-obra especializada. O método desenvolvido baseou-se na precipitação das proteínas com a utilização de ácido tricloroacético e leitura da absorbância do precipitado (coágulo leitoso) em espectrofotômetro. Os coeficientes de correlação obtidos entre o estimador de proteína (b) obtido por este método e a percentagem de proteína obtida por métodos antigos (Tabela 4) indicaram a existência de uma correlação positiva entre

eles. De acordo com os resultados, a coincidência de seleção de indivíduos entre os dois métodos foi relativamente alta (Tabela 5). Portanto, o método proposto poderia ser utilizado para auxiliar o melhorista na seleção de indivíduos com alto conteúdo de proteína.

6 CONCLUSÕES

Alguns indivíduos F_2 e algumas famílias S_1 apresentaram níveis intermediários promissores com relação à qualidade nutricional e quantidade protéica, indicando possibilidades de se melhorar quantitativa e qualitativamente a proteína do endosperma do milho.

Foi verificada a inexistência de maiores diferenças entre os dois genitores com relação às sequências genes que codificam as alfa-, beta- e delta-zeínas. Isto sugere que, as diferenças observadas entre os dois progenitores com relação a distribuição quantitativa dos polipeptídeos da fração zeína podem ser resultado da modificação de mecanismos regulatórios que conduzem ao aumento da expressão desses genes.

Os métodos baseados na precipitação de não zeína ou na precipitação de albuminas e globulinas não foram eficientes para selecionar indivíduos que apresentam alta percentagem de triptofano fazendo-se necessário o aperfeiçoamento desta metodologia. Por outro lado, o método proposto para selecionar indivíduos que apresentam alta quantidade de proteína acumulada no endosperma, mostrou ser eficiente para atender este objetivo, nos materiais avaliados neste trabalho. Contudo, faz-se necessário avaliar essa metodologia com outros materiais.



7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGOS, P.M.; PEDERSEN, K.; MARKS, M.D.; LARKINS, B.A. A structural model for maize proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.257, n.17, p.9984-9990, Sept. 1982.
- AUKERMAN, M.J.; SCHMIDT, R.J.; BURR, B.; BURR, F.A. An arginine to lysine substitution in the bZip domain of an Opaque-2 mutant in maize abolishes specific DNA binding. **Genes and Development**, New York, v.5, n.2, p.310-320, 1991.
- AXTELL, J.D. Breeding for improved nutritional quality. In: FREY, K.E. (ed.). **Plant breeding II**. Iowa State: University of Iowa State, 1981. p.365-432.
- BARROS, E.G.; LARKINS, B.A. Purification and characterization of zein-degrading proteases from endosperm of germinating maize seeds. **Plant Physiology**, Washington, v.94, p.297-303, May 1990.
- BASS, H.W.; WEBSTER, C.; O'BRIAN, G. R.; ROBERTS, J.K.M.; BOSTON, R.S. A maize ribosome-inactivating protein is controlled by the transcriptional activator opaque-2. **The Plant Cell**, Rockville, v.4, p.225-234, Feb. 1992.
- BERNER, M.S.; PHILLIPS, R.L.; KIRIHARA, J.A.; MESSING, J.W. Genetic analysis of methionine-rich storage protein accumulation in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.78, n.6, p.761-767, Dec. 1989.
- BJANARSON, M.; VASAL, S.K. Breeding of quality maize (QPM). In: JANICK, J. (ed.). **Plant breeding reviews**. Westport: AVI, 1992. p.118-216.
- BORANAT, A.; MARTINEZ, M.C.; REINA, M.; PUIGDOMENECH, P.; PALAU. Isolation and sequencing of a 28 kD glutelin-2 gene from maize. Common elements in the 5'-flanking regions among zein and glutelin genes. **Plant Science**, Calcuta, v.47, n.2, p.95-102, 1986.
- BRONDANI, C. **Análise de RFLP da tolerância à toxidez do alumínio em milho**. Lavras:ESAL, 1993. 78 p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

- BURR, F.A.; BURR, B. Three mutations in *Zea mays* affecting zein accumulation: a comparison of zein polypeptides, in vitro synthesis and processing, mRNA levels, and genomic organization. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.94, p.201-206, July 1982.
- CHRISTIANSON, D.D. NIELSEN, H.C.; KHOO, U., WOLF, M.J.; WALL, J.S. Isolation and chemical composition of protein bodies and matrix proteins in corn endosperm. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.46, n.4, p.372-381, July 1969.
- CLORE, A.M.; DANNENHOFFER, J.M.; LARKINS, B.A. EF-1 α is associated with a cytoskeletal network surrounding protein bodies in maize endosperm cells. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, p.2003-2014, Nov. 1996.
- COLEMAN, C.E.; HERMAN, E.M.; TAKASAKI, K.; LARKINS, B.A. The maize γ -zeins sequesters α -zeins and stabilizes its accumulation in protein bodies of transgenic tobacco endosperm. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, p.2335-2345, Dec. 1996.
- DALBY, A.; TSAI, C.Y. Comparison of lysine and zein and non-zein proteins contents in immature and mature maize endosperm mutants. **Crop Science**, Madison, v.15, n.4, p.513-515, July 1975.
- DAS, O.P.; MESSING, J.W. Allelic variation and differential expression at the 27-kilodalton zein locus in maize. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.7, p.4490-4497, 1987.
- DAS, O.P.; POLIAK, E.; WARD, K.; MESSING, J. A new allele of the duplicated 27 KD zein locus of maize generated by homologous recombination. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, n.12, p.3325-3330, Jan. 1991.
- DIFONZO, N.; FORNASARI, E.; SALAMINI, F.; REGGIANE, R.; SOAVE, C. Interaction of the mutants floury-2, opaque-7 with opaque-2 in the synthesis of endosperm proteins. **Journal of Heredity**, Washington, v.71, n.6, p.397-402, Nov. 1980.
- DIFONZO, N.; HASTINGS, H.; MADDALONI, M.; LOHMER, S.; THOMPSON, R.; SALAMINI, F.; MOTTO, M. Genetic and molecular studies in maize. In: HERMANN, R.G.; LARKINS, B.A. (eds.). **Plant molecular biology**. New York: Plenum, 1991. v.2, p.627-634.
- DOLL, H. Storage proteins in cereals. In: MUHAMMED, A.(ed.). **Genetic diversity in plants**. New York: Plenum, 1977. p. 337-347.
- DUDLEY, J.W. 76 generations of selection for oil and protein in maize. In: POLLAK, E.; KEMPTHORNE, O.; BAILEY, B.T. (eds.). **INTERNATIONAL CONFERENCE ON QUANTITATIVE GENETICS, 1976. Proceedings...** [Ames]: University of Iowa State, 1977. p.459-474.

- DUDLEY, J.W.; LAMBERT, R.J. Ninety generations of selection for oil and protein in maize. *Maydica*, Bergamo, v.37, n.1, p.81-87, Jan. 1991.
- DUDLEY, J.W.; LAMBERT, R.J.; ALEXANDER, D.E. Seventy generations of selection for oil and protein concentration in the maize kernel. In: DUDLEY, J.W.(ed.). **Seventy generations of selection for oil and protein percentage in maize**. Madison: Crop Science Society of America, 1974. p.181-212.
- DUVICK, D.N. Protein granules of maize endosperm cells. *Cereal Chemistry*, St. Paul, v.38, n.3, p.374-385, 1961.
- EMERSON, R.A.; BEADLE, G. W.; FRAZER, A. C. **A summary of linkage studies in maize**. Cornell: Univ. Agric. Exp. Stn. Mem., 1935. 180 p.
- ENDO, Y.; TSURUGI, K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain: mechanism of action of the toxin lectin ricin on eucaryotic ribosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v.262, n.17, p.8128-8130, 1987.
- ESEN, A. Separation of alcohol soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. *Plant Physiology*, Washington, v.80, n.3, p.623-627, 1986.
- ESEN, A. A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Cereal Science*, London, v.5, p.117-128, June 1987.
- ESEN, A.; BIETZ, J.A.; PAULIS, J.W.; WALL, J.S. Tandem repeats in the N-terminal sequence of a proline-rich protein from corn endosperm. *Nature*, London, v.296, p.678-679, 1982.
- ESEN, A.; STELER, D.A. Immunocytochemical localization of delta-zein in the protein bodies of maize endosperm cells. *American Journal of Botanic*, Columbus, v.79, n.3, p.243-248, 1992.
- FEIX, G.; QUAYLE, T. Structure and expression of zein genes of maize. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca-Raton, v.12, n.1/2, p.111-127, 1993.
- GEETHA, K.B.; LEDING, C.R.; LOPES, M.A.; WALLACE, J.C.; LARKINS, B.A. Opaque-2 modifiers increase gamma zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. *The Plant Cell*, Rockville, v.3, n.11, p.1207-1219, Nov. 1991.
- GENTINETTA, E.; MAGGIORE, F.; SALAMINI, F. Protein studies in 46 opaque-2 strains with modified endosperm texture. *Maydica*, Bergamo, v.20, p.145-164, July 1975.
- GERAGHTY, D.E.; PEIFER, M.A.; RUBENSTEIN, I.; MESSING, J. The primary structure of a plant storage protein. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.9, p.5163-5174, 1981.

- GIANAZZA, E.; VIGLIENGI, V.; RIGHETTI, P.G.; SALAMINI, F.; SOAVE, C. Amino acid composition of zein molecular components. *Phytochemistry*, Elmsford, v.16, n.2, p.315-317, 1977.
- GLOVER, D.V.; MERTZ, E.T. Com. In: OLSON, C.; FREY, K.J. (eds.). **Nutritional quality of cereal grains: genetic and agronomic improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1987. p.183-336. (ASA Monography, 28).
- HABBen, J.E.; KIRLEIS, A.W.; LARKINS, B.A. The origin of lysine-containing proteins in opaque-2 maize endosperm. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v.23, p.825-838, Aug. 1993.
- HAGEN, C.; RUBENSTEIN, I. Complex organization of zein genes in maize. *Genetics*, Madison, v.13, p.239-249, 1981.
- HASTINGS, H.; BONANOMI, S.; SOAVE, C.; DiFPNZO, N.; SALAMINI, F. Mapping genes for minor zein SDS subunits and revision of zein genes nomenclature. *Genetica Agraria*, Roma, v.38, n.4, p.447-464, 1984.
- HEJGAARD, J.; BOISEN, S. High-lysine proteins in hiproli barley breeding: identification, nutritional significance and new screening methods. *Hereditas*, Lund, v.93, p.311-320, 1980.
- 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).
- HURKMAN, W.J.; SMITH, L.D.; RICHTER, J.; LARKINS, B.A. Subcellular compartmentalization of maize storage proteins in *Xenopus* oocytes injected with zein messenger RNAs. *Journal of Cell Biology*, New York, v.89, p.292-299, July 1981.
- JONES, R.A. Effects of floury-2 locus on zein accumulation and RNA metabolism during maize endosperm development. *Biochemical Genetics*, New York, v.6, n.1, p.27-38, 1978.
- 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.
- KODRZYCKI, R.; BOSTON, R.S.; LARKINS, B.A. The opaque-2 mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *The Plant Cell*, Rockville, v.1, n.1, p.105-114, Jan. 1989.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.227, n.5259, p.680-684, Aug. 1970.

- LANDRY, J.; MOUREAUX, M.T. Heterogeneity of the glutelins of the grain of corn: selective extraction and composition in amino acids of the three isolated fractions. **Bulletin de la société de chimie biologique**, Paris, v.52, p.1021, 1970.
- LARKINS, B.A. Seed storage proteins: characterization and biosynthesis. In: MARCUS, A. (ed.). **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. San Diego: Academic, 1981. v.6, p.449-489.
- LARKINS, B.A.; LENDING, C.R.; BARROS, E. Assembly of maize storage proteins into protein bodies in developing endosperm. In: HERMANN, R.G.; LARKINS, B.A. (eds.). **Plant molecular biology**. New York: Plenum, 1991. v.2, p.619-625.
- LARKINS, B.A.; WALLACE, J.C.; GALILI, G.; LENDING, C.R.; KAWATA, E.E. Structural analyses and modification of maize storage proteins. **Developments in Industrial Microbiology**, New York, v.30, n.4, p.203-209, 1989.
- LEE, K.H.; JONES, R.A.; DALBY, A.; TSAI, C.Y. Genetic regulation of storage protein content in maize endosperm. **Biochemical Genetics**, New York, v.14, p.641-650, 1976.
- LENDING, C.R.; LARKINS, B.A. Changes in the zein composition of protein bodies during maize development. **The Plant Cell**, Rockville, v.1, n.8, p.1011-1023, Aug. 1989.
- LOPES, M.A. **Genetic and biochemical characterization of the maize mutants floury-2 and modified opaque-2**. Tucson: University of Arizona, 1993. 269 p. (Tese - Doutorado).
- LOPES, M.A.; LARKINS, B.A. γ -zein content is related to endosperm modification in Quality Protein Maize (QPM). **Crop Science**, Madison, v.31, n.6, p.1655-1662, 1991.
- LOPES, M.A.; LARKINS, B.A. Genetic analyses of opaque-2 modifier gene activity in maize endosperm. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.19, p.274-281, Feb. 1995.
- LUDEVID, M.D.; TORRENT, M.; MARTINEZ-IZQUIERDO, J.A.; PUIGDOMÈNECH, P.; PALAU, J. Subcellular localization of glutelin-2 in maize (*Zea mays* L.) endosperm. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.3, n.1, p.227-234, 1984.
- MA, Y.; NELSON, O.E. Amino acid composition and storage protein in two new high lysine mutants in maize. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.52, n.3, p.412-419, May 1975.
- MARKS, M.D.; LARKINS, B.A. Analysis of sequence micro-heterogeneity among zein mRNAs. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.257, n.30, p.9883-9976, Dec. 1982.

- MARKS, M.D.; LINDELL, J.S.; LARKINS, B.A. Quantitative analysis of the accumulation of zein mRNA during maize endosperm development. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.260, n.30, p.16445-16450, Dec. 1985.
- MCWHIRTER, K.S. A floury endosperm, high lysine locus on chromosome 10. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Columbia, n.45, p.184, 1971.
- MEHTA, S.L.; DONGRE, A.B.; JOHARI, R.P.; LODHA, M.L.; NAIK, M.S. Biochemical constraints that determine protein quality and grain yield in cereals. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Seed protein improvement in cereals and grain legumes**. Vienna, 1979. p.241-257.
- MERTZ, E.T. Case histories of existing models. In: MERTZ, E.T.(ed.). **Genetic improvement of seed proteins**. Washington: National Academy of Sciences, 1976. p.57-70.
- MERTZ, E.T.; BATES, L.S.; NELSON, O.E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. **Science**, Washington, v.145, n.3629, p.279-280, July 1964.
- MISRA, P.S.; JAMBANATHAN, R.; MERTZ, E.T.; GLOVER, D.V.; BARBOSA, H.M., MCWHIRTER, K.S. Endosperm protein synthesis in maize mutants with increased lysine content. **Science**, Washington, v.176, n.4042, p.1425-1426, June 1972.
- MISRA, P.S.; MERTZ, R.T.; GLOVER, D.V. Studies on corn proteins. VI Endosperm protein changes in single and double endosperm mutants of maize. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.52, n.2, p.161-166, Mar. 1975.
- MORO, G.L.; HABBEN, J.E.; HAMAKER, B.R.; LARKINS, B.A. Characterization of the variability in lysine content for normal and opaque-2 maize endosperm. **Crop Science**, Madison, v.36, n.6, p.1651-1659, Nov. 1996.
- MURPHY, J.J.; DALBY, A. Changes in the protein fraction of developing normal and opaque-2 maize endosperm. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.48, n.3, p.336-349, May 1971.
- MURRAY, J.J.; CRAMER, J.; MA, Y.; WEST, D. et al. Agrigenetics maize RFLP linkage map. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Columbia, n.62, p.89-90, 1988.
- NELSON, O.E. Genetic modification of protein quality in plants. **Advances in Agronomy**, New York, 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, Dec. 1965.

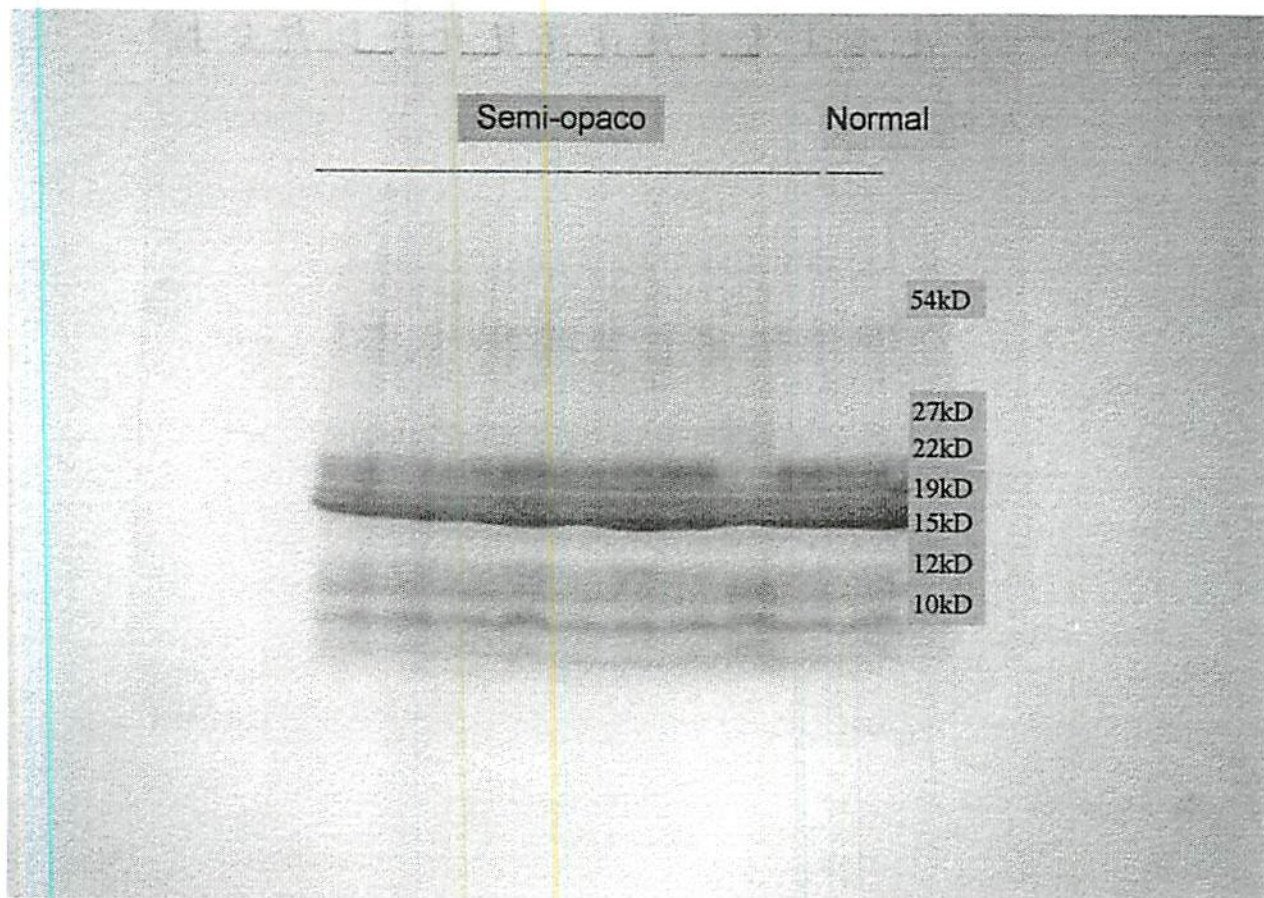
- OAKS, A.; JONES, K.E.; ROSS, D.W.; BOESSEL, I.; LENZ, D.; MISRA, S. Enzyme of nitrogen assimilation in developing seeds of *Zea mays* L. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Seed protein improvement in cereals and grain legumes**. Vienna, 1979. p179-186.
- ORTEGA, E.I.; BATES, L.S. Biochemical and agronomic studies of two modified hard-endosperm opaque-2 maize (*Zea mays* L.) populations. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.60, n.2, p.107-111, Mar. 1983.
- OSBORNE, T.B.; MENDEL, L.B. Nutritive properties of proteins of the maize kernel. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.18, n.1, p.1-6, 1914.
- PARK, W.D.; LEWIS, E.D.; RUBENSTEIN, I. Heterogeneity of zein mRNA and protein in maize. **Plant Physiology**, Washington, v.65, n.1, p.98-106, Jan. 1980.
- PAULIS, J.W.; WALL, J.S. Fractionation and properties of alkylated-reduced corn glutelin proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.251, n.1, p.57-69, 1971.
- 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.6279-6284, Oct. 1986.
- PEDERSEN, K.; BLOOM, K.S.; ANDERSON, J.N.; GLOVER, D.V.; LARKINS, B.A. Analysis of the complexity and frequency of zein genes in the maize genome. **Biochemistry**, New York, v.19, n.21, p.1644-1650, 1980.
- PEDERSEN, K.; DEVEREUX, D.R.; WILSON, E. SHELDON, E.; LARKINS, B.A. Cloning and sequence analysis reveal structural variation among related genes in maize. **The Plant Cell**, Rockville, v.29, n.10, p.1015-1026, 1982.
- PRAT, S.; CORTADAS, J.; PUIGDOMENECH, P. Nucleic Acid (cDNA) and amino acid sequences of the maize endosperm protein glutelin-2. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.13, p.1493-1504, 1985.
- RIGHETTI, P.G.; GIANAZZA, E.; VIOTTI, C.; SOAVE, C. Heterogeneity of storage proteins in maize. **Planta**, Berlin, v.136, n.2, p.115-123, 1977.
- RUBENSTEIN, I.; GERARHY, D.E. The genetic organization of zeins. In: POMERANZ, Y. (ed.). **Advances in cereal science and technology**. St Paul: American Association of Cereal Chemistry, 1989. v.8, p.297-315.

- SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of National Academic Science of USA**, Washington, v.81, p.8014-8018, Dec. 1984.
- SALAMINI, F.; DIFONZO, N.; FORNASARI, E.; GENTINETTA, E.; REGGIANI, R.; SOAVE, C. Mucronate, Mc, a dominant gene of maize which interact with opaque-2 to suppress zein synthesis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.65, n.2, p.123-128, May 1983.
- SALAMINI, F.; DIFONZO, N.; GENTINETTA, E.; SOAVE, C. A dominant mutation interfering with protein accumulation in maize seeds. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Seed protein improvement in cereals and grain legumes**. Vienna, 1979. p.97-106.
- SCHMIDT, R.J.; BURR, F.A.; AUKERMAN, M.J.; BURR, B. Maize regulatory gene opaque-2 encodes a protein with "leucine-zipper" motif that binds to zein DNA. **Proceedings of National Academic Science of USA**, Washington, v.87, n.1, p.46-50, Jan. 1990.
- SCHMIDT, R.J.; BURR, F.A.; BURR, B. Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus opaque-2. **Science**, Washington, v.238, n.4829, p.960-963, 1987.
- SCHMIDT, R.J.; KEDUTAT, M.; AUKERMAN, M.; HOSCHEK, G. Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22 kD zein genes. **The Plant Cell**, Rockville, v.4, p.689-700, June 1992.
- SCHNEIDER, E.; EARLEY, B.; DE TURK, E.E. Nitrogen fraction of the component parts of the corn kernel as affected by selection and soil nitrogen. **Agronomy Journal**, Madison, v.44, n.4, p.161-169, Apr. 1952.
- 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.
- SOAVE, C.; PRIOLI, F.; VIOTTI, A.; SALAMINI, F.; RIGHETTI, P.G. Synthesis and heterogeneity of endosperm proteins in normal and opaque-2 maize. **Maydica**, Bergamo, v.20, p.83-94, June 1975.
- SOAVE, C.; SUMAN, N.; VIOTTI, A.; SALAMINI, F. Linkage relationships between regulatory and structural gene loci involved in zein synthesis in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin. v.52, p.263-267, Feb. 1978.

- SPENA, A.; VIOTTI, A.; PIRROTTA, V. Two adjacent genomic zein sequences: structure, organization and tissue-specific restriction pattern. **Journal of Molecular Biology**, New York, v.169, p.779-881, 1983.
- STEWART, J.W.B.; RUZICKA, H.; BERGAMIN, F.; ZGATTO, E.A.G. "Flow injection analysis. Part III. Comparison of continuous flow spectrophotometry and potentiometry for the rapid determination of the total nitrogen content in plant digests" **Analytica Chimica acta**, New York, v.81, p.371-386, 1976.
- THOMPSON, G.A.; LARKINS, B.A. Structural elements regulating zein gene expression. **Bioessays**, Cambridge, v.10, n.4, p.108-113, Apr. 1989.
- TORRENT, M.; GELI, M.I.; LUDEVID, M.D. Storage protein hydrolyses and protein-body breakdown in germinated *Zea mays* L. seeds. **Planta**, Berlin, v.180, n.2, p.90-95, 1989.
- TSAI, C.Y. Early termination of zein accumulation in opaque02 maize mutant. **Maydica**, Bergamo, v.24, n.3, p.129-140, 1979a.
- TSAI, C.Y. Tissue-specific zein synthesis in maize kernel. **Biochemical Genetics**, New York, v.17, p.1109-1119, 1979b.
- TSAI, C.Y.; DALBY, A. Comparison of the effect of shrunken-4, opaque-2, opaque-7 e floury-2 genes on the zein content of maize during endosperm development. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.51, n.6, p.825-829, Nov. 1974.
- TSAI, C.Y.; HUBER, D.M.; WARREN, H.L. Relationship of the kernel sink for N to maize productivity. **Crop Science**, Madison, v.18, n.3, p.399-404, May 1978.
- TSAI, C.Y.; HUBER, D.M.; WARREN, H.L. A proposed role of zein and glutelin as N sinks in maize. **Plant Physiology**, v.66, p.330-333, Apr. 1980.
- UEDA, T.; WAVERCZA, W.; WARD, K.; SHERN, N.; KETUDAT, M.; SCHMIDT, R.J.; MESSING, J. Mutations of the 22 and 27 kD zein promoters affect transactivation by the opaque-2 protein. **The Plant Cell**, Rockville, v.4, n.6, p.701-709, 1992.
- VASAL, S.K. Use of genetic modifiers to obtain normal-type kernels with opaque-2 gene. In: PURDUE UNIVERSITY. **High quality protein maize**. Stroudsburg: Hutchinson Ross, 1975. p.197-216.
- 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, G.; PHILLIPS, R.H. (eds.). **Improvement of quality traits of maize for grain and silage use**. London: Martinus Nijhoff, 1980. p.37-73.

- 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**, Washington, v.92, n.1, p.191-196, Jan. 1990.
- WANG,S.Z. ESEN, A. Primary structureof proline-rich zein and its cDNA. **Plant Phisiology**, Washington, v.81, n.1, p.70-74, May 1986.
- WILSON, C. Multiple zeins from maize endosperms characterized by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Plant Phisiology**, Washington, v.95, n.3, p.777-786, Mar. 1991.
- WILSON, D.R.; LARKINS, B.A. Zein gene organization in maize and related grasses. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.20, n.3788, p.330-340, 1984.
- WILSON, C.M.; SHEWRY, P.R.; MIFLIN, B.J. Maize endosperm proteins compared by sodium duodecyl sulfate gel eletrophoresis and isoeletric focusing. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.58, n.4, p.275-281, 1981.
- WOLF, M.J.; KHOO, U.; SECKINGER, H.L. Subcellular structure of endosperm protein in high-lysine and normal com. **Science**, Washington, v.157, n.3788, p.556-557, Aug. 1967.

ANEXO A



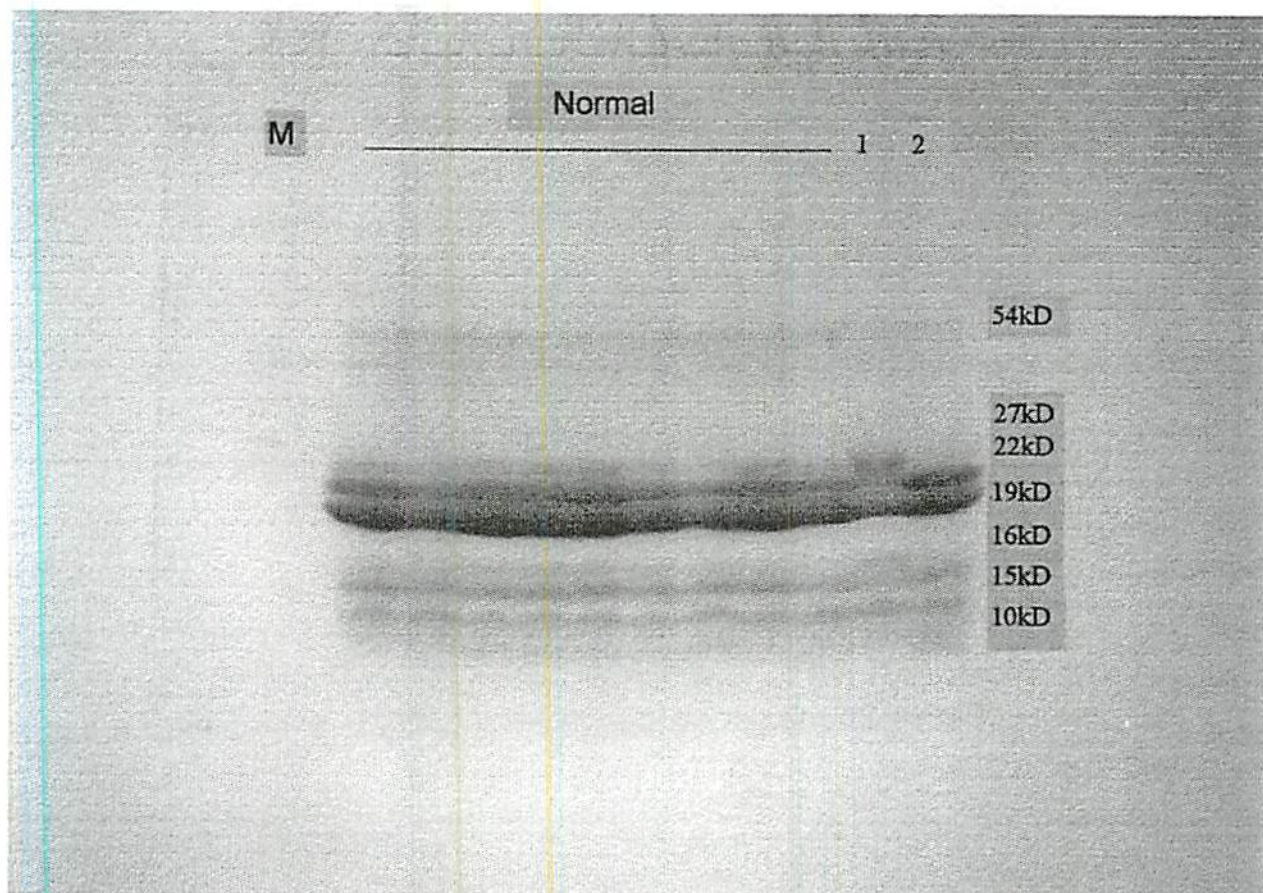


Figura 2 - Análise da fração protéica zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 1 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 2,4 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular e as linhas 1 e 2 correspondem aos genitores CMS52 e IHP, respectivamente. As diferentes classes de zeínas foram identificadas de acordo como o seu peso molecular para posterior análise em densitômetro à laser.

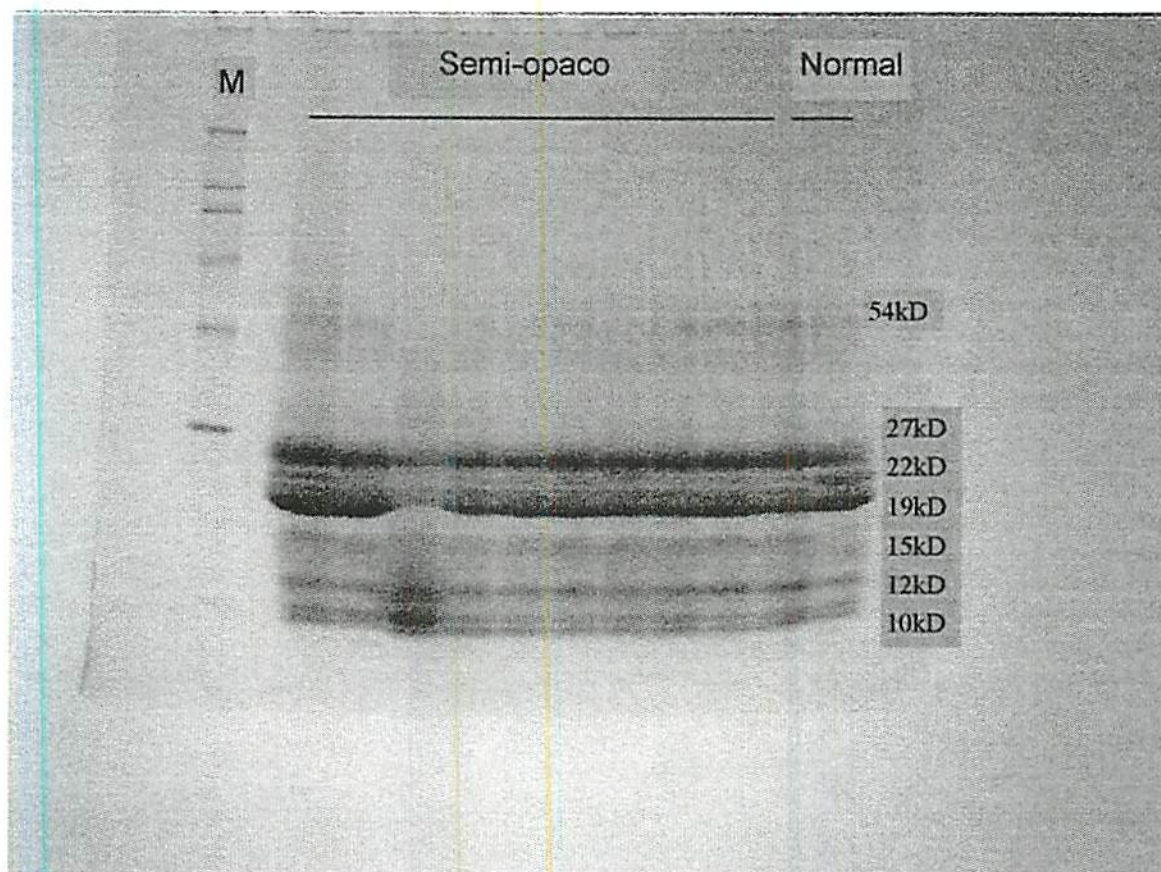


Figura 3 - Análise da fração protéica zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 4 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 2,4 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular. As diferentes classes de zeínas foram identificadas de acordo com o seu peso molecular para posterior análise em densitômetro à laser.

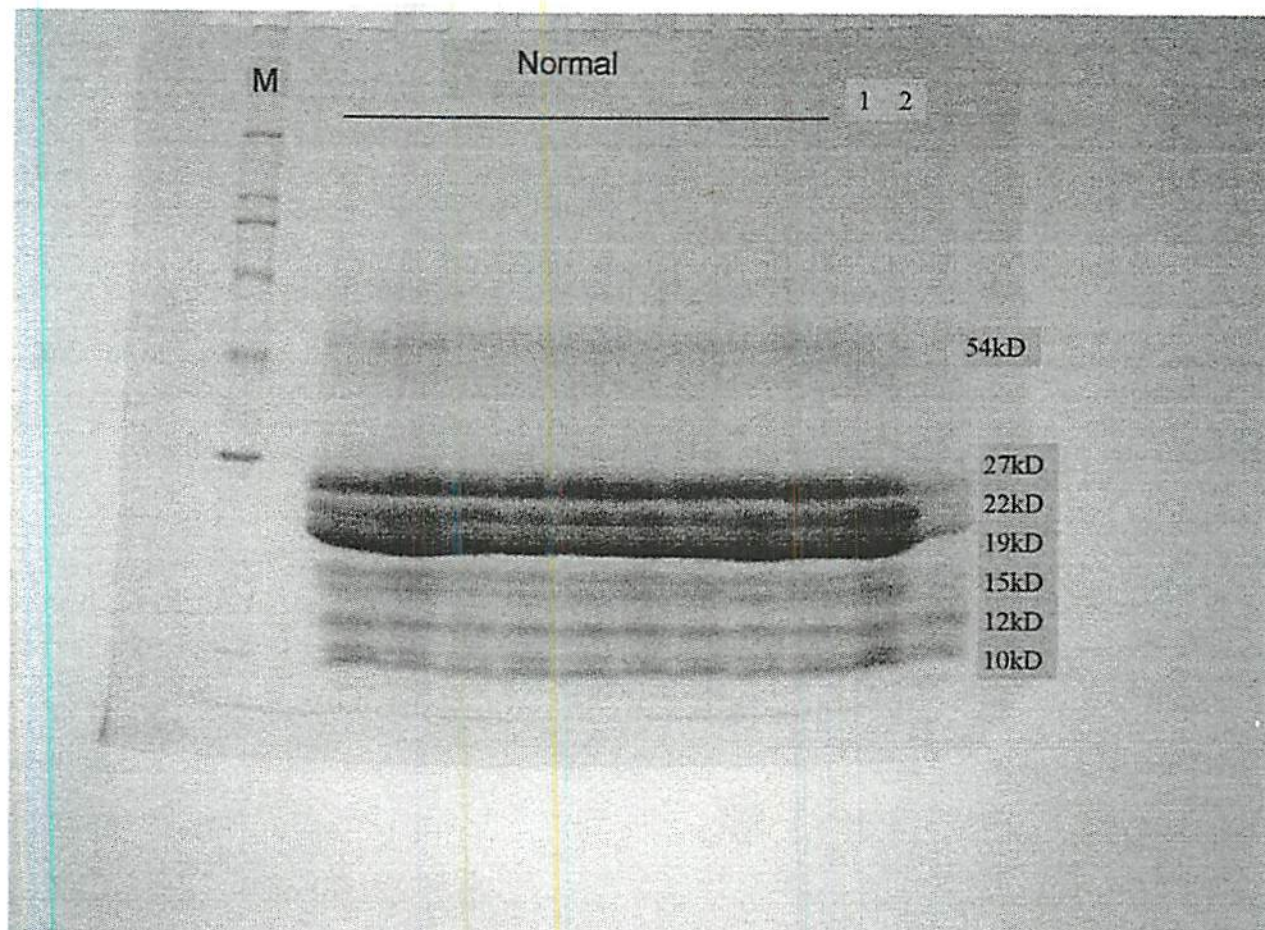


Figura 4 - Análise da fração protéica zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 4 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 2,4 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular e as linhas 1 e 2 correspondem aos genitores CMS52 e IHP, respectivamente. As diferentes classes de zeínas foram identificadas de acordo como o seu peso molecular para posterior análise em densitômetro à laser.

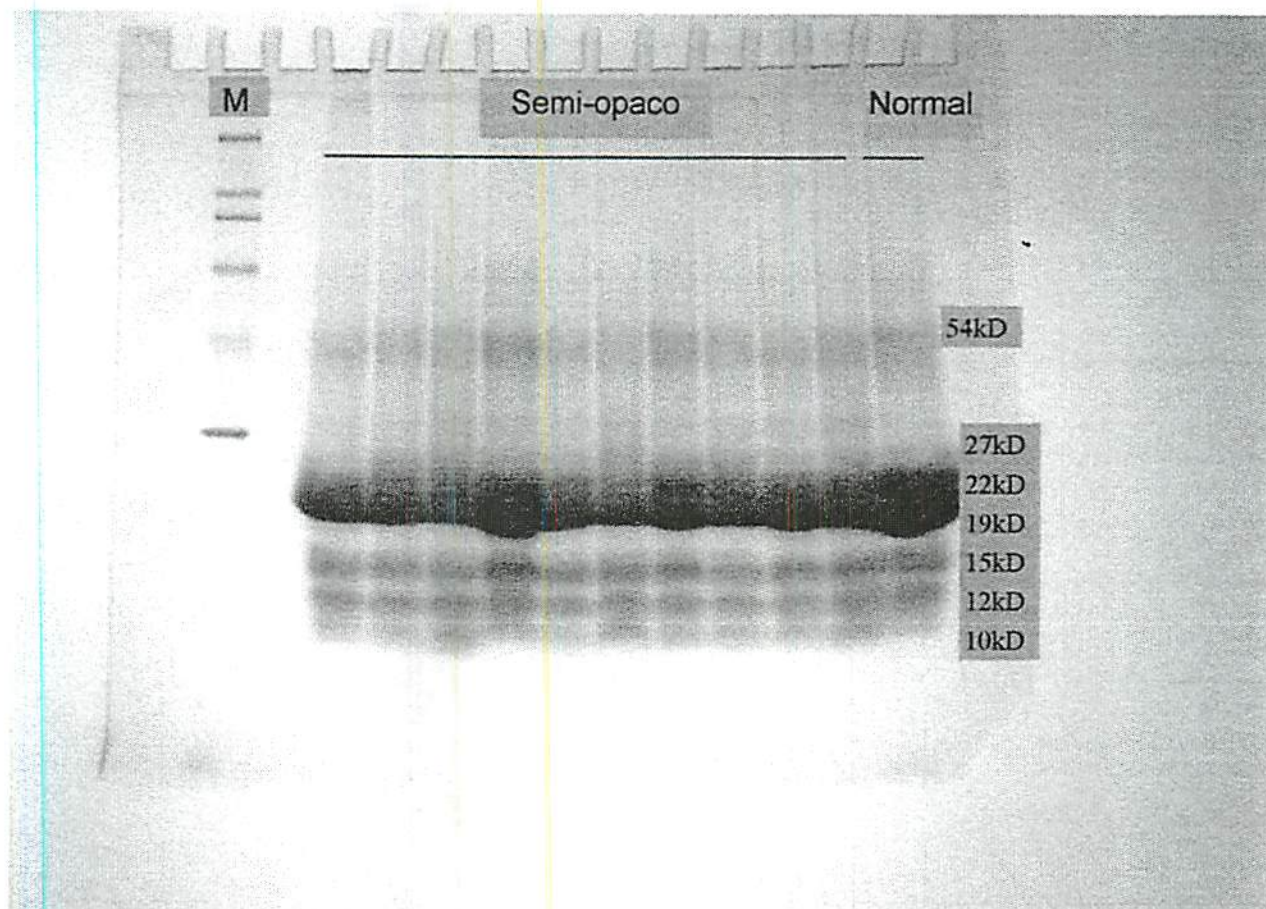


Figura 5 - Análise da fração protéica zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 6 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 2,4 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular. As diferentes classes de zeínas foram identificadas de acordo com o seu peso molecular para posterior análise em densitômetro à laser.

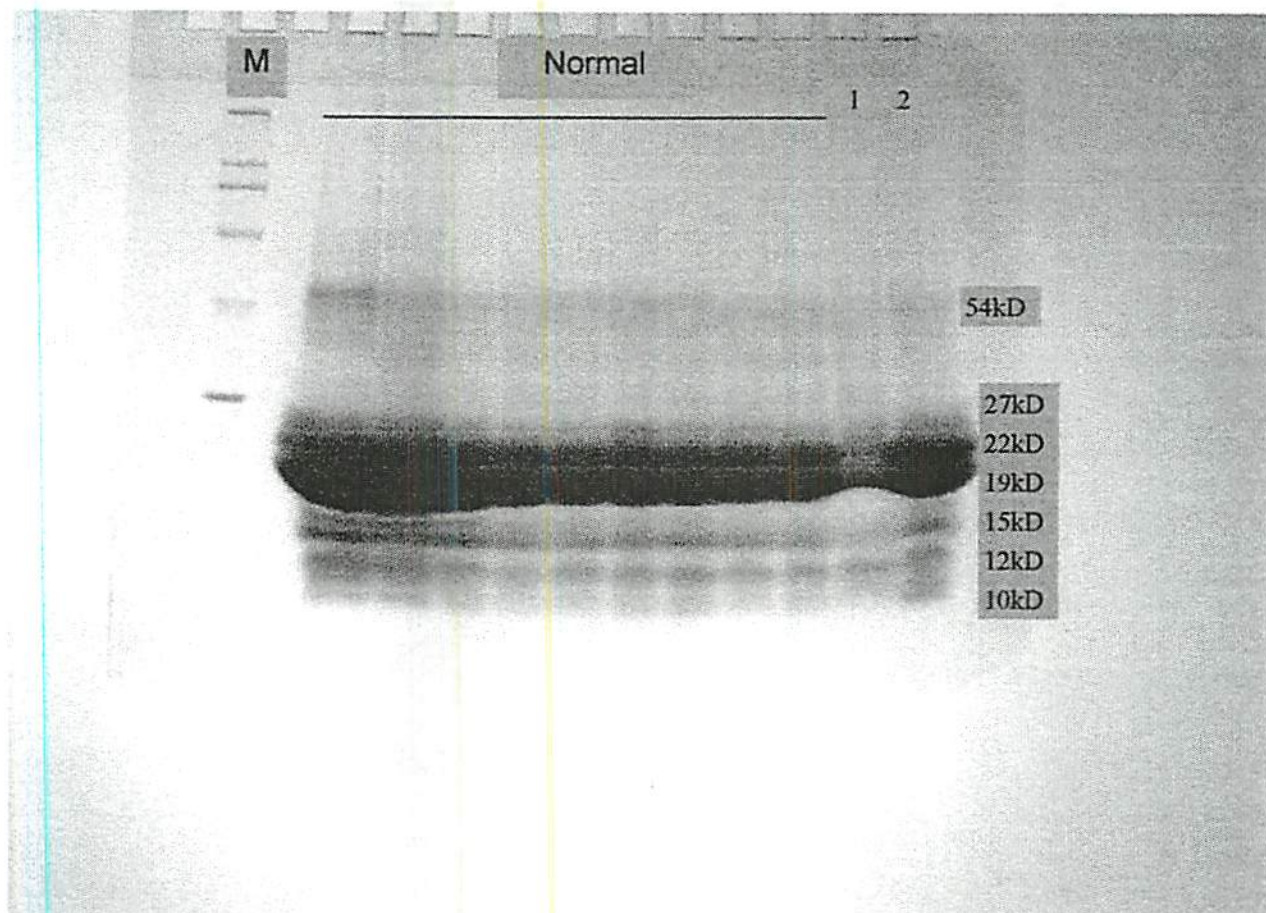


Figura 6 - Análise da fração protéica zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 6 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 2,4 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular e as linhas 1 e 2 correspondem aos genitores CMS52 e IHP, respectivamente. As diferentes classes de zeínas foram identificadas de acordo com o seu peso molecular para posterior análise em densitômetro à laser.

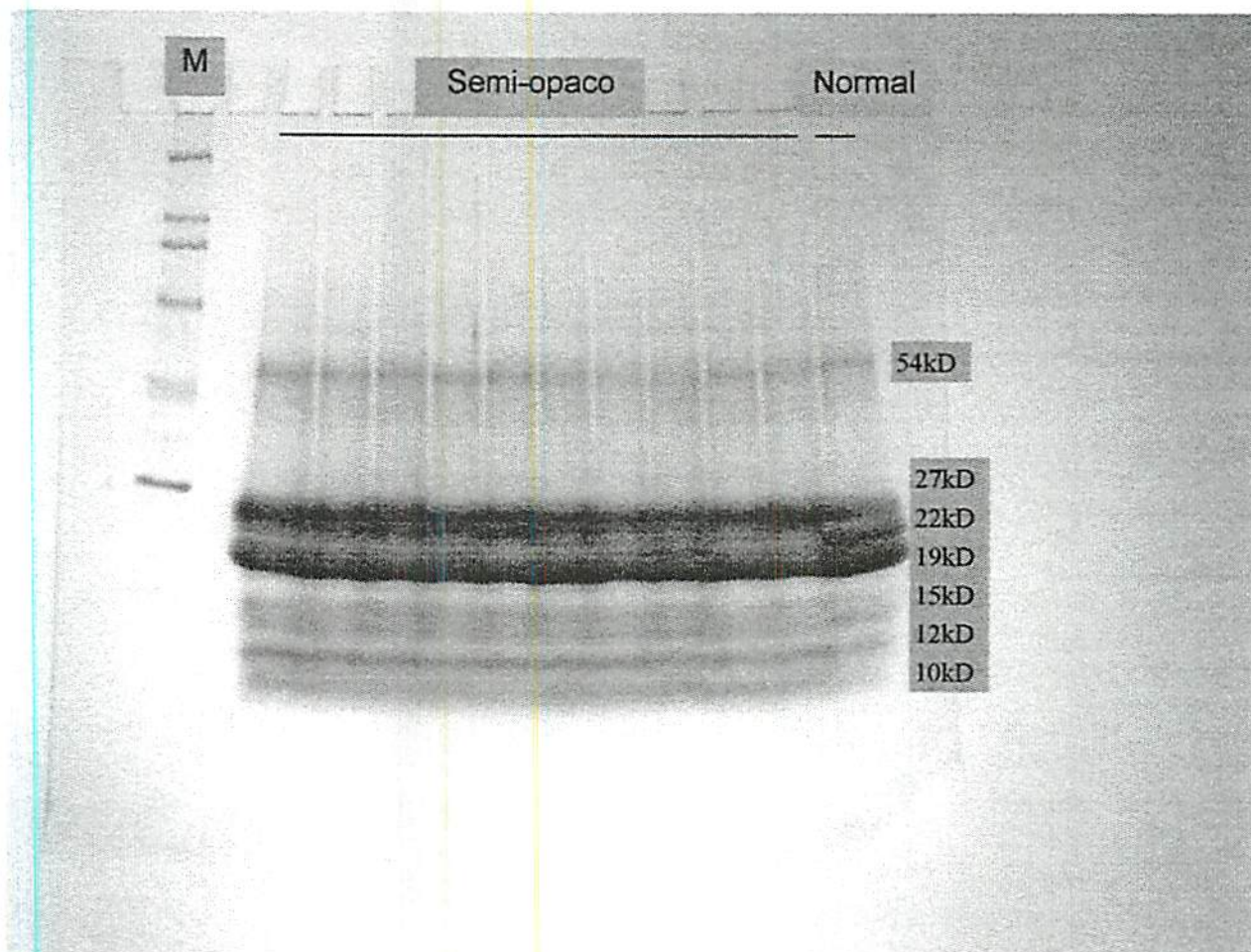


Figura 7 - Análise da fração protéica zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 9 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 2,4 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular. As diferentes classes de zeínas foram identificadas de acordo com o seu peso molecular para posterior análise em densitômetro à laser.

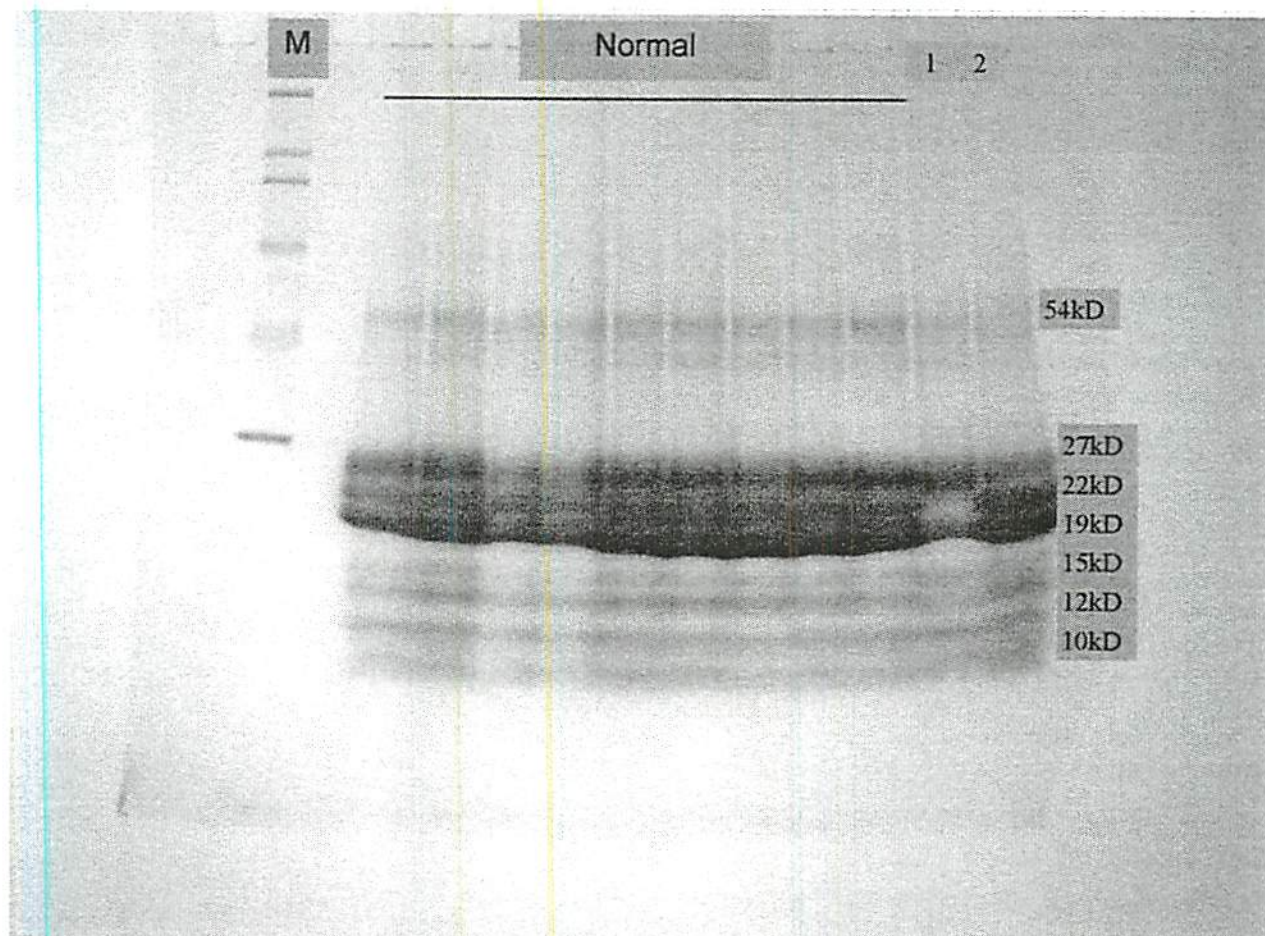


Figura 8 - Análise da fração protéica zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 9 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 2,4 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular e as linhas 1 e 2 correspondem aos genitores CMS52 e IHP, respectivamente. As diferentes classes de zeínas foram identificadas de acordo com o seu peso molecular para posterior análise em densitômetro à laser.

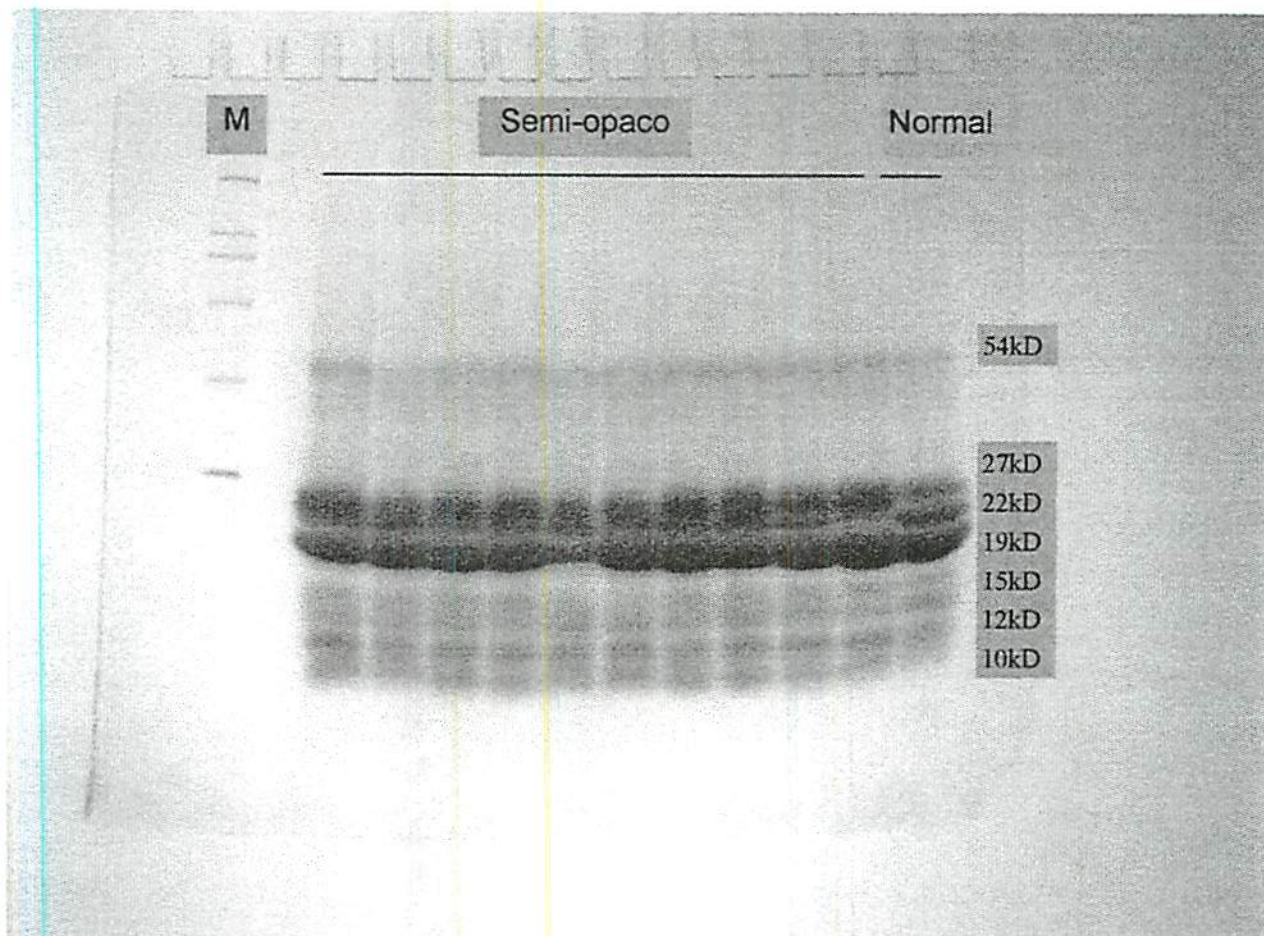


Figura 9 - Análise da fração protéica zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 10 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 2,4 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular. As diferentes classes de zeínas foram identificadas de acordo com o seu peso molecular para posterior análise em densitômetro à laser.

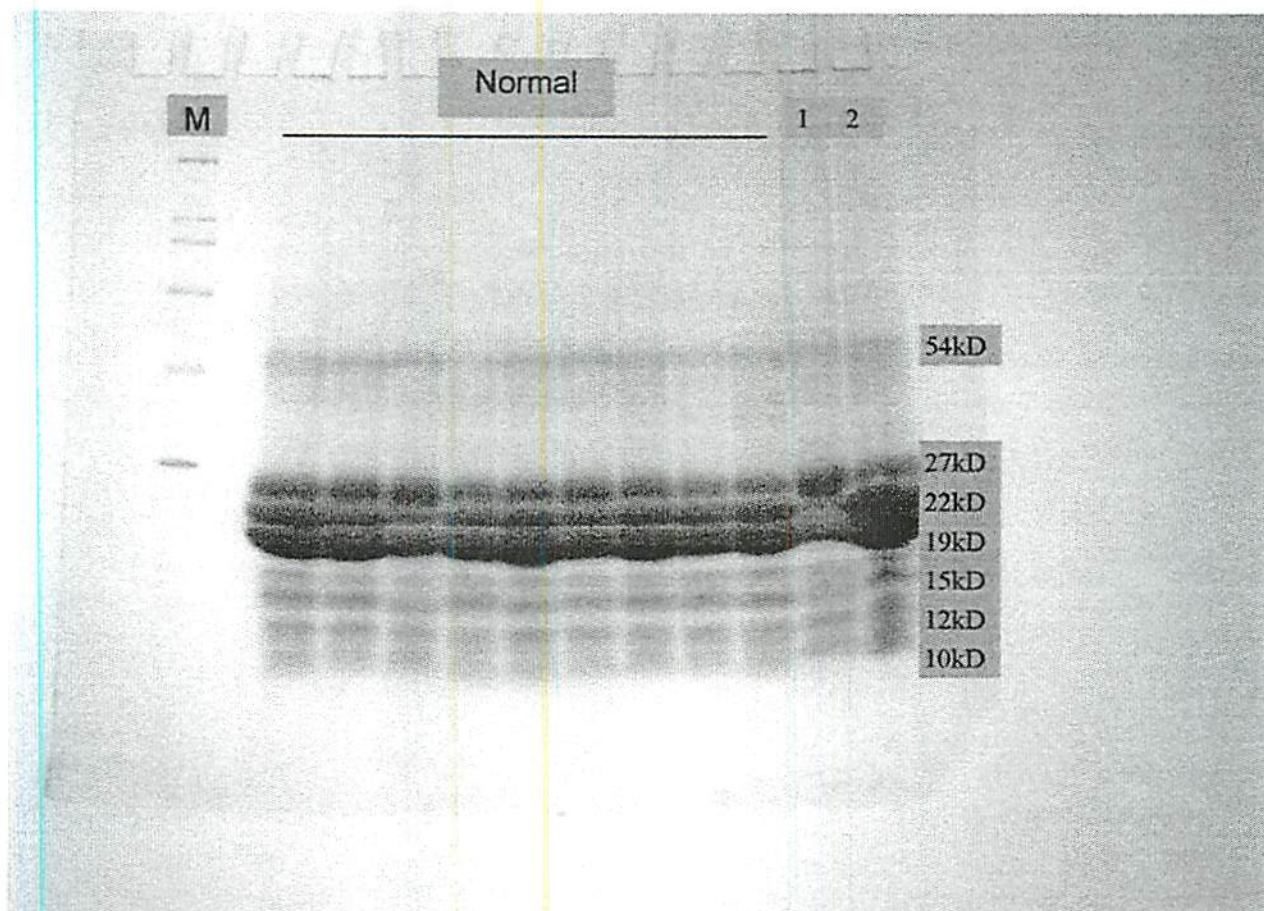


Figura 10 - Análise da fração protéica zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 10 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 2,4 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular e as linhas 1 e 2 correspondem aos genitores CMS52 e IHP, respectivamente. As diferentes classes de zeínas foram identificadas de acordo com o seu peso molecular para posterior análise em densitômetro à laser.

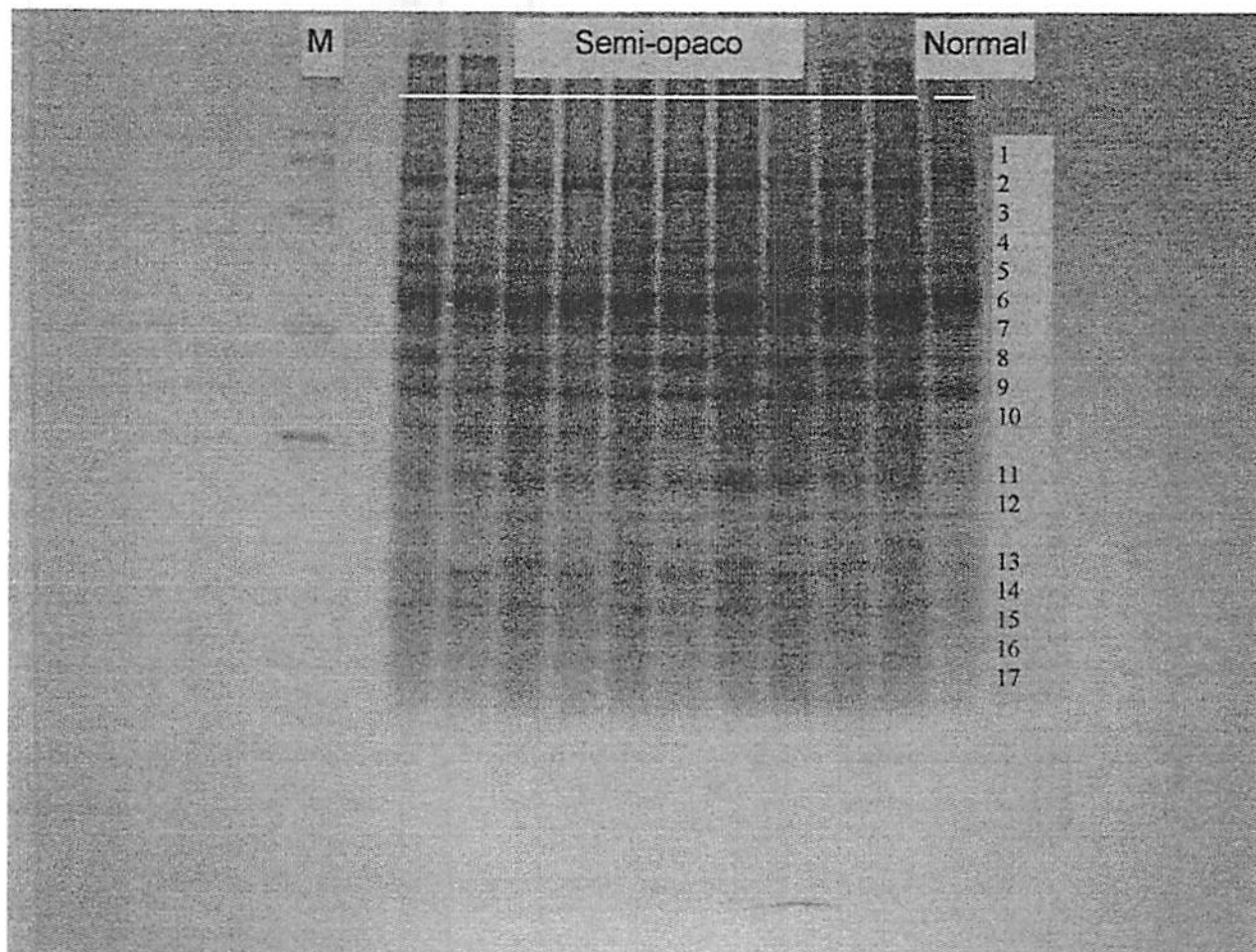


Figura 11 - Análise da fração protéica não-zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 1 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As não-zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 7,5 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular. Os polipeptídeos que compõem esta fração foram numerados de 1 a 17 para posterior análise em densitômetro a laser.

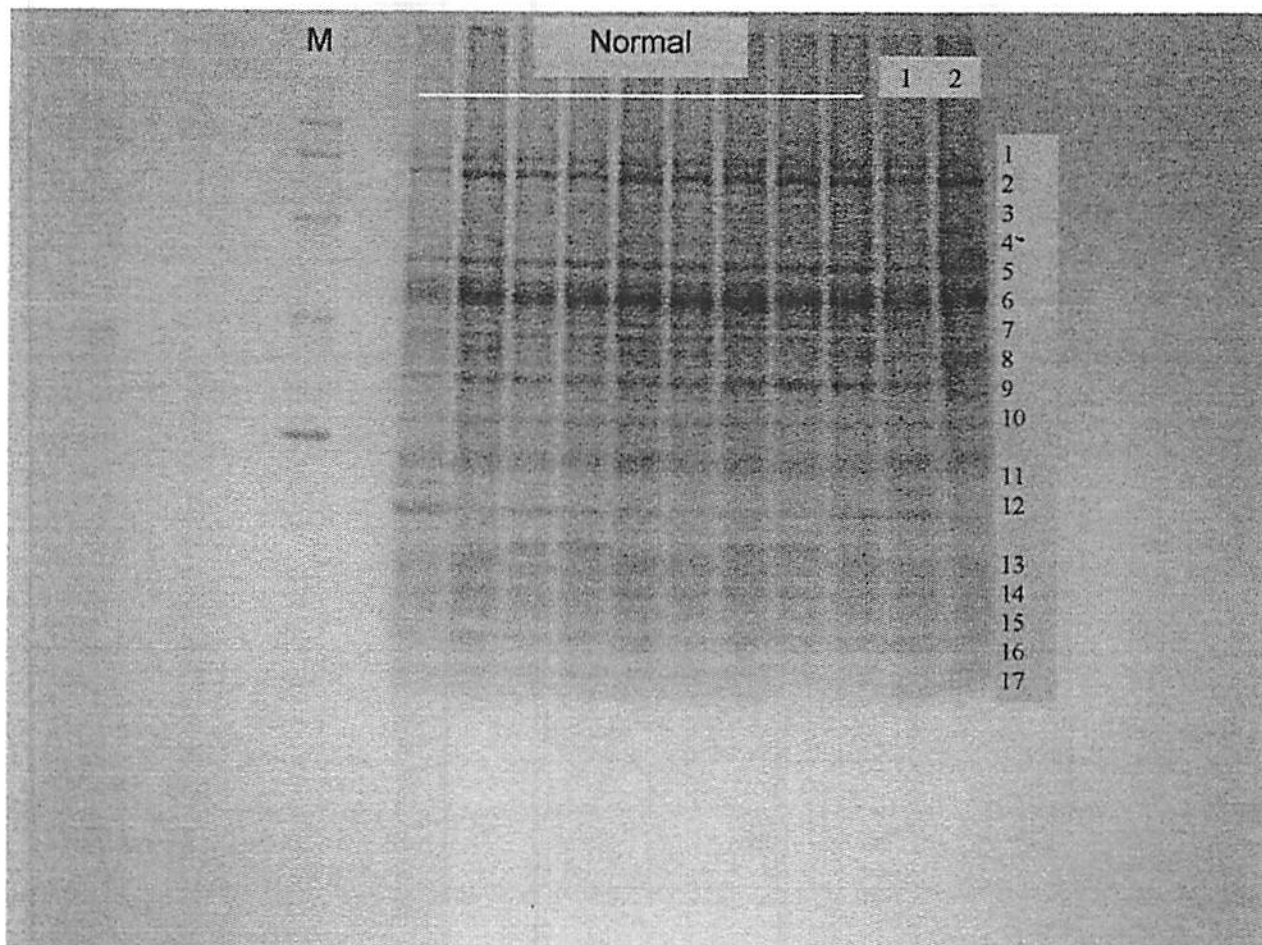


Figura 12 - Análise da fração protéica não-zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 1 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As não-zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 7,5 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular e as linha 1 e 2 correspondem aos genitores CMS52 e IHP, respectivamente. Os polipeptídeos que compõem esta fração foram numerados de 1 a 17 para posterior análise em densitômetro à laser.

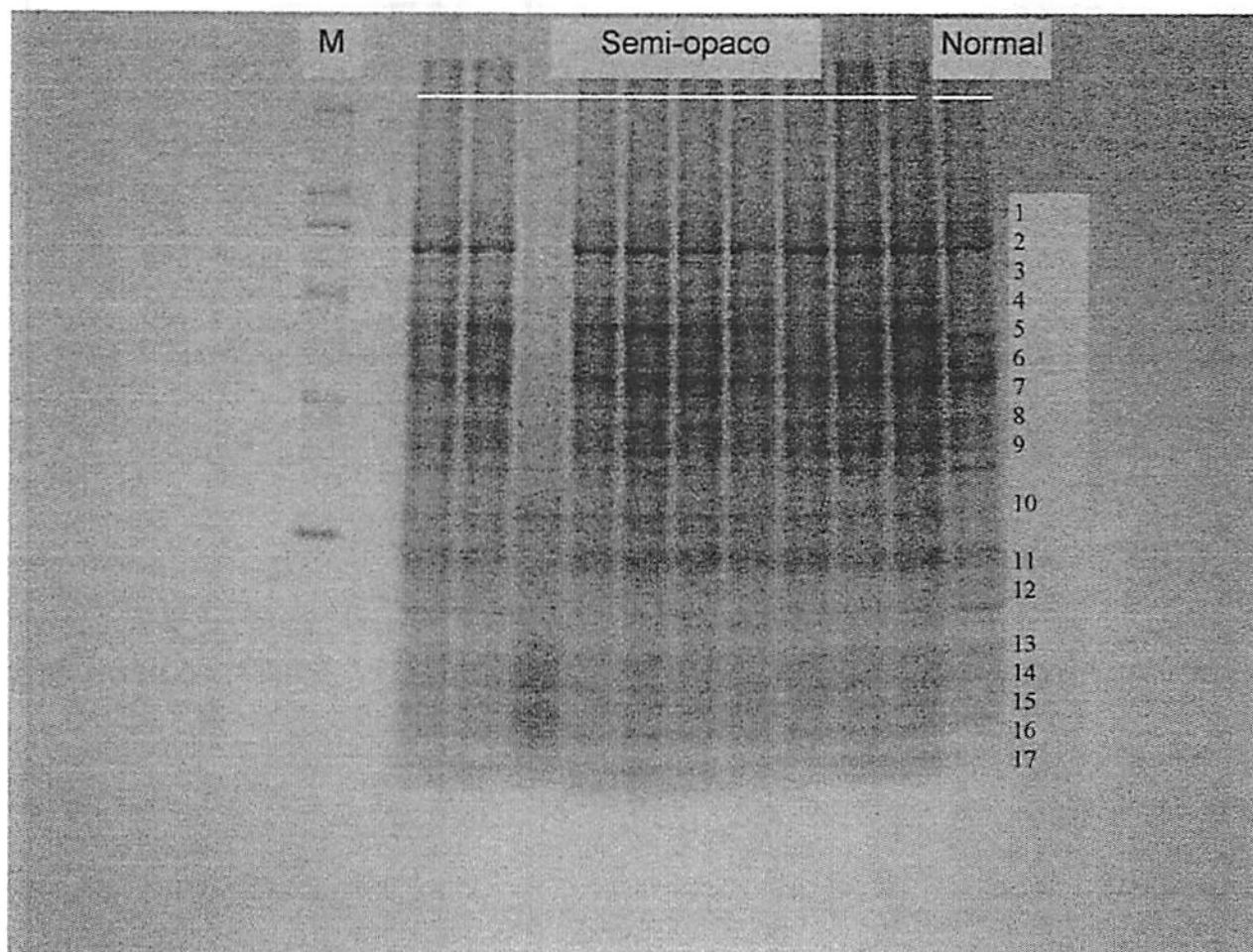


Figura 13 - Análise da fração protéica não-zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 4 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As não-zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 7,5 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular. Os polipeptídeos que compõem esta fração foram numerados de 1 a 17 para posterior análise em densitômetro a laser.

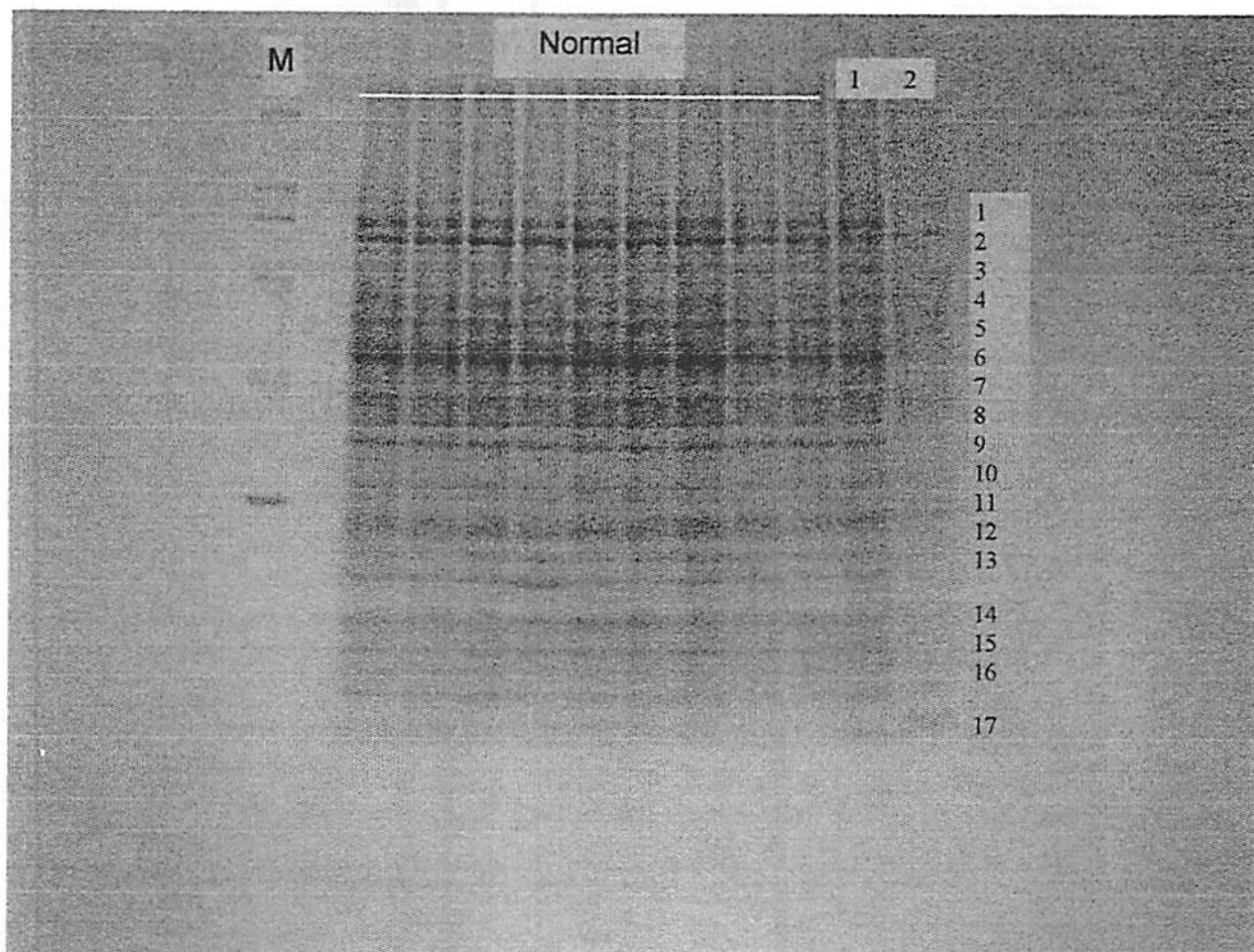


Figura 14 - Análise da fração protéica não-zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 4 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As não-zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 7,5 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular e as linhas 1 e 2 correspondem aos genitores CMS52 e IHP, respectivamente. Os polipeptídeos que compõem esta fração foram numerados de 1 a 17 para posterior análise em densitômetro a laser.

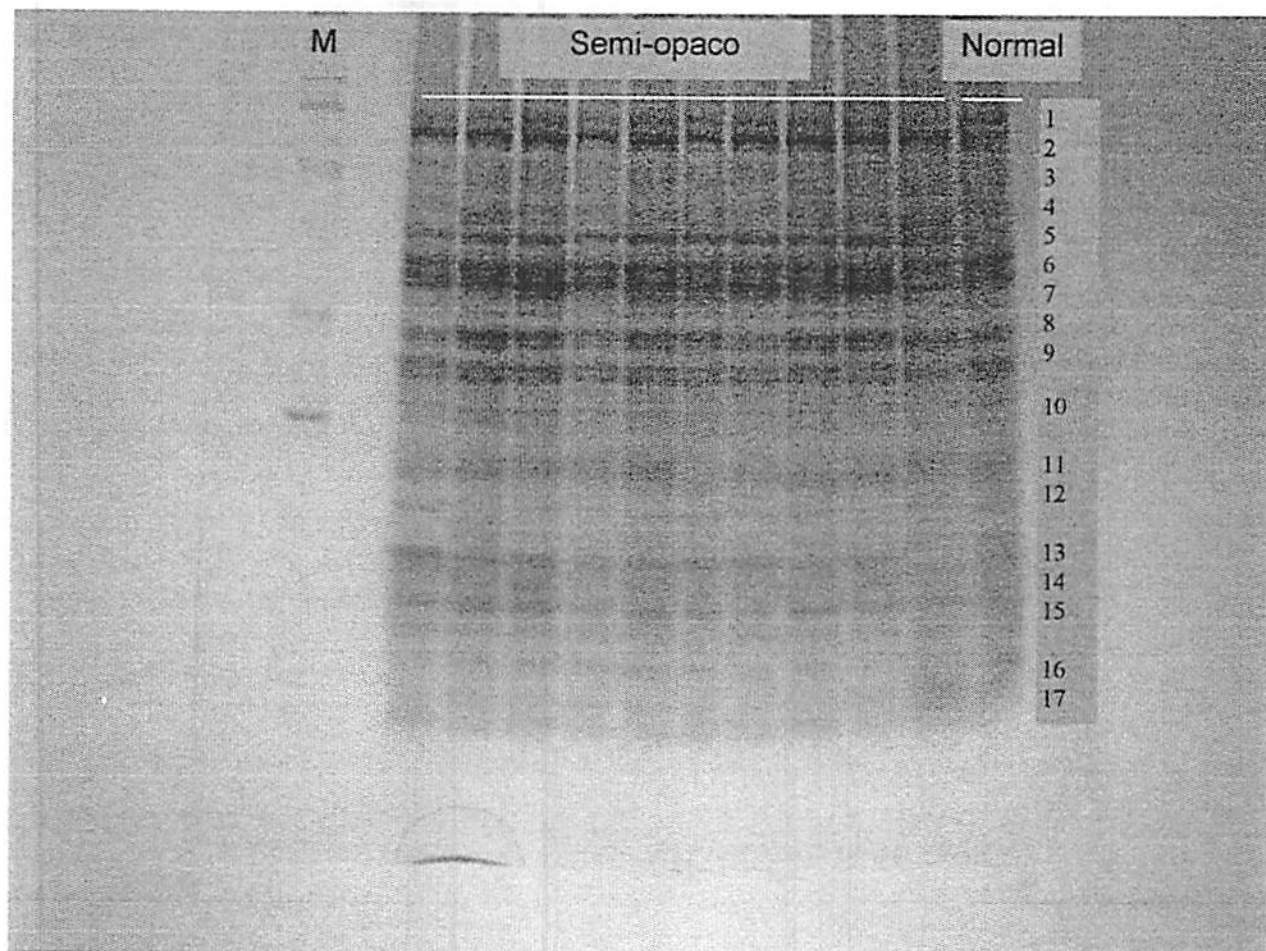


Figura 15 - Análise da fração protéica não-zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 6 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As não-zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 7,5 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular. Os polipeptídeos que compõem esta fração foram numerados de 1 a 17 para posterior análise em densitômetro a laser.

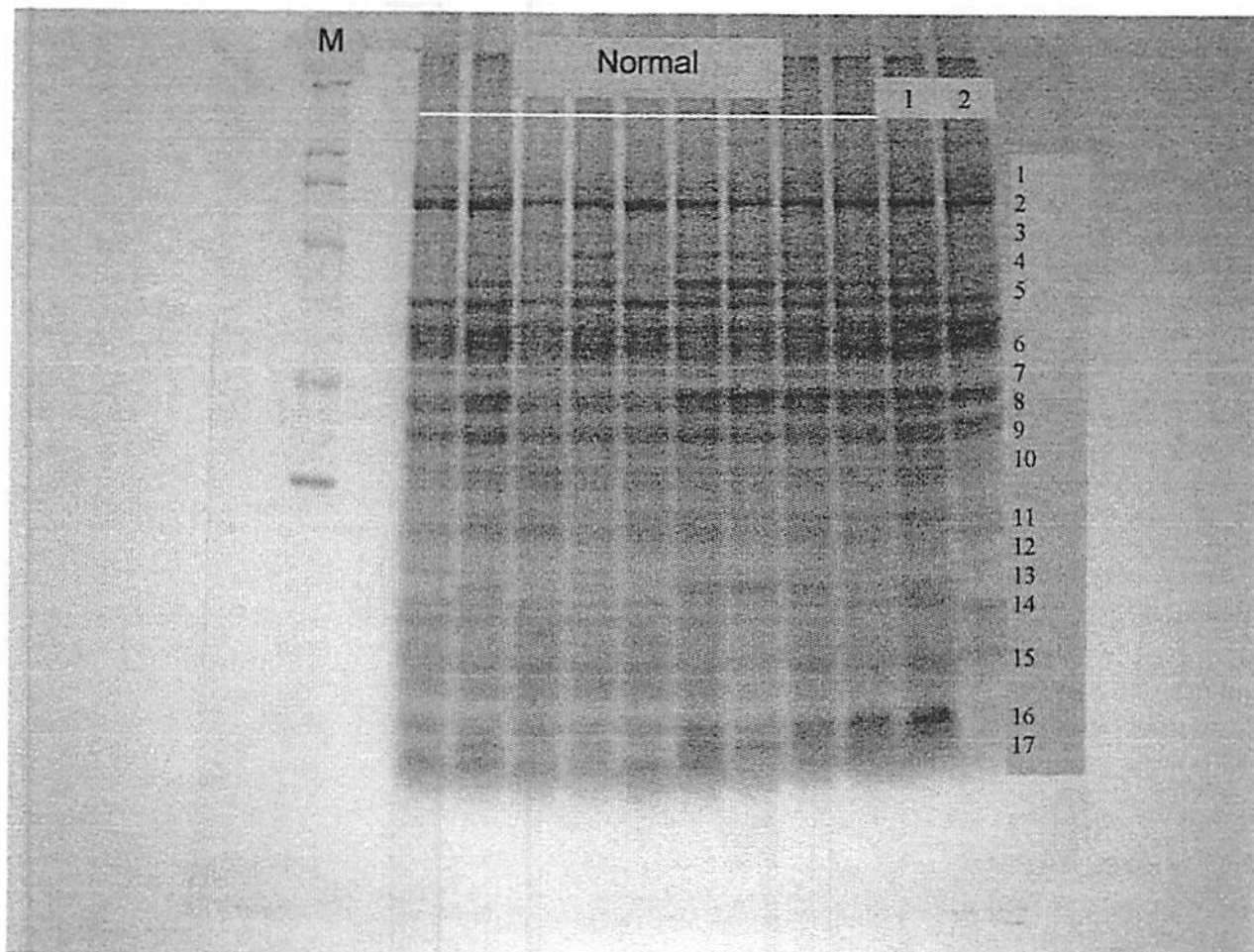


Figura 16 - Análise da fração protéica não-zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 6 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As não-zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 7,5 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular e as linhas 1 e 2 correspondem aos genitores CMS52 e IHP, respectivamente. Os polipeptídeos que compõem esta fração foram numerados de 1 a 17 para posterior análise em densitômetro a laser.

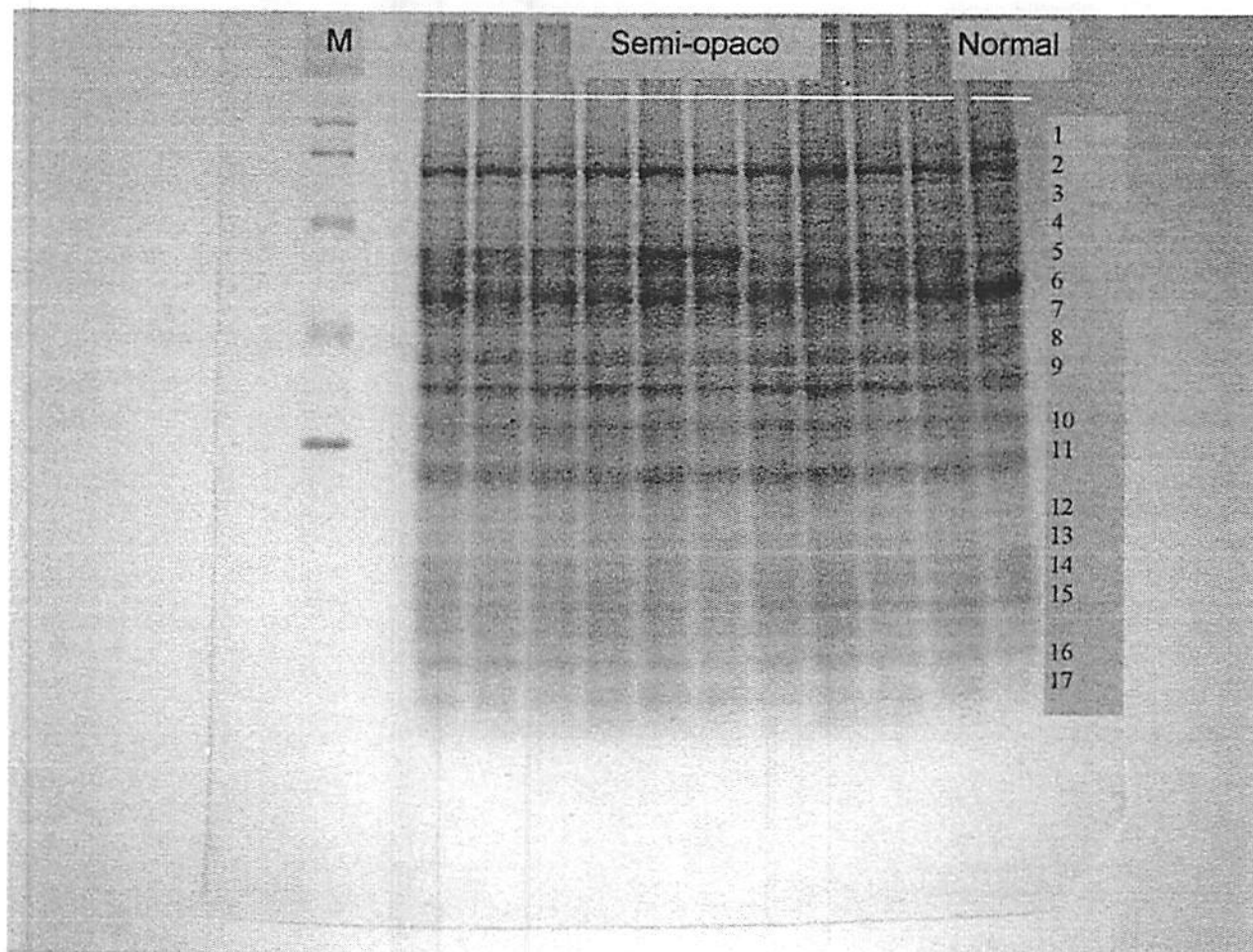


Figura 17 - Análise da fração protéica não-zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 9 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As não-zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 7,5 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular. Os polipeptídeos que compõem esta fração foram numerados de 1 a 17 para posterior análise em densitômetro à laser.

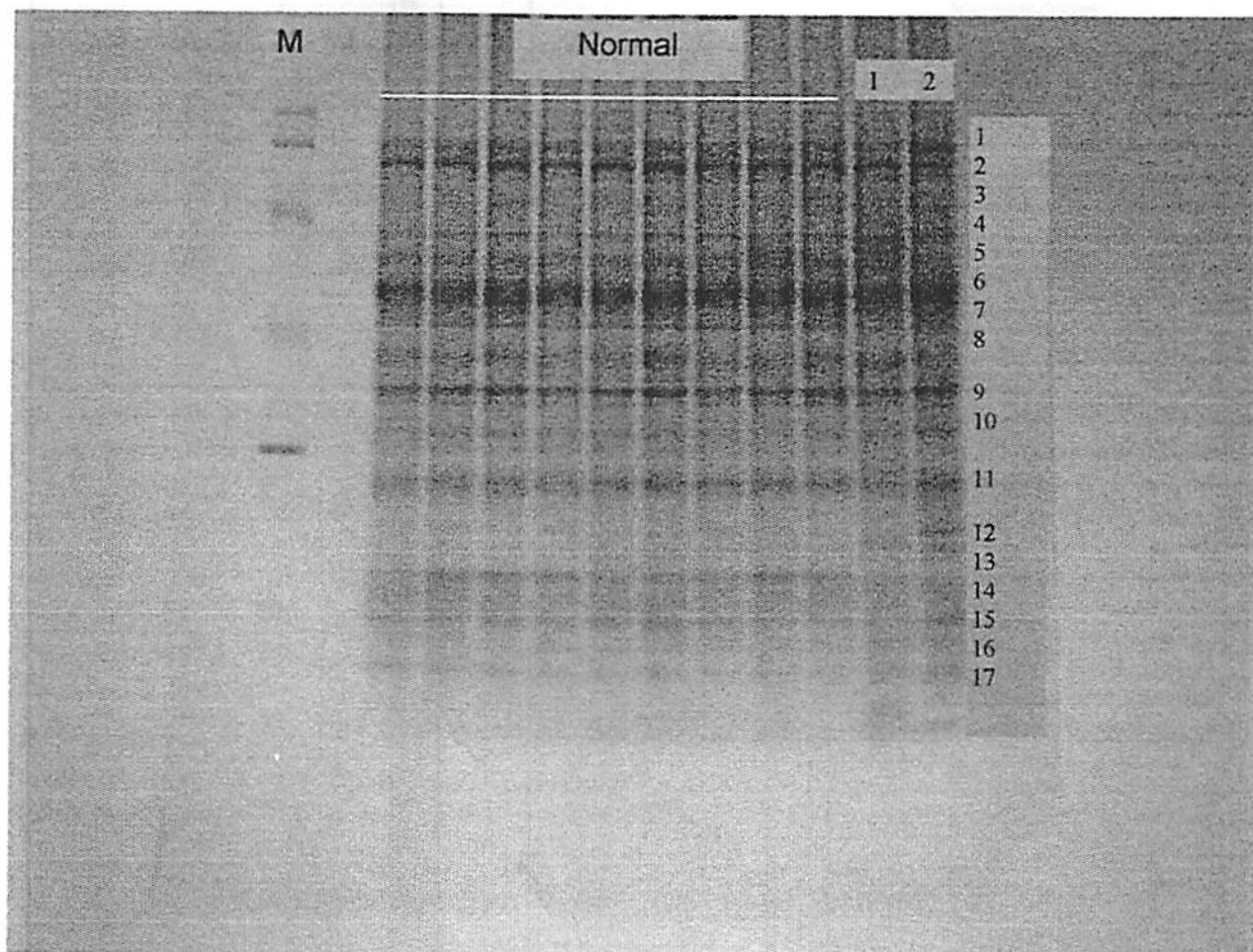


Figura 18 - Análise da fração protéica não-zeína em gel gradiente de poliácridamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 9 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As não-zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 7,5 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular e as linhas 1 e 2 correspondem aos genitores CMS52 e IHP, respectivamente. Os polipeptídeos que compõem esta fração foram numerados de 1 a 17 para posterior análise em densitômetro a laser.

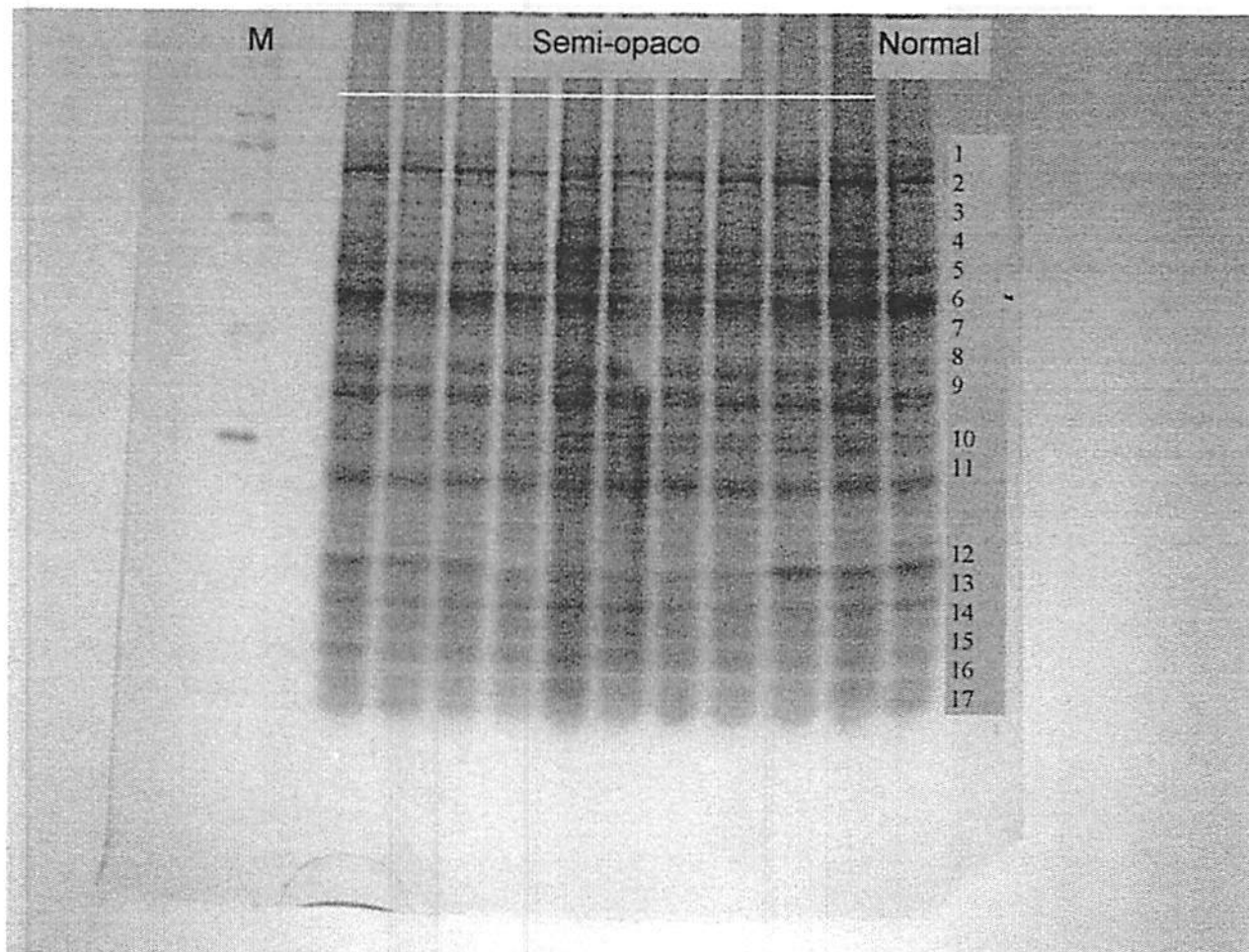


Figura 19 - Análise da fração protéica não-zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 10 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As não-zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 7,5 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular. Os polipeptídeos que compõem esta fração foram numerados de 1 a 17 para posterior análise em densitômetro a laser.

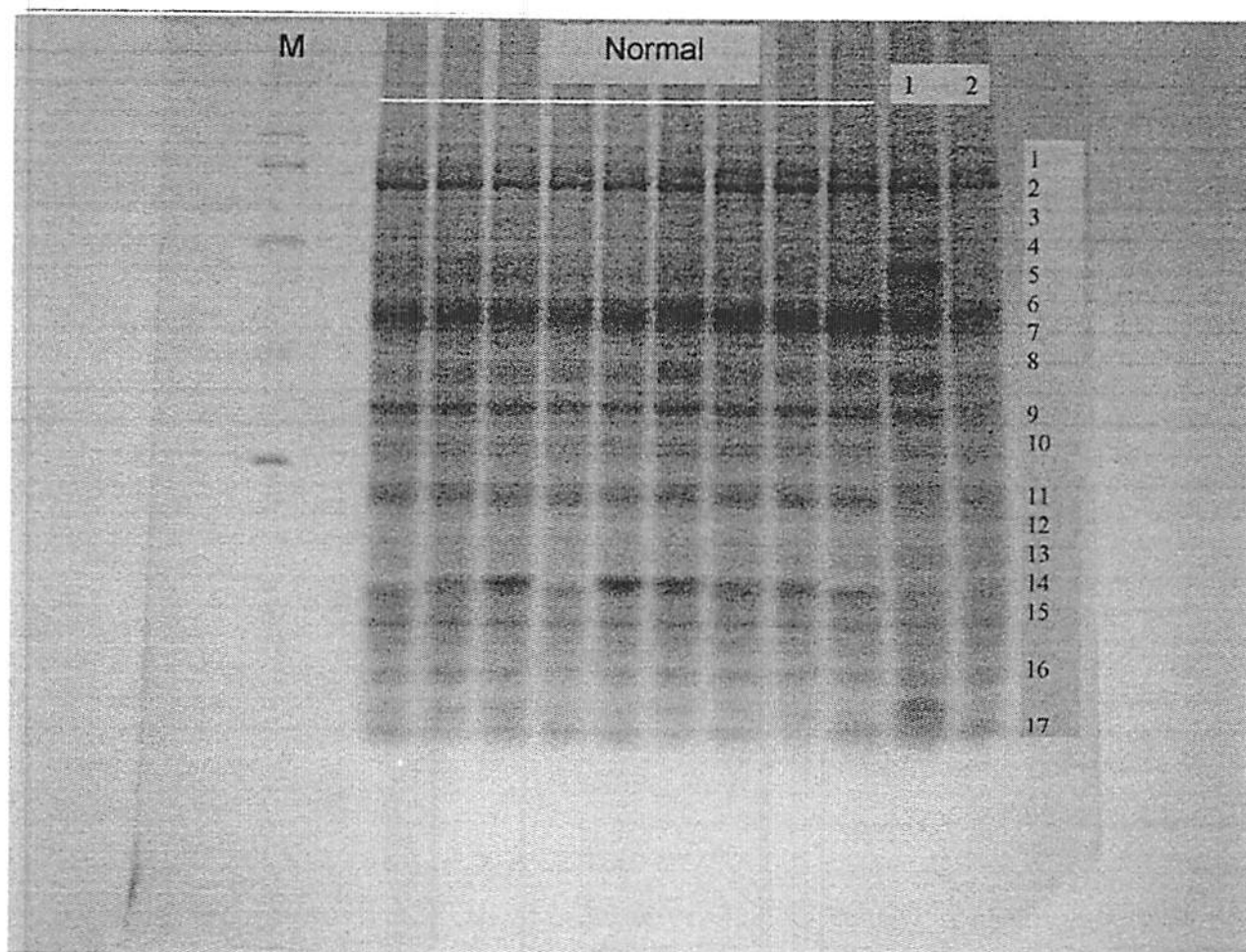


Figura 20 - Análise da fração protéica não-zeína em gel gradiente de poliacrilamida (7,5 a 18%) dos indivíduos do bulk 10 da geração F_2 , resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP. As não-zeínas foram extraídas de quantidades iguais do endosperma, sendo aplicado no gel o correspondente a 7,5 mg de endosperma. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular e as linhas 1 e 2 correspondem aos genitores CMS52 e IHP, respectivamente. Os polipeptídeos que compõem esta fração foram numerados de 1 a 17 para posterior análise em densitômetro a laser.

ANEXO B

Tabela 1 - Valores absolutos de absorvância das frações zeína e não-zeína e valores relativos das frações zeína e não-zeína dos indivíduos dos bulks F₂, resultantes do cruzamento entre CMS52 e IHP.

Progênes	Genótipo	Valores absolutos de Zeína	Valores absolutos de Não-zeína	Valores relativos de zeína	Valores relativos de Não-zeína
CMS52	semi-opaco	5776,62	16979,64	100,00	100,00
IHP	normal	14597,01	16187,82	252,69	95,34
1	semi-opaco	4385,86	17484,76	75,92	102,97
1	semi-opaco	4516,39	18376,49	78,18	108,23
1	semi-opaco	5154,82	23354,24	89,24	137,54
1	semi-opaco	7405,96	20168,49	128,21	118,78
1	semi-opaco	6046,14	22206,16	104,67	130,78
1	semi-opaco	6919,57	20393,39	119,79	120,10
1	semi-opaco	7177,45	22705,40	124,25	133,72
1	semi-opaco	5799,33	21216,54	100,39	124,95
1	semi-opaco	6932,13	18455,93	120,00	108,69
1	semi-opaco	6763,61	19894,66	117,09	117,17
1	normal	6518,61	13098,43	112,84	77,14
1	normal	7022,03	7340,18	121,56	43,23
1	normal	6522,05	14402,50	112,90	84,82
1	normal	7697,20	11719,88	133,25	69,02
1	normal	7911,97	13996,54	136,97	82,43
1	normal	8407,57	17480,92	145,54	102,95
1	normal	6801,65	13812,53	117,74	81,35
1	normal	6345,22	15987,63	109,84	94,16
1	normal	8012,19	13182,60	138,70	77,64
1	normal	6570,06	13033,08	113,74	76,76
4	semi-opaco	11782,93	13950,60	203,98	82,16
4	semi-opaco	10579,89	-----	183,15	-----

Continuação...

Tabela 1, Cont.

4	semi-opaco	8829,53	15868,48	152,85	93,46
4	semi-opaco	8100,95	17684,66	140,24	104,15
4	semi-opaco	8040,02	22421,01	139,18	132,05
4	semi-opaco	9410,45	20143,43	162,91	118,63
4	semi-opaco	9036,51	17599,83	156,43	103,65
4	semi-opaco	9518,65	17200,39	164,78	101,30
4	semi-opaco	9451,27	18560,18	163,61	109,31
4	semi-opaco	9189,27	19258,22	159,08	113,42
4	normal	7138,72	12145,93	123,58	71,53
4	normal	9075,94	12545,49	157,12	73,89
4	normal	13970,45	13059,93	241,84	76,92
4	normal	10352,69	14600,44	179,22	85,99
4	normal	10657,20	14222,26	184,49	83,76
4	normal	11496,28	15682,44	199,01	92,36
4	normal	11988,67	14546,94	207,54	85,67
4	normal	11388,34	15067,76	197,15	88,74
4	normal	12875,64	9321,84	222,89	54,90
4	normal	12450,52	9572,01	215,53	56,37
6	semi-opaco	10529,23	15685,96	182,27	92,38
6	semi-opaco	10885,78	21836,42	188,45	128,60
6	semi-opaco	11678,31	23287,56	202,17	137,15
6	semi-opaco	19385,32	15901,26	335,58	93,65
6	semi-opaco	10248,32	20690,47	177,41	121,85
6	semi-opaco	10610,21	16915,58	183,67	99,62
6	semi-opaco	13305,04	16599,05	230,33	97,76
6	semi-opaco	10913,64	18722,32	188,93	110,26
6	semi-opaco	13224,38	16774,93	228,93	98,79
6	semi-opaco	14339,22	14635,83	248,23	86,20
6	normal	18346,02	15761,38	317,59	92,83
6	normal	23165,18	19442,05	401,02	114,50
6	normal	23147,81	24919,52	400,72	146,76
6	normal	16463,61	21221,91	285,00	124,98
6	normal	14098,80	22189,54	244,07	130,68
6	normal	13910,73	22137,84	240,81	130,38
6	normal	15208,80	23925,67	263,28	140,91
6	normal	14696,25	21919,48	254,41	129,09
6	normal	13485,34	23496,99	233,45	138,38
6	normal	13566,79	23239,83	234,86	136,87
9	semi-opaco	10859,23	19281,18	187,99	113,55
9	semi-opaco	12556,04	18099,85	217,36	106,60
9	semi-opaco	12930,62	19647,43	223,84	115,71
9	semi-opaco	12029,59	20494,42	208,25	120,70

Continuação...

Tabela 1, Cont.

9	semi-opaco	13117,20	21392,61	227,07	125,99
9	semi-opaco	12621,77	17793,78	218,50	104,79
9	semi-opaco	10472,16	18893,60	181,29	111,27
9	semi-opaco	11024,43	20569,76	190,85	121,14
9	semi-opaco	10319,88	15749,70	178,65	92,76
9	semi-opaco	10848,43	16160,18	187,80	95,17
9	normal	9320,95	16676,20	161,36	98,21
9	normal	5770,80	13149,59	99,90	77,44
9	normal	9848,35	16019,62	170,49	94,35
9	normal	6904,53	17903,20	119,53	105,44
9	normal	7483,79	15203,00	129,55	89,54
9	normal	11319,24	15896,75	195,95	93,62
9	normal	11287,89	18600,08	195,41	109,54
9	normal	9789,90	15260,33	169,47	89,87
9	normal	10856,72	16083,07	187,94	94,72
9	normal	10409,52	14496,85	180,20	85,38
10	semi-opaco	8962,14	24093,70	155,14	141,90
10	semi-opaco	9042,65	19150,95	156,54	112,79
10	semi-opaco	9824,85	21301,49	170,08	125,45
10	semi-opaco	10238,42	20870,72	177,24	122,92
10	semi-opaco	8203,85	-----	142,02	-----
10	semi-opaco	10058,97	32144,05	174,13	189,31
10	semi-opaco	10763,47	22121,74	186,33	130,28
10	semi-opaco	10348,00	22220,48	179,14	130,87
10	semi-opaco	9636,86	22594,60	166,83	133,07
10	semi-opaco	9854,17	27341,90	170,59	161,03
10	normal	8351,75	20512,89	144,58	120,81
10	normal	10931,09	20234,45	189,23	119,17
10	normal	11268,89	21624,21	195,08	127,35
10	normal	9324,09	21286,55	161,41	125,37
10	normal	9483,69	17110,63	164,17	100,77
10	normal	11901,30	18624,31	206,03	109,69
10	normal	9926,87	22629,31	171,85	133,27
10	normal	10988,77	21208,72	190,23	124,91
10	normal	9281,37	18298,06	160,67	107,76
10	normal	10799,69	19984,79	186,96	117,70

Tabela 2 - Valores de percentagem de proteína e triptofano presente nas proteínas do endosperma e estimadores de proteína (b) e não-zeína (b) dos indivíduos dos bulks F₂ resultante do cruzamento entre CMS52 e IHP.

Bulks	Genótipo	%Proteína	Estimador de proteína	%Triptofano	Estimador de não-zeína
1	semi-opaco	10,68	0,00302	0,72	0,00065
1	semi-opaco	9,63	0,00370	0,45	0,00048
1	semi-opaco	10,51	0,00316	0,44	0,00060
1	semi-opaco	10,59	0,00346	0,45	0,00041
1	semi-opaco	9,52	0,00259	0,48	0,00054
1	semi-opaco	10,15	0,00291	0,46	0,00071
1	semi-opaco	12,14	0,00313	0,37	0,00122
1	semi-opaco	10,96	0,00306	0,66	0,00116
1	semi-opaco	10,58	0,00346	0,42	0,00065
1	semi-opaco	9,13	0,00356	0,43	0,00071
1	normal	10,86	0,00370	0,26	0,00034
1	normal	11,35	0,00405	0,24	0,00034
1	normal	11,88	0,00351	0,28	0,00050
1	normal	11,12	0,00428	0,23	0,00034
1	normal	11,03	0,00402	0,25	0,00023
1	normal	11,44	0,00407	0,23	0,00023
1	normal	11,86	0,00461	0,24	0,00099
1	normal	12,31	0,00468	0,24	0,00080
1	normal	10,99	0,00487	0,26	0,00061
1	normal	12,35	0,00494	0,23	0,00043
4	semi-opaco	15,59	0,00481	0,28	0,00099
4	semi-opaco	14,00	0,00430	0,31	0,00080
4	semi-opaco	14,48	0,00429	0,29	0,00061
4	semi-opaco	13,36	0,00471	0,31	0,00043
4	semi-opaco	13,84	0,00455	0,29	0,00050
4	semi-opaco	14,34	0,00435	0,28	0,00091
4	semi-opaco	12,10	0,00274	0,41	0,00063
4	semi-opaco	13,63	0,00482	0,40	0,00056
4	semi-opaco	12,88	0,00429	0,34	0,00106
4	semi-opaco	13,83	0,00464	0,29	0,00101
4	normal	16,83	0,00491	0,16	0,00037
4	normal	16,66	0,00491	0,15	0,00041
4	normal	16,77	0,00484	0,21	0,00041
4	normal	17,62	0,00456	0,18	0,00031

Continuação...

Tabela 2, Cont.

4	normal	18,02	0,00500	0,14	0,00036
4	normal	17,51	0,00490	0,17	0,00042
4	normal	17,62	0,00499	0,14	0,00042
4	normal	17,34	0,00431	0,17	0,00034
4	normal	16,72	0,00368	0,21	0,00037
4	normal	16,15	0,00493	0,19	0,00065
6	semi-opaco	11,66	0,00394	0,41	0,00059
6	semi-opaco	11,23	0,00472	0,43	0,00071
6	semi-opaco	11,46	0,00374	0,43	0,00117
6	semi-opaco	11,90	0,00414	0,39	0,00088
6	semi-opaco	11,42	0,00427	0,37	0,00059
6	semi-opaco	11,54	0,00376	0,45	0,00076
6	semi-opaco	11,33	0,00375	0,40	0,00045
6	semi-opaco	11,42	0,00348	0,41	0,00071
6	semi-opaco	11,45	0,00454	0,69	0,00048
6	semi-opaco	12,02	0,00300	0,74	0,00066
6	normal	13,03	0,00347	0,28	0,00034
6	normal	12,13	0,00322	0,29	0,00076
6	normal	13,26	0,00464	0,25	0,00044
6	normal	13,94	0,00446	0,24	0,00023
6	normal	12,64	0,00444	0,20	0,00027
6	normal	12,98	0,00472	0,25	0,00023
6	normal	13,42	0,00470	0,23	0,00034
6	normal	14,25	0,00476	0,24	0,00044
6	normal	12,58	0,00454	0,23	0,00033
6	normal	13,27	0,00471	0,24	0,00038
9	semi-opaco	9,76	0,00356	0,43	0,00071
9	semi-opaco	10,38	0,00323	0,36	0,00074
9	semi-opaco	10,34	0,00333	0,35	0,00112
9	semi-opaco	10,34	0,00327	0,37	0,00062
9	semi-opaco	8,83	0,00306	0,46	0,00048
9	semi-opaco	9,34	0,00314	0,39	0,00043
9	semi-opaco	9,77	0,00311	0,36	0,00043
9	semi-opaco	11,63	0,00351	0,41	0,00050
9	semi-opaco	10,59	0,00331	0,41	0,00062
9	semi-opaco	11,00	0,00371	0,35	0,00033
9	normal	11,85	0,00419	0,17	0,00029
9	normal	11,46	0,00407	0,21	0,00028
9	normal	13,00	0,00443	0,24	0,00048
9	normal	11,34	0,00451	0,25	0,00044
9	normal	11,45	0,00472	0,14	0,00041
9	normal	12,20	0,00502	0,24	0,00058

Continuação...

Tabela 2, Cont.

9	normal	12,06	0,00421	0,23	0,00048
9	normal	12,40	0,00454	0,35	0,00047
9	normal	9,76	0,00462	0,35	0,00050
9	normal	11,76	0,00417	0,19	0,00033

Tabela 3 - Valores de percentagem de proteína e triptofano presente nas proteínas do endosperma e estimadores de proteína (b) e não-zeína (b) das famílias S₁ resultante da autofecundação da população CMS475 QPM.

Famílias	%Proteína	Estimador de proteína	%Triptofano	Estimador de não-zeína
1	12,35	0,00292	0,64	0,00065
2	10,07	0,00254	0,67	0,00049
3	11,42	0,00267	0,64	0,00085
4	9,19	0,00236	0,73	0,00034
5	12,25	0,00360	0,51	0,00039
6	11,14	0,00355	0,49	0,00034
7	9,84	0,00290	0,71	0,00034
8	9,19	0,00277	0,69	0,00045
9	9,84	0,00277	0,75	0,00048
10	10,42	0,00295	0,61	0,00048
11	9,88	0,00256	0,75	0,00042
12	10,02	0,00250	0,82	0,00049
13	10,96	0,00343	0,61	0,00067
14	9,93	0,00355	0,60	0,00073
15	9,07	0,00231	0,76	0,00078
16	12,62	0,00355	0,59	0,00109
17	8,72	0,00248	0,67	0,00039
18	9,03	0,00277	0,66	0,00049
19	10,11	0,00246	0,89	0,00041
20	10,74	0,00321	0,81	0,00055
21	8,27	0,00261	0,77	0,00050
22	11,95	0,00310	0,70	0,00066
23	10,15	0,00314	0,74	0,00070
24	10,92	0,00355	0,81	0,00053
25	10,24	0,00250	0,76	0,00059
26	9,43	0,00260	0,81	0,00059
27	11,23	0,00285	0,91	0,00065
28	9,84	0,00276	0,78	0,00042

Continuação...

Tabela 3, Cont.

29	9,25	0,00215	0,84	0,00042
30	10,02	0,00261	0,70	0,00042
31	10,60	0,00239	0,79	0,00048
32	10,42	0,00253	0,69	0,00042
33	9,30	0,00194	0,75	0,00032
34	11,50	0,00235	0,60	0,00054
35	9,30	0,00206	0,79	0,00036
36	7,68	0,00146	0,68	0,00031
37	11,18	0,00312	0,83	0,00048
38	10,00	0,00213	0,53	0,00028
39	9,75	0,00292	0,72	0,00077
40	11,81	0,00326	0,76	0,00042
41	8,98	0,00268	0,71	0,00050
42	11,41	0,00372	0,63	0,00046
43	10,51	0,00284	0,66	0,00054
44	10,92	0,00332	0,68	0,00061
45	8,49	0,00258	0,83	0,00055
46	11,57	0,00333	0,63	0,00051
47	10,43	0,00276	0,75	0,00068
48	8,65	0,00228	0,58	0,00034
49	10,53	0,00308	0,67	0,00054
50	12,37	0,00377	0,59	0,00043
51	8,10	0,00261	0,66	0,00042
52	9,79	0,00275	0,61	0,00054
53	8,35	0,00197	1,04	0,00034
54	8,94	0,00194	0,77	0,00028
55	9,58	0,00261	0,64	0,00039
56	11,65	0,00333	0,81	0,00066
57	9,95	0,00236	0,69	0,00045
58	10,78	0,00193	0,71	0,00044
59	11,80	0,00320	0,68	0,00042
60	9,35	0,00237	0,61	0,00039
61	8,57	0,00212	0,85	0,00046
62	9,34	0,00233	0,72	0,00032
63	11,76	0,00441	0,64	0,00062
64	9,70	0,00380	0,62	0,00052
65	11,72	0,00415	0,64	0,00011
66	8,73	0,00287	0,76	0,00044
67	10,8	0,00352	0,75	0,00082
68	11,17	0,00260	0,53	0,00044
69	9,73	0,00329	0,63	0,00044
70	9,34	0,00249	0,65	0,00076

Continuação...

Tabela 3, Cont.

71	8,55	0,00314	0,97	0,00138
72	8,32	0,00192	0,77	0,00055
73	10,09	0,00242	0,68	0,00076
74	7,81	0,00232	0,56	0,00034
75	9,93	0,00237	0,73	0,00040
76	9,14	0,00287	0,54	0,00062
77	10,25	0,00218	0,56	0,00044
78	11,30	0,00256	0,77	0,00040
79	10,58	0,00272	0,61	0,00059
80	10,46	0,00288	0,56	0,00053
81	13,18	0,00343	0,50	0,00077
82	10,17	0,00279	0,59	0,00059
83	10,24	0,00233	0,65	0,00065
84	9,11	0,00234	0,63	0,00074
85	11,11	0,00282	0,57	0,00091
86	12,06	0,00345	0,62	0,00054
87	7,97	0,00154	0,69	0,00042
88	9,57	0,00249	0,56	0,00040
89	8,32	0,00204	0,69	0,00034
90	9,27	0,00248	0,69	0,00093
91	9,17	0,00250	0,62	0,00093
92	9,42	0,00212	0,60	0,00172
93	12,41	0,00261	0,95	0,00108
94	8,97	0,00199	0,69	0,00044
95	11,51	0,00308	0,63	0,00093
96	10,47	0,00269	0,51	0,00054
97	9,68	0,00267	0,66	0,00042
98	13,30	0,00334	0,81	0,00088
99	10,84	0,00297	0,63	0,00054
100	10,00	0,00095	0,38	0,00096
101	11,44	0,00285	0,65	0,00122
102	9,64	0,00215	0,57	0,00093
103	9,47	0,00266	0,80	0,00093
104	11,43	0,00314	0,82	0,00094
105	9,69	0,00235	0,75	0,00076
106	10,00	0,00162	0,57	0,00045
107	7,17	0,00188	0,76	0,00048
108	9,90	0,00286	0,70	0,00054
109	11,11	0,00285	0,70	0,00059
110	9,80	0,00259	0,72	0,00055
111	11,82	0,00309	0,50	0,00054
112	9,74	0,00241	0,76	0,00054

 Continuação...

Tabela 3, Cont.

155	10,20	0,00278	0,79	0,00054
156	10,60	0,00176	0,77	0,00071
157	10,99	0,00251	0,61	0,00061
158	10,88	0,00239	0,73	0,00048
159	10,65	0,00265	0,77	0,00099
160	9,52	0,00226	0,70	0,00034
161	10,29	0,00272	0,67	0,00053
162	9,63	0,00248	0,78	0,00043
163	9,06	0,00250	0,93	0,00061
164	6,96	0,00128	0,72	0,00033
165	8,55	0,00251	0,83	0,00048
166	8,95	0,00172	0,94	0,00065
167	10,08	0,00258	0,86	0,00093
168	10,37	0,00286	1,09	0,00082
169	12,02	0,00320	0,65	0,00093
170	13,09	0,00320	0,88	0,00183
171	12,93	0,00347	0,75	0,00127
172	10,60	0,00328	0,67	0,00144
173	11,11	0,00252	0,77	0,00189
174	11,93	0,00267	0,89	0,00116
175	9,59	0,00252	0,89	0,00138
176	10,55	0,00238	0,99	0,00133
177	8,54	0,00258	1,20	0,00062
178	8,49	0,00238	1,12	0,00045
179	9,49	0,00245	0,72	0,00060
180	8,96	0,00183	0,94	0,00045
181	10,44	0,00236	0,83	0,00178
182	10,13	0,00242	0,85	0,00127
183	9,07	0,00210	1,02	0,00099
184	10,18	0,00230	0,74	0,00059
185	9,76	0,00290	0,91	0,00100
186	10,76	0,00300	0,69	0,00072
187	8,06	0,00182	0,96	0,00055
188	10,50	0,00265	0,87	0,00050
189	10,40	0,00248	0,71	0,00061
190	13,15	0,00312	0,78	0,00065
191	9,76	0,00223	0,67	0,00057
192	10,13	0,00281	0,77	0,00049
193	9,23	0,00217	0,96	0,00054
194	9,97	0,00230	0,93	0,00048
195	10,82	0,00221	0,78	0,00076
196	12,04	0,00233	0,68	0,00054

 Continuação...

Tabela 3, Cont.

113	9,14	0,00251	0,50	0,00034
114	11,16	0,00326	0,49	0,00057
115	8,49	0,00198	0,80	0,00054
116	10,84	0,00270	0,81	0,00054
117	11,76	0,00271	0,63	0,00087
118	11,44	0,00287	0,64	0,00079
119	10,73	0,00300	0,62	0,00045
120	10,89	0,00311	0,68	0,00085
121	10,51	0,00284	0,68	0,00076
122	12,04	0,00345	0,59	0,00071
123	8,54	0,00211	0,71	0,00065
124	11,16	0,00263	0,65	0,00043
125	11,49	0,00264	0,77	0,00121
126	11,27	0,00272	0,78	0,00161
127	12,52	0,00268	0,66	0,00072
128	11,82	0,00274	0,68	0,00065
129	9,20	0,00234	0,66	0,00051
130	12,04	0,00239	0,79	0,00099
131	9,96	0,00218	0,58	0,00055
132	10,56	0,00249	0,66	0,00042
133	11,33	0,00265	0,55	0,00071
134	9,69	0,00198	0,65	0,00057
135	8,87	0,00203	0,82	0,00121
136	9,80	0,00312	0,70	0,00096
137	9,86	0,00258	0,73	0,00076
138	11,96	0,00286	0,55	0,00054
139	10,60	0,00236	0,74	0,00071
140	11,46	0,00348	0,71	0,00054
141	10,00	0,00133	0,63	0,00045
142	9,58	0,00276	0,69	0,00038
143	10,60	0,00281	0,70	0,00082
144	9,23	0,00196	0,83	0,00045
145	10,31	0,00251	0,86	0,00093
146	7,76	0,00214	0,94	0,00042
147	10,37	0,00210	0,91	0,00070
148	7,08	0,00133	1,03	0,00033
149	10,71	0,00260	0,78	0,00069
150	10,54	0,00284	0,68	0,00043
151	10,71	0,00294	0,79	0,00071
152	9,92	0,00199	0,76	0,00048
153	10,14	0,00235	0,88	0,00068
154	10,88	0,00265	0,92	0,00077

 Continuação...

Tabela 3, Cont.

197	10,66	0,00248	0,88	0,00076
198	9,76	0,00221	1,07	0,00065
199	7,58	0,00152	0,99	0,00040
200	10,82	0,00191	0,80	0,00057
201	11,62	0,00292	0,88	0,00057
202	9,56	0,00234	0,80	0,00045
203	12,33	0,00250	0,78	0,00066
204	12,68	0,00275	0,70	0,00054
205	12,43	0,00265	0,60	0,00087
206	10,12	0,00172	0,55	0,00044
207	10,45	0,00211	0,76	0,00054
208	10,40	0,00291	0,71	0,00144
209	9,48	0,00213	0,87	0,00065
210	12,20	0,00309	1,00	0,00088
211	9,77	0,00258	0,92	0,00059
212	10,99	0,00299	0,58	0,00065
213	12,20	0,00284	0,86	0,00082
214	10,65	0,00256	0,88	0,00054
215	12,39	0,00275	0,72	0,00071
216	8,37	0,00167	0,91	0,00045
217	8,66	0,00172	0,86	0,00044
218	10,16	0,00270	0,85	0,00054
219	10,16	0,00265	0,91	0,00060
220	9,29	0,00211	0,88	0,00054
221	11,13	0,00265	0,60	0,00054
222	12,25	0,00273	0,79	0,00071
223	11,67	0,00269	0,82	0,00065
224	12,88	0,00281	0,60	0,00059
225	7,59	0,00136	0,79	0,00085
226	12,25	0,00275	0,83	0,00088
227	9,43	0,00203	0,81	0,00059
228	11,81	0,00263	0,69	0,00065
229	8,37	0,00132	0,65	0,00059
230	10,23	0,00272	0,69	0,00050
231	12,23	0,00269	0,68	0,00051