

BC/14780

IB/80486



MARIA LUÍSA PENTEADO NATIVIDADE TARGON

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pela candidata Maria Luísa Penteado Natividade Targon e aprovada pela comissão julgadora Arruda

**SÍNTESE E DEPOSIÇÃO DE COIXINAS EM SEMENTES
DE *Coix lacryma-jobi* L. var. ADLAY**

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de
Genética Vegetal**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Arruda

Campinas, SP. 1991.

UNIDADE	IB/1119
N.º CHAMADA	T/174A
V.	EX
TOMBO DC/	14780
PROC.	308/91
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO G.S.	8.000,00
DATA	25/10/91
N.º CPD	

CM.00017344-2

*Ao meu marido,
Júlio
e aos meus pais,
Fábio e Lúcia
dedico*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Paulo Arruda, meu agradecimento especial pela oportunidade, orientação e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

- A Ana Beatriz Garcia, pelo apoio e amizade durante todos estes anos.

- Dra. Laura M. M. Ottoboni, pelos ensinamentos e por toda a ajuda durante o desenvolvimento do trabalho.

- Ao Dr. Adilson Leite, pela colaboração durante o desenvolvimento do plano experimental e pela análise prévia do trabalho.

- Ao Dr. Pedro Puigdomenech e à Dra. Dolores Ludevid, do Conselho Superior de Investigações Científicas, Barcelona - Espanha - pela orientação durante a execução dos trabalhos de microscopia.

- A Núria Cortadellas Ramentol, Ana Ribera Dominguez e à coordenação do Serviço de Microscopia Eletrônica da Universidade de Barcelona - Espanha, pelas facilidades oferecidas nos trabalhos de microscopia eletrônica.

- Prof. Dra. Yoko Bomura Rosato, e aos Professores Dr. Luiz Gonzaga Santoro e Dr. Antonio Celso Magalhães, pela análise prévia do trabalho e pelas valiosas sugestões.

- A Elizabeth Ribas Bilo, pela colaboração durante a realização do trabalho.

- A Sandra Luzia Scarano e Márcio Marcos da Silva, pela solicitude com que sempre me atenderam e pelo convívio amigo.

- A José Andres Yunes, pela execução dos gráficos e montagem das fotos apresentadas no trabalho.

- Aos colegas Fernando Augusto Freitas, Sílvia Regina Turcinelli, Márcio José da Silva e José Carlos Teixeira Júnior, pela convivência e amizade.

- Sementes Agrocere S/A e à CAPES, pelo suporte financeiro.

- E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução deste.

ÍNDICE

1. Introdução	6
1.1. As proteínas das sementes e sua importância	6
1.2. Acúmulo de proteínas durante o desenvolvimento	7
1.2.1. Desenvolvimento da semente	7
1.2.2. Classificação das proteínas das sementes	9
1.2.3. Síntese e deposição das prolamínas	11
1.3. Regulação da expressão dos genes das proteínas de reserva	13
1.3.1. Regulação transcricional e pós-transcricional	14
1.3.2. Expressão dos genes das proteínas das sementes em plantas transgênicas	16
1.3.3. Proteínas que se ligam ao DNA (DNA binding proteins)	17
1.4. <i>Coix lacryma-jobi</i> L.	17
2. Objetivos	27
3. Material e métodos	28
3.1. Material vegetal	28
3.2. Preparo do material	28
3.2.1. Material de vidro e plástico	28
3.2.2. Cuidados com as soluções	29
3.3. Preparo das amostras	29
3.4. Extração das coixinas	30
3.5. Determinação do teor de proteína	30
3.5.1. Digestão da matéria orgânica	31
3.5.2. Determinação colorimétrica da amônia liberada na digestão	31
3.6. Análise das coixinas através de SDS-PAGE	32
3.6.1. Soluções estoque	32
3.6.2. Preparo dos géis	32

3.6.3. Preparo das amostras	33
3.6.4. Eletroforese	33
3.7. Western blot	35
3.8. Isolamento dos corpúsculos proteicos	36
3.9. Isolamento do RNA total do endosperma	37
3.10. Extração de RNA polissomal	37
3.11. Tradução "in vitro"	38
3.12. Northern blot	39
3.12.1. Preparo do gel	39
3.12.2. Preparo das amostras	40
3.12.3. Eletroforese	40
3.12.4. Transferência do RNA polissomal para membranas de nylon	41
3.13. Minipreparação de DNA	41
3.14. Isolamento de insertos	42
3.15. Marcação de insertos	43
3.16. Hibridização de filtros na presença de formamida	45
3.17. Microscopia	46
3.17.1. Fixação de tecidos e de corpúsculos proteicos	46
3.17.2. Inclusão de tecidos e de corpúsculos proteicos	47
3.17.3. Tratamento de lâminas com poly-D- Lysine hydrobromide	48
3.17.4. Obtenção de cortes	48
3.17.5. Imunocitoquímica - Microscopia ótica	48
3.17.6. Imunocitoquímica - Microscopia eletrônica	49
4. Resultados	51
4.1. Síntese e deposição de coixinas durante o desenvolvimento das sementes de <i>Coix lacryma-jobi</i> L. var. Adlay	51
4.1.1. O desenvolvimento das sementes do Adlay	52
4.1.2. Comparação do acúmulo de proteína e RNA durante o desenvolvimento do endosperma do Adlay	52

4.1.3. Precursores das coixinas	53
4.1.4. Síntese das coixinas durante o desenvolvimento do endosperma do Adlay	56
4.1.5. Deposição das coixinas	62
4.2. Imunocitoquímica associada à microscopia	65
4.2.1. Imunocitolocalização de coixinas em tecidos do Adlay	65
4.2.2. Imunocitocalização de coixinas nos corpúsculos proteicos do endosperma do Adlay	67
5. Discussão	70
6. Conclusões	76
7. Resumo	78
8. Summary	81
9. Referências bibliográficas	83

ABREVIações

2-ME	2 Mercaptoetanol
DEPC	dietilpirocarbonato
DTT	DL-ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	aceleração da gravidade
IEF	focalização isoelétrica
MOPS	ácido 3- (n-Morfolino) propanosulfônico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
pl	ponto isoelétrico
rpm	rotações por minuto
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N,N' -tetrametil-etilenodiamina
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano

1. INTRODUÇÃO

1.1. As proteínas das sementes e sua importância

As proteínas das sementes são muito importantes do ponto de vista econômico e nutricional, e foram umas das primeiras proteínas a serem isoladas e caracterizadas. Estas proteínas são sintetizadas em grande quantidade durante a embriogênese e armazenadas nas sementes de uma maneira estável e por longos períodos de tempo, não sendo detectadas na fase não embriogênica do ciclo de vida da planta (Goldberg et al., 1989). As proteínas das sementes são codificadas por famílias multigênicas que variam em tamanho, organização e localização (Cazey et al., 1986).

Uma grande parte das proteínas encontradas nas sementes é representada pelas proteínas de reserva. Durante a germinação, estas proteínas são rapidamente hidrolisadas por enzimas sintetizadas nas células da camada de aleurona para fornecer nitrogênio e carbono, necessários para o início do desenvolvimento da plântula (Higgins, 1984; Edwards e Coruzzi, 1990).

O estudo dos genes que codificam as proteínas de reserva tem fornecido muitas informações sobre o processo de expressão gênica nas plantas superiores por 2 razões principais:

- estes genes estão envolvidos em processos muito particulares do ciclo de vida da planta.

- seus produtos são codificados em grande quantidade e em períodos bem determinados do desenvolvimento, o que facilita o estudo e manipulação a nível celular e molecular (Goldberg et al., 1989).

Assim, devido à sua alta expressão, bem como à sua contribuição à qualidade nutricional das sementes, as proteínas de reserva e seus genes têm sido estudados em várias espécies, e atualmente representam um importante sistema para estudos da expressão gênica diferencial.

1.2. Acúmulo de proteínas durante o desenvolvimento

1.2.1. Desenvolvimento da semente

Nas gramíneas em geral, após a fertilização, todo o ovário se transforma em um fruto conhecido como grão ou cariopse. O grão ou cariopse é o único órgão em que são encontrados 3 tecidos com diferentes dotações genéticas, devido ao processo característico da fertilização (Heidecker e Messing, 1986; Raghavan e Olmedilla, 1989).

Durante a maturação do ovário, ocorre a diferenciação de uma célula progenitora do saco embrionário. Esta célula, após um processo de meiose, produz 4 células haplóides. Dessas 4 células, apenas uma sobrevive e, a partir de divisões mitóticas, dá origem ao metagametófito, formado por 8 células pouco diferenciadas. Dentre estas células, 2 se destacam: uma delas é o óvulo, que se localiza na parte por onde o tubo polínico entrará no ovário; a outra é uma célula central com 2 núcleos haplóides. Através de um processo de meiose ocorre a formação de esporos haplóides nas anteras. O grão de pólen forma-se a partir de células derivadas dos esporos e nele são encontradas 2 células espermáticas e uma célula do tubo polínico.

Na polinização, quando o grão de pólen é depositado no estigma de um ovário, ocorre a formação de um tubo polínico que se estende do grão de pólen ao ovário. No ovário são depositadas as 2 células espermáticas do grão de pólen e, deste modo, ocorre a dupla fertilização: uma das células espermáticas se funde com o óvulo dando origem ao embrião; a outra célula espermática une-se à célula central contendo os 2 núcleos haplóides, formando a célula triplóide que dará origem ao endosperma.

Na cariopse são encontrados 3 tecidos diferentes que se desenvolvem a partir de células com diferentes dotações genéticas. A parte mais externa, o pericarpo, origina-se de células diplóides maternas que circundam o saco embrionário. O endosperma origina-se da célula triplóide formada a partir do segundo evento de

fertilização e possui 2 conjuntos de cromossomos maternos e um paterno. O embrião possui um conjunto de cromossomo materno e um paterno, e é a única parte da semente que, em condições apropriadas, se desenvolve em uma planta madura. O endosperma e o pericarpo são tecidos terminais e limitados à semente.

O desenvolvimento da semente ocorre de acordo com uma sequência de eventos bem definidos, que podem ser divididos em 4 fases (Hauxwell et al., 1990):

- divisão celular
- expansão celular
- maturação da semente
- dessecação e dormência

A síntese das proteínas de reserva e amido inicia-se na fase de expansão celular, sómente após a fase inicial de grande divisão celular. Neste período, ocorre uma intensa atividade biossintética nas células do endosperma e, deste modo, é acumulada em pouco tempo uma grande quantidade de proteínas e outros produtos de reserva. Durante este período observa-se um grande aumento no peso fresco da semente. Conforme vai ocorrendo a maturação da semente, a síntese das proteínas de reserva cessa, e a taxa de aumento de matéria fresca diminui (Dure, 1975; Higgins, 1984). A semente começa, então, a entrar na fase de dessecação. Na maioria das sementes, a dessecação termina a fase de maturação e conduz a um estado de dormência, até a germinação. Este período de desidratação tem sido apontado como sendo muito importante nas atividades celulares, estendendo-se de um processo de desenvolvimento, à germinação e crescimento (Bewley e Black, 1985; Kermode e Bewley, 1986; Kermode et al., 1989).

Na fase onde ocorre grande síntese de proteínas de reserva foi observado um aumento de DNA no núcleo das células do endosperma. Kowles e Phillips (1985) observaram em milho que o acúmulo de DNA nas células do endosperma atinge um nível máximo por volta de 14 a 18 dias após a polinização, o que coincide com o estágio onde ocorre a maior taxa de síntese de proteínas de reserva. De acordo com os mesmos autores, após o período de máxima síntese de proteínas, o nível de DNA começa a diminuir e, aos 22 dias após a polinização, representa aproximadamente

metade do máximo observado. Não foram feitas determinações do nível de DNA após o período citado acima, mas provavelmente este nível decai durante a maturação. Segundo os mesmos autores, o alto nível de DNA pode ser devido a processos de endoreduplicação (politenização). O aumento de DNA dos genes das prolaminas no núcleo das células do endosperma, no mesmo período em que ocorre a maior taxa de síntese dessas proteínas, justificaria o grande aumento nos níveis de mRNAs das mesmas. Não existem evidências de que ocorra uma amplificação gênica seletiva. No entanto, não podemos afirmar com segurança que este processo não ocorre; mais trabalhos precisam ser feitos para esclarecer esta questão.

1.2.2. Classificação das proteínas das sementes

Os primeiros trabalhos desenvolvidos com o objetivo de classificar as proteínas das sementes foram baseados no critério de solubilidade diferencial, usando a técnica de extração sequencial descrita por Osborne e Mendel (1914). De acordo com este critério, as proteínas das sementes foram classificadas em:

1. albuminas, solúveis em água;
2. globulinas, solúveis em soluções salinas;
3. prolaminas, solúveis em soluções alcoólicas;
4. glutelinas, solúveis em soluções ácidas ou básicas diluídas.

A subsequente introdução de novos procedimentos para separação de proteínas e análise de aminoácidos, resultou em modificações dos solventes de extração, e também nas condições para se obter frações com um mínimo de contaminação. Atualmente, as albuminas e globulinas são extraídas em uma mesma fração, em soluções salinas; as prolaminas são extraídas do endosperma dos cereais em soluções contendo 70% de etanol ou 55% isopropanol e mais um agente redutor como 2-mercaptoetanol (2-ME) (Shewry et al., 1980). A extração das glutelinas em soluções alcalinas resulta em desnaturação e degradação parcial das proteínas, o que torna as análises eletroforéticas difíceis e até mesmo impossíveis de serem realizadas. Deste modo, alguns procedimentos de extração foram desenvolvidos

com o objetivo de facilitar a análise desta fração e, entre eles, a inclusão de tampões com pH alto e contendo SDS (Moureaux e Landry, 1968).

De acordo com Shewry e Mifflin (1985) e Shewry et al., (1986), as proteínas presentes nas sementes exercem diferentes funções e, assim, podem ser classificadas em:

1. Proteínas metabólicas: Estas proteínas estão envolvidas no metabolismo das sementes e são constituídas principalmente por enzimas. Na fração das albuminas e globulinas é encontrada a maioria destas proteínas.

2. Proteínas estruturais: Boa parte das proteínas encontradas no endosperma pertence a esta classe. Como exemplo podem ser citadas as proteínas ribossomais, algumas proteínas do retículo endoplasmático e glicoproteínas das paredes celulares. Na fração das glutelinas são encontradas algumas destas proteínas.

3. Proteínas de reserva: Estas proteínas se acumulam em grande quantidade durante o desenvolvimento da semente, não possuem atividade metabólica, e sua principal função é fornecer nitrogênio, carbono e enxofre para serem subsequentemente usados durante a germinação.

Em muitas plantas dicotiledôneas, as principais proteínas de reserva são as globulinas. Estas proteínas são sintetizadas principalmente nos cotilédones do embrião em desenvolvimento (Derbyshire et al., 1976).

Nos cereais, as principais proteínas de reserva são as prolaminas, representando aproximadamente 50% das proteínas que são sintetizadas no endosperma das sementes. Aveia e arroz são exceções; seus endospermas contém pouca quantidade de prolaminas (5 a 10%), e as principais proteínas de reserva nestes cereais são as globulinas. O nome dado às prolaminas baseia-se no nome da espécie e assim, as prolaminas do milho (*Zea mays*) são chamadas zeínas, as do *Coix* (*Coix lacryma-jobi* L.), coixinas.

As prolaminas apresentam um alto teor dos aminoácidos prolina e glutamina, daí a denominação prolamina. No entanto, o teor dos aminoácidos essenciais lisina e triptofano é muito baixo, e isso reduz a qualidade nutricional dos cereais que contém alto teor de prolamina. As prolaminas encontram-se geralmente agregadas, forman-

do complexos de alto peso molecular insolúveis em água. Nas sementes, estas proteínas encontram-se depositadas nas células do endosperma em pequenas organelas (de 1 a 20 μm de diâmetro) chamadas corpúsculos proteicos (Higgins, 1984).

1.2.3. Síntese e deposição das prolaminas

As prolaminas são sintetizadas nas células do endosperma dos cereais entre 10 e 50 dias após a polinização, por polissomos associados às membranas do retículo endoplasmático rugoso. As prolaminas recém sintetizadas atravessam as membranas e depositam-se nas cisternas do retículo endoplasmático, que vão se tornando distendidas e eventualmente se destacam para formar os corpúsculos proteicos (Burr e Burr, 1976; Brandt e Ingversen, 1978; Payne et al., 1986). Os corpúsculos proteicos começam a aparecer nas células do endosperma logo após o início da síntese das proteínas e vão aumentando em número e tamanho conforme ocorre a maturação da semente (Larkins, 1981; Larkins et al., 1984).

O local da síntese das prolaminas nas células do endosperma dos cereais é também o local da deposição dessas proteínas. O único passo do processo de transporte intracelular envolvido na deposição das prolaminas é a translocação cotraducional dessas proteínas através das membranas do retículo endoplasmático rugoso. A translocação é possível devido à presença de um peptídeo sinal na sequência amino terminal da cadeia de polipeptídeos que está sendo sintetizada. Este peptídeo sinal permite a passagem da proteína através da membrana e é removido por atividade proteolítica antes mesmo da cadeia de polipeptídeos estar completa (Blobel e Dobrestein, 1975; Kreil, 1981).

A presença de peptídeo sinal tem sido observada em proteínas de reserva de muitos cereais e também de leguminosas. As sequências correspondentes aos peptídeos sinal foram deduzidas através de análises de clones de cDNA e genômico, e também pela análise de tamanho dos produtos da tradução "in vitro", muitas vezes incluindo-se membranas microssomais para mostrar a clivagem dos precursores

(Matthews e Mifflin, 1980; Beachy et al., 1981; Higgins e Spencer, 1981; Donovan et al., 1982).

Um dos primeiros trabalhos em que ficou demonstrado que as proteínas de reserva são sintetizadas como precursores foi realizado em ervilha, através da tradução "in vitro" de RNAs isolados de polissomos associados às membranas dos corpúsculos proteicos. Os produtos da tradução "in vitro" continham sequências das proteínas de reserva, mas eram maiores que as proteínas nativas (Higgins e Spencer, 1977). Com o aprimoramento das análises, foi demonstrado que os precursores poderiam ser processados e passariam a ter o mesmo tamanho que as proteínas nativas, colocando-se membranas microssomais de cotilédones de ervilha ou mesmo de pâncreas de cachorro nas reações de tradução "in vitro" (Higgins e Spencer, 1980; 1981). Deste modo, parece haver um alto grau de conservação neste passo, pois tanto microssomos preparados de cotilédones de ervilha quanto os de pâncreas de cachorro processaram os precursores das proteínas de reserva de ervilha.

Burr e Burr, (1978); Wienand e Feix, (1978); Torrent et al., (1986) demonstraram que as zeínas, prolaminas de milho, são sintetizadas como precursores, através de tradução de RNA em um sistema de tradução "in vitro". A inclusão de retículo endoplasmático de milho nestes sistemas convertia o precursor ao seu tamanho final (Larkins e Hurkman, 1978; Burr e Burr, 1981).

A presença de peptídeo sinal também foi observada em prolaminas de cevada e sorgo quando mRNAs dessas proteínas foram usados para estudos de síntese "in vitro" (Cameron-Mills et al., 1978; Weber et al., 1980; De Rose et al., 1989).

Larkins et al. (1979) demonstraram que a síntese e o processamento das prolaminas de milho podem ser feitos injetando-se mRNAs de zeínas em célula animal. Os autores injetaram mRNAs de zeínas em oócitos de *Xenopus*, e verificaram que os componentes das zeínas foram sintetizados, processados e secretados em vesículas membranosas de uma maneira muito eficaz.

Apesar das prolaminas serem sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, ocorrem variações com respeito ao transporte e deposição nos corpúsculos

proteicos. As prolaminas de milho, arroz e sorgo são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e depositadas no lúmen desta organela, onde formam os corpúsculos proteicos (Larkins e Hurkman, 1978; Taylor et al., 1985). No caso do trigo e cevada, as prolaminas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e daí são transportadas, provavelmente pelo sistema de Golgi, a vacúolos, formando os corpúsculos proteicos de origem vacuolar (Kim et al., 1988). Em arroz, onde as principais proteínas de reserva são as globulinas, são observados 2 tipos de corpúsculos proteicos. Alguns são de origem vacuolar e outros são formados de membranas do retículo endoplasmático rugoso. Através de técnicas imunocitoquímicas, foi demonstrado que as globulinas estão depositadas nos corpúsculos proteicos de origem vacuolar, enquanto que as prolaminas, nos corpúsculos proteicos formados pelas membranas do retículo endoplasmático rugoso (Bechtel e Juliano, 1980; Tanaka et al., 1980; Krishnan et al., 1986; Takaiwa et al., 1986; Lending et al., 1989).

1.3. Regulação da expressão dos genes das proteínas de reserva

A regulação da expressão dos genes das proteínas de reserva apresenta alguns aspectos característicos e muito interessantes:

- A expressão dos genes destas proteínas é regulada temporalmente durante a embriogênese; o acúmulo dos vários produtos gênicos ocorre de acordo com o estágio de desenvolvimento da semente, mostrando uma cinética sigmoide, relacionada com o aumento de peso seco e com a fase de expansão celular (Dure, 1975).

- Estas proteínas encontram-se distribuídas de uma maneira bem definida, qualitativa e quantitativa, nos tecidos da semente. Nos cereais, as prolaminas são encontradas exclusivamente nas células do endosperma, enquanto que as globulinas são encontradas no endosperma e, principalmente, no embrião (Dierks-Ventling e Ventling, 1982).

- Além do controle temporal e tecido específico, alguns fatores ambientais e genéticos também influenciam a expressão dos genes das proteínas de reserva. A síntese destas proteínas é influenciada, entre outros fatores, pelo nível de nutrientes minerais disponíveis no solo. A síntese das prolaminas de milho aumenta, em consequência da aplicação de fertilizantes nitrogenados. Em milho, cevada e sorgo, têm sido identificadas algumas mutações recessivas que reduzem a síntese de prolaminas. Devido à redução das prolaminas, a qualidade nutricional das proteínas dos mutantes é melhor, pois a concentração relativa de aminoácidos essenciais, principalmente lisina, aumenta. Em milho, um dos mutantes mais bem caracterizados é o *opaco-2* (o-2), que reduz a síntese de zeínas em aproximadamente 50% (Mertz et al., 1964; Kodrzych et al., 1989). A classe mais afetada pela mutação é a das α -zeínas; a α -zeína de 22 KDa é drasticamente reduzida, sendo detectada apenas em níveis bem baixos (Kodrzych et al., 1989). Foi demonstrado que o gene O-2 codifica uma proteína que se liga a determinadas regiões do DNA, regulando especificamente a síntese da α -zeína de 22 KDa (Lohmer et al., 1991). Os níveis de mRNAs das prolaminas é reduzido nos mutantes e, assim, parece haver uma regulação a nível de transcrição ou pós-transcrição.

1.3.1. Regulação transcricional e pós-transcricional

A observação de que existe uma relação entre os níveis de mRNA e a taxa de síntese de cada uma das proteínas de reserva, indica que a síntese destas proteínas é controlada, a princípio, a nível de transcrição.

Os níveis de mRNAs presentes na semente durante o desenvolvimento podem ser estimados através da síntese "in vitro" e titulação do RNA usando-se sondas dos genes das proteínas de reserva. Através destes estudos, ficou demonstrado que ocorrem alterações nos níveis de mRNAs, de acordo com as fases do desenvolvimento da semente. Cada mRNA tem um período específico em que atinge um nível máximo e, em seguida, decai. O período em que se observa o nível máximo de mRNA pode ser correlacionado ao período em que ocorre a maior taxa de síntese dos

respectivos polipeptídeos (Larkins et al., 1976; Park et al., 1980; Burr e Burr, 1981; Greene, 1981).

Existem algumas indicações da ocorrência de um controle da expressão dos genes das proteínas de reserva da semente a nível pós transcricional. Como exemplo, podemos citar o acúmulo dos mRNAs das subunidades α' e β da β -conglucilina da soja. O acúmulo destes mRNAs e de suas proteínas durante a embriogênese é diferente, mas os genes correspondentes são transcricionalmente ativados e reprimidos nos mesmos estágios do desenvolvimento (Naito et al., 1988; Goldberg et al., 1989). A explicação para isto é que, ou alguns mRNAs podem ser enviados ao citoplasma de uma maneira mais eficiente, ou os mRNAs são mais estáveis ou, então, podem ser consideradas as 2 hipóteses juntas. Estas observações indicam que os processos de transcrição e pós- transcrição são de grande importância na regulação da expressão dos genes das proteínas de reserva.

Uma condição primordial para que um gene seja transcrito é que este gene esteja ativado. A ativação é influenciada por alguns fatores como a estrutura da cromatina e o grau de metilação do DNA. O DNA de genes que estão sendo transcritos ativamente em um tecido deve estar menos protegido pelo complexo nucleossomal, o que permite o acesso da RNA polimerase ao promotor para iniciar a transcrição. O grau de metilação é outro fator responsável pela expressão de um gene; genes que não estão se expressando apresentam alto grau de metilação. Um aspecto muito interessante dos genes das proteínas de reserva é que tanto ativos, quanto inativos, estes genes não apresentam diferenças detectáveis no seu padrão de metilação. Bianchi e Viotti (1988) demonstraram que os genes das prolaminas e glutelinas de milho são hipometilados, e na tentativa de explicar este fato, propuseram que o processo de desmetilação ocorre em estágios bem anteriores aos da ativação dos genes destas proteínas.

1.3.2. Expressão dos genes das proteínas das sementes em plantas transgênicas

Atualmente, com o desenvolvimento das técnicas de transformação de plantas (Weising et al., 1988), a expressão de alguns genes das proteínas de sementes tem sido estudada em plantas transgênicas. Através destes estudos, tem sido verificado que genes de proteínas de sementes de várias plantas como soja, trigo, milho, feijão, introduzidos em plantas como o tabaco e petúnia, podem ser expressos corretamente durante o desenvolvimento da planta transgênica. Estes resultados indicam que sequências de DNA e fatores proteicos que são necessários para a correta expressão destes genes são altamente conservadas entre as diferentes espécies de plantas. Além disso, a distribuição destes fatores parece ocorrer nas mesmas fases do desenvolvimento das diferentes espécies de plantas (Goldberg et al., 1989).

A aplicação das técnicas de transformação de plantas, juntamente com os estudos de deleção de sequências da região "flanking" 5', tornou possível a identificação de sequências essenciais para a correta expressão temporal e tecido específica dos genes das proteínas das sementes. Deste modo, de acordo com Goldberg et al. (1989) ficou estabelecido, principalmente, que:

- as sequências necessárias para a correta expressão temporal e tecido específica dos genes das proteínas das sementes localizam-se na região "flanking" 5'.

- existem algumas sequências bem definidas na região 5' que são responsáveis pela regulação da expressão dos genes das proteínas das sementes.

- existem alguns elementos que participam da regulação da expressão dos genes das proteínas das semente. As posições desses elementos são específicas para cada um dos genes.

Estas sequências e elementos que participam da regulação da expressão gênica têm sido observados em genes das proteínas de soja (Okamuro et al., 1986; Chen et al., 1986, 1988), trigo (Colot et al., 1987), cevada (Marris et al., 1988), milho (Ueng et al., 1988; Scherthner et al., 1988) e feijão (Greenwood e Chrispeels, 1985).

1.3.3. Proteínas que se ligam ao DNA (DNA binding proteins)

Tem sido verificado que algumas proteínas nucleares que se ligam a regiões específicas da região 5' dos genes tomam parte no processo de regulação da expressão gênica. Estas proteínas foram observadas em alguns genes de eucariotos, entre eles, os das proteínas de reserva de sementes como zeínas (Maier et al., 1987), hordeínas (Kreis et al., 1986), faseolina (Guiltinan et al., 1989) e lectina da soja (Jofuku et al., 1987).

Através dos trabalhos desenvolvidos com as proteínas de reserva de milho, zeínas, foi verificado que uma proteína nuclear interage com uma sequência de DNA de 15 pb da região 5' de todos os genes das zeínas até hoje sequenciados. No entanto, não se sabe qual a real função desta proteína nos processos de regulação da expressão dos genes das zeínas (Maier et al., 1987).

Uma outra observação interessante é que a funcionalidade das proteínas nucleares aumenta e diminui durante o desenvolvimento da semente, de acordo com a taxa de transcrição dos genes das proteínas das sementes (Jofuku et al., 1987).

Existem alguns métodos usados para verificação da interação de proteínas com uma sequência de DNA, entre eles, o "DNA footprinting" (Miskimins et al., 1985) e o "gel retardation" (Singh et al., 1986).

1.4. *Coix lacryma-jobi* L.

Coix lacryma jobi L. é um cereal nativo do sudeste asiático e, apesar de ser considerado um cereal de pouca importância econômica, foi usado durante muito tempo como alimento, medicamento, ornamento e na produção de bebidas alcoólicas (Venkateswarlu e Chaganti, 1973; Arora, 1977). Este cereal, juntamente com o milho, tripsacum e sorgo, pertence à tribo Andropogoneae das Gramíneas (Clayton, 1973, 1983; Jain e Banerjee, 1974). Atualmente, o *Coix* é encontrado em todas as regiões tropicais.

As plantas do *Coix* são de hábito anual ou perene, e podem atingir 1,60 m de altura (Fig.1). Suas inflorescências são produzidas no interior de estruturas semelhantes a contas, que se desenvolvem no final de cada pedúnculo de bainha de folha. As espiguetas masculinas e femininas encontram-se em partes separadas de uma mesma inflorescência. A espiguetas feminina encontra-se no interior de um involúcro protetor, de forma circular a oval. Esse involúcro protetor pode se tornar muito duro e sua cor pode variar de verde a marrom escuro, conforme ocorre a maturação da semente. A espiguetas masculina se projeta de um orifício na parte superior do involúcro protetor (Venkateswarlu e Chaganti, 1973).

Dentre as variedades de *Coix*, a variedade Adlay tem sido a mais estudada (Fig.1). Introduzida no Brasil por volta de 1938 através de sementes trazidas das Filipinas, foi submetida a trabalhos de melhoramento genético com o objetivo de obter sementes com melhor qualidade e aumento na produção. O *Coix* tem sido usado, também, na alimentação humana e animal, em substituição ao trigo e milho (Venkateswarlu e Chaganti, 1973 ; Diaz, 1985).

Trabalhos de caracterização das proteínas do endosperma do Adlay foram recentemente realizados por Ottoboni et al. (1990 a,b) e Leite et al. (1990). Nestes trabalhos, ficou demonstrado que o Adlay contém ao redor de 20% de proteínas no seu endosperma, distribuídas entre 3 frações (Tab.1):

- fração 1 (albuminas e globulinas), extraídas em soluções contendo 0,5M NaCl, e representando aproximadamente 3% da proteína total do endosperma.

- fração 2 (prolaminas), extraídas em soluções contendo 55% isopropanol e 2% de 2-ME. Esta fração representa aproximadamente 50 a 70% da proteína do endosperma, dependendo da concentração de 2-ME usada na solução de extração.

- fração 3 (proteínas residuais), extraídas em tampão contendo 0,1M Tris-HCl pH 7,5; 7,5% 2-ME; 5% SDS. Representa aproximadamente 30% da proteína total do endosperma.

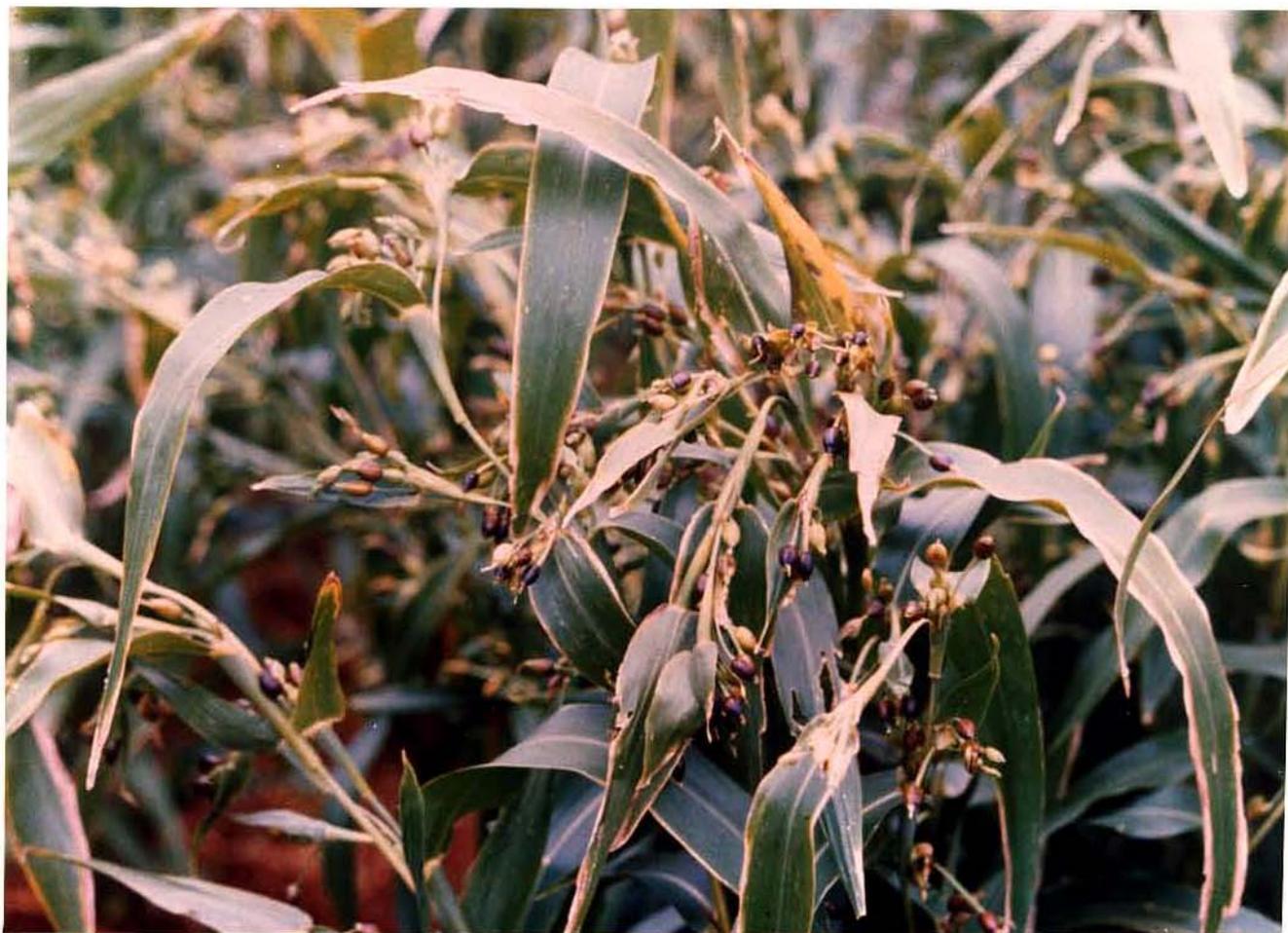


Fig.1 - Plantas de *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay cultivadas no campo experimental do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Unicamp.

Tabela 1 - Teor de proteína nas frações proteicas do endosperma do Adlay. F1 - albuminas e globulinas, extraídas em solução 0,5 M NaCl. F2 - prolaminas, extraídas em solução contendo 55% isopropanol e 20% 2-ME. F3 - proteínas residuais, extraídas em tampão de extração (5% SDS; 7,5% 2-ME; em 100 mM Tris-HCl pH7,5). Dados retirados de Ottoboni et al. (1990 a).

fração proteica	%proteína
F1	1,8
F2*	77,8
F3	20,4

* F2 extraída na presença de 20% 2-ME

A análise destas frações através de SDS-PAGE indicou que a fração 1 e fração 3 apresentam um complexo padrão de bandas, com proteínas de pesos moleculares aparentes variando de 9 a 110 KDa na fração 1, e de 15 a 110 KDa na fração 3. A fração 2, prolaminas, apresentou 5 bandas principais, com pesos moleculares aparentes de 27, 25, 22, 17 e 15 KDa, que foram chamadas de C1, C2, C3, C4 e C5, respectivamente (Fig.2).

A determinação da composição de aminoácidos nas 3 frações proteicas do endosperma do Adlay indicou que na fração 1 são encontrados principalmente ácido glutâmico, glicina e alanina (Ottoboni et al., 1990a). Esta composição de aminoácidos é similar à observada nas frações proteicas solúveis do endosperma de outros cereais. A fração 2, foi caracterizada pelo alto teor de ácido glutâmico, alanina, leucina e prolina, e pela ausência do aminoácido essencial lisina, sendo esta uma característica das prolaminas dos cereais estudados até o momento. A fração 3 apresentou uma composição de aminoácidos semelhante à observada na fração 2.

Como observado em outros cereais, as principais proteínas de reserva do endosperma do Adlay são as prolaminas, denominadas coixinas. Ottoboni et al. (1990 a) verificaram que as coixinas representam mais de 70% das proteínas do endosperma do Adlay, quando a concentração de 2-ME no solvente de extração é de 20%. Os mesmos autores verificaram que, apesar da alta concentração de 2-ME no solvente de extração, nem toda a coxina é extraída do endosperma, e a fração 3 aparece contaminada com essas proteínas.

Leite et al. (1990) determinaram que o teor de proteína em cada classe de coxina, estimado através de densitometria de géis SDS-PAGE, é de: 8% para C1, 56% para C2, 15% para C3, 17,5% para C4 e 15% para C5.

A análise das coixinas através de IEF mostrou 7 bandas principais, com valores de pI variando de 6,2 a 7,8 (Ottoboni et al., 1990 a,b). A análise individual de cada uma das bandas do gel de IEF, através de SDS-PAGE e "Western blot", indicou que as coixinas consistem de um complexo de 13 polipeptídeos diferindo em ponto isoelétrico ou peso molecular. Foram identificados 4 polipeptídeos C1, 5 C2, 1 C3, 1

Tabela 2 - Complexidade das coixinas, determinada através de IEF e SDS-PAGE. Dados adaptados de Ottoboni et al. (1990 a,b) e Leite et al.(1990)

Classe	Solubilidade	PM(KDa)	pI
α -coixina C1	40-95% IsPrOH	27	7,8
C1	"	"	6,6
C2	"	25	7,3
C2	"	"	6,9
C2	"	"	6,6
C2	"	"	6,3
C2	"	"	6,2
C4	"	17	6,3
C5	"	15	7,8
C5	"	"	7,6
γ -coixina C3	0-80% IsPrOH + 2-ME	22	?

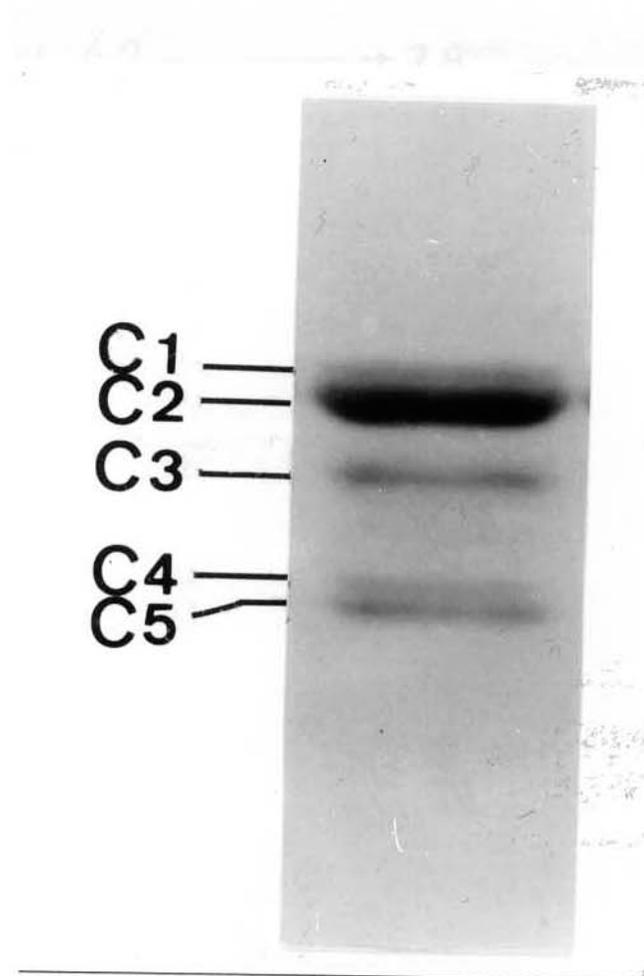


Fig.2 - SDS-PAGE das coixinas extraídas de endospermas maduros do Adlay. As coixinas foram extraídas em solução contendo 55% isopropanol e 2% 2-ME e coradas com 0,25% Comassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (5:5:1, v/v).

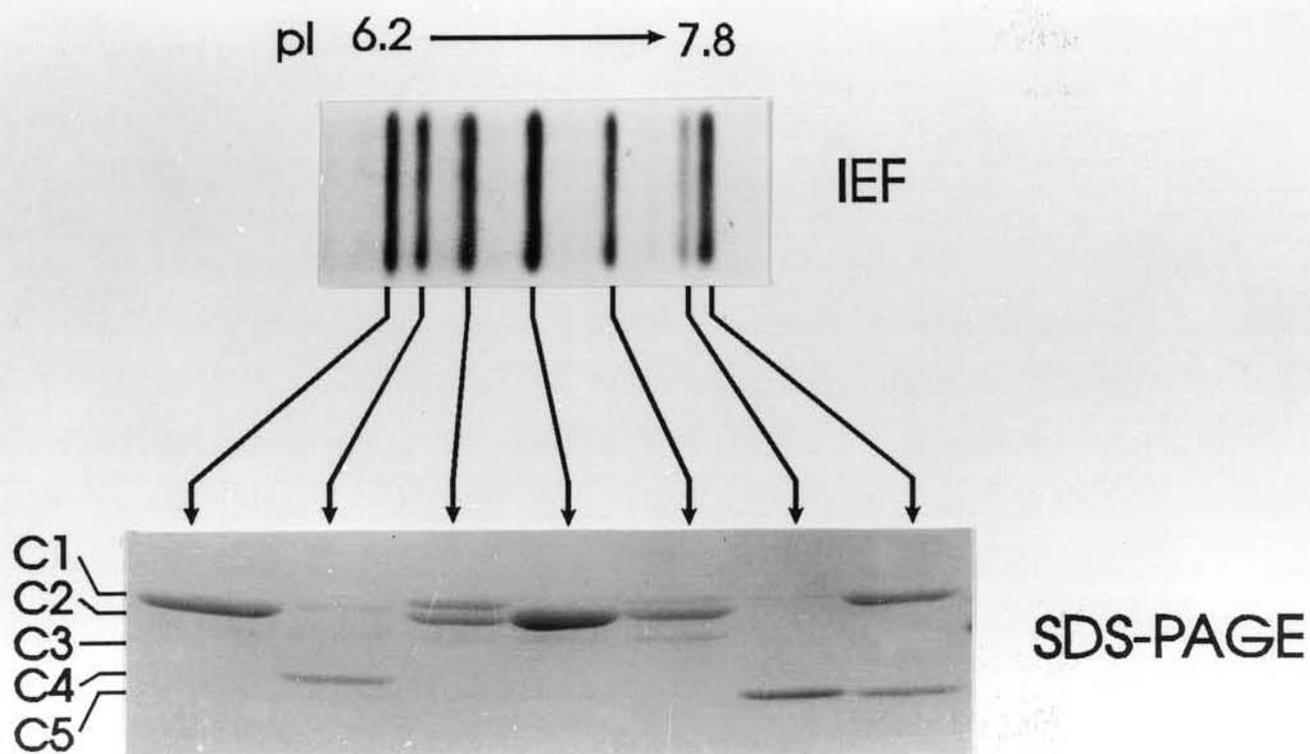


Fig.3 - Análise sequencial das coixinas extraídas de endospermas do Adlay em solução contendo 55% isopropanol e 2% 2-ME através de IEF e SDS-PAGE. As coixinas foram inicialmente submetidas a IEF e mostraram 7 bandas principais com pIs variando de 6,2 a 7,8. Essas bandas individuais foram cortadas e analisadas através de SDS-PAGE, para se obter uma resolução bi-dimensional. Esta análise demonstrou que as bandas de IEF se subdividiram em vários polipeptídeos. Dados adaptados de Ottoboni et al.(1990 a,b) e Leite et al. (1990).

C4 e 2 C5 (Fig.3). A classe de coixina C3 não representou um constituinte principal em nenhuma das 7 bandas de IEF analisadas através de SDS-PAGE. No entanto, nas análises de "Western blot", esta classe de proteína foi detectada em 5 das 7 bandas analisadas. Uma explicação para isto é que, provavelmente, ocorre interação desta proteína com o anfólito do gel.

Baseado no critério de solubilidade diferencial descrito por Esen (1986), estas prolaminas foram classificadas em α - e γ - coixinas (Leite et al., 1990). As α -coixinas (C1, C2, C4 e C5) são solúveis em soluções contendo entre 30 a 90% de etanol ou isopropanol, e correspondem a 85% da coixina total. A γ -coixina (C3) é solúvel em soluções contendo 0 a 80% de etanol ou isopropanol e mais 2% de 2-ME. Esta classe de coixina corresponde a 15% da coixina total.

Com o objetivo de investigar a homologia existente entre as prolaminas de *Coix* e milho (coixinas e zeínas, respectivamente), foram feitos estudos imunológicos usando-se anticorpos produzidos contra as 5 classes de coixinas (Leite et al., 1990). As coixinas e zeínas foram submetidas a eletroforese, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com os anticorpos produzidos contra as 5 classes de coixinas. Os resultados destes estudos indicaram que os anticorpos produzidos contra a α -coixina C1 reconheceram as α -coixinas C1 e C2, e apresentaram reação cruzada com a α -zeína de 22 KDa. Resultados similares foram obtidos com os anticorpos produzidos contra α -coixina C2. Os anticorpos produzidos contra a α -coixina C4 reconheceram C4 e todas as outras α -coixinas, e também apresentaram reação cruzada com a α - zeína de 22 KDa. Já os anticorpos produzidos contra a α -coixina C5 apresentaram resultados similares aos observados para a α -coixina C4, exceto que este anticorpo não reagiu com a classe de α -coixina C4. Os anticorpos produzidos contra a γ -coixina (C3) reconheceram C3 e apresentaram uma forte reação cruzada com a γ -zeína de 27 KDa. Além disto, foi observado nas análises de "Western blot", que tanto em *Coix* como em milho, ocorre reação com várias proteínas de peso molecular mais alto, que não haviam sido detectadas nas análises de SDS-PAGE (Leite et al., 1990).

Estes resultados indicaram a existência de uma grande homologia entre as α -coixinas e a α -zeína de 22 KDa, e também entre a γ -coixina e a γ -zeína de 27 KDa. A homologia entre as prolaminas de *Coix* e milho foi confirmada através de técnicas de "Southern blot", usando como sondas insertos correspondentes aos genes das α -zeínas de 19 e 22 KDa (Marks e Larkins, 1982) e das γ -zeínas de 28 e 16 KDa (Prat et al., 1985; Prat et al., 1987). Os resultados destas análises mostraram que ocorre um complexo padrão de hibridização do DNA genômico do *Coix* com o inserto correspondente à zeína de 22 KDa, ao passo que com o de 19 KDa, não houve hibridização. Quando o inserto de zeína de 28 KDa foi usado como sonda, foi observada hibridização em apenas uma banda. Resultados similares foram observados quando o DNA genômico do *Coix* foi hibridizado com o inserto correspondente ao gene da zeína de 16 KDa; neste caso a banda que apresentou hibridização foi a mesma que hibridizou com o inserto da zeína de 28 KDa (Leite et al., 1990). Em trabalhos realizados por Ludevid et al. (1985) ficou demonstrado, através de técnicas imunológicas e análise de sequência de DNA, que as 2 classes de γ -zeína são homólogas. Esta homologia justifica a hibridização das 2 classes de γ -zeína com a mesma sequência do DNA genômico do *Coix*.

2. OBJETIVOS

As coixinas, prolaminas do endosperma do cereal *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay, foram recentemente caracterizadas por pesquisadores do Laboratório de Genética Vegetal do CBMEG - UNICAMP (Ottoboni et al., 1990 a,b; Leite et al., 1990). No entanto, uma análise da expressão dos genes que codificam essas proteínas, e também da deposição destas nas células do endosperma durante o desenvolvimento da semente do Adlay não foram feitas. Deste modo, este trabalho teve os seguintes objetivos:

1- analisar o padrão de síntese das coixinas durante o desenvolvimento do endosperma do Adlay, através de técnicas de SDS-PAGE, "Western blot" e "Northern blot".

2- estudar a localização dos corpúsculos protéicos nas células do endosperma do Adlay através de técnicas de imunocitoquímica associadas à microscopia ótica.

3- caracterizar o padrão de deposição das coixinas nos corpúsculos proteicos do endosperma do Adlay através de técnicas de imunocitoquímica associadas à microscopia eletrônica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Para a realização deste trabalho foi utilizado o *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay. O *Coix* é uma planta monocotiledônea, pertencente à família das Gramíneas e classificada na tribo Andropogoneae, juntamente com o milho, tripsacum e sorgo.

As plantas do Adlay foram cultivadas no campo experimental do Laboratório de Genética Vegetal do CBMEG - Unicamp. Nos experimentos sobre a síntese das coixinas durante o desenvolvimento do endosperma, foram utilizadas sementes colhidas em diferentes estágios do desenvolvimento, do imaturo ao maduro. Para isto, o desenvolvimento da semente foi dividido em 5 estágios, baseado na cor do involúcro protetor e no peso fresco e seco do endosperma (Fig.5). Este critério foi adotado devido à dificuldade em se conduzir polinização controlada nesta planta. As sementes foram colhidas e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido onde ficaram armazenadas até serem utilizadas. Sementes maduras foram estocadas à temperatura ambiente, em lugar seco.

3.2. Preparação do material

3.2.1. Material de vidro e plástico

O material de vidro usado nos trabalhos de proteína e DNA foi lavado com detergente neutro, enxaguado exaustivamente com água de torneira e, em seguida, enxaguado 4 vezes com água destilada, sendo que a última enxaguada foi com água fervendo. O material foi, então, coberto com papel alumínio e esterilizado em estufa a 180°C durante 16 horas. O material de plástico foi esterilizado por autoclavagem, a 120°C e 1 Kgf/cm² durante 20 minutos.

Nos trabalhos com RNA o cuidado com o material foi maior, pois o sucesso nas preparações de RNA depende da eliminação de contaminação com ribonucleases.

A vidraria usada nas preparações foi lavada com detergente neutro, enxaguada com água de torneira e tratada com uma solução 7,5% KOH em etanol durante 5 minutos. Em seguida, a vidraria foi enxaguada e esterilizada como descrito acima. Foi usado sempre material de plástico novo esterilizado por autoclavagem durante 30 minutos.

As cubas usadas para correr os géis de RNA, as caixas das ponteiras e as pipetas automáticas foram tratadas durante 4 horas com água destilada contendo 0,1% (DEPC). Após este período o material foi exaustivamente enxaguado com água destilada tratada com DEPC autoclavada e, em seguida, seco à temperatura ambiente.

3.2.2. Cuidados com as soluções

Nos trabalhos de proteína e DNA, a água usada foi destilada, filtrada em um sistema "Milli Q" e esterilizada por autoclavagem durante 20 minutos. Nos trabalhos com RNA, a água e soluções foram tratadas com 0,1% (DEPC). A preparação foi feita da seguinte maneira: o DEPC foi colocado na água e nas soluções, os frascos foram vigorosamente agitados durante alguns minutos para que o DEPC fosse bem misturado e colocados a 37°C durante 12 horas; em seguida, a água e as soluções foram autoclavadas durante 20 minutos. Os produtos da decomposição do DEPC, CO₂ e etanol, são facilmente removidos de soluções quentes. Soluções contendo Tris-HCl não podem ser preparadas diretamente com DEPC, pois ocorre reação deste com o Tris-HCl. Estas soluções foram preparadas com a água tratada com o DEPC (autoclavada) e, em seguida, autoclavadas.

Nos trabalhos de microscopia, todas as soluções foram preparadas com água "Milli-Q" e esterilizadas por filtração em filtros millipore de 0,22 µm

3.3. Preparo das amostras

Aproximadamente 100 sementes do Adlay de cada estágio do desenvolvimento foram liofilizadas e, depois de secas, seus invólucros foram retirados. Em seguida,

os germes foram removidos e os endospermas triturados até obtenção de uma farinha fina. As farinhas assim obtidas foram colocadas em tubos Falcon de 50 ml e desengorduradas através de 2 extrações com 5 volumes de acetona, durante 10 minutos cada. Após cada extração, os tubos foram centrifugados a 1000 g, por 5 minutos a 4°C, em uma centrífuga de mesa Spin-6, Incibrás. A acetona foi removida invertendo-se os tubos, as farinhas foram colocadas em placas de Petri para secar e armazenadas em vidros bem fechados.

3.4. Extração das coixinas

As coixinas foram extraídas do endosperma do Adlay em uma solução aquosa contendo 55% de isopropanol e 2 % de 2-Mercaptoetanol (2-ME). Foram feitas 2 extrações consecutivas à temperatura ambiente, em tubos para rotor JA-21, Beckman. A primeira extração foi feita numa proporção de 4:1 (v/w) durante 16 horas e a segunda, a 3:1 (v/w) durante 2 horas. Após cada extração, foi feita uma centrifugação a 10000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes contendo as prolaminas foram combinados e o volume medido. As frações protéicas foram estocadas a -20°C até serem utilizadas.

3.5. Determinação do teor de proteína

A determinação do teor de proteína nas frações contendo as prolaminas, foi feita de acordo com modificações da metodologia descrita por Nkonge e Balance (1982). Esta determinação envolve 2 etapas:

- digestão da matéria orgânica com ácido sulfúrico;
- determinação colorimétrica da amônia liberada na digestão pela reação do salicilato e hipoclorito com a amônia.

3.5.1. Digestão da matéria orgânica

Alíquotas de 100 μ l das frações contendo as prolaminas foram colocadas em tubos de digestão calibrados para 20 ml. Em seguida, foram adicionados 1,5 ml de ácido sulfúrico concentrado e os tubos foram colocados em placas digestoras até obtenção de um extrato claro. Os tubos foram retirados da placa e, quando frios, foram colocados 100 μ l de água oxigenada. Em seguida, foram novamente colocados na placa digestora durante aproximadamente 30 minutos para total evaporação da água oxigenada. Após este tempo, os extratos foram diluídos com água destilada a um volume de 20 ml.

3.5.2. Determinação colorimétrica da amônia liberada na digestão

A curva padrão utilizada para a determinação colorimétrica foi preparada a partir de uma solução estoque contendo 100 μ g/ml de nitrogênio, da seguinte maneira: 47,16 mg de sulfato de amônio, previamente seco por 3 horas a 100°C, foram digeridos com 1,5 ml de ácido sulfúrico e, em seguida, diluídos com água destilada a 100 ml. As soluções de trabalho, contendo 2, 4, 6, 8 e 10 μ g N/ml, foram preparadas diluindo-se a solução estoque com o branco (solução 7,5% de ácido sulfúrico).

Para a determinação do teor de nitrogênio nas amostras, 0,5 ml dos extratos obtidos como descrito em 3.5.1. foram colocados em tubos de ensaio contendo 1,5 ml de um tampão composto de uma mistura 1:1 da solução A (0,2 M Na_2HPO_4 ; 0,2 M NaOH; 0,36 M $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) e da solução B (2,5 M NaOH). Foram adicionados 0,4 ml da solução C (0,12 M salicilato de sódio; 0,1 M nitroprussiato de sódio), as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 25 °C por 5 minutos para equilibrar a temperatura. Em seguida, foram adicionados 0,2 ml de 5,0% hipoclorito de sódio e as amostras foram incubadas a 25 °C durante 30 minutos. Após este período, foram adicionados 10 ml de água destilada, e foi feita a leitura da absorbância a 660 nm em um espectrofotômetro Varian, UV 6345. O mesmo

procedimento foi feito com as soluções padrão de nitrogênio. O teor de proteína foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator 6,25.

3.6. Análise das coxinas através de gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

As coxinas extraídas como descrito em 3.4 foram analisadas através de géis de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), gradiente 5-20%, de acordo com modificações da metodologia descrita por Laemmli (1970). Os géis foram preparados em placas de vidro de 15x16 cm, separadas por espessadores de acrílico de 1,5 mm de espessura. Para a corrida foram utilizadas cubas verticais de tamanho padrão.

3.6.1. Soluções estoque

As soluções estoque utilizadas na preparação dos géis foram as seguintes:

- Solução de acrilamida-bisacrilamida 30:0,8 - 30g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida em 100 ml de água destilada. Esta solução foi filtrada em papel Whatman nº1 e mantida em frasco escuro a 4°C.
- Tampão de resolução do gel: 3M Tris-HCl pH 8,8.
- Tampão de empacotamento do gel: 0,5M Tris-HCl pH 6,8.
- Solução de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS).
- Solução de persulfato de amônia a 1,5%.
- TEMED

3.6.2. Preparação dos géis

Para a preparação dos géis de resolução, foram colocados em 2 provetas de 10 ml os seguintes volumes das soluções estoque:

soluções	5%	20%
	(ml)	(ml)
acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)	1,66	6,66
tampão de resolução	1,25	1,25
SDS 10%	0,09	0,09
persulfato de amônia 1,5%	0,23	0,23
glicerol	-	1,00
TEMED	0,003	0,003
H ₂ O qsp	10,00	10,00

Os géis de resolução foram preparados com o auxílio de um formador de gradiente e de uma bomba peristáltica Incibrás modelo BP 100. Após a polimerização do gel de resolução, foi colocado o pente e, em seguida, com o auxílio de uma pipeta, o gel de empacotamento.

A composição do gel de empacotamento foi a seguinte:

soluções	(ml)
acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)	2,50
tampão de empacotamento	5,00
SDS 10%	0,20
persulfato de amônia 1,5%	1,00
TEMED	0,015
H ₂ O	11,30

Após a polimerização, os géis foram colocados a 4°C até serem usados.

3.6.3. Preparo das amostras

Alíquotas das frações protéicas foram colocadas em tubos eppendorf e, em seguida, foi adicionado o tampão da amostra 3x concentrado. O tampão da amostra

era composto de: 0,15M Tris-HCl pH 6,8; 5% 2-ME; 2% SDS; 0,1% azul de bromofenol; 45% glicerol. Antes de serem aplicadas nos géis, as amostras foram colocadas em banho-maria fervente durante 5 minutos.

Os marcadores de peso molecular utilizados nos géis e foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (Pharmacia). Os padrões usados foram os seguintes:

94,0 KDa - fosforilase b de músculo de coelho

67,0 KDa - soroalbumina bovina

43,0 KDa - ovoalbumina

30,0 KDa - anidrase carbônica de eritrócitos bovinos

20,1 KDa - inibidor de tripsina de soja

14,4 KDa - α -lactalbumina de leite bovino

Os padrões também foram colocados em banho-maria fervente durante 5 minutos antes de serem aplicados nos géis.

3.6.4. Eletroforese

Os géis foram montados na cuba e o tampão de corrida foi colocado nos reservatórios. O tampão de corrida consistia de: 25 mM Tris-HCl; 0,192 M glicina pH 8,3; 0,1% SDS. Após a aplicação das amostras nos géis, a corrida eletroforética foi feita à temperatura ambiente, a 100 volts, até que a frente de azul de bromofenol atingisse o fim do gel.

Após o processo de eletroforese, os géis foram corados em uma solução contendo 0,25% Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol: água: ácido acético (5:5:1, v/v), e descorados em metanol: água: ácido acético (3:6:1, v/v). Os géis foram mantidos em uma solução 2,5% ácido acético.

3.7. Western blot

Após a eletroforese, os géis foram incubados 2 vezes durante 40 minutos, à temperatura ambiente, em um tampão de transferência, composto de: 48 mM Tris-HCl; 39 mM glicina; 0,04% (w/v) SDS; 20% (v/v) metanol. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond C extra, Amersham), de acordo com as especificações da LKB (LKB - Produkter, Bromma, Sweden). A transferência foi feita no aparelho Multiphor II Novablot (LKB), formado por duas placas de grafite conectadas a uma fonte de voltagem através de eletrodos. Para a transferência, foram colocados na placa de grafite conectada ao eletrodo positivo: nove folhas de papel de filtro cortadas do tamanho exato do gel e umedecidas no tampão de transferência, a membrana de nitrocelulose também umedecida no tampão, o gel, e mais nove folhas de papel de filtro umedecidas. Por cima desta montagem, foi colocada a placa de grafite conectada ao eletrodo negativo, e a transferência das proteínas para as membranas foi feita a $0,8 \text{ mA/cm}^2$ durante 2 horas.

Após a transferência, as membranas foram incubadas durante 1 hora a 37°C , com agitação, no tampão TBS (20 mM Tris-HCl; 137 mM NaCl, pH7,6) contendo 5% de leite desengordurado Molico; 0,1% Tween 20. As membranas foram, em seguida, incubadas durante 16 horas a 37°C , com agitação, em tampão TBS contendo 5% de leite Molico e os anticorpos na diluição adequada (Leite et al., 1990; Ottoboni et al., 1990a). Após este período, as membranas foram lavadas 2 vezes rapidamente e 3 vezes 5 minutos, à temperatura ambiente, com o tampão TBS contendo 0,1% Tween 20 (TBS-T). Depois de lavadas, as membranas foram incubadas durante 1 hora a 37°C , com agitação, com o complexo proteína A-peroxidase diluído 1:5000 em tampão TBS. Foram, então, novamente lavadas como descrito acima e incubadas em uma solução de revelação contendo 100 ml de 50 mM tampão acetato pH 4,5; 50 mg de 3-amino-9-etilcarbazole; 3 ml de N,N-dimetilformamida; $100 \mu\text{l}$ de H_2O_2 . Para preparar esta solução, os 50 mg de 3-amino-9-etilcarbazole devem ser dissolvidos nos 3 ml de N,N-dimetilformamida e, depois de dissolvidos, é que o

tampão acetato e a H_2O_2 são adicionados. Quando a coloração desejada foi obtida, as membranas foram colocadas em água destilada a fim de parar a reação e depois secas à temperatura ambiente.

3.8. Isolamento dos corpúsculos protéicos

O isolamento dos corpúsculos protéicos foi feito de acordo com pequenas modificações da metodologia descrita por Larkins e Hurkmam (1978). Aproximadamente 1 grama de endosperma do Adlay colhido nos diferentes estágios do desenvolvimento foi triturado em nitrogênio líquido até obtenção de uma farinha fina. Esta farinha foi transferida para tubos Falcon de 15 ml e foram adicionados 8 volumes de tampão A (0,2 M Tris-HCl pH 8,5; 60 mM KCl; 50 mM $MgCl_2$; 0,2 M sacarose). A suspensão foi bem homogeneizada e centrifugada a 500 g durante 10 minutos, a 4°C, em uma centrífuga de mesa Spin-6, Incibrás. Alíquotas de 3 ml do sobrenadante 500 g foram colocadas no topo de um gradiente descontínuo de sacarose, formado por 2 ml de solução 2 M sacarose; 3,5 ml de solução 1,5 M sacarose e 3,5 ml de solução 0,5 M sacarose, preparadas em tampão B (40 mM Tris-HCl pH 8,5; 20 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$). Os gradientes foram preparados em tubos para rotor SW-41, Beckman. O material foi centrifugado durante 2 horas a 77000 g, a 4°C, em uma ultracentrífuga Beckman. Após a centrifugação, a porção superior dos gradientes foi retirada com uma pipeta automática, e a fração contendo os corpúsculos protéicos, localizada entre 1,5 e 2,0 M sacarose, foi retirada e diluída 5 vezes com o tampão A sem sacarose. Os corpúsculos protéicos foram, então, sedimentados a 55000 g durante 1 hora, a 4°C, em tubos para rotor SW-41, Beckman. Em seguida, foram suspensos em 2 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA) e armazenados a -20°C. Para as análises de SDS-PAGE, alíquotas dos corpúsculos proteicos foram liofilizadas e suspensas em solução contendo 55% isopropanol e 2% 2-ME.

3.9. Isolamento do RNA total de endosperma

O RNA total foi isolado do endosperma do Adlay dos 5 estágios de desenvolvimento, de acordo com modificações da metodologia descrita por Naito et al. (1988). Aproximadamente 1 grama dos endospermas foi triturado em nitrogênio líquido até a obtenção de uma farinha bem fina. Esta farinha fina foi homogeneizada em 10 volumes de tampão de extração contendo 1 volume de 0,1 M Tris-HCl pH9,0; 1% SDS e 1 volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v). As emulsões foram transferidas para tubos eppendorf e as fases aquosas foram extraídas 2 vezes com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v). Os ácidos nucleicos foram precipitados durante 6 horas a -20°C com 0,1 volumes de 3 M acetato de sódio pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol gelado. Após centrifugação durante 30 minutos, os peletes foram lavados com 70% etanol e liofilizados. Os ácidos nucleicos foram dissolvidos em água e o RNA total do endosperma do Adlay nos diferentes estágios do desenvolvimento foi precipitado com 2M LiCl, a 4°C , durante 16 horas. O RNA foi coletado através de centrifugação por 30 minutos a 4°C , lavado 1 vez com 2 M LiCl gelado e 1 vez com 70% etanol. Em seguida, o RNA de cada estágio foi suspenso em 120 μl de água tratada com 0,1% DEPC. A determinação da concentração de RNA total no endosperma em cada estágio de desenvolvimento foi determinada pela leitura da absorbância a 260 nm em um espectrofotômetro Varian, UV 6345, como indicado por Maniatis et al. (1982).

3.10. Extração do RNA polissomal

O RNA polissomal foi extraído dos corpúsculos protéicos isolados como descrito em 3.8, de acordo com a metodologia descrita por Mechler, B.M. (1987). Os corpúsculos protéicos suspensos em 2 ml de TE foram transferidos para tubos Falcon de 15 ml e foi adicionado a cada tubo 1 volume do tampão de extração quente (1% SDS; 200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,4; 40 mM EDTA). As suspensões foram bem homogeneizadas e os tubos colocados em banho-maria fervente durante

2 minutos. Após este tempo, foram colocados no gelo até atingir uma temperatura de aproximadamente 30°C. A concentração de Tris-HCl foi ajustada a 0,1 M, usando uma solução 1 M Tris-HCl pH 9,0, e a concentração de SDS foi ajustada a 1 % com uma solução 10% SDS. Em seguida, foram feitas 3 extrações com 1 volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v). Após cada extração a fase aquosa foi separada por centrifugação a 2500 rpm, a 4°C, por 10 minutos, em centrífuga de mesa Spin-6, Incibrás. O RNA de cada estágio foi precipitado em tubos Corex com 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M pH 5,2, e 2,5 volumes de etanol, a -20°C, durante 16 horas. O RNA foi sedimentado através de centrifugação a 7000 rpm por 45 minutos, a 4°C, em rotor JA-20, em uma centrífuga refrigerada Beckman. O precipitado foi lavado com 70% etanol e centrifugado a 7000 rpm, por 30 minutos a 4°C. O RNA de cada estágio foi liofilizado e suspenso em 150 µl de água tratada com 0,1 % (DEPC). A concentração de RNA em cada estágio foi determinada como descrito em 3.9.

3.11. Tradução "in vitro"

O RNA polissomal isolado como descrito em 3.10 foi usado no experimento de síntese "in vitro". A tradução foi feita usando-se o kit "Wheat germ cell-free system" (Amersham), de acordo com as instruções do fabricante e usando-se [³⁵S]-metionina (Amersham) como precursor. Inicialmente procedeu-se à determinação da concentração ótima de K⁺, que foi de 150mM e, em seguida foi feita a reação que consistia de:

Soluções	volume (µl)
- 1M acetato de sódio	4
- 1mM mistura de aminoácidos (-metionina)	2
- mRNA (0,2 µg)	1
- metionina	5
- extrato de germe de trigo	15
- água	3

A reação foi incubada a 25°C durante 1 hora. Uma alíquota de 10 μ l da reação de tradução foi retirada e colocada em eppendorf contendo 40 μ l de água destilada e 12 μ l de TCA 100% (a concentração final de TCA foi de 20%). O eppendorf foi colocado durante 20 minutos no gelo e, em seguida, os produtos da tradução foram coletados através de centrifugação por 10 minutos, à temperatura ambiente. O pelete foi lavado com 200 μ l de acetona gelada. Após centrifugação, o pelete foi liofilizado e suspenso em 20 μ l de tampão de amostra preparado como descrito em 3.6.3.

A amostra foi submetida a eletroforese em gel 12,5% de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). Após a eletroforese o gel foi corado e descorado (3.6.4). Em seguida, o gel foi colocado durante 20 minutos em Amplify TM (Amersham) e seco a vácuo. As posições dos marcadores de peso molecular foram anotadas com tinta contendo material radioativo, e o gel foi, então, exposto a filme de raio-X durante 2 dias a -70°C.

3.12. Northern blot

A análise de "Northern blot" refere-se ao RNA fracionado em gel, transferido para um suporte sólido e hibridizado com um ácido nucleico marcado radioativamente. Assim, o mRNA polissomal de cada estágio, preparado como descrito em 3.10., foi submetido a eletroforese em gel denaturante e subsequentemente transferido para membranas de nylon (Hybond N, Amersham) para posterior hibridização (Maniatis et al., 1982). Géis denaturantes são usualmente usados devido à estrutura secundária observada nos mRNAs.

3.12.1. Preparo do gel

O gel foi preparado em placa de vidro de 12x15 cm. Para cada gel foram colocados em erlenmeyer de 500 ml:

- 1,5 g de agarose
- 15 ml de 10x MOPS (0,2 M MOPS [ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfônico]; 50 mM acetato de sódio; 10 mM EDTA; pH 7,0)
- 130,5 ml de água destilada.

A agarose foi dissolvida e resfriada a 50°C. Em uma capela, foram adicionados 7,7 ml de formaldeído 37% à solução de agarose e, em seguida, a solução foi bem homogeneizada. O gel foi colocado na placa de vidro (aproximadamente 0,5 cm de altura), coberto com papel alumínio para ser protegido da luz, e ficou descansando durante pelo menos 1 hora antes de ser usado.

3.12.2. Preparo das amostras

As amostras de RNA polissomal de cada estágio, num volume de 38 μ l, foram liofilizadas e suspensas em 5 μ l de água destilada. Este volume de 38 μ l correspondia a 20 μ g de RNA no estágio 3. Depois de suspensas, foram adicionados 25 μ l de tampão de amostra (750 μ l de formamida deionizada, 150 μ l de 10x MOPS, 240 μ l de formaldeído 37%, 100 μ l de água, 100 μ l de glicerol, 80 μ l de azul de bromofenol 10%) e as amostras foram colocadas em banho-maria a 65°C durante 15 minutos. Após este período, foram colocadas no gelo e, em cada amostra, foi adicionado 1 μ l de brometo de etídeo 10 mg/ml. As amostras foram bem homogeneizadas e aplicadas no gel.

3.12.3. Eletroforese

O gel foi colocado na cuba previamente tratada com DEPC e o tampão de corrida 1xMOPS foi colocado numa quantidade suficiente para cobri-lo. Imediatamente antes de serem aplicadas as amostras, os pocinhos foram lavados com o tampão de corrida, com o auxílio de uma pipeta automática. A eletroforese foi feita a 60 volts, durante 6 horas, em uma sala escura. A frente de azul de bromofenol migrou

aproximadamente 6 cm e, após a corrida, o RNA foi transferido para membrana de nylon.

3.12.4. Transferência do RNA polissomal para membrana de nylon

A transferência do RNA para membrana de nylon foi feita de acordo com as especificações da Amersham e da metodologia descrita por Maniatis et al. (1982). O gel foi inicialmente colocado em água 2 vezes por 5 minutos e, em seguida, incubado em 10x SSC 2 vezes durante 20 minutos cada, com agitação ocasional. Durante a incubação do gel, a membrana de nylon foi pré-umidecida em água por 5 minutos e em 10x SSC também por 5 minutos. Para a transferência, foi colocada na cuba de eletroforese uma tira de papel Whatman 3 MM da largura do gel e comprida o suficiente para alcançar os reservatórios. O gel foi colocado em cima desta tira e foram colocadas tiras de filme de raio-X usadas nas suas laterais, de aproximadamente 0,5 cm de largura. Por cima foi colocada a membrana de nylon Hybond N cortada do tamanho exato do gel e 3 pedaços de papel Whatman 3 MM umidecidos no tampão de transferência. Em cima, foi colocada uma camada de papel de germinação numa altura de 4 cm, uma placa de vidro e um peso de 500 gramas. A transferência foi feita por capilaridade, usando o tampão 10x SSC, durante aproximadamente 16 horas. Após este período, a membrana foi seca à temperatura ambiente e o RNA foi fixado durante 2 horas a 80°C.

3.13. Minipreparação de DNA dos clones pBCx 25.10 e pBCx 22.3

Os clones de cDNA de α - e γ -coixinas (pBCx27.10 e pBCx22.3, respectivamente) usados neste trabalho foram preparados no Laboratório de Genética Vegetal do CBMEG - Unicamp (Leite et al., resultados não publicados).

Para a extração do DNA foram feitas minipreparações, de acordo com modificações da metodologia descrita por Maniatis et al. (1982). Os clones foram retirados de culturas permanentes, inoculados em placas de meio LB contendo

ampicilina e incubados a 37°C durante a noite. A composição do meio LB, por litro, é: 10 g NaCl; 10 g Bacto triptona; 5 g de extrato de levedura, pH 7,4. Para as minipreparações, 1 colônia isolada foi inoculada em 5 ml de meio LB contendo ampicilina e incubada durante a noite a 37°C, com agitação. Em seguida, foram colocados em eppendorfs 1,5 ml da cultura e estes foram centrifugados durante 2 minutos em uma microcentrífuga. Os sobrenadantes foram descartados, os pellets suspensos em 200 μ l de solução I contendo 4 mg/ml de lisozima (50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA) e os eppendorfs foram incubados por 5 minutos no gelo. Foram, em seguida, adicionados 400 μ l de solução II recém preparada (0,2 M NaOH; 1% SDS), o conteúdo dos eppendorfs foi homogeneizado por inversão e estes foram incubados no gelo por exatamente 5 minutos. Foram adicionados 300 μ l de solução III (7,5 M AcCOONH₄ pH 7,8), novamente o conteúdo dos eppendorfs foi bem homogeneizado e estes foram incubados no gelo por 10 minutos. Em seguida, foram centrifugados durante 5 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram transferidos para novos eppendorfs, foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol e os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o DNA foi coletado por centrifugação durante 10 minutos e lavado com 70% etanol. O DNA foi liofilizado e suspenso em 50 μ l de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) contendo 10 μ g RNase/ml. Alíquotas de 5 μ l de DNA foram digeridas com as enzimas apropriadas durante 1 hora e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% para verificar o estado do DNA.

3.14. Isolamento dos insertos.

Para o isolamento dos insertos correspondentes aos genes das α - e γ -coixinas, o DNA dos clones pBCx 27.10 e pBCx 22.3 foi digerido com as enzimas EcoRI e XhoI, em reações contendo: 50 μ l do DNA, 7 μ l de tampão da enzima, 7 μ l de água destilada, 3 μ l de EcoRI e 3 μ l de XhoI. As reações foram incubadas em banho-maria a 37°C durante 2 horas. Após a digestão, o DNA dos clones foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% preparado em tampão TAE (0,04 M Tris-acetato;

0,001 M EDTA) contendo 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídeo. Os insertos foram retirados dos géis em papel DE-81 (Whatman), de acordo com modificações da metodologia descrita por Dretzen et al. (1981) e Danner, D.B. (1982). Para a retirada dos insertos foi feito um corte no gel, abaixo das bandas correspondentes aos genes das coixinas, e o papel DE-81 foi colocado com o auxílio de uma pinça estéril. A eletroforese foi monitorada com luz UV e interrompida quando todo o DNA entrou no papel. Em seguida, o papel DE-81 foi retirado e colocado em uma ponteira de P 1000 tendo na ponta lâ de vidro siliconizada. Esta ponteira foi encaixada na tampa cortada de um eppendorf e toda a montagem foi colocada em tubo Falcon de 15 ml. Foram colocados na ponteira 600 μl de tampão de eluição (20 mM Tris-HCl pH8,0; 2mM EDTA; 1,5 M NaCl) e o DNA foi eluído do papel DE-81 durante 1 hora a 37°C. Ao final deste tempo, a montagem foi centrifugada a 2000 rpm em uma centrífuga de mesa (Fanen, Excelsa Baby) durante 1 minuto. O papel DE-81 foi lavado uma vez com 200 μl do tampão de eluição e centrifugado como descrito acima. O DNA eluído foi transferido para outro eppendorf e extraído 3 vezes consecutivas com um volume de: butanol-1 equilibrado com água destilada, butanol-1, e novamente com butanol-1 equilibrado. A separação das fases foi feita através de centrifugação em microcentrífuga durante 2 minutos. Em seguida, o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol durante 16 horas a -20°C. O DNA foi sedimentado através de centrifugação durante 30 minutos a 4°C em uma microcentrífuga, lavado com 70% etanol e suspenso em um volume adequado de água. A pureza do DNA dos insertos foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%/TAE.

3.15. Marcação dos insertos

A marcação dos insertos correspondentes aos genes das coixinas foi feita de acordo com as instruções do "kit Multiprime DNA labelling system", da Amersham. Inicialmente, o DNA dos insertos foi denaturado em um banho fervente por 5 minutos e colocado no gelo. A reação de marcação foi feita em eppendorfs, e consistia de:

- dATP	4 μ l
- dGTP	4 μ l
- dTTP	4 μ l
- reaction buffer	5 μ l
- primer	5 μ l
- α - ³² P dCTP	7 μ l (70 μ Ci)
- Klenow	2 μ l
- DNA	19 μ l (0,1 μ g)

A reação foi incubada à temperatura ambiente por 4 horas e, ao final deste tempo, foram colocados 4 μ l de 0,5 M EDTA, a fim de parar a reação. O volume da reação foi completado para 100 μ l com o tampão STE (10 mM Tris-HCl pH8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA).

O DNA marcado foi separado dos nucleotídeos não incorporados através de cromatografia em colunas de Sephadex G-50, como descrito por Maniatis et al. (1982). As colunas foram preparadas em seringas descartáveis de 1 ml com as pontas fechadas com lã de vidro siliconizada. O volume das seringas foi preenchido com Sephadex G-50 equilibrado em STE, as seringas foram colocadas em tubos Falcon de 15 ml e centrifugadas durante 2 minutos a 4000 rpm em uma centrífuga de mesa Fanen, Excelsa Baby. Este processo foi repetido até o volume da coluna atingir 0,9 ml. Em seguida, a coluna foi lavada com 100 μ l de STE por 2 vezes e, após cada lavagem, foi centrifugada como descrito acima. As amostras de DNA, num volume de 100 μ l, foram aplicadas nas colunas, centrifugadas como descrito acima, e recuperadas em eppendorfs colocados no fundo dos tubos. Alíquotas de 1 μ l foram retiradas das amostras antes e depois da cromatografia, e aplicadas em papel DE-81 para contagem da radioatividade em um contador de cintilações (LKB). Deste modo, a porcentagem de incorporação foi determinada.

3.16. Hibridização dos filtros na presença de formamida

A hibridização foi feita de acordo com as especificações da Amersham para membranas de nylon (Hybond-N) e com a metodologia descrita por Maniatis et al. (1982). A pré-hibridização foi feita durante 4 horas a 42°C, com agitação, na seguinte solução: 6xSSC (1x SSC contém 0,15 M NaCl; 0,015 M citrato de sódio); 0,05x Blotto (Johnson et al., 1984); 0,2% SDS; 50% formamida deionizada; 100 µg/ml de DNA de esperma de salmon denaturado (preparado como descrito em Maniatis et al., 1982). O DNA de esperma de salmon foi denaturado durante 5 minutos a 100°C e, em seguida, foi imediatamente colocado no gelo até ser adicionado à solução. A solução foi filtrada em papel Whatman 1MM e colocada em recipientes plásticos com tampa, num volume de 0,08 ml/cm² de filtro.

Após as 4 horas, a solução de pré-hibridização foi descartada e os filtros foram colocados na solução de hibridização. A solução de hibridização possuía a mesma composição da solução de pré-hibridização e mais 5% sulfato de dextran e a sonda denaturada, a uma atividade específica de 10⁶ a 10⁸ cpm. A sonda foi denaturada como descrito para o DNA de esperma de salmon. A hibridização foi feita durante 16 horas a 42°C, com agitação.

A formamida usada nas soluções foi deionizada durante 2 horas, com agitação, em 5% de resina AG 501-X8 (Bio-Rad). Após a deionização, a formamida foi filtrada em papel 1MM e estocada a -20°C, em frasco escuro.

Após a hibridização, os filtros foram lavados uma vez rapidamente e uma vez durante 20 minutos, à temperatura ambiente, em uma solução contendo 1xSSC; 0,1% SDS, e 2 vezes por 30 minutos, a 60°C, em solução contendo 0,1xSSC; 0,1% SDS. Os filtros foram, então, colocados em Magipack, selados e expostos ao Hyperfilm M-AP (Amersham), a -70°C durante algumas horas.

3.17. Microscopia

Os trabalhos de microscopia foram realizados no Conselho Superior de Investigações Científicas e no Serviço de Microscopia Eletrônica da Universidade de Barcelona - Espanha, sob orientação do Dr. Pedro Puigdomenech e da Dra. Dolores Ludevid.

Os trabalhos de imunocitoquímica foram feitos inicialmente a nível de microscopia ótica em endosperma, embrião, escutelo coleóptile e raiz do *Coix*. Em seguida, foram feitos os estudos sobre a localização das coxinas através de técnicas de imunocitoquímica associadas à microscopia eletrônica.

Nestes trabalhos foram usados endosperma, embrião e escutelo de sementes de *Coix* do estágio 3 do desenvolvimento, e também raiz e coleóptile de aproximadamente 7 dias após a germinação da semente do *Coix*. Os corpúsculos protéicos usados nos trabalhos de imunocitoquímica associada à microscopia eletrônica foram obtidos como descrito em 3.8.

3.17.1. Fixação dos tecidos e dos corpúsculos protéicos

Secções de aproximadamente 1 mm³ dos tecidos foram longitudinalmente cortadas sobre placas de vidro contendo algumas gotas de fixador recém-preparado. A composição do fixador foi: 0,3% (w/v) paraformaldeído; 0,3% (v/v) glutaraldeído em PBS contendo 2,5% (w/v) sacarose (PBS-S). O tampão PBS é composto de: 4 mM KH₂PO₄; 26 mM NaOH; 130 mM NaCl, pH 7,5. Para a preparação do fixador, 400 mg de paraformaldeído foram colocados em 10 ml de PBS-S e aquecidos a 60°C, com agitação e protegidos da luz; depois de dissolvido e frio, foram adicionados 120 µl de glutaraldeído 25%. Depois de serem cortadas, as secções foram imediatamente colocadas em eppendorfs contendo 100 µl do fixador, e a fixação foi feita durante 1:30 h à temperatura ambiente.

Alíquotas da fração contendo os corpúsculos protéicos foram colocadas em eppendorfs e centrifugadas para se obter pellets de aproximadamente 1 mm³. Os

pellets foram lavados com 100 μ l de PBS-S durante 5 minutos e fixados em 100 μ l de 0,5% (v/v) glutaraldeído em PBS-S durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Após a fixação, as preparações dos tecidos e corpúsculos proteicos foram neutralizadas com 300 μ l de 0,2 M NH_4Cl em PBS, por 2 vezes durante 10 minutos e lavadas com 300 μ l de PBS por 3 vezes durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as preparações foram desidratadas através de tratamento com soluções de etanol, a 4°C, do seguinte modo:

30% etanol por 60 minutos

50% etanol por 30 minutos

80% etanol por 10 minuto

100% etanol por 16 horas

100% etanol por 2 horas imediatamente antes da inclusão.

3.17.2. Inclusão dos tecidos e dos corpúsculos protéicos

Após a desidratação, os tecidos e os corpúsculos protéicos foram incluídos em 100 μ l da resina LR White, da seguinte maneira:

LR White	etanol	temperatura(°C)	tempo(h)
1	3	4	2:30
2	2	4	2:30
3	1	4	2:30
4	0	4	12:00

Após a inclusão, os tecidos foram transferidos para cápsulas de gelatina (Gelatine Kapseln Grobe 0,68 ml für die Elektronenmikroskopie) com o auxílio de um palito. Os corpúsculos protéicos foram transferidos com o auxílio de uma pipeta automática. O volume foi preenchido com a resina LR White e, em seguida, as cápsulas foram fechadas com as tampas apropriadas e colocadas a 60°C durante

24 horas para polimerização da resina. Após as 24 horas as amostras incluídas foram removidas das cápsulas.

3.17.3. Tratamento das lâminas com poly-D-Lysine

Este tratamento foi feito para que os cortes permanecessem fixos nas lâminas após os vários tratamentos. As lâminas foram lavadas com detergente, enxaguadas exaustivamente em água e passadas em água destilada e álcool. Após secagem à temperatura ambiente, foram passadas uma a uma em solução contendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de poli-D lysine hydrobromide (Sigma P 1149), em 10 mM Tris-HCl pH 8,0. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e guardadas em caixas apropriadas até serem utilizadas.

3.17.4. Obtenção de cortes

Os blocos contendo os tecidos e os corpúsculos protéicos foram inicialmente piramidados em um piramitômetro Reichert TM 60 (Vienna, Austria) e, em seguida, foram feitos cortes semi-finos de 0,5 a 1,0 μm de espessura no ultra-micrótomo Reichert UM 2 (Vienna, Austria). Estes cortes foram depositados em lâminas tratadas como descrito em 3.17.3., contrastados durante 2 minutos em azul de metileno [0,5% w/v) azul de metileno; 0,5% (w/v) borax tetraborato de sódio cristalizado], e observados ao microscópio ótico para verificar o estado do material. Após a verificação, foram feitos os cortes para serem usados nos estudos de imunocitoquímica associados à microscopia ótica e eletrônica.

3.17.5. Imunocitoquímica - microscopia ótica

Secções semi-finas dos tecidos (0,5-1,0 μm) foram obtidas como descrito em 3.17.4. e depositadas em lâminas tratadas com poli- D- lysine hydrobromide. As lâminas foram secas à temperatura ambiente. As secções foram incubadas por 10

minutos à temperatura ambiente em PBS contendo 10% (v/v) metanol e 3% (v/v) H₂O₂, lavadas 2 vezes à temperatura ambiente com PBS e uma vez por 10 minutos em PBS contendo 0,1% Tween-20 (PBS-T). O PBS-T foi removido e as secções foram saturadas com solução I (PBS-T; 0,1% soro albumina bovina) durante 2 horas à temperatura ambiente. Após a saturação, as secções foram incubadas durante 16 horas a 4°C com os anticorpos produzidos contra α -coixina de 25 KDa (C2) e contra γ -coixina de 22 KDa (C3) (Ottoboni et al., 1990a) diluídos 1:100 em solução I. Como controle foi usado o soro não imune, também diluído 1:100 em solução I. Todas as incubações foram feitas em placas de Petri de 13 cm cobertas com papel de filtro umedecido em água para evitar a evaporação. Em seguida, as lâminas foram colocadas em recipientes próprios e lavadas 3 vezes por 10 minutos com PBS. As secções foram, então, incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com o complexo proteína A-ouro de 10 nm de diâmetro (Sigma chemical), diluído 1:30 em solução I. As lâminas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS, 3 vezes por 5 minutos em água destilada e então secas com papel de filtro. As secções foram, em seguida, tratadas com uma gota de "Silver enhancement mixture" - IntenSE M (Jansen Life Sciences Products, Olen, Belgium) durante aproximadamente 7 minutos, de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram acompanhadas em microscópio ótico e quando a coloração desejada foi atingida, as lâminas foram colocadas em recipientes próprios contendo água destilada, a fim de parar a reação. As lâminas foram secas com papel de filtro e as secções foram cobertas com lamínulas. Para isto, foi colocada uma gota de Histovitrex (Carlo Erba) sobre as secções e por cima foram colocadas as lamínulas, tomando-se o cuidado de não deixar bolhas. As secções foram, em seguida, observadas ao microscópio ótico Zeiss (West Germany).

3.17.6. Imunocitoquímica - microscopia eletrônica

Secções finas (70-80 nm) dos corpúsculos protéicos incluídos em LR White foram obtidas em um ultramicrotomo Reichert UM 2 (Vienna, Austria), coletadas em meio

aquoso e depositadas em grades de cobre. Todas as lavagens e incubações foram feitas em gotas de 100 μ l das soluções. Essas gotas foram pipetadas sobre tiras de Parafilme que haviam sido previamente colocadas em placas de Petri de 13 cm de diâmetro. Ao lado das tiras de parafilme, foram colocados lenços de papel dobrados e umedecidos em água para evitar a evaporação. As grades, sempre com as secções para cima, foram lavadas 2 vezes por 5 minutos em PBS e as secções foram saturadas 2 horas à temperatura ambiente com a solução I. As secções foram, então, incubadas durante 16 horas, a 4°C, com os anticorpos produzidos contra as α - e γ -coixinas, diluídos 1:200 em solução I. O soro não imune na mesma diluição foi usado como controle. Após a incubação com os anticorpos, as grades foram lavadas 3 vezes durante 10 minutos com PBS, e as secções foram incubadas com o complexo proteína A-ouro de 20 nm de diâmetro (Sigma chemicals), diluído 1:30 em solução I, durante 1 hora à temperatura ambiente. As grades foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS-T contendo 0,5 M NaCl; 3 vezes por 5 minutos com PBS e depois, com o auxílio de uma pipeta automática, com 2 ml de PBS e 2 ml de água. As grades foram secas em papel de filtro, contrastadas por 30 minutos com 2% acetato de uranila e pós contrastadas por 10 minutos com Reynold's citrato de chumbo. Em seguida, as secções foram observadas em microscópio eletrônico Phillips, EM 301 (Eindhoven, the Netherlands).

4. RESULTADOS

4.1. Síntese e deposição de coxinas durante o desenvolvimento das sementes de *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay

A análise do padrão de síntese e deposição das coxinas durante o desenvolvimento das sementes do Adlay foi feita de acordo com o esquema apresentado na Fig.4. Os resultados obtidos nas análises são apresentados a seguir.

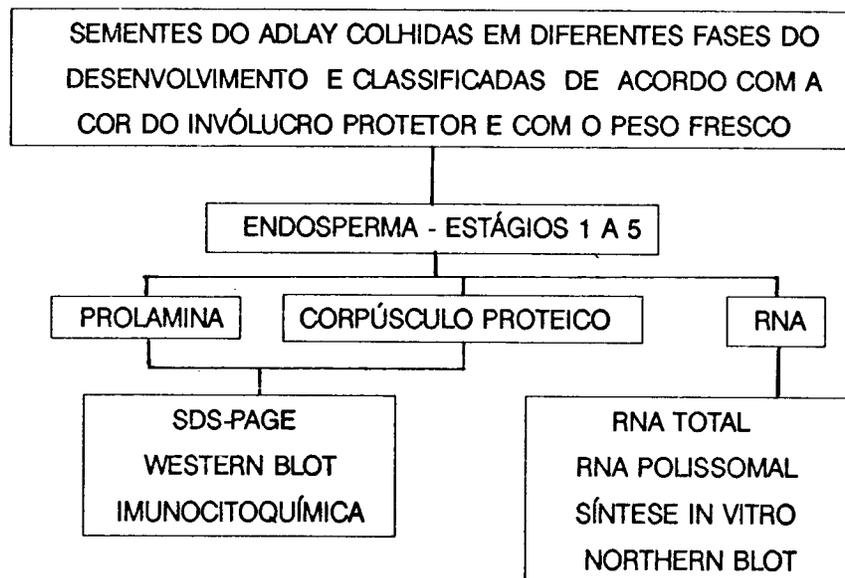


Fig.4 - Esquema indicando as etapas do trabalho sobre a síntese e deposição das coxinas durante o desenvolvimento da semente de *Coix lacryma-jobi*

4.1.1. O desenvolvimento das sementes de *Coix lacryma-jobi* L. var. *Adlay*

As sementes do *Adlay* são produzidas em ramos apicais da planta do *Coix*. Em cada ramo são encontradas de 6 a 9 flores formadas por um involúcro protetor, dentro do qual ocorre o desenvolvimento da semente. O tempo de abertura de cada flor varia muito entre as flores de um mesmo ramo (Fig. 5A) e entre os diversos ramos de uma mesma planta. Deste modo, torna-se muito difícil a condução de polinização controlada para se obter sementes em fases específicas do desenvolvimento.

O desenvolvimento das sementes do *Adlay* foi, então, dividido em 5 estágios, baseado na cor do involúcro protetor e no peso seco e fresco das sementes (Fig. 5B e 5D). Como podemos observar na Fig. 5B, durante o desenvolvimento da semente a cor do seu involúcro protetor varia de verde a marrom, sendo esta variação usada como um indicador do desenvolvimento da semente. Na Fig. 5C, observamos as sementes de cada estágio sem o involúcro protetor. Podemos notar que não ocorre um aumento muito grande no tamanho da semente durante o desenvolvimento.

Variações no peso seco e fresco das sementes dos 5 estágios do desenvolvimento são apresentadas na Fig. 5D. O peso fresco das sementes dos 5 estágios variou de 34 a 119 mg/endosperma, enquanto que o peso seco variou de 8 a 75 mg/endosperma. O tempo de maturação das sementes do *Adlay* é de aproximadamente 45 a 50 dias, dependendo das condições ambientais, tais como temperatura, umidade e nutrientes disponíveis no solo.

4.1.2. Comparação do acúmulo de proteína e RNA durante o desenvolvimento do endosperma do *Adlay*

As coixinas foram extraídas do endosperma do *Adlay* nos diferentes estágios do desenvolvimento (1 a 5) em soluções contendo 55% de isopropanol e 2% de 2-mercaptoetanol. A quantificação das coixinas foi feita como descrito em 3.5. e o teor dessas proteínas em cada estágio é apresentado na Fig.6. Como podemos

observar, as coixinas começaram a se acumular logo no início do desenvolvimento (estágio 1) e o acúmulo máximo foi observado nos estágios 4 e 5. O teor das coixinas nos diferentes estágios variou de 1,6 a 11,0 mg/endosperma.

O RNA total foi extraído do endosperma do Adlay dos 5 estágios do desenvolvimento e quantificado como descrito em material e métodos. Os níveis de RNA total em cada estágio do desenvolvimento são apresentados na Fig.6. O nível máximo foi observado nos estágios 1 e 2, e foi diminuindo conforme ocorria a maturação da semente. No estágio 5, foi observado um nível de RNA que correspondia a aproximadamente 15% do nível máximo do RNA total. O alto nível de RNA total observado no início do desenvolvimento do endosperma é, provavelmente, devido às intensas atividades metabólicas que ocorrem no tecido durante estes estágios, e que não estão relacionadas com a síntese das coixinas.

RNAs polissomais foram purificados de corpúsculos proteicos isolados de endospermas nos diversos estágios de desenvolvimento como descrito em 3.10. Na Fig.6 observamos que o nível do RNA polissomal no endosperma do Adlay foi baixo no estágio 1, aumentou gradativamente até o estágio 3, onde atingiu o nível máximo, e então decaiu a níveis mais baixos, dentro do intervalo estudado, conforme ocorria a maturação. Nesta figura, podemos observar, também, que estágio de máximo acúmulo de RNA polissomal coincide com a fase de crescimento logarítmico da planta.

4.1.3. Precursores das coixinas

O RNA polissomal isolado do endosperma no estágio 3 do desenvolvimento foi usado em experimentos de síntese de proteínas "in vitro", como descrito em 3.11. Os produtos da tradução "in vitro", obtidos na presença de [³⁵S]-metionina, foram analisados em gel 12,5% de poliacrilamida, contendo SDS (SDS-PAGE) e fluorografia (Fig.7), e apresentaram o padrão característico das coixinas. As 5 classes de coixinas foram observadas mas, com exceção da γ -coixina (C3, 22KDa), eram aproxima-



Fig.5 - Desenvolvimento das sementes de *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay. (A) Ramos da planta do Adlay mostrando sementes em diferentes estágios do desenvolvimento. **(B)** Sementes do Adlay classificadas em 5 estágios do desenvolvimento, baseado na cor do involúcro protetor e no peso fresco e seco do endosperma. **(C)** Sementes do Adlay sem o involúcro protetor, mostrando o endosperma nos 5 estágios do desenvolvimento. O peso fresco e seco do endosperma nos 5 estágios é apresentado em **(D)**. **(D)** Variações no peso fresco (o) e seco (o) do endosperma durante o desenvolvimento.

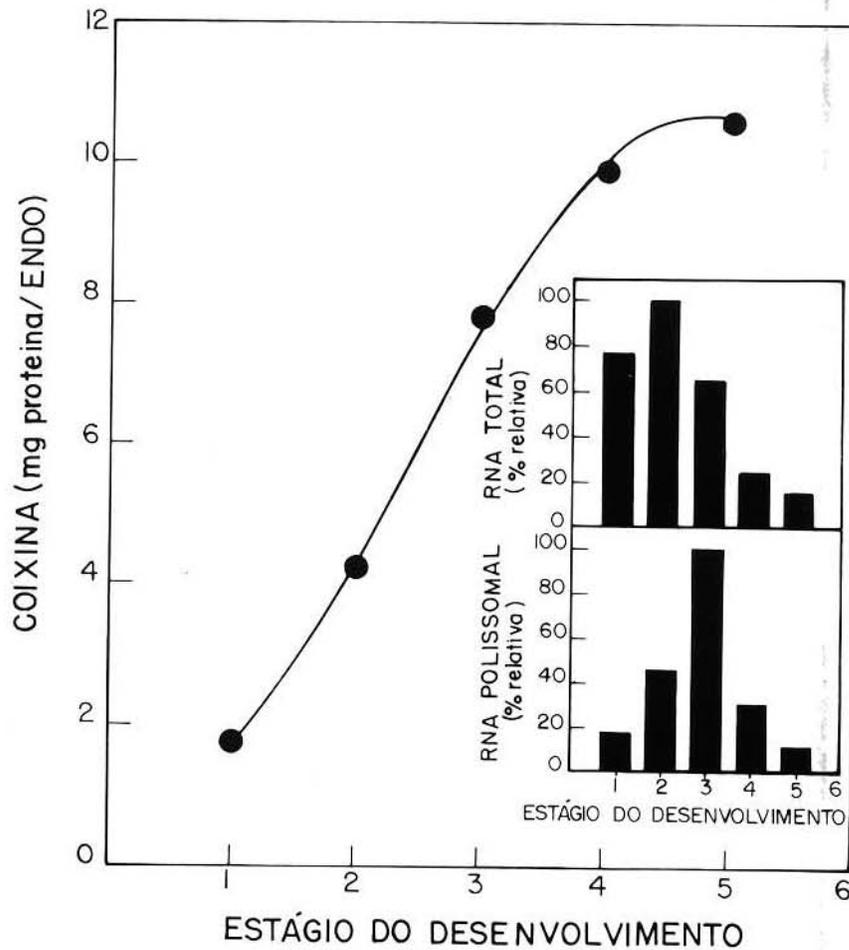


Fig.6 - Comparação do acúmulo de proteína e RNA durante o desenvolvimento do endosperma do Adlay. As coixinas, o RNA total e o RNA polissomal foram extraídos de endospermas nos diferentes estágios do desenvolvimento e quantificados como descrito em material e métodos.

mente 2 KDa maiores que as coixinas nativas. O peso molecular aparente apresentado por estas proteínas foi de 30, 27, 22, 19 e 17 KDa. Este resultado sugere que as coixinas, como observado em prolaminas de outros cereais, são sintetizadas como precursores.

4.1.4. Síntese de coixinas durante o desenvolvimento do endosperma do Adlay

Para verificar o padrão de síntese de cada uma das classes de coixinas, estas proteínas foram extraídas do endosperma do Adlay nos diversos estágios do desenvolvimento como descrito em 3.4 e analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), gradiente 5 a 20%.

O padrão de acúmulo de coixinas durante o desenvolvimento do endosperma é apresentado na Fig. 8A. Podemos observar que, conforme ocorre a maturação, também ocorre um aumento gradual em todas as classes de coixina. No estágio 1 (Fig.8A, linha 1), as classes de α -coixina C1 (27KDa), C4(17KDa) e C5(15KDa) foram detectadas em pequenas quantidades, enquanto que a α -coixina C2(25KDa) foi detectada em uma quantidade bem maior. A α -coixina C2 representou a classe de coixina mais abundante neste estágio, bem como em todos os outros através da maturação. A γ -coixina (C3, 22KDa) não foi detectada no estágio 1. No estágio 2 (Fig.8A, linha 2), foram detectadas as 5 classes de coixina, sendo que as α -coixinas C1, C4 e C5 foram observadas em quantidades similares, enquanto que a γ -coixina foi detectada em níveis bem menores. No estágio 3 (Fig.8A, linha 3), as 5 classes de coixinas foram perfeitamente detectadas e, nos estágios 4 e 5 (Fig.8A, linhas 4 e 5) atingiram o nível máximo de acúmulo.

O padrão diferencial de acúmulo observado entre as α - e γ -coixinas foi confirmado através de análises de "Western blot", como descrito em material e métodos (3.7). As proteínas de géis em replicata da Fig.8A foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com os anticorpos produzidos contra as α -coixinas C1 + C2 (Fig.8B), C4 (Fig.8C) e C5 (Fig.8D), e contra a γ -coixina C3 (Fig. 8D). Os

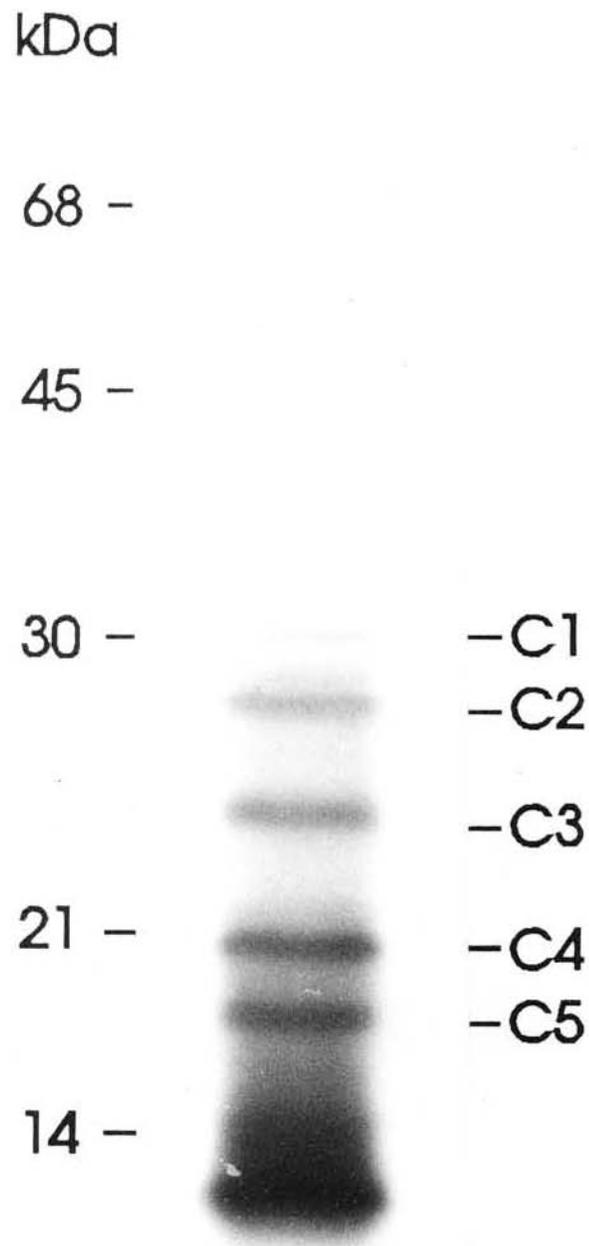


Fig.7 - Fluorografia dos produtos da tradução "in vitro" dos mRNAs isolados de endospermas no estágio 3 do desenvolvimento usando [^{35}S]-metionina como precursor. Os números à esquerda correspondem à posição de marcadores de peso molecular; à direita estão indicadas as posições das pré-coixinas.

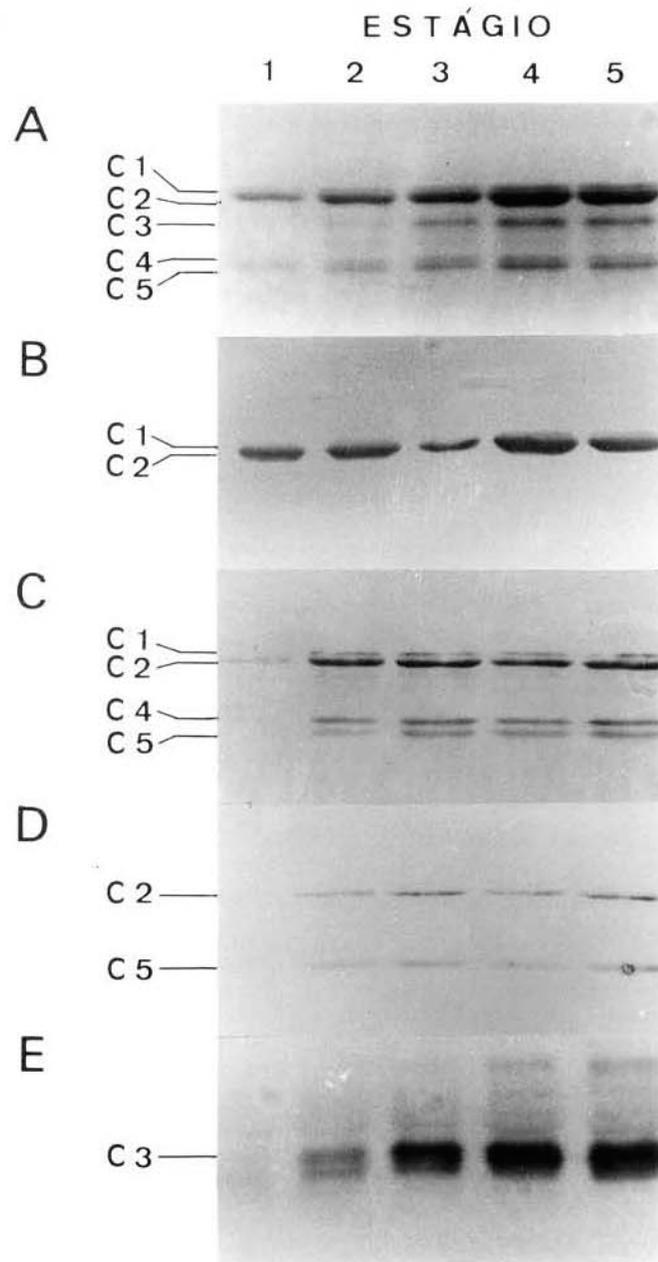


Fig.8 - Análise do padrão de síntese das coixinas durante o desenvolvimento. (A) SDS-PAGE das coixinas extraídas de endospermas nos diferentes estágios do desenvolvimento (1 a 5). As coixinas foram coradas com 0,25% Comassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (5:5:1, v/v). (B a E) Análise imunológica de géis em replicata de (A). As coixinas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpos produzidos contra as α -coixinas C1+C2 (B), C4 (C) e C5 (D), e também com anticorpos produzidos contra a γ -coixina (E). Após lavagem, foram incubadas com o complexo proteína A-peroxidase e coradas em uma solução indicadora.

"imunoblots" confirmaram os resultados obtidos através da análise de SDS-PAGE, que sugeriram que as α -coixinas são sintetizadas em estágios anteriores aos da síntese da γ -coixina. Os imunoblots também mostraram as reações cruzadas anteriormente observadas por Ottoboni et al. (1990 a) e Leite et al. (1990). O anticorpo produzido contra as α -coixinas C1 + C2 reconheceu C1 e C2 (Fig.8B). O anticorpo contra a α -coixina C4 reconheceu C4 e apresentou reação cruzada com todas as outras α -coixinas (Fig.8C). O anticorpo contra a α -coixina C5 reconheceu C5 e apresentou reação cruzada com a α -coixina C2 (Fig.8D). Na Fig. 8E observamos que o anticorpo produzido contra a γ -coixina (C3) reconheceu C3 e apresentou reação cruzada com proteína de peso molecular mais elevado. Estas reações cruzadas podem ser devidas a epitopos comuns presentes nas classes de proteínas.

Com o objetivo de verificar se a diferença no tempo de síntese das α - e γ -coixinas corresponde a diferenças no tempo de expressão dos genes das coixinas, mRNAs polissomais de cada estágio foram preparados como descrito em 3.10. e alíquotas de 38 μ l foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo formaldeído (38 μ l correspondiam a aproximadamente 20 μ g de mRNA polissomal no estágio 3) (Fig.9). Podemos observar na Fig.9 que ocorre um acúmulo de mRNAs durante o desenvolvimento do endosperma do Adlay. Este acúmulo atingiu um máximo aproximadamente na metade do desenvolvimento (estágio 3) e foi decaindo conforme ocorria a maturação da semente. Após a eletroforese, os mRNAs polissomais foram transferidos para membranas de nylon e hibridizados com clones de cDNA de α -e γ -coixinas, pBCx27.1 e pBCx22.3 (Leite et al.,manuscrito em preparação), respectivamente.

O resultado da hibridização com o clone de cDNA de α -coixina pode ser observado na Fig.10A. As mensagens de α -coixinas começaram a se acumular no estágio 1 (linha 1), atingiram um nível máximo no estágio 3 (linha 3) e então decaíram conforme ocorria a maturação da semente, não sendo detectadas no estágio 5 (linha 5).

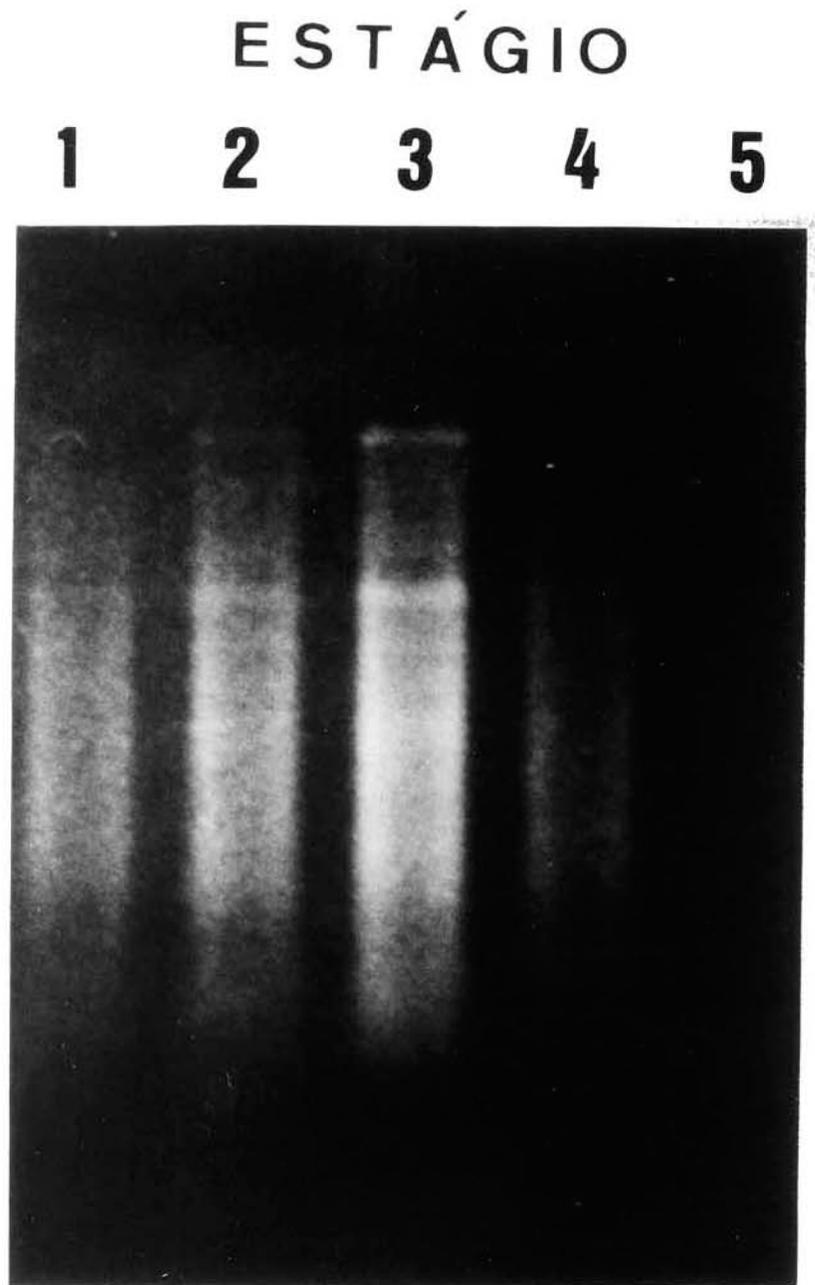


Fig.9 - Eletroforese dos mRNAs isolados do endosperma do Adlay nos diferentes estágios do desenvolvimento. Os mRNAs foram submetidos a eletroforese em gel denaturante de agarose e transferidos para membranas de nylon, como descrito em material e métodos. Linhas 1 a 5 correspondem aos mRNAs isolados de endospermas nos estágios 1 a 5, respectivamente.

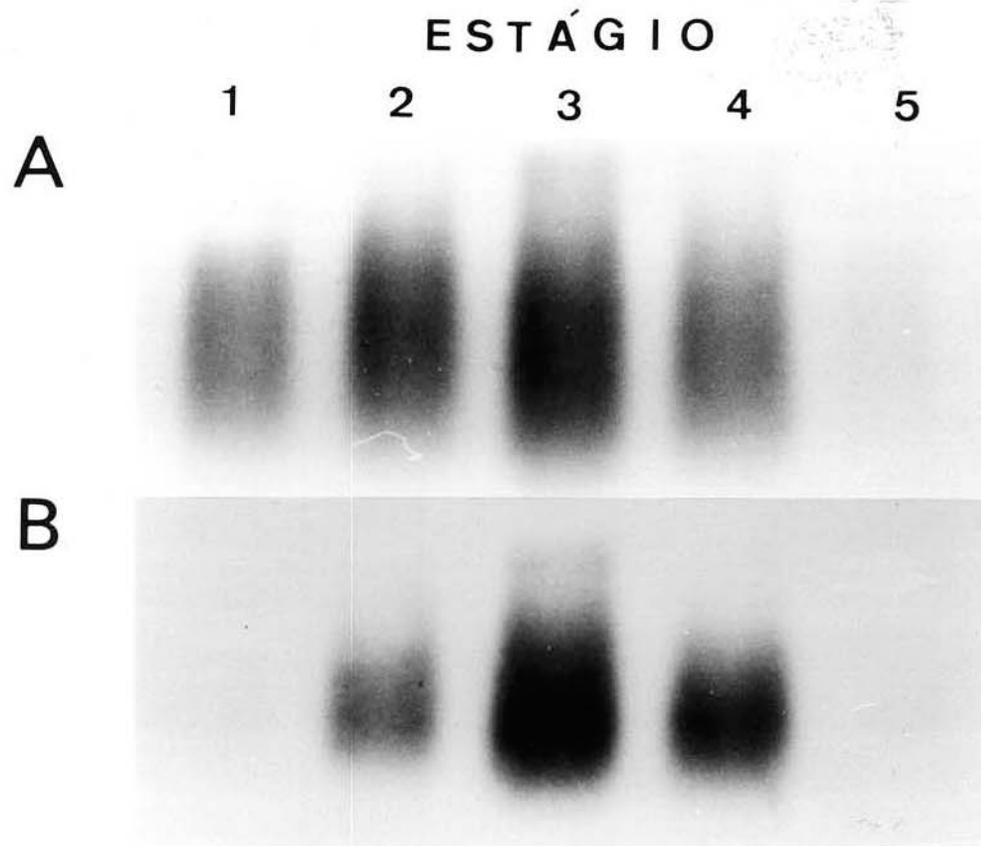


Fig. 10 - Análise de "Northern blot" de mRNAs isolados de endospermas nos 5 estágios do desenvolvimento. Volumes iguais de mRNA foram fracionados em gel de agarose 1,2% contendo 6% formaldeído. Os mRNAs foram transferidos para membranas de nylon e hibridizados com o clone de cDNA de α -coixina pBCx 27.10 (A) e com o clone de cDNA de γ -coixina pBCx 22.3 (B). O tempo de exposição ao filme de raio X foi de 1 hora para o RNA hibridizado com pBCx 27.10 e 18 horas para o RNA hibridizado com pBCx 22.3.

O resultado da hibridização com o clone de cDNA de γ -coixina, pBCx22.3, pode ser observado na Fig.10B. As mensagens de γ -coixina começaram a ser acumuladas no estágio 2 de desenvolvimento do endosperma (linha 2), atingiram um nível máximo no estágio 3 (linha 3) e então decaíram em direção à maturação da semente. Neste caso também não foram detectadas no estágio 5 (linha 5).

Os níveis de RNAs polissomais das γ -coixinas foram bem menores que os observados para os RNAs polissomais das α -coixinas. O tempo de exposição aos filmes de RX foi de 1 hora para os filtros hibridizados com o clone de cDNA de α -coixinas, e de 18 horas para os hibridizados com o clone de cDNA de γ -coixina.

Deste modo, podemos dizer que estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos nas análises das coixinas através de SDS-PAGE e "Western blot". Foi observada uma correlação entre os níveis de RNAs polissomais e a síntese das classes de coixinas.

4.1.5. Deposição das coixinas

Com o objetivo de verificar se as coixinas são depositadas nos corpúsculos proteicos, estas organelas foram isoladas de endospermas no estágio 3 do desenvolvimento como descrito em 3.8, as coixinas foram extraídas e comparadas com as coixinas extraídas de endospermas maduros, através de análises de SDS-PAGE e "Western blot".

A Fig.11A apresenta a análise de SDS-PAGE das proteínas extraídas de endosperma maduro (linha 1) e de coixinas extraídas de corpúsculos proteicos (linha 2). A análise de SDS-PAGE das coixinas extraídas dos corpúsculos proteicos indicou que as 5 classes de coixinas estão presentes nestas organelas. Além das 5 classes, podemos observar que as coixinas extraídas dos corpúsculos proteicos apresentaram um polipeptídeo de 19 KDa, que não está presente nas coixinas extraídas dos endospermas maduros.

Para confirmar as análises de SDS-PAGE, as coixinas de géis em replicata da Fig.11A foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com os

anticorpos produzidos contra as α -coixinas C1 + C2 (Fig.11B), C4 (Fig.11C), C5 (Fig.11D), e contra a γ -coixina C3 (Fig.11E).

Os resultados dos "imunoblots" confirmaram os resultados obtidos nas análises de SDS-PAGE, indicando que as α - e γ -coixinas estão realmente depositadas nos corpúsculos proteicos do Adlay, como observado para prolaminas de outros cereais. Além disso, ficou demonstrado que nenhum dos anticorpos apresentou reação cruzada com o polipeptídeo de 19 KDa. Este polipeptídeo foi observado em extratos brutos de endosperma do Adlay quando os mesmos foram submetidos a eletroforese (dado não apresentado). Não se sabe até o momento qual a função deste polipeptídeo, mas podemos supor que seja um constituinte das paredes dos corpúsculos proteicos.

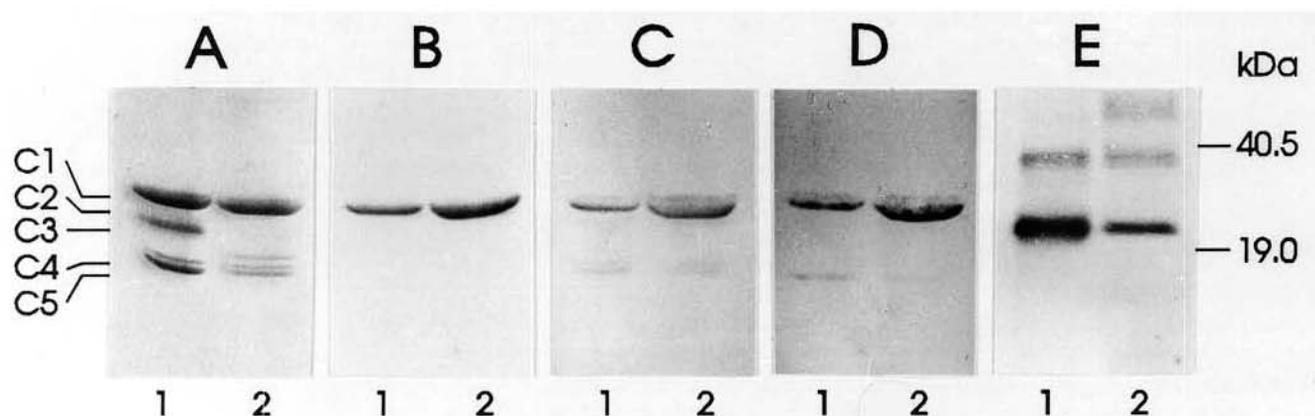


Fig.11 - Comparação de coixinas extraídas de endospermas maduros e de corpúsculos proteicos. (A) SDS-PAGE de coixinas extraídas de endosperma maduro do Adlay (linha 1) e de corpúsculos proteicos (linha 2). (B a E) Análise imunológica das coixinas de géis em replicata de (A). As coixinas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com os anticorpos produzidos contra as α -coixinas C1 + C2 (B), C4 (C) e C5 (D), e contra o anticorpo produzido contra a γ -coixin (E). Após lavagem, foram incubadas com o complexo proteína A -peroxidase e coradas em uma solução indicadora.

4.2. Imunocitoquímica associada à microscopia

Os estudos de imunocitoquímica foram feitos a nível de microscopia ótica e eletrônica, e os resultados obtidos nos trabalhos são apresentados a seguir.

4.2.1. Imunocitocalização de coixinas em endosperma, embrião, escutelo, raiz e coleóptile do Adlay

Neste experimento, as secções dos tecidos foram incluídas em resina LR White como descrito em 3.17.2. Secções semi-finas foram obtidas, uma parte foi corada com azul de metileno para verificar o estado do material, e a outra parte foi usada para os estudos imunocitoquímicos. Assim, as secções foram incubadas com os anticorpos produzidos contra a α -coixina de 25 KDa (C2) e contra a γ -coixina (C3), como descrito em 3.17.5. O soro não imune foi usado como controle. Após incubação com o complexo proteína A-ouro e tratamento com "Silver enhancement mixture" IntenSE M, as secções foram observadas ao microscópio ótico.

Secções semi-finas de embrião, escutelo, coleóptile e raiz incubadas com os anticorpos produzidos contra as α - e γ -coixinas não apresentaram marcação, indicando, como era esperado, que as coixinas não estão presentes nestes tecidos (dado não apresentado). O controle não apresentou marcação inespecífica (dado não apresentado).

No entanto, as secções de endosperma incubadas com os anticorpos produzidos contra as α - e γ -coixinas revelaram a marcação característica em forma de grânulos escuros. Na Fig. 12A podemos observar a secção de endosperma incubada com o anticorpo produzido contra a α -coixina C2, e na Fig. 12B, a secção incubada com o anticorpo produzido contra a γ -coixina (C3). A intensidade da marcação foi maior para a α -coixina que para a γ -coixina, provavelmente devido aos altos níveis desta proteína nas células do endosperma. Nesta figura, podemos observar, também, que os corpúsculos proteicos encontram-se nas células do endosperma do Adlay preenchendo os espaços entre os grânulos de amido.

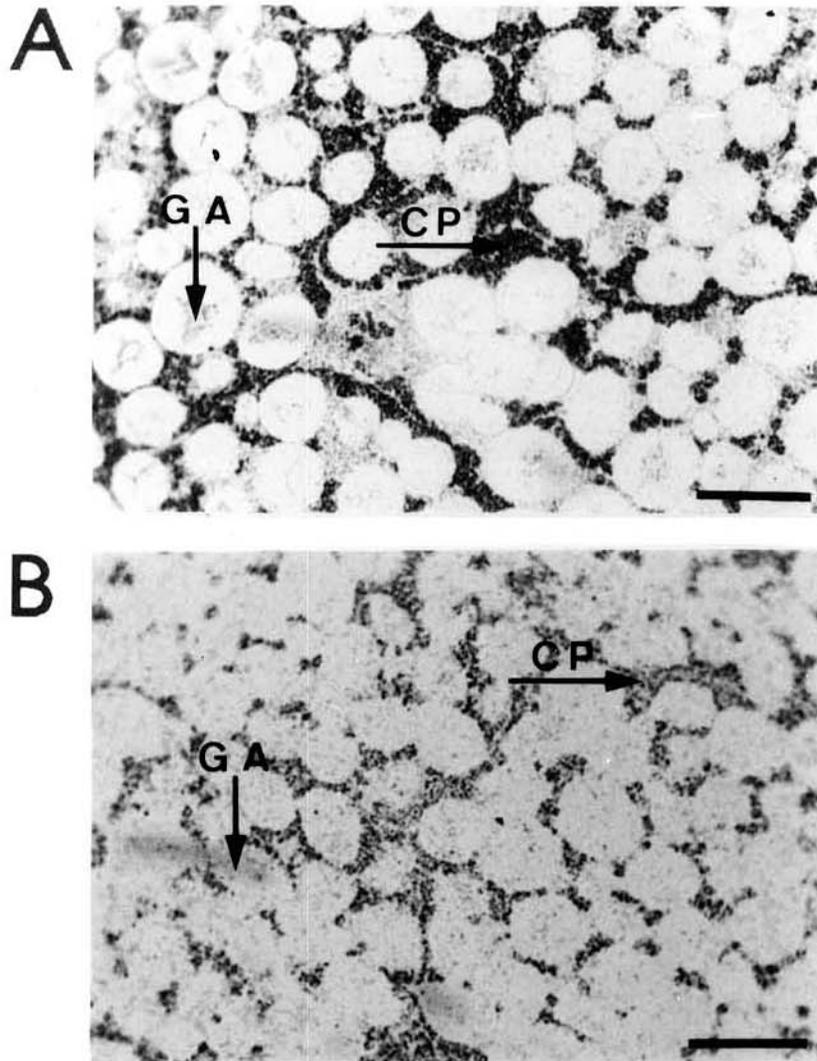


Fig.12 - Imunocitocalização de coixinas no endosperma do Adlay. Secções semi-finas de endosperma imaturo do Adlay foram obtidas, incluídas em resina LR White e incubadas com anticorpos produzidos contra α - e γ - coixinas. Abreviações usadas: ga, grânulos de amido; cp, corpúsculos proteicos. Bar = 5 μ m. (A) Secção incubada com o anticorpo produzido contra a α - coixina C2, seguido de incubação com proteína A conjugada a partículas de ouro de 10 nm, e tratamento com "Silver enhancement mixture". (B) como (A), mas usando-se o anticorpo produzido contra a γ -coixina.

4.2.2. Imunocitocalização das coixinas nos corpúsculos proteicos do endosperma do Adlay

Os corpúsculos proteicos são organelas localizadas nas células do endosperma, e neles são armazenadas as proteínas de reserva das plantas. São formados por uma matriz proteica uniforme, delimitada por uma membrana associada a polirribossomos. A forma dessas organelas é de circular a oval, e seu diâmetro é de poucos microns (Pernolet e Mosse, 1983).

Com o objetivo de verificar a localização das classes de coixinas no interior dos corpúsculos proteicos, estas organelas foram incluídas em Resina LR White (material e métodos, 3.17.2). Secções ultra-finas foram obtidas e incubadas com os anticorpos produzidos contra as α - e γ -coixinas e com o soro não imune. Após a incubação com os anticorpos, foram tratadas com o complexo proteína A-ouro, contratadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas ao microscópio eletrônico.

Nas Fig.13A e 14A são apresentadas as secções incubadas com o soro não imune. Podemos observar que não houve marcação, o que indica a ausência de reação inespecífica. As secções incubadas com os anticorpos produzidos contra as α -coixinas C1, C2, C4, C5 e contra a γ -coixina (Fig. 13B a 13F e 14B a 14F, respectivamente) mostraram que as 5 classes de coixinas encontram-se por todo o corpúsculo proteico. A secção incubada com o anticorpo produzido contra a α -coixina C2 (Fig.13 e 14C) apresentou uma marcação maior que a observada para as outras classes de coixina, provavelmente devido à alta concentração desta proteína nas células do endosperma do Adlay. Deste modo, podemos dizer que a intensidade da marcação é proporcional à concentração de cada classe de coixina presente nas células do endosperma do Adlay.

Os corpúsculos proteicos isolados do endosperma do Adlay no estágio 3 do desenvolvimento apresentaram uma grande variação em tamanho, com diâmetros variando de 0,2 a 3,7 μ m. As membranas desses corpúsculos proteicos são, aparentemente, contínuas.

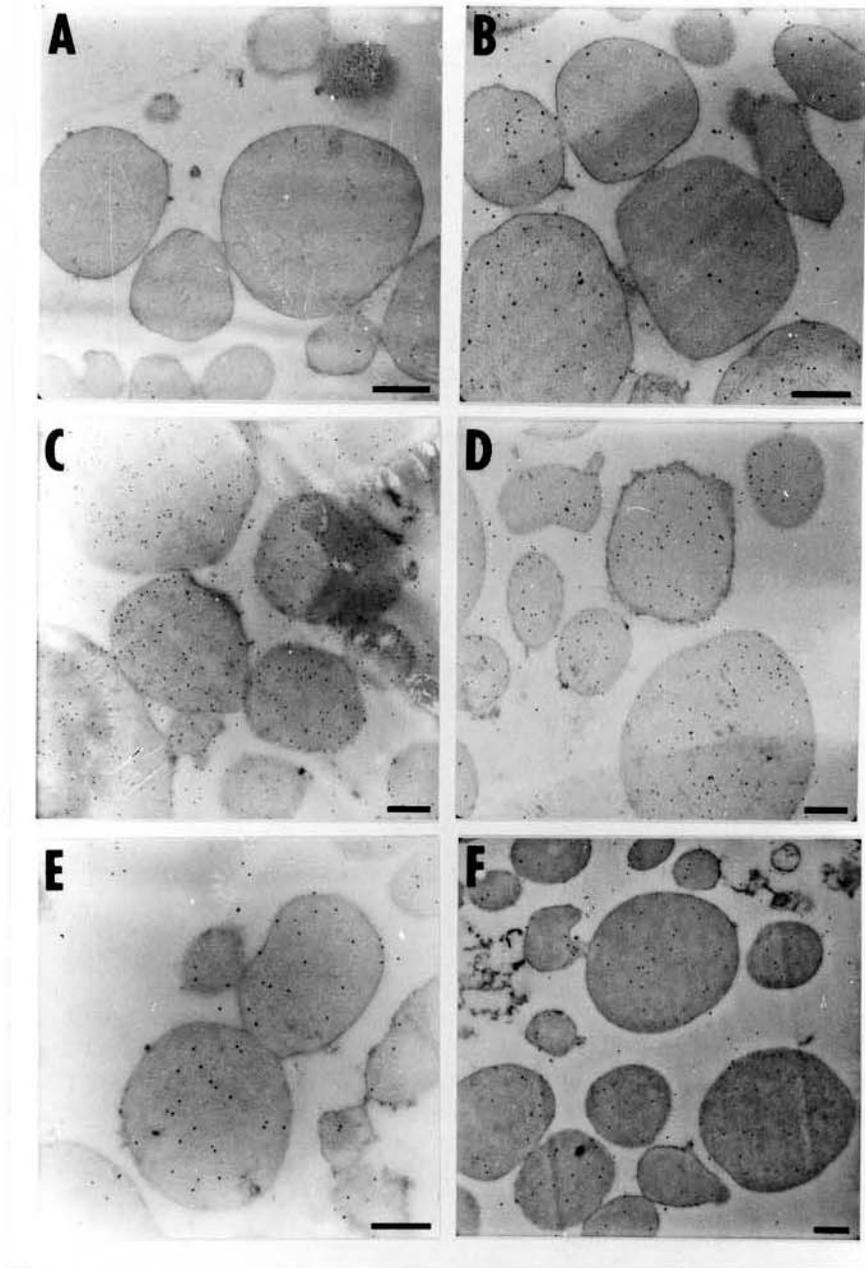


Fig.13 - Imunocitocalização das coixinas nos corpúsculos proteicos do endosperma do Adlay. Corpúsculos proteicos isolados de endospermas do Adlay no estágio 3 de desenvolvimento foram incluídos em resina LR White e usados para análises imunocitoquímicas. Secções ultra-finas dos corpúsculos proteicos foram incubadas com o soro não imune (A), com os anticorpos produzidos contra as α -coixinas C1 (B), C2 (C), C4 (D), C5 (E), e contra a γ -coixina (F), seguido de incubação com proteína A conjugada a partículas de ouro de 20 nm. Bar = 0,5 μ m.

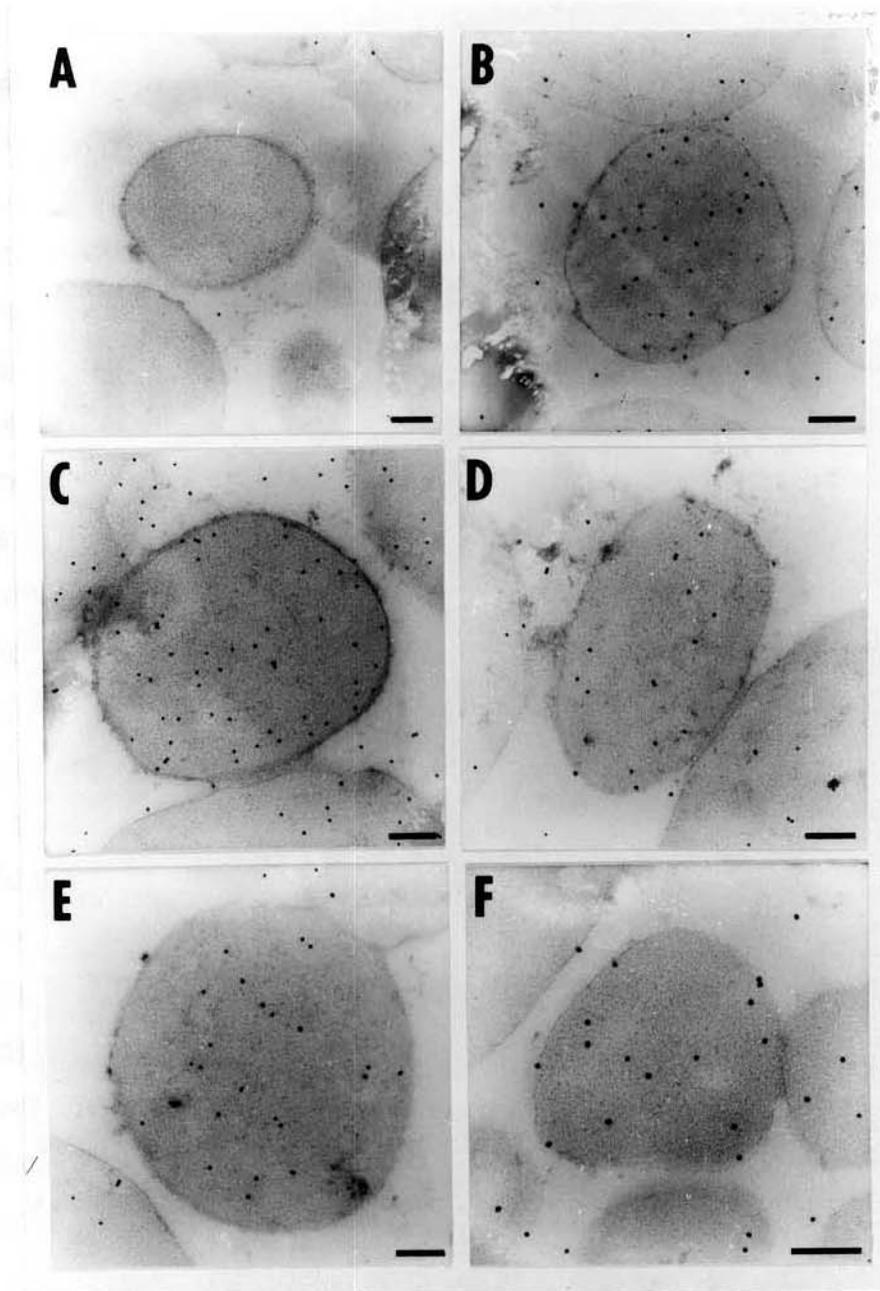


Fig.14 - Imunocitocalização de coxinas nos corpúsculos proteicos do endosperma do Adlay. Como descrito na Fig.13, porém em maior aumento. Bar = 0,25 μ m.

5. DISCUSSÃO

A principal proteína de reserva do endosperma das sementes de *Coix lacryma-jobi* L. é uma prolamina denominada coixina. Esta proteína representa aproximadamente 70% da proteína total da semente, quando extraída na presença de 20% de 2-ME (Ottoboni et al., 1990 a). A caracterização das coixinas foi feita recentemente em nosso laboratório por Ottoboni et al. (1990 a,b) e Leite et al.(1990), mas a regulação da expressão dos genes que codificam estas proteínas durante o desenvolvimento das sementes do *Coix* não havia, ainda, sido investigada.

Com o objetivo de analisar os mecanismos da expressão dos genes das coixinas, foram feitos alguns estudos sobre o acúmulo dessas proteínas e mRNAs durante o desenvolvimento do endosperma do *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay. Para isto, tornou-se necessário obter sementes do Adlay representativas dos vários estágios do desenvolvimento. No nosso caso, devido à dificuldade em se conduzir polinização controlada, as sementes foram escolhidas de acordo com a cor do seu invólucro protetor e com o peso seco (Fig.5). Apesar de ser um pouco arbitrária, esta classificação mostrou-se extremamente satisfatória, como pode ser notado nos resultados obtidos nos trabalhos.

O acúmulo das coixinas mostrou uma cinética sigmoideal (característica do acúmulo das proteínas das sementes), seguindo o aumento de peso fresco e seco do endosperma (Fig.6). O acúmulo das coixinas e seus mRNAs ocorreu nos estágios iniciais do desenvolvimento, e pôde ser nítidamente observado um acúmulo máximo de mRNAs nos estágios de maior taxa de acúmulo das coixinas (Fig.6). Pôde ser observado que conforme ocorria a síntese e deposição das coixinas, ocorria a diminuição dos mRNAs, até níveis não detectáveis nas sementes maduras (Fig.6).

Além de ter ocorrido um controle temporal nos genes das coixinas, verificamos que estes genes são tecido específicos. Através dos estudos de imunocitocalização, observamos que as coixinas são encontradas exclusivamente nas células do endosperma, e não nos outros tecidos analisados.

A tradução dos mRNAs isolados de corpúsculos proteicos mostrou como produto as 5 classes de coixinas (Fig.7). Estas proteínas apresentaram pesos moleculares aparentes de 30, 27, 22, 19 e 17 KDa, o que indicou que as α -coixinas são aproximadamente 2 KDa maiores que as coixinas nativas. Este resultado sugere que as α -coixinas, como as α -zeínas (Burr et al., 1978; Larkins and Hurkman, 1978) e outras prolaminas de cereais (Mathews e Mifflin, 1980; Donovan et al., 1982), são sintetizadas como precursores. Os precursores possuem uma sequência amino terminal relacionada à translocação de proteínas no interior do retículo endoplasmático, para serem acumuladas e formarem os corpúsculos proteicos. A sequência sinal é removida por clivagem proteolítica durante a tradução, antes mesmo da cadeia de polipeptídeos estar completa (Blobel e Doberstein, 1975; Kreil, 1981). Ao contrário das α -coixinas, não foi observada nenhuma alteração no peso molecular aparente do produto da tradução "in vitro" correspondente à γ -coixina C3. Resultados similares foram verificados para as γ -zeínas (Torrent et al., 1986), e o processamento dessas proteínas só pôde ser demonstrado pela comparação dos pls dos produtos da tradução com os seus produtos de translocação através da membrana, e através de dados de sequência de clones de cDNA e genômicos. Como os produtos da tradução "in vitro" apresentaram principalmente as 5 classes de coixinas, podemos concluir que o RNA polissomal quantificado na Fig.6 representa mRNAs das coixinas.

Neste trabalho foi verificado que o tempo de acúmulo dos mRNAs específicos das coixinas, bem como o tempo de síntese dessas prolaminas, não é o mesmo para todas as classes de coixinas. Através das análises de SDS-PAGE e "Western blot", verificamos que as α -coixinas C1, C2, C4 e C5 são sintetizadas em estágios do desenvolvimento anteriores aos da síntese da γ -coixina (C3) (Fig.8). Esta expressão gênica diferencial foi confirmada através das análises de "Northern blot". Os mRNAs das α -coixinas estavam presentes no endosperma das sementes do Adlay desde o início do desenvolvimento, enquanto que os mRNAs das γ -coixinas foram observados no endosperma somente a partir do estágio 2. Os mRNAs das α - e γ -coixinas atingiram um nível máximo de acúmulo no estágio 3, coincidindo com o estágio onde

ocorre a maior taxa de acúmulo das coixinas (Fig.9). Foi observado em aveia (Brinegar e Paterson, 1982), milho (Viotti et al., 1979; Park et al., 1980), cevada (Mathews e Mifflin, 1980; Rahman et al., 1983) e ervilha (Chandler et al., 1983). que as alterações na taxa de síntese de grupos de proteínas de reserva estão associadas com as mudanças nas populações de seus mRNAs. Esta observação sugere que a taxa de síntese de cada proteína é determinada pelo nível de seu mRNA, que pode ser determinado pela taxa de transcrição, pela estabilidade do mRNA, ou ambas.

Baseado nos resultados obtidos nas análises de SDS-PAGE e "Western blot" de coixinas extraídas de corpúsculos proteicos e de endospermas maduros do Adlay, podemos concluir que as 5 classes de coixinas encontram-se depositadas nestas organelas (Fig. 10). Os corpúsculos proteicos presentes no endosperma do Adlay representam depósitos de prolaminas, e o mesmo tem sido observado para os corpúsculos proteicos de milho e trigo (Khoo e Wolf, 1970; Larkins e Hurkman, 1978; Taylor et al., 1985).

Muito interessantes foram os resultados obtidos nos estudos de imunocitoquímica associados à microscopia ótica e eletrônica. Os métodos imunocitoquímicos têm sido muito utilizados nos últimos 40 anos para localizar proteínas nos tecidos. O objetivo principal de qualquer método imunocitoquímico é preparar o tecido de modo que:

- os anticorpos tenham acesso ao local onde o antígeno está localizado;
- o tecido seja preservado para que a imagem corresponda à disposição do tecido "in vivo";
- a antigenicidade do componente a ser analisado sobreviva ao processo de preparação do tecido.

Isto pôde ser obtido com a resina LR White, a qual, após infiltração no endosperma amiláceo do Adlay, manteve a excelente antigenicidade das coixinas. Além disto, os cortes dos tecidos foram obtidos com grande facilidade, o que não ocorre com outras resinas que têm sido usadas.

Através destes estudos, ficou demonstrado que os corpúsculos proteicos do Adlay encontram-se embebidos entre os grânulos de amido presentes no endosperma, como já observado em outros cereais (Pernollet e Mosse, 1983).

A análise através de microscopia eletrônica mostrou a ocorrência de uma grande variação no tamanho dos corpúsculos proteicos isolados do endosperma do Adlay no estágio 3 do desenvolvimento. Estes corpúsculos apresentaram diâmetros que variavam de 0,3 a 3,6 μm . De acordo com Lending e Larkins (1989), o tamanho dos corpúsculos proteicos em milho depende da sua localização no endosperma e do estágio de maturação (variam de 0,2 a 1,4 μm de diâmetro). Estes autores também verificaram que ocorre a formação de um gradiente de tamanho dos corpúsculos proteicos; os que estão localizados na parte mais externa, próximo à camada de aleurona, são menores, e vão aumentando em tamanho em direção ao interior do endosperma. Um gradiente também é observado durante o desenvolvimento da semente; conforme ocorre a maturação, o tamanho dos corpúsculos proteicos aumenta. Neste trabalho, a grande variação observada no tamanho dos corpúsculos proteicos é devida, provavelmente, à localização dos mesmos nas células do endosperma. Um estudo detalhado do endosperma do Adlay, a nível de microscopia eletrônica, precisaria ser feito para que mais informações a esse respeito fossem obtidas.

A distribuição das 5 classes de coixinas nos corpúsculos proteicos foi analisada através das técnicas de imunocitoquímica associadas à microscopia eletrônica. Ficou demonstrado que as classes de coixinas distribuem-se por todo o corpúsculo proteico, não apresentando um padrão bem definido de localização.

De acordo com os trabalhos desenvolvidos por Ludevid et al. (1984) e Lending et al. (1988), foi proposto por Lending e Larkins (1989) um modelo para a deposição de zeínas nos corpúsculos proteicos do endosperma de milho. Estes autores sugeriram que as β - e γ -zeínas são inicialmente depositadas nas células do retículo endoplasmático como depósitos escuros, ao redor das camadas periféricas, enquanto que as α -zeínas, neste estágio inicial, estão presentes em níveis bem reduzidos ou ausentes. O subsequente acúmulo das α -zeínas foi observado como

depósitos claros nas regiões internas dos corpúsculos proteicos. Foi verificado que conforme ocorria a maturação, as α -zeínas foram se acumulando na região central dos corpúsculos proteicos, ficando circundadas por uma fina camada formada pelas β - e γ -zeínas.

O padrão de acúmulo das α - e γ -coixinas não está de acordo com o modelo proposto para o acúmulo das classes de zeínas. A γ -coixina não foi observada na periferia e nem as α -coixinas nas regiões internas dos corpúsculos proteicos do Adlay. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as α - e γ -coixinas encontram-se por todo o corpúsculo proteico. Este resultado pode ser devido ao tempo de deposição de proteínas e ao empacotamento de cada classe de prolamina. Em *Coix*, a distribuição de coixinas pode ser mais flexível que a das zeínas em milho, devido às diferenças estruturais e morfológicas entre as sementes destas 2 espécies. Ludevid et al. (1984) sugeriram que a γ -zeína tem uma função estrutural, envolvida na manutenção da integridade dos corpúsculos proteicos do endosperma de milho. Ocorre uma grande mudança na estrutura dos corpúsculos proteicos quando os mesmos são extraídos na presença de 2-ME, pois este agente redutor solubiliza a γ -zeína. No entanto, não foi possível concluir se a γ -coixina exerce uma função similar nos corpúsculos proteicos do *Coix*. Não podemos afirmar, também, que este é o único padrão de deposição das coixinas, pois o trabalho foi realizado usando-se corpúsculos proteicos isolados de todo o endosperma do Adlay, e não de camadas celulares bem definidas. Os resultados podem ter sido afetados pelo tempo de maturação do corpúsculo proteico e pelo tipo de célula na qual ele estava localizado.

A partir da observação dos corpúsculos proteicos do Adlay (Fig.13 e 14), ficou demonstrado que suas membranas são aparentemente contínuas, como as membranas dos corpúsculos proteicos de milho, sorgo e mileto (Mifflin e Burgess, 1982; Pernollet e Mosse, 1983). Em trabalhos realizados por Mifflin e Burgess (1982), foi observado que os corpúsculos proteicos do endosperma de trigo e cevada não são envoltos por uma membrana contínua, intacta. Isto foi demonstrado através de trabalhos de microscopia eletrônica e tratamento dos corpúsculos proteicos com proteases. Os corpúsculos proteicos do endosperma de trigo e cevada são sensíveis

ao tratamento com protease, ocorrendo a degradação das suas proteínas quando os mesmos são expostos a essas enzimas. Já os corpúsculos proteicos de milho não são sensíveis ao tratamento com proteases, pois são protegidos por uma membrana contínua, intacta, que impede a passagem das enzimas.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no trabalho, chegamos às seguintes conclusões:

1. A extração das coixinas do endosperma de sementes colhidas em diferentes estágios do desenvolvimento, e a subsequente análise através de SDS-PAGE e "Western blot", demonstrou que as α -coixinas são sintetizadas em estágios anteriores aos da síntese da γ -coixina. Através destas análises ficou demonstrado, também, que a classe de α -coixina C2 foi a mais abundante em todos os estágios do desenvolvimento.

2. A análise de corpúsculos proteicos isolados de endospermas no estágio 3 do desenvolvimento, através de SDS-PAGE e "Western blot", revelou que as 5 classes de coixinas estão presentes nestas organelas. Além das 5 classes de coixinas, foi observado um polipeptídeo de 19 Kd, apenas nas coixinas extraídas dos corpúsculos proteicos. Os anticorpos produzidos contra as classes de coixinas não reagiram com este polipeptídeo.

3. Os mRNAs específicos das coixinas podem ser facilmente purificados dos corpúsculos proteicos isolados do endosperma do Adlay. A síntese "in vitro" desses mRNAs mostrou o padrão característico das coixinas. As 5 classes de coixinas estavam presentes, mas com exceção de C3, eram aproximadamente 2 Kd maiores que as proteínas nativas. Este resultado indicou que as coixinas são sintetizadas como precursores.

4. Ocorreu um acúmulo de mRNAs durante o desenvolvimento do endosperma das sementes do Adlay. O nível máximo foi observado aproximadamente na metade do desenvolvimento (estágio 3), e foi decaindo até níveis não detectáveis, conforme ocorria a maturação da semente.

5. Através das análises de "Northern blot", foi observado que o acúmulo dos mRNAs específicos das α -coixinas ocorreu em estágios anteriores aos do acúmulo dos mRNAs específicos da γ -coixina. Além disso, os níveis dos mRNAs específicos das α -coixinas foi muito mais elevado.

6. A comparação dos níveis de coixinas, RNA total e RNA polissomal (mRNA), extraídos de endospermas de sementes colhidas nas diferentes fases do desenvolvimento, demonstrou que no estágio onde ocorria a maior taxa de síntese de coixinas (estágio 3), também ocorria o maior acúmulo de RNA polissomal (mRNA). O nível de RNA total foi alto nos 2 primeiros estágios do desenvolvimento, e então decaiu em direção à maturação da semente.

7. Através de técnicas de imunocitoquímica associadas à microscopia ótica, ficou demonstrado que os corpúsculos proteicos do Adlay estão localizados exclusivamente nas células do endosperma, preenchendo os espaços entre os grânulos de amido. As coixinas não foram detectadas nos outros tecidos analisados.

8. Através de técnicas de imunocitoquímica associadas à microscopia eletrônica, ficou demonstrado que as 5 classes de coixinas encontram-se por todo o corpúsculo proteico do Adlay, não ocorrendo um padrão bem definido de distribuição, como observado em milho.

9. O diâmetro dos corpúsculos proteicos isolados de endospermas do Adlay no estágio 3 de desenvolvimento variou de 0,3 a 3,6 μm , e suas membranas pareciam ser contínuas.

6. RESUMO

Neste trabalho, foi feita uma análise do padrão de síntese e deposição de prolaminas em sementes de *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay. Estas prolaminas, chamadas coixinas, representam aproximadamente 50% da proteína total do endosperma do Adlay e podem ser agrupadas em 2 classes: α - e γ - coixinas. As α -coixinas representam aproximadamente 85% das coixinas e são constituídas por 4 proteínas, com pesos moleculares aparentes de: 27 KDa (C1); 25 KDa (C2); 17 KDa (C4) e 15 KDa (C5). A γ -coixina representa aproximadamente 15% das coixinas e compreende apenas uma classe de proteína de 22 KDa (C3).

Para a realização deste trabalho, as sementes do Adlay foram colhidas em diferentes fases do desenvolvimento e classificadas em 5 estágios, baseado na cor do invólucro protetor e no peso fresco do endosperma. Este critério foi adotado devido à dificuldade em se conduzir polinização controlada nas plantas do Adlay.

Uma comparação do acúmulo de proteína e RNA durante o desenvolvimento do endosperma do Adlay foi feita. As coixinas, o RNA total e o RNA polissomal foram extraídos e quantificados. Os resultados da quantificação indicaram que as coixinas começaram a se acumular no início do desenvolvimento e atingiram um nível máximo nos estágios 4 e 5. O teor de RNA total no endosperma do Adlay nos estágios iniciais do desenvolvimento foi mais elevado e, conforme foi ocorrendo a maturação, esse teor foi diminuindo, chegando a representar aproximadamente 15% do RNA total do endosperma no estágio 5. No início do desenvolvimento, o teor de mRNA polissomal foi baixo, este nível foi aumentando e atingiu o máximo no estágio 3 (meio da maturação). A partir deste estágio, foi decaindo em direção à maturação da semente. Neste estudo comparativo, ficou demonstrado que no estágio onde ocorria a maior taxa de síntese de coixinas também ocorria a maior concentração de mRNAs polissomais. O alto teor de RNA total observado nos estágios iniciais do desenvolvimento deve estar relacionado com as intensas atividades metabólicas que ocorrem no tecido, mas que não estão relacionadas com a síntese das coixinas.

A análise dos produtos da tradução "in vitro" de mRNAs associados aos corpúsculos proteicos do endosperma do Adlay, através de SDS-PAGE e fluorografia, mostrou o padrão característico das coixinas. As 5 classes de coixinas estavam presentes, mas com exceção de C3, eram aproximadamente 2 KDa maiores que as proteínas nativas. Este resultado sugere que as coixinas, como as prolamínas de outros cereais, são sintetizadas como precursores.

As coixinas extraídas do endosperma das sementes nos vários estágios do desenvolvimento foram analisadas através de SDS-PAGE e "Western blot", usando anticorpos produzidos contra as 5 classes de coixinas. Estas análises indicaram que as α -coixinas foram sintetizadas em estágios anteriores aos da síntese da γ -coixina, e também indicaram que a classe de coixina de 25 KDa (C2) é a mais abundante desde os primeiros estágios do desenvolvimento da semente.

Os mRNAs isolados dos endospermas nas diferentes fases do desenvolvimento foram analisados através de "Northern blot", usando sondas de cDNA de α -coixina (pBCx27.1) e de γ -coixina (pBCx 22.3). O resultado desta análise indicou que as mensagens de α -coixinas começaram a se acumular no endosperma do Adlay logo no 1º estágio do desenvolvimento; atingiram o máximo no estágio 3 e a partir deste estágio foram diminuindo até níveis não detectáveis no estágio 5. As mensagens de γ -coixina começaram a se acumular somente no estágio 2, atingiram o máximo também no estágio 3, e foram decaindo até o estágio 5.

As coixinas foram extraídas de corpúsculos proteicos isolados do endosperma do Adlay no estágio 3 do desenvolvimento e comparadas com as coixinas extraídas de endosperma maduro através de SDS-PAGE e "Western blot". Os resultados desta análise indicaram que as 5 classes de coixinas estão presentes nos corpúsculos proteicos do Adlay. Na análise de SDS-PAGE dos corpúsculos proteicos foi observado um polipeptídeo de 19 KDa que não reagiu com nenhum dos anticorpos usados e nem estava presente nas coixinas extraídas do endosperma maduro.

Através de técnicas de imunocitoquímica associadas à microscopia ótica, e usando-se anticorpos produzidos contra a α -coixina de 25 KDa (C2) e contra a γ -coixina 22 KDa (C3), foi demonstrado que estas proteínas encontram-se exclusiva-

mente nas células do endosperma do Adlay, preenchendo os espaços deixados pelos grânulos de amido. As coixinas não foram detectadas nos outros tecidos analisados.

A localização das coixinas nos corpúsculos proteicos foi verificada através de técnicas de imunocitoquímica associadas à microscopia eletrônica. Para isto, foram utilizados os anticorpos produzidos contra as 5 classes de coixinas. Ficou demonstrado que as 5 classes de prolaminas encontram-se espalhadas por todo o corpúsculo proteico do Adlay, não apresentando um padrão bem definido de deposição, como observado para as prolaminas de milho, zeínas.

7. SUMMARY

This work presents the results of an analysis of the synthesis and deposition of prolamins in seeds of *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay. Those prolamins, called coixins, represent approximately 50% of total prolamins present in Adlay endosperm, and can be grouped in two classes: α - and γ -coixins. Alpha-coixins represent 85% of total coixins and are constituted by 4 proteins with apparent molecular weights of 27 KDa (C1), 25 KDa (C2), 17 KDa (C4) e 15 KDa (C5). Gamma-coixin represents approximately 15% of coixins and comprises only one class of protein of 22 KDa (C3).

For the realization of this work, Adlay seeds were collected in different phases of development and classified in 5 stages, based on the protection shell color and endosperm fresh and dry weight. This criterion was used due of the difficulty to conduct controlled pollination in this plant.

The comparison of protein and RNA accumulation during Adlay endosperm development was done. Coixins, total RNA and polysomal RNA were extracted and quantified. The results of the quantification indicated that coixins began to accumulate in the beginning of the development and reached maximum levels in stages 4 and 5.

The level of total RNA in Adlay endosperm was high in stage 1 and 2; as maturation occurs, the level declined and in stage 5 represented approximately only 15% of total RNA. In the beginning of the development, the level of polysomal RNA was minimum, reached maximum level in stage 3 (mid maturation) and then declined toward seed maturity. This comparative study indicated that the stage of maximum polysomal mRNA accumulation corresponds to the stage of maximum rates of coixin synthesis. The high level of total RNA in earlier developmental stages is probably due to intense metabolic activities in the endosperm, not related to coixin synthesis.

The in vitro translation products of mRNAs isolated from stage 3 endosperm were analysed by SDS-PAGE and fluorography. The fluorograph presented the characteristic band pattern of the coixins. The coixin classes were present, but with the exception of C3, they were approximately 2 KDa larger than the native coixins. This

results suggests that the coixins, as other cereal prolamins, are synthesised as precursors.

The coixins were extracted from stages 1 to 5 endosperm and analysed by SDS-PAGE and western blot, using antisera raised against the 5 coixin classes. Those analyses showed that α -coixins were synthesised in earlier developmental stages than γ -coixin. The analyses also indicated that C2 α -coixin (25 KDa) represented the most abundant coixin class in all developmental stages.

The mRNAs isolated from the 5 developmental stages were analysed by Northern blot, using α - and γ -coixin cDNA clones as probes (pBCx27,1 and pBCx 22,3, respectively). The results of this analysis showed that the α -coixin messages began to accumulate in stage 1, reached their maximum level at stage 3 and then decreased toward seed maturity, with non detectable levels at stage 5. Gamma-coixin messages started to accumulate only in the stage 2 endosperm, reached a maximum level at stage 3 and then decreased towards seed maturity.

Coixins extracted from protein bodies isolated from stage 3 endosperm were compared with coixins extracted from mature endosperm by SDS-PAGE and western blot analysis. The SDS-PAGE pattern of coixins extracted from protein bodies indicated that the 5 coixin classes were present in those organelles. The SDS-PAGE analysis also showed an extra-band of 19 KDa that was not present in the coixins extracted from mature endosperms and did not cross-reacted with the antisera raised against the 5 coixin classes.

Immunocytochemistry techniques associated to light microscopy, (using antisera raised against C2 α - and C3 γ -coixin) indicated that the coixins are found exclusively in the endosperm cells, filling the spaces left by the starch granules. Coixins were not detected in the other tissues analysed.

The localization of the coixin classes into the protein bodies was analysed by immunocytochemistry analysis associated to electron microscopy, using antisera raised against the 5 coixin classes. The results showed that the 5 coixin classes were spread all over the protein bodies, did not showing a well defined pattern of deposition, as observed in maize.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arora, R.K. (1977) Job's Tears (*Coix lacryma-jobi*) - A minor food and fodder crop from North Eastern India. *Econ. Bot.* **31**: 358-366
- Beachy, R.N., Jarvis, N.P., Barton, K.A. (1981) Biosynthesis of subunits of the soybean 7S storage protein. *J.Mol.Appl.Genet.* **1**: 19-27
- Bechtel, D.R., Juliano, B.O. (1980) Formation of protein bodies in the starchy endosperm of rice (*Oriza sativa* L.): a reinvestigation. *Ann. Bot.* **45**: 503-509
- Bewley, J.D., Black, M. (1985) *Seeds: Physiology of Development and Germination.* Plenum Press, New York - USA
- Bianchi, M.W., Viotti, A. (1988) DNA methylation and tissue-specific transcription of the storage protein genes of maize. *Plant Mol. Biol.* **11**: 203-214
- Blobel, G., Dobrerstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes II. Reconstruction of functional rough microsome from heterogeneous components. *J. Cell Biol.* **67**: 852-862
- Brandt, A., Ingversen, J. (1978) Isolation and translation of hordein messenger RNA from wild type and mutant endosperms in barley. *Carlsberg Res. Commun.* **43**: 451-469
- Brineager, A.C., Paterson, D.M. (1982) Synthesis of oat globulin precursors. Analogy to legume 11S storage protein synthesis. *Plant Physiol.* **70**: 1767-1769
- Burr, B., Burr, F.A. (1976) Zein synthesis in maize endosperm by polyribosomes attached to protein bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 515-519
- Burr, B., Burr, F.A., Rubenstein, I., Simon, M.N. (1978) Purification and translation of zein messenger RNA from maize endosperm protein bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 696-700
- Burr, B., Burr, F.A. (1981) In vitro uptake and processing of prezein and other maize preproteins by maize membranes. *J. Cell Biol.* **90**: 427-434
- Cameron-Mills, V., Ingversen, J., Brandt, A. (1978) Transfer of *in vitro* synthesised barley endosperm proteins into the lumen of the endoplasmic reticulum. *Carlsberg Res. Commun.* **43**: 91-102

- Casey, R., Domoney, C., Ellis, N. (1986) Legume storage proteins and their genes. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.* **3**: 2-95
- Chandler, P.M., Higgins, T.J.V., Randall, P.J., Spencer, D. (1983) Regulation of legumin levels in developing pea seeds under conditions of sulfur deficiency: rates of legumin synthesis and levels of legumin mRNA. *Plant Physiol.* **71**: 47-54
- Chen, Z.L., Schuler, M.A., Beachy, R.N. (1986) Functional analysis of regulatory elements in a plant embryo-specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8560-8564
- Chen, Z.L., Pan, N.S., Beachy, R.N. (1988) A DNA sequence element that confers seed-specific enhancement of a constitutive promoter. *EMBO J.* **7**: 297-302
- Clayton, W.D. (1973) The awnless species of Andropogoneae. *Kew Bull.* **28**: 49-58
- Clayton, W.D. (1983) Notes on tribe Andropogoneae (Gramineae) *Kew Bull.* **35**: 813-818
- Colot, V., Robert, L.S., Kavanaugh, T.A., Bevan, M.W., Thompson, R.D. (1987) Localization of sequences in wheat endosperm protein genes which confer tissue-specific expression in tobacco. *EMBO J.* **6**: 3559-3564
- Danner, D.B. (1982) Recovery of DNA fragments from gels by transfer to DEAE-Paper in an electrophoresis chamber. *Anal. Biochem.* **125**: 139-142
- Derbyshire, E., Wright, D.J., Boulter, D. (1976) Legumin and vicilin storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* **15**: 3-24
- De Rose, R.T., Ma, D.P., Kwon, I.S., Hasnain, S.E., Klassy, R.C., Hall, T.C. (1989) Characterization of the kafirin gene family from sorghum reveals extensive homology with zein from maize. *Plant Molec. Biol.* **12**: 245-256
- Diaz, N.M. (1985) Caracterização e utilização do *Coix* em panificação. *Alimentos e tecnologia* **4**: 17-18
- Dierks-Ventling, C., Cozens, K. (1982) Immunochemical crossreactivity between zein, hordein and gliadin. *FEBS Letters* **142**: 147-150
- Donovan, G.R., Lee, J.W., Longhurst, T.J. (1982) Cell-free synthesis of wheat prolamins. *Aust. J. Plant Physiol.* **9**: 59-68

- Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P., Chambon, P. (1981) A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anl. Biochem.* **112**: 295-298
- Dure, L.S. (1975) Seed formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **26**: 259-278
- Edwards, J.W., Coruzzi, G.M. (1990) Cell-specific gene expression in plants. *Annu. Rev. Genet.* **24**:275-303
- Esen, A. (1986) Separation of alcohol soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. *Plant Physiol.* **80**: 623-627
- Guiltinan, M.J., Thomas, J.C., Nessler, C.L., Thomas, T.L. (1989) Expression of DNA binding proteins in carrot somatic embryos that specifically interact with a cis regulatory element of the French bean phaseolin gene. *Plant Mol. Biol.* **13**: 605-610
- Goldberg, R.B., Barker, S.J., Perez-Grau, L. (1989) Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* **56**: 149-160
- Greene, F.C. (1981) In vitro synthesis of wheat (*Triticum aestivum* L.) storage proteins. *Plant Physiol.* **68**: 778-783
- Greenwood, J.S., Chrispeels, M. (1985) Correct targeting of the bean storage protein phaseolin in the seeds of transformed tobacco. *Plant Physiol.* **79**: 65-71
- Hauxwell, A.J., Corke, F.M.K., Hedley, C.L., Wang, T.L. (1990) Storage protein gene expression is localised to regions lacking mitotic activity in developing pea embryos. An analysis of seed development in *Pisum sativum* XIV (1990) *Development* **110**: 283-289
- Heidecker G., Meesing, J. (1986) Structural analysis of plant genes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**: 439-466
- Higgins, T.J.V. (1984) Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 191-221
- Higgins, T.J.V., Spencer, D. (1977) Cell-free synthesis of pea seed proteins. *Plant Physiol.* **60**: 655-661

- Higgins, T.J.V., Spencer, D. (1980) Biosynthesis of pea seed proteins: evidence for precursor forms from *in vivo* and *in vitro* studies. In Genome organization and expression in plants, ed. C.J. Leaver, pp 245-258 New York. Plenum. 607 pp
- Higgins, T.J.V., Spencer, D. (1981) Precursor forms of pea vicilin subunits: modification by microsomal membranes during cell-free translation. *Plant Physiol.* **67**: 201-211
- Jain, S.K., Banerjee, D.K. (1974) Preliminary observations on the ethnobotany of the genus *Coix*. *Econ. Bot.* **28**: 38-42
- Jofuku, K., D., Okamuro, J.K., Goldberg, R.B. (1987) Interaction of an embryo DNA binding protein with a soybean lectin gene upstream region. *Nature* **328**: 734-737
- Johnson, D.A., Gautsch, J.W., Sportsman, J.R., Elder, J.H. (1984) Improved technique utilizing non-fat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal. Techn.* **1**: 3-8
- Kermode, A.R., Bewley, J.D. (1986) Alteration of genetically regulated synthesis in developing seeds by desiccation. In Membranes, Metabolism and dry organisms. Ed. A.C. Leopold. Cornell University Press, Ithaca, New York. pp59-84
- Kermode, A.R., Pramanik, S.K., Bewley, J.D. (1989) The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. VI. Desiccation induced changes in messenger RNA populations within the endosperm of *Ricinus communis* L. seeds. *J. of Exp. Botany* **40**: 33-41
- Khoo, U., Wolf, M.J. (1970) Origin and development of protein granules in maize endosperm. *Am. J. Bot.* **57**: 1042-1050
- Kim, W.T., Francesch, V.R., Krishnan, H.B., Okita, T.W. (1988) Formation of wheat protein bodies: involvement of the Golgi apparatus in gliadin transport. *Planta* **176**: 173-182
- Kodrzycki, R., Boston, R.S., Larkins, B.A. (1989) The *opaque-2* mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *The Plant Cell* **1**: 105-114
- Kowles, R.V., Phillips, R.L. (1985) DNA amplification patterns in maize endosperm nuclei during kernel development. *Proc. Natl. Acad. Sc.* **82** : 7010-7014

- Kreil, G. (1981) Transfer of proteins across membranes. *Ann. Rev. Biochem.* **50**: 317-348
- Kreis, M., Williamson, M.S., Forde, J., Schmutz, D., Clark, J., Buxton, B., Pywell, J., Marris, C., Henderson, J., Harris, N., Shewry, P.R., Forde, B.G., Mifflin, B.J. (1986) Differential gene expression in the developing barley endosperm. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **314**: 355-365
- Krishnan, B.H., Franceschi, V.R., Okita, T.W. (1986) Immunochemical studies on the role of the Golgi complex in protein body formation in rice seeds. *Planta* **169**: 471-481
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-684
- Larkins, B.A. (1981) Seed storage proteins: characterization and biosynthesis. In *The biochemistry of plants*, ed. P.K. Stumpf, E.E. Conn. **6**: 449-489. New York. Academic. 658 pp
- Larkins, B.A., Jones, R.A., Tsai, C.Y. (1976) Isolation and *in vitro* translation of zein messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* **15**: 5506-5511
- Larkins, B.A., Hurkman, W.J. (1978) Synthesis and deposition of zein in protein bodies of maize endosperm. *Plant Physiol.* **62**: 256-263
- Larkins, B.A., Pedersen, K., Handa, A.K., Hurkman, W.J., Smith, L.D. (1979) Synthesis and processing of maize storage proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 6448-6452
- Larkins, B.A., Pedersen, K., Marks, M.D., Wilson, D.R. (1984) The zein proteins of maize endosperm. *Trends Biol. Sci.* **9**: 306-308
- Leite, A., Ottoboni, L.M.M., Targon, M.L.P.N., Silva, M.J., Turcinelli, S.R., Arruda, P. (1990) Phylogenetic relationship of zeins and coixins as determined by immunological cross-reactivity and Southern blot analysis. *Plant Mol. Biol.* **14**: 743-751
- Lending, C.R., Chesnut, R.S., Shaw, K.L., Larkins, B.A. (1988) Structure of maize protein bodies and immunocytochemical localization of zeins. *Protoplasma* **143**: 51-62

- Lending, C.R., Larkins, B.A. (1989) Changes in zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *The Plant Cell* **1**: 1011-1023
- Ludevid, D., Torrent, M., Martinez-Izquierdo, J.A., Puigdomenech, P., Palau, J. (1984) Subcellular localization of glutelin-2 in maize (*Zea mays* L.) endosperm. *Plant Mol. Biol.* **3**: 227-234
- Ludevid, M.D., Martinez-Izquierdo, J.A., Armengol, M., Torrent, M., Puigdomenech, P., Palau, J. (1985) Immunological relations between glutelin-2 and low molecular weight zein-2 proteins from maize (*Zea mays* L.) endosperm. *Plant Sci.* **41**: 41-48
- Lohmer, S., Maddaloni, M., Motto, M., Di Fonzo, N., Hartings, H., Salamini, F., Thompson, R.D. (1991) The maize regulatory locus *Opaque-2* encodes a DNA-binding protein which activates the transcription of the b-32 gene. *EMBO J.* **3**: 617-624
- Maier, U.G., Brown, J.W.S., Feix, G. (1987) Binding of a nuclear factor to a consensus sequence in the 5' flanking regions of zein genes from maize. *EMBO J.* **6**: 17-22
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Marks, M.D., Larkins, B.A. (1982) Analysis of sequence microheterogeneity among zein messenger RNAs. *J. Biol. Chem.* **257**: 9976-9983
- Marris, C., Gallois, P., Copley, J., Kreis, M. (1988) The 5' flanking region of a barley B-hordeína gene controls tissue and developmental specific CAT expression in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* **10**: 359-366
- Matthews, J.A., Mifflin, B.J. (1980) In vitro synthesis of barley storage proteins. *Planta* **149**: 262-268
- Mechler, B. (1987) Isolation of messenger RNA from membrane bound polysomes. *Meth. in Enzim.* **152**: 241-248
- Mertz, E.T., Bates, L.S., Nelson, O.E. (1964) Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* **145**: 279-280

- Mifflin, B.J., Burgess S.R. (1982) Protein bodies from developing seeds of barley, maize, wheat and peas. The effect of protease treatment. *J. Exp. Botany* **33**: 251-260
- Miskmins, W.K., Roberts, M.P., McClelland, A., Ruddle, F.H. (1985) Use of a protein-blotting procedure and specific DNA probe to identify nuclear proteins that recognize the promoter region of the transferrin receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 6741-6744
- Moureaux, T., Landry, J. (1968) Extraction selective des proteines du grain de maïs et en particulier de la fraction glutelines. *C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris.* **2668**: 2302-2305
- Naito, S., Dubé, P.H., Beachy, R.N. (1988) Differential expression of conglycinin α' and β subunit genes in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **11**: 109-123
- Nkonge, C., Ballance, G.M. (1982) A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in micro-Kjeldahl digests. *J. Agric. Food Chem.* **30**: 416-420
- Okamuro, J.K., Jofuku, K.D., Goldberg, R.B. (1986) Soybean seed lectin gene and flanking nonseed protein genes are developmentally regulated in transformed tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8240-8244
- Osborne, T.B., Mendel, L.B. (1914) Nutritive properties of proteins of the maize kernel. *J. Biol. Chem.* **18**: 1-6
- Ottoboni, L.M.M., Leite, A., Targon, M.L.P.N., Crozier, A., Arruda, P. (1990 a) Characterization of the storage protein in seed of *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay. *J. Agric. Food Chem.* **38**: 631-635
- Ottoboni, L.M.M., Leite, A., Targon, M.L.P.N., Silva, M.J., Arruda, P. (1990 b) Heterogeneity of *Coix*, maize and teosinte prolamins detected by isoelectric focusing. *Rev. Bras. Genet.* **13**: 313-322
- Park, W.D., Lewis, E., Rubenstein, I. (1980) Heterogeneity of zein mRNA and protein in maize. *Plant Physiol.* **65**: 98-106

- Payne, P.I., Holt, L.M., Burgess, S.R., Shewry, P.R. (1986) Characterization by two-dimensional gel electrophoresis of the protein components of protein bodies, isolated from the developing endosperm of wheat (*Triticum aestivum*). *J. Cereal Sc.* **4**: 217-223
- Pernollet, J.C., Mosse, J. (1983) Structure and location of legume and cereal seed storage proteins. In: *Seed Proteins*, pp 155-191, Daussant, J., Mosse, J., Vaughan, J. (eds) Academic Press, London
- Prat, S., Cortadas, J., Puigdomenech, P., Palau, J. (1985) Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequence of the maize endosperm protein glutelin-2. *Nucl. Acids Res.* **13**: 1493-1504
- Prat, S., Perez-Grau L., Puigdomenech, P. (1987) Multiple variability in the sequence of a family of maize endosperm proteins. *Gene* **52**: 41-49
- Raghavan, V., Olmedilla, A. (1989) Spatial patterns of histone mRNA expression during grain development and germination in rice. *Cell Diff. and Develop.* **27**: 183-196
- Rahman, S., Shewry, P.R., Mifflin, B.J. (1982) Differential protein accumulation during barley grain development. *J. Exp. Botany.* **33**: 717-728
- Scherthaner, J.P., Matzke, M.A, Matzke, A.J.M. (1988) Endosperm-specific activity of a zein promoter in transgenic tobacco plants. *EMBO J.* **7**: 1249-1255
- Shewry, P.R., Field, J.M., Kirkman, M.A., Faulks, A.J., Mifflin, B.J. (1980) The extraction, solubility and characterization of two groups of barley storage polypeptides. *J. Exp. Bot.* **31**: 393-407
- Shewry, P.R., Mifflin, B.J. (1985) Seed storage proteins of the economically important cereals. In *Advances in cereal science and technology*, ed. Y. Pomeranz, St. Paul Minnesota **7**: 1-83
- Shewry, P.R., Tatham, A.S., Forde, J., Kreis, M., Mifflin, B.J. (1986) The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *J. Cereal Sci.* **4**: 97-106

- Sign, H., Sen, R., Baltimore, D., Sharp, P.A. (1986) A nuclear factor that binds to a conserved elements sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* **319**: 154-158
- Takaiwa, F., Kikuchi, S., Oono, K. (1986) The structure of rice storage protein glutelin precursor deduced from cDNA. *FEBS* **206**: 33-35
- Tanaka, K., Sugimoto, T., Ogawa, M., Kazai, Z. (1980) Isolation and characterization of two types of protein bodies in the rice endosperm. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 1633-1639
- Taylor, J.R.N., Schussler, L., Liebonberg, N.v.d.W. (1985) Protein body formation in the starch endosperm of developing *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds *S. Afr. J. Bot.* **51**: 35-40
- Torrent, M., Poca, E., Campos, N., Ludevid, M.D., Palau, J. (1986) In maize, glutelin-2 and low molecular weight zeins are synthesised by membrane-bound polyribosomes and translocated into microsomal membrane. *J. Plant Mol. Biol.* **7**: 393-403
- Ueng, P., Galili, G., Sapparana, V., Goldsborough, P.B., Dubé, P., Beachy, R.N., Larkins, B.A. (1988) Expression of a maize storage protein gene in petunia plants is not restricted to seeds. *Plant Physiol.* **86**: 1281-1285
- Venkateswarlu, J., Chaganti, R.S.K. (1973) Job's Tears (*Coix lacryma-jobi* L.) ICAR Tech. Bull. (Agric.) **43-44**: 1-54
- Viotti, A., Sala, E., Marotta, R., Alberi, P., Balducci, C., Soave, C. (1979) Genes and mRNAs coding for zein polypeptides in *Zea mays*. *Eur. J. Biochem.* **102**: 211-222
- Weber, E., Neuman, D. (1980) Protein bodies, storage organelles in plant seeds. *Biochem. Physiol. Pflanz.* **175**: 279-306
- Weiseng, K., Schell, J., Kahl, G. (1988) Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. *Ann. Rev. Genet.* **22**: 421-477
- Wienand, U., Feix, G. (1978) Electrophoretic fractionation and translation *in vitro* of poly-A-containing RNA from maize endosperm. *Eur. J. Biochem.* **92**: 605-611