

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/10682
IB/80048

DOUTORADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1989

LAURA M. M. OTTOBONI



*Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pela candidata Laura M. M.
Ottoni e aprovada pela comissão julgadora*

Arruda

**As Proteínas do Endosperma de Coix lacryma-jobi L. var.
Adlay: Caracterização e Comparação com Proteínas do
Endosperma do Milho e Teosinte**

Tese apresentada ao Insti-
tuto de Biologia da Uni-
versidade Estadual de Cam-
pinas para a obtenção do
Título de Doutor em Ciên-
cias.

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO ARRUDA

**CAMPINAS
Estado de São Paulo - Brasil
1989**



CLASSIF.	<u>I</u>
AUTOR.	<u>Ot 3 p</u>
V.	EX.
TOMBO BC/10682	
<u>1B/891</u>	

1B/80048
pc/10682

À minha mãe,

Que sempre deu-me
forças para enfrentar
todos os desafios.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Arruda, pela orientação, estímulo e contribuição em minha formação científica e realização deste trabalho.

Ao Dr. Adílson Leite, pelo estímulo e valiosa colaboração na realização dos experimentos de Southern Blot.

Ao Prof. Dr. Renato Bonatelli Júnior, Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles, Prof. Dr. Ladaslav Sodek e Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, que realizaram o exame prévio desta tese, pela leitura e importantes sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, Prof. Dr. Antonio Celso Novaes de Magalhães, Prof. Dr. Renato Bonatelli Júnior, Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles, Prof. Dr. Hiroshi Aoyama e Prof. Dr. Valdomiro Carlos Sgarbieri, membros da Banca Examinadora desta tese.

A bióloga Maria Luisa N. Targon, pela inestimável colaboração e leitura minuciosa da tese.

Ao biólogo Márcio José da Silva, pelo valioso auxílio na elaboração das fotografias desta tese.

À bióloga Silvia R. Turcinelli, pela dedicação no auxílio do preparo das soluções utilizadas nos experimentos.

A Silvia Helena Costa Crivelenti, pela prestatividade e eficiência com que desempenhou a parte burocrática da tese.

Ao Prof. Dr. Octávio Henrique Pavan, pela pronta disposição a permitir o uso do Laboratório de Virologia de Insetos e às colegas de pós-graduação deste Laboratório, Nancy, Alejandra, Jaqueline, Helena e Cristina, pelo incentivo e amizade.

À Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato, pela pronta disposição com que permitiu o uso do Laboratório de Genética de Microrganismos e às colegas de pós-graduação deste Laboratório, Andréa, Rejane e Suzy, pela amizade.

Ao Prof. Dr. William José da Silva, pelo fornecimento do germoplasma utilizado nesta tese.

A Silvia M. M. Ottoboni, pela dedicação e paciência no trabalho de digitação e montagem da tese.

À Bacharel em Computação Cláudia Mariscal R. Alves e à bióloga Rose Sakata, pelo auxílio na utilização do computador.

Aos colegas do Laboratório de Genética Vegetal, Luciane, Márcia, Cristiane, Fátima, Ricardo, Bia e Solange, pelo incentivo e amizade.

Ao Jurandir, Helena, Sandra, Marcos e Creuza, da Secretaria do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, pela eficiência com que sempre providenciaram o material necessário para os experimentos.

À minha família, Antônia, Mariinha, Laura, Vicente, Dayse, Luís, Darcy, Liane e Aron, pelo carinho e companheirismo.

Agradeço às entidades responsáveis pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho: FAPESP, CAPES, FINEP-PADCT, CABIO, CNPq-PIG V.

ABREVIACÕES

A	adenina
Ala	alanina
Arg	arginina
ASG	glutelina solúvel em álcool
BSA	soro albumina bovina
C	citossina
cDNA	DNA complementar
Cys	cisteína
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo 5'-trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamina tetracético
FMOC	9-fluorenil-metilcloroformato
G	guanina
Gln	glutamina
H ³	tríteo
HEPES	ácido N-2-hidroxietyl-piperazina-N'- 2-etanosulfônico
His	histidina
HPLC	cromatografia líquida de alta resolução
IEF	focalização isoeletrica
Ile	isoleucina
Kb	quilobase
kDa	quilodalton
LB	Luria-Bertani
Leu	leucina
LM-II	Landry-Moureaux II
LM-III	Landry-Moureaux III
mRNA	RNA mensageiro
ONPG	orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
32p	fósforo 32
pb	pares de bases
pI	ponto isoeletrico
Pro	prolina
qsp	quantidade suficiente para
RER	retículo endoplasmático rugoso
RNA	ácido ribonucléico
RSP	proteína solúvel reduzida
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
Ser	serina
T	timina
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N ¹ , N ¹ -tetrametiletilenodiamina
Tyr	tirosina

UV luz ultravioleta
Val valina
2-D 2-dimensões
2-ME 2-mercaptoetanol

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	01
1. Proteínas da semente do milho.....	01
2. Características da principal proteína de reserva do milho -- zeína.....	06
3. Heterogeneidade de carga da zeína.....	14
4. Loci reguladores e seus efeitos na zeína.....	17
5. Características dos genes que codificam zeína.....	24
6. Os representantes da tribo Andropogoneae.....	25
II. OBJETIVOS.....	29
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
1. Material vegetal.....	31
2. Extração das proteínas de reserva.....	33
3. Quantificação das proteínas de reserva pelo método de micro-Kjeldahl.....	34
4. Análise de aminoácidos.....	36
5. Eletroforese de proteínas em géis de acrilamida contendo SDS.....	37
6. Focalização isoeletrica das prolaminas em géis de agarose.....	41
7. Análise das prolaminas em 2-D.....	44
8. Purificação das prolaminas do Adlay.....	45
9. Preparo dos antisoros contra C2 e C3.....	47
10. Análise imunológica das prolaminas.....	49
11. Isolamento do DNA genômico de plantas.....	51
12. Digestão do DNA genômico das plantas com enzimas de restrição.....	54
13. Transferência dos DNAs genômicos digeridos para membranas de nylon.....	55
14. Transformação da linhagem de E. coli HB101 com os clones de zeína pZ 22,3 e pZ 19,1.....	57
15. Extração do DNA plasmidial em pequena escala.....	60
16. Extração do DNA plasmidial em larga escala.....	62
17. Isolamento dos fragmentos correspondentes aos genes da zeína dos clones pZ 22,3 e pZ 19,1.....	65
18. Marcação dos fragmentos correspondentes aos genes da zeína.....	67

19. Hibridização dos filtros na presença de formamida.....	70
IV. RESULTADOS.....	72
1. Caracterização das proteínas do endosperma do Adlay.....	72
2. As proteínas do endosperma e o DNA genômico do Adlay e do Maya.....	87
2.1. Comparação das proteínas do endosperma do Adlay com as do Maya.....	87
2.2. Comparação dos fragmentos de restrição do DNA genômico do Adlay com os do Maya quando hibridizados com as sondas de zeína pZ 22,3 e pZ 19,1.....	100
3. As proteínas e o DNA de Coix, milho e teosinte.....	108
3.1. Caracterização e comparação das proteínas do endosperma de teosinte com as de milho e Coix.....	106
3.2. Análise em IEF das prolamínas de Coix, milho e teosinte.....	110
3.3. Comparação dos fragmentos de restrição do DNA genômico de milho e teosinte hibridizados com as sondas de zeína pZ 22,3 e pZ 19,1.....	121
V. DISCUSSÃO.....	130
VI. CONCLUSÕES.....	142
VII. SUMÁRIO.....	145
VIII. SUMMARY.....	149
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	153

I - INTRODUÇÃO

I.1. PROTEÍNAS DA SEMENTE DO MILHO

Nos cereais, as proteínas correspondem a aproximadamente 10% do peso seco das sementes. O estudo das proteínas da semente é fundamentado no trabalho desenvolvido por OSBORNE (1909, 1914), que classificou estas proteínas de acordo com a sua solubilidade em diferentes solventes. Assim, as proteínas solúveis em água foram designadas ALBUMINAS; as solúveis em soluções salinas foram designadas GLOBULINAS; as solúveis em álcool, PROLAMINAS; e as solúveis em soluções ácidas diluídas ou soluções básicas, GLUTELINAS. Foi somente na última década que a classificação de OSBORNE começou a ser questionada devido ao aparecimento de novas metodologias de extração (BRIGHT e SHEWRY, 1983). BYERS et al. (1983), por exemplo, observaram que a extração das glutelinas do trigo variava de acordo com fatores como a temperatura das extrações, solventes, tampões etc. Baseado neste fato, BYERS et al (1983) propuseram que as proteínas da semente fossem classificadas em: proteínas metabólicas, proteínas de reserva e proteínas estruturais.

As proteínas de reserva são aquelas que se acumulam em quantidades substanciais na semente. Alguns dos

fatores que comumente caracterizam este tipo de proteína são: (a) sua importância na alimentação humana e animal; (b) sua composição peculiar de aminoácidos; nos cereais, por exemplo, as proteínas de reserva são deficientes em aminoácidos essenciais; (c) sua localização em organelas de reserva denominadas de corpúsculos protéicos; (d) grupos relacionados de polipeptídeos geralmente compõem estas proteínas (PERNOLLET e MOSSÉ, 1983; LARKINS et al., 1984).

Aparentemente, as proteínas de reserva não possuem nenhuma função enzimática (LARKINS, 1982). A principal função destas proteínas é fornecer nitrogênio reduzido (N) ao embrião e à plântula durante a germinação e nas fases iniciais de crescimento. Nestes estágios, as proteínas de reserva são hidrolisadas e os aminoácidos são liberados (SPENCER, 1984). As proteínas metabólicas e estruturais (albuminas, globulinas e algumas glutelinas) também são hidrolisadas e os aminoácidos liberados são utilizados pela plântula durante o desenvolvimento. Contudo, esta é uma função secundária das proteínas metabólicas e estruturais (WILSON, 1987).

As prolaminas são as proteínas de reserva encontradas em maior quantidade no endosperma dos cereais, com exceção do arroz e da aveia (MIFLIN e SHEWRY, 1979). O alto teor de prolina e glutamina observado nestas proteínas foi responsável pela denominação de prolaminas dada a elas por OSBORNE (1908). O nome dado para as prolaminas dos diferentes cereais é baseado no nome da espécie. Assim sendo, a prolamina do milho (*Zea mays* L.)

é denominada zeína, a prolamina da cevada (*Hordeum vulgare* L.) é denominada hordeína etc. (LARKINS et al., 1984).

A zeína é composta por um grupo de prolaminas que representa mais de 50% das proteínas encontradas no endosperma. Essa proteína é responsável pelo baixo teor nutritivo do milho, uma vez que ela apresenta deficiência em aminoácidos essenciais, principalmente lisina e triptofano. Outras características da zeína são o tamanho relativamente pequeno e a heterogeneidade de carga (PAYNE e RHODES, 1982). A síntese da zeína ocorre no endosperma em desenvolvimento, entre 12 a 50 dias após a polinização (PEDERSEN et al., 1982). Durante a biossíntese da zeína, uma sequência sinalizadora localizada no terminal amino do polipeptídeo que está sendo sintetizado parece iniciar uma interação entre o ribossomo e o retículo endoplasmático rugoso (RER), resultando na formação de um polissomo ligado à membrana (LARKINS et al., 1979). Este polipeptídeo sinalizador é removido à medida em que as proteínas entram no RER e se associam para formar os corpúsculos protéicos (LARKINS et al., 1984). Os corpúsculos protéicos são limitados por uma membrana que apresenta polissomos aderidos à sua superfície (LARKINS, 1979). Foi sugerido por BURR e BURR (1979) que os peptídeos sinalizadores das zeínas, sintetizados nos polissomos aderidos às membranas dos corpúsculos protéicos, são removidos quando os polipeptídeos passam pela membrana do corpúsculo protéico para ali se depositarem. O conteúdo e a concentração da zeína parecem diminuir em direção ao centro da semente, já que nesta direção os

corpúsculos protéicos tornam-se menores e menos frequentes (BURR e BURR, 1979).

Com exceção da aveia, onde as globulinas são as principais proteínas de reserva, nos cereais em geral as albuminas e globulinas estão concentradas no embrião e na camada de aleurona da semente (PAYNE e RHODES, 1982). No milho, as albuminas e globulinas representam juntas 6% da proteína total encontrada no endosperma (HANSEL et al., 1973). Ao contrário do endosperma, no embrião do milho as albuminas chegam a representar 80% ou mais da proteína total (TSAI, 1983). As albuminas e globulinas são sintetizadas logo no início do desenvolvimento da semente (MISRA et al., 1975a; TSAI, 1979b). As albuminas representam principalmente as enzimas envolvidas no metabolismo do grão em desenvolvimento (PAYNE e RHODES, 1982). Poucas das muitas enzimas encontradas nesta fração foram isoladas e caracterizadas (WILSON, 1983). Entre as enzimas identificadas em gel desnaturante de poliacrilamida estão a sacarose sintetase e as enzimas envolvidas na síntese de amido, que são requeridas em grandes quantidades, já que a síntese de amido é a principal reação metabólica do endosperma (WILSON, 1987). Não está claro qual a função das globulinas no endosperma, isto é, não se sabe se estas proteínas estariam envolvidas em metabolismo, estrutura ou reserva (PAYNE e RHODES, 1982). Quanto ao embrião, KHAVKIN et al. (1978) sugerem as globulinas como sendo as principais proteínas de reserva neste tecido. Elas seriam responsáveis pelo fornecimento dos aminoácidos utilizados na síntese de enzimas envolvidas na hidrólise das proteínas de reserva do endosperma

durante a germinação. As globulinas do milho têm sido pouco estudadas devido à sua baixa porcentagem no endosperma.

As glutelinas representam a fração protéica mais difícil de ser caracterizada e definida por duas razões: (1) não são solubilizadas facilmente e (2) qualquer resíduo de albumina, globulina ou prolamina remanescente de extrações sequenciais prévias irá contaminar a fração de glutelina, que é a última a ser extraída do endosperma (PAYNE e RHODES, 1982). Foi observado que quando as glutelinas são extraídas com soluções ácidas e submetidas a eletroforese em géis de amido, elas não conseguem penetrar os poros do gel devido ao seu alto peso molecular (BOUNDY et al., 1967). Contudo, quando um agente redutor como o 2-mercaptoetanol (2-ME), por exemplo, é incluído na extração há uma redução do peso molecular, o que indica que as glutelinas são compostas por subunidades mantidas juntas através de pontes dissulfeto (PAYNE e RHODES, 1982).

A porcentagem de glutelinas no endosperma do milho gira em torno de 34% (HANSEL et al., 1973). Apesar da quantidade de deposição de glutelinas no endosperma aumentar com a quantidade de zeína, a sua porcentagem na proteína total do grão diminui com o decorrer do desenvolvimento do endosperma, já que a velocidade de deposição de zeína é maior (MUNTZ, 1982). As glutelinas são as principais proteínas de reserva do arroz. Neste cereal, no qual elas representam 80% da proteína total, a sua síntese predomina durante todo o período de acumulação das proteínas de reserva (PALMIANO et al., 1968).

Acredita-se que as glutelinas do milho sejam proteínas estruturais (TSAI, 1983). WOLF et al. (1967) mencionaram que as glutelinas seriam responsáveis pela formação de uma matriz ao redor dos grãos de amido e dos corpúsculos protéicos da zeína. Posteriormente, CHRISTIANSON et al. (1969, 1974) utilizaram centrifugação em gradiente de sacarose para isolar as proteínas da matriz do endosperma em desenvolvimento. Ficou constatado que a composição de aminoácidos destas proteínas é similar à composição de aminoácidos das glutelinas extraídas do endosperma com soluções contendo 2-ME e dodecil sulfato de sódio (SDS). Quando as proteínas da matriz são tratadas com 2-ME, as ligações que mantêm estas proteínas juntas são rompidas (WALL e PAULIS, 1978), liberando assim os grãos de amido e os corpúsculos protéicos.

I.2. CARACTERÍSTICAS DA PRINCIPAL PROTEÍNA DE RESERVA DO MILHO -- ZEÍNA

Os primeiros estudos sobre os solventes e condições de extração da zeína foram feitos por OSBORNE (1897) e OSBORNE e MENDEL (1914). Ficou concluído destes estudos que a zeína é solúvel em álcool, ácido acético e fenol. As zeínas são também solúveis em detergentes (TSAI, 1983). Quanto às soluções alcoólicas, OSBORNE (1897) demonstrou que a zeína pode ser extraída com metanol 95%, etanol 60 a 85% e isopropanol 60%. Entre as soluções alcoólicas, as mais utilizadas para extração

da zeína são as de etanol ou isopropanol 60 a 70% em água (ESEN, 1986). Além dos solventes, outros fatores afetam a extração quantitativa da zeína; são eles: a quantidade de lipídios na farinha, a temperatura da extração e os tipos de interações entre as proteínas (TSAI, 1983). Foi sugerido (BAUDET et al., 1966; DALBY, 1974) que a extração da zeína quando feita à temperatura ambiente não é tão eficiente quanto as extrações realizadas a 60°C por 90 minutos. O uso de agentes redutores na solução de extração também torna a solubilização da zeína mais eficaz (TSAI, 1983).

A zeína é composta por proteínas que diferem na sua solubilização em álcool dependendo da presença ou ausência do agente redutor 2-ME (LARKINS et al., 1984). O fato de metodologias ligeiramente diferentes terem sido usadas pelos diversos pesquisadores para a extração da zeína contribuiu para o aparecimento da nomenclatura arbitrária e complicada existente atualmente (SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação). Assim sendo, a zeína extraída do endosperma do milho em soluções de etanol 70% ou isopropanol 55% na ausência do agente redutor é conhecida como: LM-II, zeína-1 (LANDRY e MOUREAUX, 1970; SODEK e WILSON, 1971). Geralmente, após a extração com soluções de álcool sem 2-ME segue-se uma segunda extração com soluções de álcool contendo 2-ME. A zeína extraída nestas condições é conhecida como: LM-III, glutelina-1, zeína-2, glutelina solúvel em álcool (ASG) e zeína-similar (LANDRY e MOUREAUX, 1970; SODEK e WILSON, 1971; PAULIS e WALL, 1971, 1977a; MISRA et al., 1975). A zeína

extraída diretamente em soluções de álcool contendo o agente redutor é chamada de zeína total (WILSON, 1987).

ESEN (1986) separou a zeína através de solubilidade diferencial em três frações com composição de polipeptídeo própria. Assim sendo, essas três classes foram designadas de α -zeína, β -zeína e γ -zeína (ESEN, 1986; WANG e ESEN, 1986). A α -zeína é solúvel em etanol 95% (MCKINNEY, 1958) ou isopropanol 90% (ESEN, 1986). Ela representa 80% da zeína total (ESEN, 1986). A β -zeína é solúvel em soluções de isopropanol 60% e representa 15% da zeína total. Apesar de ser solúvel em isopropanol 60%, a extração da β -zeína é limitada quando o agente redutor não é adicionado ao solvente (ESEN, 1986). A γ -zeína é extraída em soluções de álcool ou em água na presença do agente redutor e representa 5 a 10% da zeína total (ESEN, 1986).

Quando a zeína total é submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), ela geralmente se subdivide em cinco classes de peso molecular aparente de: 27, 22, 19, 14-16 e 10 kDa (SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação). Apesar dos pesos moleculares aparentes destas classes de zeína variarem de gel para gel, como pode ser constatado nas diversas publicações (GIANAZZA et al., 1977; LEE et al., 1976), o perfil de separação da proteína é reconhecido facilmente nos géis (BUNCE et al., 1985). Esta variação nos pesos moleculares publicados levou WILSON (1987) a propôr que as diferentes classes de zeína fossem

denominadas por letras, ao invés de peso molecular aparente. Assim sendo, a classe de 22 kDa foi denominada de zeína-A; a classe de 19 kDa foi denominada de zeína-B; as classes entre 14-16 kDa foram denominadas de zeína-C; e a classe de 10kDa, de zeína-D. WILSON (1987) referiu-se à zeína de 27 kDa como proteína solúvel reduzida (RSP). Esta proteína é conhecida também como glutelina reduzida solúvel em álcool (PAULIS e WALL, 1971) e glutelina-2 (PRAT et al., 1985). A denominação de α , β e γ zeína também ajuda no agrupamento das diversas classes de peso molecular aparente. Assim, a α -zeína engloba as proteínas com peso molecular aparente entre 19 a 24 kDa, a β -zeína representa as proteínas de 14 a 16 kDa e a γ -zeína representa a classe de 27 kDa (SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação).

Foi constatado que as diferentes classes de zeína apresentam características próprias. A zeína de 27 kDa se acumula ao redor da parte interna da membrana dos corpúsculos protéicos (LUDEVID et al., 1984). A presença de polipeptídeo sinalizador na zeína de 27 kDa é conivente com a presença desta proteína dentro dos corpúsculos protéicos (LUDEVID et al., 1984). Uma das características da zeína de 27 kDa é seu alto teor de prolina (25%) (SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação). PRAT et al. (1985) subdividiram a sequência madura da zeína de 27 kDa em cinco regiões. Segundo PRAT et al. (1985), a primeira região no terminal -NH₂ é um segmento de 11 aminoácidos. Seguindo-se a este segmento, a segunda região, denominada região repetitiva, é composta por 8 cópias do hexapeptídeo Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu. A terceira região é composta por uma

sequência Pro-X alternada entre os resíduos 70 e 91. O terminal -COOH é rico em glutamina e foi subdividido em dois, dando origem à quarta e quinta região. A quarta região é composta pelos resíduos de 92 a 148. Esta região é rica em cisteína e apresenta certa homologia interna, já que o heptapeptídeo Gln-Cys-X-Glx-X-Leu-Arg é repetido por 2 vezes e a sequência relacionada Gln-Cys-Gln-Ser-Leu-Arg também ocorre nesta região. A quinta região começa no resíduo 148 e não apresenta homologia interna. Existe uma certa homologia entre a zeína de 27 kDa e a zeína de 15 kDa (SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação). Esta homologia ocorre entre os aminoácidos 34 a 49 da zeína de 15 kDa e os de 112 a 125 da zeína de 27 kDa. A outra homologia observada para estas proteínas é entre os aminoácidos 61 a 73 da zeína de 15 kDa e os de 130 a 141 da zeína de 27 kDa (SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação).

O peso molecular dos 204 resíduos da zeína de 27 kDa foi deduzido com base na sequência do clone de cDNA pME 119 da proteína como sendo de 21.780 daltons (PRAT et al., 1985). Duas possíveis explicações foram dadas por WANG e ESEN (1986) para o fato do peso molecular aparente da proteína calculado em géis de SDS-PAGE ter aproximadamente 5 kDa a mais que o peso molecular calculado através da sequência de aminoácidos. A primeira explicação seria que os aminoácidos histidina e arginina presentes na proteína reduziram a carga negativa do complexo proteína-SDS, que ante a influência de um campo elétrico migra em direção do anodo no gel de poliacrilamida. Assim sendo, a redução da carga negativa diminuiria a velocidade de migração da proteína

no gel. A outra possibilidade seria que a preponderância da prolina na estrutura primária da proteína pode fazer com que as cadeias de polipeptídeos se estendam completamente como resultado da destruição da estrutura secundária e terciária da proteína pelo agente desnaturante. Logo, uma cadeia de polipeptídeos estendida iria migrar mais vagarosamente no gel do que uma do mesmo tamanho parcialmente desnaturada.

As zeínas de 19 e 22 kDa apresentam uma composição de aminoácidos similar, sendo que os aminoácidos mais abundantes nestas frações são a glutamina (20%), leucina (20%), alanina (14%) e prolina (9%) (LARKINS et al., 1984). Os comprimentos das proteínas maduras variam de 210 a 245 aminoácidos (SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação). A estrutura primária completa destas proteínas foi primeiramente determinada por GERAGHTY et al. (1981) através do sequenciamento do clone de cDNA A30. Entre as características observadas na sequência de aminoácidos da proteína está o aparecimento de repetições de dipeptídeos. Assim sendo, o dipeptídeo Ala-Ala aparece 7 vezes; o dipeptídeo Leu-Leu, 8 vezes; e o dipeptídeo Gln-Gln, 14 vezes. Outra característica observada foi a presença de repetições de peptídeos de 20 aminoácidos, que aparecem aproximadamente 8 vezes na região central da proteína (GERAGHTY et al., 1981). Segundo LARKINS (1983), a primeira destas sequências repetitivas que ocorrem na zeína de 19 e 22 kDa começa entre 35 a 36 aminoácidos do terminal -NH₂. O terminal -COOH que se segue a estas repetições é levemente maior na zeína de 22 kDa, sendo então responsável pela diferença de tamanho encontrada

entre as duas zeínas (LARKINS, 1983). ARGOS et al. (1982) utilizaram-se de modelos estruturais gerados em computadores e propuseram que os peptídeos repetitivos são alfa-hélices que interagem através de pontes de hidrogênio para dar a configuração de bastão às moléculas de proteínas. De acordo com o modelo, os resíduos de glutamina ficariam nos finais das hélices e formariam pontes de hidrogênio com moléculas de proteínas vizinhas, o que poderia contribuir para a agregação das proteínas nos corpúsculos protéicos (ARGOS et al., 1982; LARKINS, 1983; SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação). Foi levantada a hipótese de que se estas sequências repetitivas fossem de fato importantes para a estrutura do polipeptídeo e agregamento do mesmo nos corpúsculos protéicos, qualquer tentativa de engenharia da proteína envolvendo estas sequências seria desvantajosa (LARKINS, 1983).

A composição de aminoácidos das diversas classes de zeína é similar no sentido de que todas são ricas nos aminoácidos glutamina, leucina, alanina e prolina (GIANAZZA et al., 1977). Contudo, as zeínas de 27, 15 e 10 kDa são caracterizadas pelo alto teor de metionina e cisteína (GIANAZZA et al., 1977). O fato destas classes de zeína só serem extraídas na presença do agente redutor levou PAULIS et al. (1969) a proporem que estas proteínas interagem através de ligações dissulfeto (-S-S-). De acordo com GIANAZZA et al. (1977), as pontes -S-S- formadas pelas zeínas de 15 e 10 kDa estariam envolvidas na formação dos corpúsculos de zeína, já que elas estabilizam agregados macromoleculares. PEDERSEN et al. (1986) determinaram a sequência de aminoácidos da zeína de 15 kDa

através do sequenciamento do clone genômico gZ15A. Ficou constatado que a proteína contém 160 aminoácidos, sendo que 18 resíduos são de metionina e 7 são de cisteína, formando juntos 15,6% do total de aminoácidos. As metioninas estão localizadas em três grupos de aproximadamente 30 aminoácidos cada um. O primeiro, entre os resíduos de 1 a 30, contém 4 metioninas; o segundo, entre os resíduos de 59 a 89, contém 7 metioninas; e o terceiro, entre os resíduos de 115 a 145, contém 7 metioninas. Estes blocos estão separados um do outro por aproximadamente 30 aminoácidos (PEDERSEN et al., 1986). Duas regiões de homologia foram identificadas entre os resíduos de 45 a 50 (Ala-Ala-Ala-Pro-Tyr-Tyr) e os de 154 a 160 (Ala-Ala-Ile-Pro-Pro-Tyr-Tyr), mas nenhuma sequência repetitiva de peptídeos foi identificada na zeína de 15 kDa (PEDERSEN et al., 1986). Também não foi identificada nenhuma homologia de sequência entre as zeínas de 22 e 19 kDa e a de 15 kDa.

Apesar da zeína de 10 kDa ter uma composição de aminoácidos similar à da zeína de 15 kDa (GIANAZZA et al., 1977), elas diferem na solubilização em álcool (ESEN, 1986). KIRIHARA et al. (1988) determinaram a sequência de nucleotídeos do clone de cDNA 10kZ-1 e, através desta sequência, ficou constatado que a zeína de 10 kDa é composta por uma sequência de 129 aminoácidos. Esta sequência é extremamente rica em metionina (22,5%) (KIRIHARA et al., 1988). PHILLIPS et al. (1981) detectaram um teor de 30% de metionina nas proteínas da semente da linhagem de milho BSSS-53. Foi constatado que o aumento de metionina nesta linhagem era o resultado do aumento dos níveis da

zeína de 10 kDa no endosperma (PHILLIPS e MCCLURE, 1985). Quando os níveis de RNA da zeína de 10 kDa nas linhagens de milho BSSS-53 e W23 foram comparados, ficou constatado que eles eram mais substanciais na linhagem BSSS-53 (KIRIHARA et al., 1988). Duas hipóteses foram levantadas para explicar esses aumentos. A primeira atribui o aumento dos níveis de RNA a um aumento da transcrição do gene (s) da zeína de 10 kDa e a segunda levanta a possibilidade da estabilidade do RNA encontrado na linhagem BSSS-53 ser diferente da encontrada na linhagem W23 (KIRIHARA et al., 1988).

I.3. HETEROGENEIDADE DE CARGA DA ZEÍNA

Quando submetida a análise em gel de focalização isoelétrica (IEF), a zeína total apresenta um padrão bastante heterogêneo (GIANAZZA et al., 1977). Neste tipo de gel, a zeína é separada em aproximadamente 15 componentes (SOAVE et al., 1975). WILSON (1984) introduziu avanços na metodologia de separação dos polipeptídeos da zeína em IEF e detectou de 14 a 17 bandas para cada linhagem analisada, sendo que de 7 a 10 destas bandas eram bandas principais. Os componentes de IEF são quantitativa e qualitativamente diferentes nas várias linhagens de milho (GIANAZZA et al., 1976; GENTINETTA et al., 1975). A heterogeneidade de carga encontrada na zeína é independente de interações com o meio ambiente e do estágio de desenvolvimento do endosperma, já que não existe aparecimento de outras bandas ou

supressão das bandas originalmente encontradas no início da síntese da proteína (RIGHETTI et al., 1977).

Para testar se a heterogeneidade observada para a zeína não era devida à presença de grupamentos prostéticos, já que a perda de alguns resíduos de açúcar pode resultar em microheterogeneidade, RIGHETTI et al. (1977) submeteram extratos de zeína a IEF e a seguir coraram os géis com o reagente periódico fucsina-ácida para glicoproteínas e com Sudan Black para detecção de lipoproteínas. Nenhum resíduo de açúcar foi detectado nas bandas de IEF da zeína e apenas um dos componentes menores de pI 3 foi corado com Sudan Black, mas constatou-se que este componente era um resíduo de proteína da membrana do corpúsculo protéico. A possibilidade das interações anfólito-zeína serem as causas da heterogeneidade também foram descartadas por RIGHETTI et al. (1977), já que os mesmos padrões observados nos géis foram observados em gradientes de densidade de sorbitol e quando as proporções anfólito-proteína foram alteradas. A heterogeneidade da zeína também não parece ser o resultado da desamidação parcial de glutamina e asparagina, já que experimentos in vitro demonstraram que a zeína é resistente à desamidação; contudo, a possibilidade de uma desamidação parcial ocorrer in vitro não pode ser completamente excluída (RIGHETTI et al., 1977).

Várias evidências de que a heterogeneidade da zeína observada em IEF não é devida a artefatos foram sugeridas. Uma destas evidências advém do fato de que o padrão de IEF da

proteína é específico para cada genótipo e, além disso, os resultados de cruzamentos entre linhagens homozigotas de milho demonstraram que as gerações filiais herdam cada uma das bandas de IEF da zeína como unidades Mendelianas simples (RIGHETTI et al., 1977; SOAVE et al., 1978a). Outras evidências são que as zeínas sintetizadas in vitro demonstram a mesma heterogeneidade de carga das zeínas sintetizadas in vivo (VIOTTI et al., 1978) e que os polipeptídeos de zeína variam na sua sequência de aminoácidos (VITALE et al., 1980).

As zeínas de 22 e 19 kDa são responsáveis por grande parte da heterogeneidade observada quando a zeína total é submetida a IEF (HEIDECKER e MESSING, 1986; SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação). HEIDECKER e MESSING (1986) sugeriram que as variações de aminoácidos nas sequências repetitivas das zeínas de 22 e 19 kDa seriam responsáveis pela heterogeneidade de carga destas proteínas. Esta complexidade da zeína observada em análises de IEF está em concordância com a heterogeneidade observada nas sequências de DNA dos clones de zeína (GALILI et al., 1987). A heterogeneidade de carga das zeínas de 22 e 19 kDa sugere que múltiplos genes codificam para estas proteínas (MARKS e LARKINS, 1982). Enquanto as zeínas de 22 e 19 kDa apresentam uma grande heterogeneidade de carga, as zeínas de 15 e 10 kDa são compostas por apenas um ou dois polipeptídeos, o que está em concordância com a detecção de apenas um ou dois genes que codificam para estas proteínas no genoma do milho (LARKINS et al., 1984; KIRIHARA et al., 1988). Quanto à zeína de 27 kDa, apesar de ESEN et al. (1981) terem detectado um total de 14 a 16

componentes em IEF em gel de poliacrilamida contendo uréia 6M e anfólitos de pH 6-9,5, estes componentes não parecem ser codificados por uma família multigênica, já que as informações obtidas da sequência de 7 clones independentes sugerem que uma única sequência codifica para a proteína (WANG e ESEN, 1986). Nenhuma explicação conclusiva foi dada por WANG e ESEN (1986) para a heterogeneidade de carga observada para a zeína de 27 kDa em IEF.

O sistema de focalização isoelétrica da zeína tem sido amplamente empregado para a determinação do padrão da proteína em diferentes linhagens de milho, o que é extremamente importante para a caracterização e identificação destas linhagens (NUCCA et al., 1978). Com a caracterização das linhagens, torna-se possível detectar qualquer tipo de contaminação entre linhagens diferentes e a realização de estudos taxonômicos, como o desenvolvido por NUCCA et al. (1978), onde 50 linhagens diferentes foram agrupadas de acordo com as suas respectivas origens.

I.4. LOCI REGULADORES E SEUS EFEITOS NA ZEÍNA

Várias mutações que reduzem a síntese de prolamina foram identificadas no milho (SOAVE e SALAMINI, 1984). Entre estas mutações estão os genes mutantes opaco-2 (o2), opaco-6 (o6), opaco-7 (o7), floury-2 (fl2) e De-B30. Estas

mutações aumentam o valor nutritivo da semente, já que ao reduzirem a porcentagem de zeína no endosperma há um aumento das outras frações protéicas (albuminas, globulinas e glutelinas) que são ricas em lisina e triptofano (DIFONZO et al., 1977; SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação). Quanto à disposição destes genes no genoma do milho, os genes opaco-2 e De-B30 estão localizados no braço curto do cromossomo 7, na mesma região onde foram localizados 7 genes que codificam para a zeína de 19 kDa e 1 gene que codifica para a zeína de 10 kDa (SOAVE e SALAMINI, 1984). O gene floury-2 está localizado no braço curto do cromossomo 4, na mesma região onde foram localizados 5 genes da classe de zeína de 22 kDa e 3 genes da classe de zeína de 19 kDa; ainda no cromossomo 4, foram localizados genes da zeína de 22 kDa no braço longo (SOAVE e SALAMINI, 1984). O gene opaco-7 está localizado no braço longo do cromossomo 10 e associado a este gene está um gene da zeína de 22 kDa (SOAVE e SALAMINI, 1984). A localização do gene opaco-6 no genoma do milho é desconhecida (SOAVE e SALAMINI, 1984). É interessante mencionar que um gene que codifica a zeína de 15 kDa foi encontrado no braço longo do cromossomo 6 (SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação).

Entre as mutações que afetam a síntese de zeína, a opaco-2 foi uma das primeiras a ser identificada (MERTZ et al., 1964). Esta mutação é recessiva e faz com que a síntese de zeína se inicie após a data prevista de 12 dias após a polinização (LARKINS et al., 1984). A velocidade de deposição da zeína é baixa neste mutante e termina aproximadamente 35 dias após a polinização, enquanto que em genótipos normais ela termina

50 dias após a polinização (Tsai, 1983; Larkins et al., 1984). Como resultado, as sementes opaco-2 têm 50% a menos de zeína do que as sementes normais (LARKINS et al., 1984), sendo que a classe de zeína mais afetada é a de 22 kDa (LEE et al., 1976). Duas razões contribuem para as sementes opaco-2 terem um teor mais elevado de aminoácidos essenciais do que as sementes normais. A primeira é, obviamente, a redução da zeína e a segunda é a redução do peso do endosperma com concomitante aumento do peso do embrião (TSAI, 1983). A razão pela qual o gene opaco-2 não é comumente incorporado em linhagens de milho, já que ele aumenta o valor nutritivo do cereal, é que ele introduz efeitos colaterais indesejáveis, como redução na produção e endosperma quebradiço, o que contribui para perdas durante a colheita, além de provocar uma maior susceptibilidade ao ataque de doenças e insetos (TSAI, 1983).

As mutações opaco-6 e opaco-7 também são recessivas e causam redução na síntese de zeína, sendo que a mutação opaco-6 causa uma redução generalizada da zeína, afetando igualmente todas as classes da proteína (SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação). A mutação opaco-7 afeta principalmente a classe de 19 kDa da zeína (DI FONZO et al., 1980). Do mesmo modo que a mutação opaco-6, a mutação floury-2 também afeta todos os polipeptídeos da zeína, sendo que a porcentagem desta proteína que a mutação reduz é dependente da dose do gene floury-2 presente no endosperma (LARKINS et al., 1984). Na condição de homozigoto, no endosperma triplóide, o floury-2 inibe aproximadamente 40% da zeína (SOAVE e SALAMINI,

1984). Quanto à mutação De-B30, ela é dominante e causa uma redução de 30% da zeína, afetando principalmente a classe de 22 kDa (LARKINS et al., 1984).

DI FONZO et al. (1980) utilizaram a linhagem de milho W64A nas versões normal, opaco-2, flourey-2 e opaco-2 flourey-2 e a linhagem W22 nas versões normal, opaco-2, opaco-7 e opaco-2 opaco-7 para determinar as interações entre os genes flourey-2 e opaco-7 com o gene opaco-2. Ficou constatado que, na presença de 3 doses do alelo recessivo opaco-2, a ação do flourey-2 é completamente encoberta, prevalecendo assim o fenótipo da zeína observado quando somente o opaco-2 está presente no genótipo. Este fato indica que o alelo opaco-2 é epistático sobre o flourey-2 no que diz respeito à síntese de zeína. Já no caso do mutante duplo opaco-2 opaco-7, na forma homozigota tanto a zeína de 22 kDa quanto a de 19 kDa são suprimidas, indicando que ambas as mutações são ativas (DI FONZO et al., 1980). Os resultados dos experimentos levaram DI FONZO et al. (1980) a proporem que existem várias vias de regulação da síntese de zeína, sendo que pelo menos uma destas vias, da qual o gene opaco-2 faz parte, está envolvida com a síntese da zeína de 22 kDa. Uma outra via, da qual o gene opaco-7 faria parte, estaria envolvida com a síntese da zeína de 19 kDa. Quanto ao gene flourey-2, ele estaria envolvido na mesma via de regulação da qual faz parte o gene opaco-2 (DI FONZO et al., 1980).

Os mecanismos através dos quais as mutações que afetam a síntese de zeína agem são desconhecidos (LARKINS et

al., 1984). Contudo, é interessante salientar que mutações que afetam determinados genes da zeína estão localizados em cromossomos diferentes desses genes (HEIDECKER e MESSING, 1986). Assim sendo, os genes *opaco-2* e *De-B30*, localizados no braço curto do cromossomo 7, vão afetar principalmente a zeína de 22 kDa, que é codificada por genes encontrados sobretudo no cromossomo 4 (HEIDECKER e MESSING, 1986). Já o gene *opaco-7*, que causa redução da zeína de 19 kDa (cujos genes estão localizados principalmente no cromossomo 7), está localizado no cromossomo 10 do milho. LANGRIDGE et al. (1982) desenvolveram uma série de experimentos com as versões normal e *opaco-2* da linhagem de milho A619. Com estes experimentos, LANGRIDGE et al. (1982) constataram através de hibridizações entre os mRNAs da linhagem normal e mutante com sonda de cDNA da zeína que a redução da proteína no mutante é uma consequência da redução dos níveis de mRNA, principalmente dos mRNAs da zeína de 22 kDa. Em outros experimentos, o DNA genômico das linhagens normal e mutante foram digeridos com diversas enzimas de restrição e hibridizados com as sondas de cDNA da zeína de 22 e 19 kDa. Ficou constatado que nenhuma mudança na organização dos genes da zeína ocorre no mutante, pois os padrões de hibridização são iguais em ambas as versões da A619 (LANGRIDGE et al., 1982).

BURR e BURR (1982) desenvolveram experimentos similares aos de LANGRIDGE et al. (1982) e também não detectaram nenhuma mudança importante no número ou organização dos genes da zeína. Os resultados destes experimentos podem indicar que as mutações afetam funções reguladoras ao invés das sequências que

codificam para a proteína (SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação). PEDERSEN et al. (1980) utilizaram versões normal e opaco-2 de uma linhagem de milho (W84A), diferente da utilizada por LANGRIDGE et al. (1982), e determinaram que os níveis de mRNA da zeína eram reduzidos de 30 a 40% no mutante. Apesar dos fatores envolvidos na redução da zeína no mutante não serem conhecidos, eles podem envolver efeitos na transcrição dos mRNAs ou na estabilidade dos mesmos (PEDERSEN et al., 1980; SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação).

Até o momento, nenhum produto dos genes reguladores da zeína foi identificado (SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação). Contudo, existem outras proteínas além da zeína que estão associadas a estes genes (SOAVE e SALAMINI, 1984). Uma delas é uma proteína solúvel, de peso molecular aparente de 32 kDa, que é sintetizada no endosperma normal no período de síntese da zeína (SOAVE e SALAMINI, 1984). A presença desta proteína no endosperma é inibida em sementes homozigotas para os genes opaco-2 e opaco-6 (SOAVE e SALAMINI, 1984). Originalmente, pensou-se que esta proteína era um produto do locus opaco-6. No entanto, experimentos recentes parecem rejeitar esta hipótese (SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação). As funções biológicas da proteína de 32 kDa são desconhecidas (SOAVE e SALAMINI, 1984). DI FONZO et al. (1986) compararam a composição de aminoácidos da proteína de 32 kDa com a da zeína e constataram que essas composições são completamente diferentes. Foi constatada também a ausência de associação destas proteínas com corpúsculos protéicos, o que levou DI FONZO et al.

(1986) a desacreditarem da possibilidade da proteína de 32 kDa ter funções de reserva. Além disso, o fato desta proteína ser encontrada no citossol, onde ela aparentemente não interage com nenhuma outra proteína, torna provável a possibilidade dela exercer funções enzimáticas (DI FONZO et al., 1986).

A outra proteína encontrada em associação com os loci reguladores tem peso molecular aparente de 70 kDa (SOAVE e SALAMINI, 1984). Esta proteína é encontrada no endosperma normal e seus níveis aumentam à medida em que aumenta a dose de certos alelos mutantes, como o floury-2 e De-B30 (SOAVE e SALAMINI, 1984). Nos estágios iniciais do desenvolvimento do endosperma a proteína de 70 kDa foi localizada principalmente nos corpúsculos protéicos da zeína, mais especificamente (segundo sugestão de SOAVE e SALAMINI, 1984) na membrana do corpúsculo protéico. Apesar da função exata desta proteína ser desconhecida, SOAVE e SALAMINI (1984) sugeriram que a proteína poderia interferir especificamente com a zeína, alterando a sua síntese, ou não especificamente, alterando o acúmulo da zeína no corpúsculo protéico através da sua deposição anormal na membrana deste. Uma terceira possibilidade levantada por SOAVE e SALAMINI (1984) é de que talvez a proteína de 70 kDa represente um tipo de proteína de reserva diferente da zeína e que é suprimida no endosperma normal e liberada na presença de certos alelos mutantes.

I.5. CARACTERÍSTICAS DOS GENES QUE CODIFICAM

ZEÍNA

Muitas das características gerais dos genes encontrados em plantas foram primeiramente observadas através de estudos de genes que codificam proteínas de reserva (DURE, 1985). Entre estas características estão as sequências reguladoras denominadas de "TATA box", que regulam a precisão da iniciação da transcrição, e a "CCAAT box", que regula a eficiência da transcrição (GROSSCHEDL e BIRNSTIEL, 1980; MCKNIGHT e KINGSBURY, 1982). HU et al. (1982) compararam a sequência de nucleotídeos do clone genômico Z4 da zeína com a sequência do clone de cDNA A20 e localizaram a sequência TATAAATA aproximadamente 30 resíduos à esquerda do primeiro nucleotídeo, no terminal 5' do clone de cDNA. A sequência CCAAT foi localizada por HU et al. (1982) à esquerda da "TATA box", sendo que 45 nucleotídeos separam os primeiros nucleotídeos das duas sequências. Não se sabe ao certo se as sequências TATA e CCAAT identificadas são sinais reguladores dos genes da zeína (LARKINS e PEDERSEN, 1982; HEIDECCKER e MESSING, 1986). Da sequência do clone genômico Z4 ainda foi observado que a sequência que codifica zeína se inicia em um codon ATG e termina em um codon TAG (HU et al., 1982). Os sinais de poliadenilação AATAAA e AATAAG foram encontrados no clone genômico Z4, na região 3' que não codifica a proteína (HU et al., 1982).

Uma característica singular dos genes de organismos superiores é apresentar interrupções alternadas

denominadas introns entre as sequências codificadoras denominadas exons (LEWIN, 1983). O fato dos introns serem considerados uma característica comum não significa que eles estejam presentes em todos os genes de eucariotos. A estrutura dos genes da zeína, por exemplo, foi descrita como sendo similar a de vários outros genes de eucariotos, exceto pelo fato de não conter introns (LARKINS e PEDERSEN, 1982). A ausência de introns nos genes da zeína foi detectada através da comparação da sequência de clones de cDNA com clones genômicos (HU et al., 1982) e através da análise de alças em R em microscópio eletrônico (PEDERSEN et al., 1982). No experimento realizado por PEDERSEN et al. (1982), o clone genômico ZG99 (zeína de 19 kDa) foi hibridizado com mRNA da zeína e uma única alça em R foi observada em microscópio eletrônico, sugerindo a ausência de introns (pelo menos introns maiores que 50 pares de bases -- pb -- no gene). Este resultado foi apoiado pela sequência de DNA, pois não foram encontradas junções GT/AG, que são típicas de introns (PEDERSEN et al., 1982). Apesar do resultado de diversos experimentos indicarem a ausência de introns nos genes da zeína, LARKINS e PEDERSEN (1982) acham prematura a generalização desta informação.

I.6. OS REPRESENTANTES DA TRIBO ANDROPOGONEAE

O milho foi domesticado há pelo menos 7000 anos atrás e atualmente, com uma produção de 475 milhões de toneladas, ele é o segundo cereal mais produzido no mundo (GAY,

1987). O fato do milho ser altamente domesticado fez com que ele perdesse a capacidade de se propagar na natureza sem a ajuda do homem (BEADLE, 1980). Ao contrário do milho, algumas gramíneas selvagens, como *Tripsacum* e teosinte, propagam-se espontaneamente na natureza (PAULIS e WALL, 1977).

Apesar da origem do milho não estar esclarecida, um grau de parentesco é atribuído entre o milho e as gramíneas selvagens *Tripsacum* e teosinte. Os resultados de experiências citogenéticas e de hibridizações entre o milho e o teosinte, as quais produziram descendentes férteis, levam a crer que o teosinte seja o ancestral mais próximo do milho (GALINAT, 1974). HAKE e WALBOT (1980) realizaram uma série de experimentos de hibridização de DNA para definir as relações existentes entre o genoma do milho e seus possíveis progenitores, entre eles o teosinte. Estes autores constataram que o DNA do milho tem muitas sequências em comum com o teosinte. E mais, os teosintes das raças Chalco e Guatemala provavelmente contribuíram para o genoma do milho, o que está em concordância com os dados obtidos em experimentos citológicos e morfológicos (HAKE e WALBOT, 1980). Segundo HAKE e WALBOT (1980), o impacto da seleção humana na evolução do milho contribuiu para a distância existente entre ele e as gramíneas aparentadas.

A constatação de que cruzamentos entre o milho e o *Tripsacum* e entre o milho e o teosinte produzem descendentes férteis torna viável o uso destas gramíneas como fonte de variabilidade genética para o milho (PAULIS e WALL,

1977). Com o uso de hibridizações entre o milho e as gramíneas selvagens, vários genes de relevância econômica poderiam ser transferidos do *Tripsacum* e do teosinte para o milho. Como exemplo de um destes genes, podemos citar o gene que codifica para resistência a *Puccinia sorghi*, causadora da ferrugem no milho (BERGQUIST, 1981).

PAULIS e WALL (1977) utilizaram *Tripsacum dactyloids*, teosintes Chalco e El Salada, milho de pipoca argentino, o híbrido comercial de milho SX52 e uma linhagem de milho com alto teor de proteína ("Illinois High Protein") para uma análise comparativa dos aminoácidos das proteínas de reserva do grão. Foi constatado que existem pequenas diferenças na composição de aminoácidos nas albuminas e globulinas dos diversos materiais. Contudo, os grãos dos teosintes contêm um pouco menos de lisina que os outros. A composição de aminoácidos das zeínas também é similar, sendo que o *Tripsacum* contém um pouco mais de metionina. Quanto às ASG, existem pequenas diferenças entre os materiais e o *Tripsacum* apresentou novamente o maior teor de metionina. Ficou constatado que a fração responsável pela maior porcentagem de metionina no *Tripsacum* é a ASG, tendo sido sugerido por PAULIS e WALL (1977) que a introdução de genes do *Tripsacum* no milho poderia elevar o teor de metionina neste cereal. A composição de aminoácidos das proteínas residuais diferem nos materiais (PAULIS e WALL, 1977).

Além do milho, *Tripsacum* e teosinte, o *Coix lacryma-jobi* L. também faz parte da tribo Andropogoneae. Apesar

do Coix ser considerado um cereal de menor importância, o seu cultivo vem sendo realizado por um longo tempo na Ásia (VENKATESWARLU e CHAGANTI, 1973). Existem muitas variedades de Coix, sendo que elas geralmente variam na estrutura do invólucro da semente (ARORA, 1977). O que incentivou a propagação do Coix pelo mundo foi principalmente a utilização deste cereal como alimento, medicamento e ornamento (VENKATESWARLU e CHAGANTI, 1973). No Brasil, por exemplo, vem sendo realizada uma série de experimentos onde o Coix substitui em até 20% do trigo em panificação (DIAZ, 1985).

Entre as variedades de Coix *lacryma-jobi* L., o Adlay é uma das mais comuns (JAIN e BANERJEE, 1974). Esta variedade de Coix foi introduzida no Brasil por volta de 1938 (TORRES e BERGAMIN, 1951). Uma das características do Adlay é a presença de 20% de proteína na semente, sendo que a responsável por grande parte desta proteína é uma prolamina denominada coixina (TORRES e BERGAMIN, 1951). Em uma análise preliminar desta proteína, ficou constatado que ela tem uma baixa porcentagem de aminoácidos essenciais (TORRES e BERGAMIN, 1951).

II - O B J E T I V O S

Até o momento, não existia nenhuma análise minuciosa das prolaminas do *Coix lacryma-jobi* L. Era essencial que um trabalho de caracterização dessas prolaminas fosse desenvolvido com o intuito de esclarecer o grau de expressão dessas proteínas, bem como a homologia existente entre elas e a zeína do milho e teosinte. Além da importância acadêmica, as informações obtidas a respeito das prolaminas e demais proteínas do endosperma poderão ser relevantes para orientar o melhoramento do milho, visando obter genótipos com expressão diferencial de genes que codificam para prolaminas.

A presente análise visou obter informações das proteínas do endosperma nos seguintes aspectos:

1. Teor de nitrogênio e análise de aminoácidos das proteínas do endosperma do Adlay e subsequente comparação com as proteínas do milho.
2. Caracterização através de eletroforese das proteínas do endosperma do Coix e comparação com as proteínas do milho e teosinte.

3. Análise de focalização isoeletrica das prolaminas do Coix, milho e teosinte para determinação da heterogeneidade destas proteínas.

4. Análise em duas dimensões dos polipeptídeos da zeína e coixina.

5. Análise imunológica das prolaminas do Coix, milho e teosinte.

6. Utilização de sondas de cDNA das classes da zeína do milho de 22 e 19 kDa para avaliação da homologia entre estas sondas e os genes de prolamina do Coix e teosinte.

III - MATERIAL E MÉTODOS

III.1. MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado nos experimentos foram os representantes da tribo Andropogoneae do gênero Tripsacinae -- *Zea mays* L. variedade Maya e linhagem 1038 e as variedades de teosinte *Zea mays mexicana* e *Zea luxurians* -- e do gênero Coicinea -- *Coix lacryma-jobi* L. variedade Adlay e variedade Acre. A variedade Maya original foi sintetizada pela Seção de Cereais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) a partir de uma combinação de 14 linhagens dentadas da raça Tuxpenho. Esta linhagem, proveniente de germoplasma mexicano, é a fonte principal das linhagens dentadas utilizadas na síntese dos híbridos 1/2 dente cultivados no Brasil. A linhagem 1038 é dentada e foi sintetizada no Laboratório de Genética Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) a partir da variedade Asteca, raça Tuxpenho. A variedade Asteca é uma população sintética feita pelo IAC a partir de linhagens tropicais de San Luis Potosi.

Quanto aos teosintes, o *Zea mays mexicana* é da raça Chalco -- "Chalco Los Reyes". Este teosinte é encontrado no Vale do México, México, nos mesmos locais utilizados para o

cultivo do milho. A hibridização deste teosinte com o milho é comum. O *Zea luxurians* pertence à raça Guatemala e é encontrado no sudeste da Guatemala e Honduras. As chances de hibridização deste teosinte com o milho são raras nestes locais devido ao isolamento geográfico e estacional. As variedades de *Coix lacryma-jobi* L. são nativas da Índia, Burma, China e Malásia. A variedade Adlay foi introduzida no Brasil em 1938 e é encontrada em diversas regiões do Brasil. A variedade Acre é encontrada no Acre.

Outras linhagens e variedades de milho, teosinte e *Coix* foram utilizadas somente nos experimentos de determinação da heterogeneidade destes materiais através de focalização isoelétrica. Uma descrição destes materiais é dada a seguir: *Zea mays* L. linhagem 126-3 é homozigota e procedente da variedade sintética SRR Duro, composta de germoplasma da raça Cateto e raças Flint das Antilhas; linhagem 107-1 é homozigota e proveniente da raça Cateto São Simão; linhagem 75-3 é homozigota e procedente da variedade sintética Asteca Prolífico da raça Tuxpenho. Todas as linhagens descritas acima foram desenvolvidas na UNICAMP pelo Dr. William J. da Silva. As variedades de teosinte utilizadas foram: *Zea mays mexicana*, raça Batan; *Zea mays mexicana*, raça Central Plateau; *Zea mays parviglumis*, raça Balsas; e *Zea perennis*. As variedades de *Coix lacryma-jobi* L. utilizadas foram: Faxina, coletada na Fazenda Santa Gertrudes; Tailândia, coletada na Tailândia; e Rosário, coletada na região de Campinas.

As amostras de todos os materiais vegetais utilizados nos experimentos e descritos acima foram obtidas no Banco de Germoplasma do Laboratório de Genética Vegetal da UNICAMP. É importante salientar que as informações obtidas sobre o *Coix lacryma-jobi* L. são bastante restritas.

III.2. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE RESERVA

Aproximadamente 500 sementes de cada um dos materiais vegetais descritos acima tiveram os germes descartados e a seguir foram moídas em um moinho de hélice (Tecnal, Micro MR). O farelo obtido foi homogeneizado em um moinho de bola (Tecnal, TE 350) por 2 minutos. A farinha foi desengordurada através de dois tratamentos subsequentes com 5 volumes de acetona. Após cada tratamento, o material era centrifugado por 5 minutos a 4000 rpm em uma centrífuga de mesa (Fanem, Excelsa Baby) e o sobrenadante (acetona) era descartado. Após o último tratamento com acetona, as farinhas foram espalhadas em placas de Petri e mantidas ao ar livre até que estivessem secas.

As proteínas do endosperma foram fracionadas sequencialmente de acordo com a sua solubilidade em diferentes solventes através de modificações da metodologia descrita por PAULIS et al. (1978). Assim sendo, as proteínas da Fração 1 (F1) -- aminoácidos livres, albuminas e globulinas -- foram extraídas por 2 vezes com NaCl 0,5 M (5:2, v/p) a 4°C. Ao final de um

período de duração de 1 hora para cada extração, as proteínas da F1 eram coletadas através de centrifugação em rotor JA-21 (Beckman, J2-21) a 12000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Os resíduos foram lavados 2 vezes com água (5:2, v/p) antes do início da extração das proteínas da Fração 2. A Fração 2 (F2) -- prolaminas -- foi extraída por 2 vezes consecutivas, à temperatura ambiente, com isopropanol 55% contendo concentrações variáveis de 2-mercaptoetanol (2-ME). A extração inicial foi a 4:1 (v/p) por 12 horas e a segunda extração foi a 3:1 (v/p) por 2 horas. As prolaminas foram coletadas através de centrifugação em rotor JA-21 (Beckman, J2-21) a 12000 rpm por 10 minutos a 20°C. Os resíduos foram lavados por 2 vezes com isopropanol 55% (4:1, v/p). A Fração 3 (F3) -- proteínas residuais -- foi extraída à temperatura ambiente com dodecil sulfato de sódio (SDS) 5%, 2-ME 7,5% em Tris-HCl 100 mM, pH 7,5 a 3:1 (v/p). Após um período de incubação de aproximadamente 2 horas, as amostras foram fervidas a 100°C por 5 minutos e centrifugadas em rotor JA-21 (Beckman, J2-21) a 12000 rpm por 10 minutos a 20°C. As frações protéicas foram aliquotadas e mantidas a -20°C.

III.3. QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE RESERVA PELO MÉTODO DE MICRO-KJELDAHL

As determinações do teor de nitrogênio nas frações protéicas das sementes foram feitas através de modificações dos métodos de NKONGE e BALLANCE (1982). Em tubos de

digestão previamente calibrados para 20 ml foram colocadas amostras das frações protéicas F1 e F2 e do endosperma residual obtido após as extrações da Fração 2. A seguir, adicionou-se 1,5 ml de ácido sulfúrico concentrado e as amostras foram colocadas em uma placa digestora. Quando as soluções se tornaram claras, as amostras foram retiradas da placa digestora, resfriadas e diluídas para um volume de 20 ml com água destilada.

As soluções padrão de nitrogênio foram preparadas através da digestão de 47,16 mg de sulfato de amônio previamente seco por 3 horas a 103°C. O sulfato de amônio digerido foi diluído para um volume de 100 ml para que uma solução concentrada de 100 ug de N/ml fosse obtida. O branco foi preparado através da digestão de ácido sulfúrico concentrado. Ele foi utilizado para diluições da solução de 100 ug de N/ml em soluções padrão com concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 ug de N/ml.

Para a determinação colorimétrica da amônia liberada na digestão, 0,5 ml dos digeridos foram colocados em tubos de ensaio contendo 1,5 ml de um tampão preparado através da mistura de 1:1 de uma solução A -- Na_2HPO_4 0,2 M, NaOH 0,2 M, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,36 M -- com uma solução B -- NaOH 2,5 M. A seguir, adicionou-se nos tubos de ensaio 0,4 ml da solução de salicilato-nitroprussiato composta de 20 g (0,12 M) de salicilato de sódio e 30 mg (0,1 mM) de nitroprussiato de sódio dissolvidos em água destilada. Após a adição do salicilato-nitroprussiato, as misturas nos tubos de ensaio foram homogeneizadas e colocadas em um banho a 25°C por 5 minutos para equilibrar a temperatura. No

final dos 5 minutos, 0,2 ml de hipoclorito de sódio (Q-Boa, Indústrias Anhembi S.A.) foram adicionados e as misturas voltaram a ser incubadas no banho a 25°C por 30 minutos. As amostras foram, a seguir, diluídas com 10 ml de água destilada, as absorbâncias foram medidas a 660 nm em um espectrofotômetro (Varian, UV 6345) e o teor de nitrogênio foi determinado. A quantidade de proteína nas amostras foi estimada através da multiplicação do teor de nitrogênio por 6,25.

III.4. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

Aliquotas contendo aproximadamente 100 ug das frações protéicas F1, F2 e F3 da variedade de milho Maya e da variedade de Coix Adlay foram hidrolisadas através de tratamento com 1 ml de HCl 6 N a 110°C por 20 horas. Após serem hidrolisadas, as amostras foram neutralizadas com NaOH, liofilizadas e ressuspendidas em 200 µl de água destilada em um frasco de vidro. A seguir, adicionou-se 50 µl de tampão borato 1 M, pH 8,3 e 200 µl de uma solução de 9-fluorenil-metilcloroformato (FMOC) 15 mM em acetona. A mistura foi deixada à temperatura ambiente por 5 minutos para que a reação se processasse. Os excessos de reagentes foram removidos através de três extrações com volumes iguais de pentano (EINARSSON et al., 1983). Os derivados fluorescentes dos aminoácidos-FMOC foram analisados por cromatografia líquida de

alta resolução (HPLC), como cortesia do Dr. Goran Sandberg (Ulmea, Suíça).

Durante a cromatografia, os solventes fluíram a uma velocidade de 1 ml min^{-1} em um cromatógrafo líquido Waters, composto por duas bombas M45, um homogeneizador dinâmico de solventes e um gerador de gradiente M680. As amostras foram introduzidas fora da coluna em um injetor Valco. Para as separações de fase reversa foi utilizada uma coluna de $250 \times 4,6 \text{ mm d.i.}$ ODS-Hypersil ($5 \mu\text{m}$). Esta coluna foi eluída por 20 minutos com 50-60% de metanol em um tampão composto por ácido acético/trietilamina/água (7:1:992, v/v), pH 4,2 ajustado com NaOH. Seguiu-se a esta primeira eluição um segundo passo no qual foram utilizados 80-100% de metanol durante um período de 20 minutos. Ao deixarem a coluna, as amostras eram dirigidas para um detector de fluorescência (Shimadzu, RF 530) com emissão a 313 nm.

III.5. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GÉIS DE ACRILAMIDA CONTENDO SDS

As frações protéicas foram analisadas através de eletroforese em géis de gradiente de 5-20% de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme modificações da metodologia de LAEMMLI (1970). As placas de vidro de $15 \times 18 \text{ cm}$ utilizadas em eletroforese foram previamente tratadas com HCl 6

N, enxaguadas exaustivamente em água corrente e destilada e finalmente secas a 60°C. Os moldes utilizados para a montagem dos géis foram preparados através da separação das laterais das placas de vidro com espaçadores de acrílico de 1,5 mm. A parte de baixo dos moldes foram vedadas com uma solução de 2% de Bacto agar (Difco) em água. Os géis foram corridos em cubas de acrílico verticais de tamanho padrão, contendo um reservatório superior e um reservatório inferior conectados através de eletrodos à fonte de voltagem.

As soluções e tampões estoque utilizados no preparo dos géis foram: (1) solução de acrilamida -- 30% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida dissolvidos em água; esta solução foi filtrada em papel Whatman No. 1 e mantida em frasco escuro a 4°C; (2) tampão do gel de resolução -- Tris-HCl 3 M, pH 8,8; (3) tampão do gel de empacotamento -- Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; (4) solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) -- 10% de SDS dissolvido em água; (5) solução de persulfato de amônio -- 1,5% de persulfato de amônio dissolvido em água.

Para cada gel de resolução preparado foram misturadas separadamente em provetas de 10 ml uma solução de 5% de acrilamida e uma solução de 20% de acrilamida. A solução de 5% de acrilamida consistia de: solução de acrilamida 30:0,8, 1,66 ml; tampão de resolução, 1,24 ml; SDS 10%, 100 µl; persulfato de amônio 1,5%, 240 µl; N, N, N¹, N¹-tetrametiletilenodiamina (TEMED), 3,3 µl; água qsp, 10 ml. A solução de 20% de acrilamida era composta por: solução de acrilamida 30:0,8, 6,66 ml; tampão

de resolução, 1,24 ml; SDS 10%, 100 µl; persulfato de amônio 1,5%, 240 µl; glicerol (87%), 1,15 ml; TEMED, 3,3 µl; água qsp, 10 ml. Para cada gel de empacotamento foi utilizado: solução de acrilamida 30:0,8, 1,3 ml; tampão do gel de empacotamento, 2,5 ml; SDS 10%, 100 µl; persulfato de amônio 1,5%, 750 µl; TEMED, 10 µl; água qsp, 10 ml.

As soluções de 5 e 20% de acrilamida foram colocadas nos recipientes de uma cuba de formação de gradiente conectada em uma bomba peristáltica (Incibrás, BP-100). A bomba peristáltica foi ligada em velocidade máxima, as soluções de acrilamida foram misturadas gradativamente com a ajuda de um agitador magnético e a mistura fluiu vagarosamente para o molde das placas de vidro formando um gradiente linear de 5-20% de acrilamida. No final do gradiente, 1 ml de água destilada foi colocado no gel para nivelar a superfície. Após um período de 20-30 minutos para a polimerização do gel, a água foi removida e o gel de empacotamento de aproximadamente 2 cm de altura foi colocado. Antes que o gel de empacotamento começasse a polimerizar, foi introduzido no gel um pente de acrílico para que as aberturas necessárias para colocação das amostras se formassem.

O tampão 3x concentrado utilizado para o preparo das amostras consistia de: glicerol 10%, 2-ME 5% e SDS 2% em Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. O tampão da amostra foi feito semanalmente e mantido a 4°C. Uma solução de azul de bromofenol 0,1% foi preparada e adicionada nas amostras após elas terem sido

misturadas com o tampão. As amostras foram fervidas em um banho a 100°C por 5 minutos, antes de serem colocadas nos géis. Os padrões de peso molecular (Pharmacia) utilizados nos géis de SDS-PAGE foram: Fosforilase b de músculo de coelho, 84 kDa; Albumina de soro bovino, 67 kDa; Ovalbumina da clara do ovo, 43 kDa; Anidrase carbônica de eritrócitos bovinos, 30 kDa; Inibidor de tripsina da soja, 20,1 kDa; α -Lactalbumina de leite bovino, 14,4 kDa. Aproximadamente 100 μ g de cada uma das proteínas relacionadas acima foram dissolvidas em 100 μ l do tampão de amostra e fervidas por 5 minutos antes que alíquotas de 3 μ l fossem colocadas nos géis com o auxílio de uma pipeta Wiretrol (Drummond) de 5 μ l graduada.

O tampão de reservatório utilizado para a corrida dos géis consistia de: Tris 25 mM, glicina 0,192 M, pH 8,3 e SDS 0,1%. As eletroforeses foram realizadas à temperatura ambiente a 100 volts (V) até que a frente de azul de bromofenol atingisse o final do gel. Após a eletroforese, os géis foram corados por 2 horas com Coomassie Blue R 250 (Sigma) 0,25% em metanol/água/ácido acético (5:5:1, v/v). Os géis foram descorados em metanol/água/ácido acético (3:6:1, v/v) e guardados em uma solução de 2,5% de ácido acético.

III.6. FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA DAS PROLAMINAS EM GÉIS DE AGAROSE

A focalização isoeletrica (IEF) das prolaminas foi feita através da combinação das especificações dadas pela LKB (LKB - Produkter, Bromma, Sweden) com a metodologia descrita por WILSON (1984). As placas de vidro utilizadas para a montagem dos géis foram unedecidas com água destilada e chapas de 0,2 mm de espessura de GelBond (FMC) com lados hidrofílicos e hidrofóbicos e tamanho de 125 x 245 mm foram aderidas a elas com o auxílio de um cilindro de madeira. As placas de vidro contendo superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas foram separadas por um espaçador de borracha em forma de U de 0,75 mm de espessura por 5 mm de largura. Para evitar vazamentos do gel, as placas de vidro foram presas com grampos de metal.

Para cada gel de focalização isoeletrica, 1% de agarose (LKB, IsoGel) foi misturada com 15 ml de água em um tubo de ensaio previamente calibrado para 25 ml. A solução de agarose foi colocada em um banho com temperatura regulada entre 95-100°C por aproximadamente 10 minutos. A temperatura do banho foi a seguir abaixada para 55-60°C e 2 mM de uma solução estoque de ditiotreitol (DTT) 0,05 M foi adicionado. Após a adição de DTT, 0,4% de anfólito de pH 3,5-9,5 (LKB) e 1,6% de anfólito de pH 5-8 (LKB) foram adicionados e homogeneizados na solução de agarose. Finalmente, 5 M de uréia foi adicionada na solução vagarosamente e com constante agitação. O volume final foi completado para 25 ml e a solução foi pipetada com o auxílio de

uma pipeta de 10 ml no molde pré-aquecido para que a formação de bolhas no gel fosse evitada. O molde foi então vedado completamente com fita crepe para prevenir possíveis ressecamentos e o gel foi mantido a 4°C por 12 horas para que a polimerização da agarose fosse completa.

Antes do início da focalização isoelétrica, as placas de vidro do molde foram separadas, o espaçador de borracha foi retirado e o gel de agarose que permaneceu aderido ao lado hidrofílico da GelBond teve a unidade de sua superfície retirada com papel de filtro. A seguir, o gel foi colocado na placa horizontal, resfriada a 10°C, da cuba de focalização isoelétrica. Entre o gel e a placa foi colocada uma solução de 5% de glicerol. Para a aplicação das amostras, foi colocado a 75 mm do catodo do gel uma borracha com orifícios de 2 x 10 mm na sua superfície. Esta borracha foi vedada no gel com óleo de silicone. As amostras de 5 µl de prolamina foram colocadas no gel com uma pipeta Wiretrol (Drummond) de 5 µl. Para a focalização, o eletrólito usado no catodo do gel foi NaOH 1 M e o eletrólito usado no anodo foi ácido acético 0,5 M.

Para focalização isoelétrica, foi utilizado um aparelho Multiphor II (LKB) operado a voltagem constante. Nos primeiros 15 minutos da focalização foi aplicada uma voltagem de 200 V. A seguir, a cuba foi aberta e a borracha utilizada para a aplicação das amostras foi retirada. Nos 25 minutos que se seguiram foi aplicada uma voltagem de 600 V. A voltagem foi aumentada para 1000 V nos últimos 60 minutos da focalização. Toda

vez que foi observado a condensação de água no gel durante a corrida, a voltagem foi desligada e a água, retirada com o auxílio de papel de filtro.

Após o período de focalização, as proteínas no gel foram fixadas por 40 minutos com 300 ml de uma solução de ácido acético/ácido tricloroacético (TCA)/água (5:3:92, v/v). O gel foi brevemente lavado com água destilada e comprimido entre duas placas de vidro contra 1 cm de papel de filtro para que toda água fosse retirada. Ele foi corado com 200 ml de uma solução de metanol/ácido acético/água (20:10:70, v/v) que continha 10 ml de Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma) 0,5% dissolvido em metanol. O gel foi descorado com metanol/ácido acético/água (20:10:70, v/v), enxaguado por 30 segundos com ácido acético 1% e por 30 segundos com água destilada. O gel foi seco à temperatura ambiente ou com o auxílio de um secador de cabelos.

Os pontos isoelétricos (pI) dos polipeptídeos das prolaminas foram determinados com o auxílio de proteínas padrão (Sigma) de pIs conhecidos. Estas proteínas padrão utilizadas foram: β -Lactoglobulina A de leite, pI 5,13; Anidrase carbônica B de eritrócitos bovinos, pI 5,85; Anidrase carbônica B de eritrócitos humanos, pI 6,57; Mioglobulina de coração de cavalo, pI 6,76 e 7,16. A distância de cada banda de prolamina e de proteína padrão do anodo do gel foi medida com uma régua. A seguir, foi construído o gráfico de migração das proteínas padrão versus os seus respectivos pIs. A partir deste gráfico, a equação

da reta ($y = mx + b$) foi determinada e a partir dela, os pIs das prolaminas foram calculados.

III.7. ANÁLISE DAS PROLAMINAS EM 2-D

As prolaminas de *Coix lacryma-jobi* var. Adlay e *Zea mays* L. var. Maya foram submetidas a uma combinação de IEF e SDS-PAGE, que é equivalente às análises feitas em géis de duas dimensões (2-D). Estes experimentos foram feitos através de modificações do método descrito por WILSON (1986). As amostras das prolaminas de Adlay e Maya foram primeiramente submetidas a IEF em géis de agarose com anfólitos de pH 5-8 + 3,5-9,5 (LKB). Após o período de IEF, os géis foram tratados com ácido acético/TCA/água (5:3:92, v/v) por aproximadamente 3 horas, com trocas de solução de 30 em 30 minutos. Os géis foram lavados com água e secos com a ajuda de um secador de cabelos.

Todas as bandas principais de proteínas visíveis nos padrões de IEF do Adlay e do Maya após a precipitação com ácido acético/TCA/água foram cortadas e colocadas separadamente em tubos eppendorf novos. Aproximadamente 20 µl de tampão da amostra foram adicionados em cada eppendorf. Os tubos eppendorf foram a seguir colocados em um banho a 100°C por 3-5 minutos. As amostras foram colocadas nos géis de gradiente de 5-20% de SDS-PAGE com o auxílio de uma pipeta Wiretrol (Drummond) de 25 µl previamente aquecida para evitar a

solidificação da agarose. As eletroforeses foram realizadas à temperatura ambiente a 80 V até que as amostras atingissem o gel de resolução e a 100 V daí por diante. Os géis de 2-D foram corados com Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma) 0,25% e descorados com metanol/água/ácido acético.

III.8. PURIFICAÇÃO DAS PROLAMINAS DO ADLAY

As classes de coixina C2 (25 kDa) e C3 (22 kDa) do *Coix lacryma-jobi* L. var. *Adlay* foram purificadas em larga escala através de eletroforese em géis preparativos de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). As placas de vidro de 14 cm de largura por 12 cm de comprimento utilizadas para a montagem dos géis foram separadas nas laterais e na parte inferior por espaçadores de 5 mm de espessura. A seguir, as placas foram vedadas completamente com Bacto agar (Difco) 2%. Os géis preparativos foram feitos com as soluções estoque descritas em III.5. Eles eram compostos por um gel de resolução de 12% de acrilamida e um gel de empacotamento de 5% de acrilamida. A mistura para o gel de resolução era composta de: solução de acrilamida 30:0,8, 25,05 ml; tampão de resolução, 6 ml; SDS 10%, 600 µl; persulfato de amônio 10%, 300 µl; TEMED, 30 µl; água qsp, 60 ml. A mistura para o gel de empacotamento consistia de: solução de acrilamida 30:0,8, 2,6 ml; tampão do gel de empacotamento, 5 ml; SDS 10%, 200 µl; persulfato de amônio 10%, 100 µl; TEMED, 10 µl; água qsp, 20 ml.

Os géis preparativos foram pré-corridos a 40 V por 30 minutos. A seguir, as amostras de 4 ng do extrato total da prolamina do Adlay foram misturadas com 2 ml do tampão da amostra, fervidas por 5 minutos a 100°C e colocadas nos géis. Os géis foram corridos à temperatura ambiente a 100 V até que a frente de azul de bromofenol atingisse o final do gel. Após a eletroforese, os géis foram removidos das placas, evitando-se o contato dos dedos, e colocados em recipientes de plástico limpos. Os géis foram lavados com água destilada gelada e corados por 5 minutos com uma solução de KCl 0,25 M e DTT 1 mM gelada (HAGER e BURGESS, 1980).

As bandas foram cortadas dos géis e as proteínas contidas nelas foram recuperadas através de eletroeluição por 12 horas a 20 V. Após o processo de eletroeluição, as proteínas foram liofilizadas e ressuspensas em uma solução de isopropanol 55 % e 2-ME 2%. O grau de pureza das bandas isoladas foi confirmado através de eletroforese de aliquotas de 50 µl de proteína em géis de gradiente (5-20%) de SDS-PAGE. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R 250 0,25% e descorados com metanol/água/ácido acético.

O fato das outras classes (C1, C4 e C5) menores de prolamina do Adlay estarem próximas umas das outras (C4 e C5) ou de outra classe maior (C1 e C2) dificultou o isolamento delas nos géis preparativos. Sendo assim, elas foram purificadas em menor escala através de SDS-PAGE de gradiente de 5-20%. Amostras de 15 µl do extrato bruto de prolamina contendo

aproximadamente 50 µg de proteína foram misturadas com 25 µl do tampão da amostra e aplicadas no gel. Após a eletroforese, o gel foi corado com KCl e as proteínas foram recuperadas através de eletroeluição. O grau de pureza das bandas foi confirmado através de SDS-PAGE.

III.9. PREPARO DOS ANTISOROS CONTRA C2 E C3

Os anticorpos policlonais contra as classes de coixinas purificadas C2 e C3 foram produzidos em coelhos brancos de linhagens puras. Os animais foram injetados subcutaneamente com 1 mg do antígeno dissolvido em 1 ml de isopropanol 55% contendo 2-ME 2% e emulsificado em um volume igual de adjuvante Freund completo (Difco). Após um intervalo de 15 dias, os coelhos foram injetados novamente com 1 mg do antígeno em 1 ml de isopropanol 55% contendo 2-ME 2% e emulsificado com 1 ml do adjuvante Freund incompleto (Difco). Ao final de um período adicional de 15 dias, foram coletados 15 ml de sangue de cada coelho. O sangue coletado foi mantido a 4°C durante a noite, centrifugado a 3000 rpm em uma centrífuga de mesa (Fanem, Excelsa Baby) por 15 minutos e o sobrenadante contendo o antisoro foi coletado. Os antisoros foram aliquotados e guardados a -20°C.

O título dos antisoros foi determinado pelo teste de imunoensaio ELISA de acordo com as especificações da

Amersham (Amersham, N812) e modificações da metodologia de LUDEVID et al. (1985). Amostras do extrato total e das bandas isoladas das prolaminas do Adlay foram diluídas 1:50 com tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,6, NaN₃ 0,2%. Um total de 100 µl de cada uma das diluições foi colocado separadamente em uma placa de polivinil para adsorção durante a noite a 4°C em uma câmara umida. Cada orifício da placa de polivinil onde haviam sido colocadas as amostras foi lavado por 3 vezes (100 µl cada vez) com tampão fosfato salino (PBS), composto de KH₂PO₄ 4 mM, NaOH 26 mM e NaCl 150 mM, pH 7,5, contendo Tween 20 0,1% (v/v). Os sítios não específicos foram bloqueados com 100 µl de soro albumina bovina (BSA) 1% (p/v) em PBS. Após a adição do BSA, a placa de polivinil foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. O soro não imune, obtido antes que os coelhos fossem injetados com os antígenos, e os anticorpos contra C2 e C3 foram diluídos com PBS e 100 µl de cada diluição foram adicionados na placa de polivinil. As diluições dos soros não imunes foram de 1:100 e 1:1000 e as diluições dos anticorpos foram de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000.

Após a adição dos soros não imunes e dos anticorpos contra C2 e C3, a placa de polivinil foi incubada a 37°C por 1 hora. A seguir, a placa foi lavada com PBS-Tween 20 e foram adicionados 50 µl de β-galactosidase ligada ao conjugado (proteína A) diluída 1:500 em PBS, pH 7,5, contendo Tween 20 0,1%, MgCl₂ 10 mM, 2-ME 1 mM, BSA 1%. O período de incubação com β-galactosidase ligada ao conjugado foi de 1 hora a 37°C. A placa foi lavada novamente com PBS-Tween 20 e 100 µl da solução do

substrato (orto-nitrofenil- β - D-galactopiranosideo, ONPG) foram adicionados. Para a solução do substrato, ONPG 3 mM foi diluído em PBS, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 10 mM e 2-ME 0,1 M. A reação com o substrato se processou até que a intensidade de cor desejada fosse obtida. Para parar a reação, foram adicionados 50 μ l de Na_2CO_3 1 M.

III.10. ANÁLISE IMUNOLÓGICA DAS PROLAMINAS

As prolaminas do milho, Coix e teosinte foram submetidas a SDS-PAGE em géis de gradiente de 5-20% (LAEMMLI, 1970). Após o processo de eletroforese, os géis foram incubados por 30 minutos em 250 ml de tampão de transferência composto de: Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,1%, metanol 20% e água. Ao final dos 30 minutos, o tampão de transferência foi trocado e os géis foram incubados por um período adicional de 30-40 minutos à temperatura ambiente. A transferência das proteínas do gel foi feita através das especificações da LKB (LKB - Produkter, Bromma, Sweden), em uma unidade de transferência Multiphor Novablot (LKB). Esta unidade era composta de duas placas de grafite, conectadas através de eletrodos em uma fonte de voltagem. As proteínas dos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Schleicher e Schwell, BA 85) ou membranas de nylon (Amersham, Hybond-N) colocadas em cima de 9 folhas de papel de filtro umedecidas com o tampão de transferência. Os géis foram colocados em cima das membranas e acima deles foram colocadas

outras 9 folhas de papel de filtro umedecidas com o tampão de transferência. A transferência das proteínas foi feita a 0,8 mA cm⁻² por um período de 2 horas.

Após o período de transferência, as membranas foram colocadas em uma solução composta de tampão Tris salino (TBS; composto de Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM), pH 7,6, Tween 20 0,1% e leite desengordurado (Molico) 5%. As membranas foram incubadas nesta solução por 1 hora, a 37°C, sob agitação. A seguir, as membranas foram transferidas para uma solução de leite desengordurado (Molico) 5%, dissolvido em TBS e contendo os anticorpos a uma diluição de 1:500. As membranas foram incubadas nesta solução durante a noite, a 37°C, sob agitação constante. As membranas foram submetidas a 2 lavagens breves e 3 lavagens de 5 minutos cada uma em TBS-Tween 20 (TBS-T). Após serem lavadas, as membranas foram incubadas por 1 hora a 37°C com o conjugado Proteína A-peroxidase, diluído 1:5000 em TBS. As membranas foram lavadas novamente com TBS-T e incubadas por 10 minutos em uma solução reveladora (tampão acetato 50 mM, pH 4,5, 100 ml; 50 mg de 3-amina-9-etilcarbazole dissolvidos em 3 ml de dimetilformamida; 100 µl de H₂O₂). Assim que a coloração desejada foi atingida, as membranas foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente.

III.11. ISOLAMENTO DO DNA GENÔMICO DE PLANTAS

Para a extração do DNA genômico, aproximadamente 400 sementes de milho, Coix e teosinte foram lavadas brevemente com água bidestilada e colocadas em erlenmeyers de 250 ml contendo água suficiente para encobri-las. As sementes ficaram embebendo durante a noite, sob agitação constante, a 28°C. Após o período de embebição, as sementes foram esterilizadas com uma solução de cloramina T 1%. A seguir, elas foram lavadas por 5-6 vezes com água bidestilada estéril. Elas foram germinadas no escuro a 28°C em potes de plástico, previamente tratados com etanol 95% e luz germicida, contendo vermiculita autoclavada. Ao final de 2 ou 3 semanas, as plântulas foram cortadas rente ao solo com uma lâmina de bisturi estéril e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido.

Aproximadamente 40 g de tecido vegetal foram utilizados para o isolamento do DNA genômico pela metodologia descrita por RIVIN et al. (1982). Os materiais vegetais foram macerados em almofariz contendo nitrogênio líquido até que um pó fino de coloração esbranquiçada fosse obtido. Foram adicionados, a seguir, 8-20 volumes de tampão de homogeneização composto de: sacarose 0,3 M; Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; MgCl₂ 5 mM. Os materiais foram colocados e mantidos no gelo enquanto foram homogeneizados em um Polytron (Superohm) à velocidade máxima. Após a homogeneização, os materiais foram filtrados com a ajuda de uma bomba a vácuo e um funil de Buchner contendo 3 camadas de gaze estéril. Os núcleos foram isolados através de centrifugação em

rotor JA-20 (Beckman, J2-21) a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o resíduo contendo os núcleos foi mantido no gelo. A seguir, os núcleos foram ressuspensos em 20 ml de tampão de ruptura (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; ácido etilenodiamina tetracético -- EDTA -- 20 mM; sarcosil 1%) e incubados por 1 hora à temperatura ambiente.

À final do período de incubação, foram adicionados 0,95 g de CsCl por ml de solução e as proteínas insolúveis e polissacarídeos foram removidos através de centrifugação em rotor JA-20 (Beckman, J2-21) a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em gaze estéril e 300 µg/ml de brometo de etídeo foram adicionados. A concentração do CsCl foi ajustada (índice de refração de aproximadamente 1,3895) e as soluções foram centrifugadas em rotor VTi 80 (Beckman, L8-80M) a 50000 rpm por 20 horas. A banda fluorescente de DNA formada durante a centrifugação foi removida cuidadosamente com o auxílio de uma seringa com agulha de 30 x 12. A seguir, o brometo de etídeo foi removido do DNA através de diversas extrações com butanol equilibrado com água destilada. O DNA dos diversos materiais foi dialisado durante a noite contra 1 litro de Tris-EDTA (TE) composto de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM, pH 8,0. O TE foi substituído e os DNAs foram dialisados por um período adicional de 4 horas.

As membranas utilizadas para a diálise dos DNAs foram preparadas de acordo com a metodologia de MANIATIS et al. (1982). Os tubos de membrana foram cortados em pedaços de

10-20 cm e colocados para ferver por 10 minutos em uma solução de bicarbonato de sódio 2% e EDTA 1 mM. A seguir, as membranas foram lavadas com água bidestilada e fervidas por 10 minutos em uma solução de EDTA 0,001 M. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente para esfriarem e, posteriormente, foram guardados submersos em EDTA 0,001 M a 4°C. Antes de serem usadas, as membranas foram lavadas com água bidestilada estéril por dentro e por fora.

Após o processo de diálise, o DNA dos diversos materiais foi aliqotado e guardado a -20°C. A concentração dos DNAs foi determinada através da leitura da absorbância a 260 nm em um espectrofotômetro (Varian, UV 6345). O rendimento obtido com a metodologia utilizada foi de 5-20 ug DNA/g tecido vegetal. O grau de pureza das amostras foi calculado pela razão A_{280}/A_{260} . A seguir, alíquotas de 10 ul dos DNAs foram misturadas com 10 ul de água e 4 ul do tampão de coloração -- azul de bromofenol 0,25%, sacarose 40% (p/v) em água -- mantido a 4°C e 8 vezes concentrado. As amostras assim preparadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,5% (MANIATIS et al., 1982). Juntamente com os DNAs genômicos de plantas foi colocado no gel como marcador de peso molecular 0,5 µg de DNA do bacteriófago lambda (λ) de aproximadamente 50 kb.

Para o preparo do gel, a agarose foi dissolvida em tampão Tris-borato (TBE) composto de: Tris 0,089 M, ácido bórico 0,089 M e EDTA 0,002 M, pH 8,0. Após a agarose ter sido completamente dissolvida, a solução foi resfriada a 50°C e

0,5 µg de brometo de etídeo (solução estoque de 10 mg de brometo de etídeo por ml de água, mantida no escuro a 4°C) foi adicionado por ml da solução de agarose. Esta foi então colocada em uma placa de vidro horizontal previamente vedada nos lados com fita crepe e o pente para a aplicação das amostras foi inserido a 1 mm de altura da placa. Após um período de 30-45 minutos para a polimerização da agarose, o gel foi colocado em uma cuba de acrílico horizontal submerso em tampão TBE. A corrida foi a 90 V até que a frente de azul de bromofenol atingisse o final do gel.

III.12. DIGESTÃO DO DNA GENÔMICO DAS PLANTAS COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Os DNAs genômicos foram digeridos com as enzimas de restrição Eco RI, Bam HI e Hind III (Pharmacia). Aproximadamente 10 µg dos DNAs genômicos foram colocados em tubos eppendorf estéreis. A seguir, foram adicionados 20 µl dos tampões das enzimas 10 vezes concentrado. Assim sendo, nas digestões com a enzima de restrição Eco RI, o tampão adicionado era composto de: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 7 mM; e 2-ME 7 mM. Nas digestões com Bam HI, o tampão utilizado foi: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; NaCl 100 mM; MgCl₂ 7 mM; e 2-ME 7 mM. O tampão da enzima Hind III era composto de: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; NaCl 80 mM; MgCl₂ 7 mM; e 2-ME 7 mM. Após a adição do tampão, foi adicionado água estéril e 10 U das enzimas por µg de DNA genômico. Os volumes finais das reações foram de 200 µl. As reações foram

homogeneizadas gentilmente e incubadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte, foram adicionadas mais 2 U das enzimas e as reações foram incubadas por um período adicional de 4 horas.

Ao final da digestão, os DNAs foram extraídos 1 vez com clorofórmio (clorofórmio/álcool isoamílico, 24:1 v/v). Após centrifugação por 2 minutos em uma micro centrífuga (Incibrás, Spin 1), a fase aquosa foi coletada e os DNAs foram precipitados com 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, e 2 volumes de etanol gelado. Os DNAs foram colocados por 2 horas a -20°C e centrifugados por 15 minutos em micro centrífuga (Incibrás, Spin 1). Os precipitados foram ressuspensos depois de secos em 30 µl de água estéril. A seguir, adicionou-se 6 µl do tampão de coloração 8 vezes concentrado e os DNAs foram submetidos a eletroforese em géis de agarose 0,8% em tampão TBE. Os géis foram corridos durante a noite a 20 V. No final das eletroforeses, os géis foram fotografados e os DNAs, transferidos para membranas de nylon (Amersham, Hybond-N).

III.13. TRANSFERÊNCIA DOS DNAs GENÔMICOS DIGERIDOS PARA MEMBRANAS DE NYLON

As transferências dos DNAs genômicos de milho, Coix e teosinte para as membranas de nylon (Hybond-N) foram feitas de acordo com as especificações da Amersham (Amersham International, U.K.) e da metodologia descrita por

MANIATIS et al. (1982). Para a transferência, os géis foram primeiramente incubados por 15 minutos à temperatura ambiente na solução de depuração composta de HCl 0,25 M. Os géis foram lavados 2 vezes com água destilada estéril para que o excesso de ácido fosse retirado. A seguir, os géis foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente na solução de desnaturação (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M). A solução de desnaturação foi trocada e os géis foram incubados por um período adicional de 30 minutos. Os géis foram lavados novamente com água destilada estéril e incubados por 1 hora à temperatura ambiente na solução de neutralização (Tris-HCl 1 M, pH 8,0; NaCl 1,5 M).

Os géis foram retirados da solução de neutralização em papel Whatman 3 MM e colocados em cubas de eletroforese horizontais em cima de uma ponte de papel Whatman 3 MM que conectava os dois reservatórios. As membranas foram colocadas sobre os géis após as laterais destes terem sido cobertas com tiras usadas de filme de raio X. Em cima das membranas foram colocadas 3 folhas de papel Whatman 3 MM, unedecidas em SSC (solução estoque de SSC 20 vezes concentrada: NaCl 3 M citrato de sódio 0,3 M, pH 7,4) 6 vezes concentrado. Sobre as folhas de papel Whatman foi colocada uma camada de 5 cm de papel toalha. No topo da camada de papel toalha foi colocada uma placa de vidro com um erlenmeyer de 1 litro (700-800 ml de água) em cima. A seguir, foi adicionado SSC 20 vezes concentrado nos reservatórios e a transferência se processou durante a noite.

Após o processo de transferência, as membranas foram lavadas com SSC 2 vezes concentrado para retirar a agarose. As membranas permaneceram em cima de papel de filtro à temperatura ambiente até que estivessem secas. As membranas foram colocadas uma a uma entre 2 folhas de papel Whatman 3 MM. As laterais das folhas de papel Whatman foram grampeadas e os filtros foram colocados em uma estufa a 80°C por 2 horas. As membranas foram mantidas à temperatura ambiente até o momento da hibridização com as sondas.

III.14. TRANSFORMAÇÃO DA LINHAGEM DE E. coli

HB101 COM OS CLONES DE ZEÍNA

pZ 22.3 E pZ 19.1

Dois clones, plasmídeo pBR322 com inserções de cDNA dos genes que codificam os polipeptídeos de 22 (clone pZ 22,3) e 19 (clone pZ 19,1) kDa da zeína, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Brian A. Larkins, da Universidade de Purdue, U.S.A.

Antes dos clones de zeína serem introduzidos nas células de E. coli, foi feita uma curva de crescimento para a bactéria. A curva de crescimento foi feita da maneira descrita por MILLER (1972). Aproximadamente 5 ml de meio LB (Luria-Bertani) contendo Bacto triptona 10 mg/ml, extrato de levedo 5 mg/ml, NaCl 0,25 mM, pH 7,5, foi inoculado com a

linhagem de bactéria HB101. O meio inoculado foi mantido a 37°C durante a noite, sob agitação constante. A cultura obtida foi diluída 1:50 com meio LB líquido pré-aquecido. A seguir, ela foi incubada a 37°C, sob agitação constante. Depois dos primeiros 30 minutos de incubação, aliquotas de 1 ml foram coletadas em intervalos de 10 minutos e diluídas 1:1 com meio LB para leitura a 550 nm em um espectrofotômetro (Varian, UV 6345). Quando as leituras da densidade óptica atingiram 0,6, as amostras passaram a ser diluídas 1:5 com meio LB, já que leituras acima de 0,6 são menos confiáveis devido à pequena quantidade de luz transmitida. As aliquotas da cultura de bactéria foram retiradas até que as leituras no espectrofotômetro permanecessem constantes. As informações sobre a geração da HB101 foram obtidas através do gráfico da densidade óptica versus tempo.

A transformação da HB101 com os clones pZ 22,3 e pZ 19,1 foi feita de acordo com a metodologia descrita por MANIATIS et al. (1982). Aproximadamente 5 ml de meio LB líquido foram inoculados com a bactéria HB101. O meio inoculado foi incubado a 37°C durante a noite. A seguir, foi coletada uma aliquota de 1 ml da cultura de bactéria e colocada em 100 ml de meio LB. O meio inoculado foi incubado a 37°C até que uma densidade de aproximadamente 5×10^7 células/ml fosse obtida. A cultura de bactérias foi resfriada em gelo por 10 minutos e as células foram coletadas através de centrifugação em rotor JA-20 (Beckman, J2-21) a 6000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 50 ml de uma solução estéril, resfriada no gelo.

e composta de: CaCl_2 50 mM e Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. A suspensão de células foi incubada em um banho de gelo por 15 minutos e centrifugada em rotor JA-20 (Beckman, J2-21) a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células, ressuspensas em CaCl_2 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, em um volume equivalente a 1/15 do volume original. Aliquotas de 0,2 ml das células ressuspensas foram colocadas em tubos eppendorf pré-resfriados e incubadas por 12-24 horas a 4°C. Aproximadamente 0,5 µg do DNA das sondas dissolvido em TE foi adicionado às aliquotas de 0,2 ml de células e a mistura foi incubada no gelo por 30 minutos. As células foram transferidas para um banho pré-aquecido a 42°C por 2 minutos. A seguir, foi adicionado 1 ml de meio LB em cada tubo e as células foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Aliquotas contendo quantidades apropriadas de células foram plaqueadas em meio LB sólido (Bacto triptona 10 mg/ml, extrato de levedo 5 mg/ml, NaCl 0,25 mM, pH 7,5, Bacto agar 15 mg/ml) contendo 12,5 µg/ml de tetraciclina (solução estoque composta de 12,5 mg/ml de tetraciclina dissolvida em etanol/água 50% v/v, esterilizada por filtração e guardada em aliquotas no escuro a -20°C). As placas foram incubadas a 37°C por 12-16 horas.

Após o crescimento das bactérias, colônias isoladas foram obtidas através da metodologia de MANIATIS et al. (1982). Para isto, uma alça de platina foi esterilizada e com seu auxílio, foram coletadas as bactérias de colônias bem definidas nas placas de meio LB sólido. As bactérias que aderiram na alça de platina foram transferidas para um tubo estéril contendo 1 ml

de meio LB líquido. Os aglomerados de bactéria foram dispersados através de agitação. A alça de platina foi esterilizada novamente e mergulhada na suspensão de bactérias. As bactérias que aderiram na alça de platina foram plaqueadas em um segmento da placa de Petri contendo meio LB sólido. A seguir, a alça de platina foi esterilizada novamente e colocada no final do segmento do primeiro plaqueamento. As bactérias que aderiram à alça foram plaqueadas em um novo segmento da placa de meio LB sólido. Este procedimento foi repetido por mais 3 vezes. A placa foi incubada invertida a 37°C por 16 horas. As colônias isoladas foram guardadas em culturas permanentes. Para isto, 5 ml de meio LB líquido foram inoculados com as colônias isoladas e incubados a 37°C durante a noite. Aproximadamente 0,85 ml da cultura foi transferida para tubos eppendorf estéreis contendo 0,15 ml de glicerol estéril. Os tubos foram fechados e o conteúdo, misturado. A seguir, as culturas foram guardadas a -70°C.

III.15. EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA

Para testar se as colônias isoladas depois da transformação continham os plasmídeos apropriados, foi feita uma extração de DNA plasmidial em pequena escala, de acordo com a metodologia de HOLMES e QUIGLEY (1981). As bactérias foram retiradas das culturas permanentes com uma alça de platina estéril e plaqueadas em meio LB sólido contendo 12,5 µg/ml de

tetraciclina e 25 µg/ml de estreptomicina (solução estoque composta de 20 mg/ml de estreptomicina dissolvida em água; a solução foi esterilizada por filtração e guardada em aliquotas a -20°C). Após serem feitos inóculos de aproximadamente 1 cm, as placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Aliquotas de 100 µl de tampão STET (sacarose 8%; Triton X-100 0,5%; EDTA 50 mM, pH 8,0; Tris-HCl 10 mM, pH 8,0) foram colocadas em tubos eppendorf estéreis.

As células dos inóculos de 1 cm foram coletadas e ressuspendidas nos 100 µl de tampão STET com o auxílio da alça de platina. A seguir, foram adicionados 10 µl de lisozima (solução estoque de 10 mg/ml de lisozima dissolvida em água) e após agitação vigorosa, as células foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Os tubos eppendorf foram colocados em um banho a 100°C por 40 segundos e centrifugados por 10 minutos, à temperatura ambiente, em uma micro centrífuga (Incibrás, Spin 1). Os sobrenadantes contendo os plasmídeos foram removidos para tubos eppendorf limpos com o auxílio de uma micro pipeta de 100 µl. Os DNAs foram precipitados com 100 µl de isopropanol durante a noite a -20°C. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos em uma micro centrífuga (Incibrás, Spin 1), os sobrenadantes foram descartados e os DNAs foram dissolvidos, depois de secos, em 20 µl de TE. Os DNAs foram misturados com tampão de coloração e analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os géis foram corridos em tampão TBE a 100 V até que a frente de azul de bromofenol atingisse o final do gel. Após a eletroforese, os géis foram

corados por 20 minutos com 10 µl de brometo de etideo (solução estoque de 1 mg/ml) em água. O DNA no gel foi visualizado sob luz ultra-violeta (UV).

III.16. EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM LARGA ESCALA

Para extração do DNA plasmidial dos clones de zeína pZ 22,3 e pZ 19,1 em larga escala, primeiramente foi feita a amplificação dos plasmídeos em presença de cloranfenicol (MANIATIS et al., 1982) para que uma quantidade de aproximadamente 2 mg de plasmídeo/litro de cultura fosse obtida. A amplificação foi feita através da inoculação de 10 ml de meio LB líquido contendo 12,5 µg/ml de tetraciclina com uma colônia isolada de bactéria. O meio inoculado foi incubado durante a noite a 37°C com agitação vigorosa. Aproximadamente 0,1 ml da cultura obtida durante a noite foi utilizado para inocular 25 ml de meio LB líquido contendo 12,5 µg/ml de tetraciclina. O meio inoculado foi incubado a 37°C com agitação vigorosa até que a cultura atingisse uma absorbância a 600 nm de aproximadamente 0,8. Os 25 ml da cultura obtida foram utilizados para inocular 500 ml de meio LB líquido pré-aquecido a 37°C e contendo 12,5 µg/ml de tetraciclina. O meio inoculado foi incubado a 37°C com agitação vigorosa por 2,5 horas. A seguir, foram adicionados 2,5 ml de uma solução de cloranfenicol (solução estoque composta de 34 mg/ml de cloranfenicol dissolvido em etanol 100% e mantida a

-20°C). A concentração final de cloranfenicol na cultura era de 170 µg/ml. A cultura foi incubada a 37°C com agitação vigorosa por um período adicional de 12-16 horas.

Após a amplificação dos plasmídeos, as bactérias foram coletadas e o DNA dos plasmídeos foram isolados de acordo com a metodologia descrita por MANIATIS et al. (1982). A coleta das bactérias foi feita através de centrifugação em rotor JA-14 (Beckman, J2-21) a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de bactérias foi lavado com 100 ml de STE (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 10 mM, pH 7,8; EDTA 1 mM) gelado. A seguir, as bactérias foram ressuspensas em 100 ml de uma solução gelada composta de sacarose 10% em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Após isto, foram adicionados 2 ml de uma solução de lisozima composta de 10 mg/ml de lisozima em Tris-HCl 0,25 M, pH 8,0, e 8 ml de EDTA 0,25 M. A solução foi misturada através de diversas inversões e incubada no gelo por 10 minutos. Foram dispersados rapidamente na solução, com a ajuda de um bastão de vidro, 4 ml de SDS 10%. Imediatamente após a dispersão do SDS, foram adicionados 6 ml de NaCl 5 M, resultando em uma concentração final de 1 M. A solução foi misturada lentamente por inversão e incubada no gelo por 1 hora. O DNA de alto peso molecular e os restos celulares das bactérias foram removidos através de centrifugação em rotor SW 41 (Beckman, L8-80M) a 30000 rpm por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi extraído 2 vezes com fenol/clorofórmio e 1 vez com clorofórmio.

O fenol utilizado nas extrações do sobrenadante foi redestilado a 160°C e guardado em aliquotas a -20°C. Antes de ser usado, o fenol foi aquecido a 68°C e extraído várias vezes com Tris-HCl 1 M, pH 8,0. A seguir, foi extraído com Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo 2-ME 0,2% até que o pH da fase aquosa fosse maior que 7,6. O fenol assim equilibrado foi mantido a 4°C. Após as extrações do sobrenadante com fenol e clorofórmio, a fase aquosa foi transferida para tubos de centrifuga corex e 2 volumes de etanol foram adicionados. A solução foi incubada a -20°C por 1-2 horas. O DNA foi recuperado através de centrifugação em rotor JA-20 (Beckman, J2-21) a 3500 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi lavado com etanol 70% à temperatura ambiente. O etanol foi descartado e o DNA foi seco com a ajuda de um dissecador a vácuo. O DNA foi dissolvido em 8 ml de TE, pH 8,0, e purificado em gradiente de CsCl.

Para cada ml da solução de DNA foi adicionado 1 g de CsCl. O CsCl foi dissolvido na solução gentilmente através de movimentos de inversão do tubo corex. A densidade da solução era de 1,55 g/ml ($n = 1,3860$). A seguir, foi adicionado 0,8 ml da solução de brometo de etideo (10 mg/ml em água), dando uma concentração final de 600 µg/ml. A solução foi centrifugada em rotor VTi 80 (Beckman, L8-80M) a 60000 rpm por 20 horas a 20°C. Após a centrifugação, duas bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV longa. A banda superior era composta de DNA linear e circular aberto e a banda inferior era composta de DNA circular. A banda inferior de DNA foi removida do tubo de centrifuga com o

auxílio de uma seringa com agulha de grosso calibre. O DNA plasmidial foi colocado em tubo eppendorf e o brometo de etideo foi removido através de extrações com butanol saturado com água. As extrações com butanol foram repetidas até que nenhum vestígio de cor rosa fosse observado na fase aquosa. O DNA foi dialisado contra TE, pH 8,0, e guardado a -20°C.

III.17. ISOLAMENTO DOS FRAGMENTOS CORRESPONDENTES

AOS GENES DA ZEÍNA DOS CLONES

pZ 22.3 E pZ 19.1

O DNA dos clones pZ 22,3 e pZ 19,1 foi digerido com a enzima de restrição Pst I (Pharmacia) para que os insertos correspondentes aos genes da zeína fossem liberados. Para a digestão, foram adicionados 20 µl (1 µg) do DNA dos clones em tubos eppendorf estéreis. A seguir, foram adicionados 2,5 µl do tampão da enzima Pst I (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 100 mM; e MgCl₂ 10 mM) 10 vezes concentrado, 1 µl da enzima Pst I (13 U) e 1,5 µl de água. O volume total da reação foi de 25 µl. A reação foi incubada durante a noite a 37°C. Após a digestão, foram adicionados 6 µl de tampão de coloração 6 vezes concentrado e os DNAs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etideo em tampão TBE. Os insertos foram coletados do gel de agarose pela metodologia descrita por DRETZEN et al. (1981) e DANNER (1982).

Para a coleta dos insertos no gel, pequenos pedaços de papel DEAE (Whatman, DE 81) foram cortados e incubados por aproximadamente 2 horas em uma solução de NaCl 2,5 M a 4°C. Os pedaços de papel DEAE foram lavados por 3 vezes com água estéril e 1 vez com tampão TBE por 5 minutos. A seguir, as bandas correspondentes aos insertos de zeína foram localizadas no gel de agarose com o auxílio de uma luz UV. Após a corrida ser interrompida, foram feitas incisões no gel ao lado das bandas e o papel DEAE foi inserido no gel com o auxílio de uma pinça. Após a remoção da pinça, as incisões no gel se fecharam sobre o papel DEAE e a eletroforese continuou até que as bandas de DNA tivessem migrado totalmente para os pedaços de papel. A eletroforese foi interrompida e os pedaços de papel DEAE foram removidos com o auxílio de uma pinça estéril. Os papéis DEAE foram lavados por 3 vezes com água estéril e após as lavagens o excesso de água foi retirado encostando-se os lados dos papéis DEAE em papel de filtro.

Para a retirada do DNA do papel DEAE foi colocado um pouco de lã de vidro na ponta de uma ponteira para micro pipeta de 1000 µl. A ponteira foi introduzida em um eppendorf cuja tampa havia sido cortada o suficiente para que a ponteira se encaixasse. A ponteira e o eppendorf foram colocados em um tubo de centrifuga. Foram adicionados 200 µl de tampão de eluição (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; EDTA 2 mM; NaCl 1,5 M) na ponteira e esta foi centrifugada a 2000 rpm em uma centrifuga de mesa (Fanem, Excelsa Baby) por 5 minutos. Os papéis DEAE contendo o DNA foram colocados na ponteira depois desta ter sido

transferida para um eppendorf limpo. A seguir, foram adicionados 200 µl do tampão de eluição e os papéis foram incubados por 1 hora a 37°C. A ponteira foi centrifugada a 2000 rpm (Fanem, Excelsa Baby) por 5 minutos e mais 200 µl de tampão de eluição foram adicionados. Depois da ponteira ser centrifugada novamente a 2000 rpm (Fanem, Excelsa Baby) por 5 minutos, foram adicionados mais 100 µl de tampão. A ponteira foi centrifugada e o DNA coletado foi transferido para um tubo eppendorf estéril. O DNA foi extraído uma vez com butanol equilibrado em água. Após a extração, o DNA foi centrifugado por 30 segundos em uma microcentrífuga (Incibrás, Spin 1) e a fase superior (butanol) foi descartada. O DNA foi extraído uma segunda vez com butanol não equilibrado em água. O butanol foi removido e o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol gelado a -20°C durante a noite. O DNA foi centrifugado por 15 minutos em uma microcentrífuga (Incibrás, Spin 1), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%. O DNA foi ressuscitado em TE e marcado com ^{32}P -dNTP.

III.18. MARCAÇÃO DOS FRAGMENTOS CORRESPONDENTES AOS GENES DA ZEÍNA

A marcação dos fragmentos correspondentes aos genes da zeína que codificam para as proteínas 22 e 19 kDa foi feita de acordo com a metodologia descrita por FEINBERG e VOGELSTEIN (1983). O DNA dos fragmentos foi desnaturado em um

banho a 100°C por 10 minutos. A seguir, o DNA foi colocado no gelo e a mistura da reação de marcação do DNA foi preparada em tubo eppendorf como se segue: 30 µl de DNA (200 ng), 10 µl de tampão OLB (Solução A: 1 ml de Tris-HCl 1,25 M, pH 8,0; MgCl₂ 0,125 M; 18 µl de 2-ME; 5 µl de dTTP 0,1 M; e 5 µl de dGTP 0,1 M. Solução B: HEPES -- ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2-etanosulfônico -- 2M, pH 6,6. Solução C: hexadesoxirribonucleotídeos 90 U/ml. A/B/C foram misturadas nas proporções de 100:250:150, v/v e guardadas em aliquotas a -20°C), 2 µl de γ -³²P-dATP (46 uCi), 7,5 µl de γ -³²P-dCTP (38 uCi), 2 µl BSA (10 mg/ml) e 1 µl de "Klenow fragment" (Amersham) 5 U.

Antes da adição da enzima na reação de marcação, 1 µl da mistura foi retirado e colocado em papel DE-81 (Whatman) para ser utilizado como controle. Depois da adição da enzima, a reação foi incubada a 37°C. Foram retiradas amostras de 1 µl em intervalos de 1 hora para a monitoração da reação. Estas amostras foram colocadas em papel DE-81 (Whatman) e foram lidas em um cintilador (Beckman, RackBeta 1217) antes e depois do papel ter sido lavado por 4 vezes em Na₂HPO₄ 0,5 M (5 minutos de duração para cada lavagem), 2 vezes com água (1 minuto de duração para cada lavagem) e 2 vezes com etanol 95% (1 minuto de duração para cada lavagem). Os filtros lavados medem somente a radioatividade incorporada nos ácidos nucléicos. A monitoração da reação foi feita em CHERENKOV (H³) e a porcentagem de incorporação de ³²P foi feita dividindo-se a leitura da radioatividade nos filtros lavados pela leitura obtida nos não

lavados. Para parar a reação, foram adicionados 4 μ l de EDTA 0,5 M. A seguir, adicionou-se aproximadamente 50 μ l de STE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0).

O DNA marcado foi separado dos (α - 32 P) NTPs não incorporados através de cromatografia em colunas de Sephadex G-50 (MANIATIS et al., 1982). Para o preparo da coluna, foi colocado lã de vidro siliconizada na ponta de uma seringa descartável de 1 ml. A seguir, a seringa foi preenchida com Sephadex G-50 equilibrado em STE. A seringa foi inserida em um tubo de centrifuga e centrifugada a 4000 rpm (Fanem, Excelsa Baby) por 4 minutos. Foi adicionado mais Sephadex G-50 equilibrado em STE e a coluna foi empacotada até que ela atingisse um volume de 0,9 ml. A seguir, a coluna foi lavada por 2 vezes com 200 μ l de STE. Os 100 μ l da amostra contendo o DNA foram colocados na coluna e recuperados em um eppendorf estéril após centrifugação. Depois da cromatografia, 1 μ l da amostra de DNA foi colocada em papel DE-81 para contagem em CHERENKOV antes e depois da lavagem do filtro. Foi colocado também 1 μ l da amostra de DNA marcado em 5 ml de líquido de cintilação para uma contagem mais precisa da radioatividade no canal de 32 P do cintilômetro. A porcentagem de incorporação foi determinada novamente e a atividade específica da sonda foi determinada.

III.19. HIBRIDIZAÇÃO DOS FILTROS NA PRESENÇA DE FORMAMIDA

A hibridização das sondas com os DNAs genômicos foi feita de acordo com as especificações da Amersham (Amersham International, U.K.) para membranas de nylon (Hybond-N) e a metodologia descrita por SIEGEL e BRESNICK (1986). A pré-hibridização foi feita colocando-se os filtros contendo os DNAs genômicos em sacos de polietileno, nos quais foram adicionados 0,08 ml/cm² da solução de pré-hibridização. Para a solução de pré-hibridização, uma solução de SSC 20 vezes concentrada foi diluída para 6 vezes e SDS 0,2% foi adicionado. A seguir, adicionou-se leite desengordurado Molico 0,25% e a mistura foi colocada em um banho a 70°C. Foi adicionado por último formamida desionizada 50%; o volume final da solução foi completado com água. A solução de pré-hibridização foi filtrada em papel Whatman 1 MM e colocada no saco de polietileno. Os filtros foram pré-hibridizados durante a noite a 42°C com agitação constante.

A solução de pré-hibridização foi descartada e o DNA das sondas com atividade específica entre 10⁸ a 10⁹ cpm/ug foi desnaturado a 100°C por 10 minutos e colocado no gelo por 5 minutos. A seguir, o DNA foi misturado com solução de pré-hibridização e 0,05 ml/cm² de solução foi colocado nos sacos de polietileno contendo os filtros. A hibridização foi feita durante a noite a 42°C com agitação constante. Após a hibridização, os filtros foram lavados por 2 vezes com SSC 2

vezes concentrado e SDS 0,1% à temperatura ambiente, sendo que o período de cada lavagem foi de 15 minutos. Seguiram-se 2 lavagens de 1 hora cada uma com SSC 0,1 vez concentrado e SDS 0,1% a 55°C. Os filtros foram lavados rapidamente com SSC 2 vezes concentrado e embrulhados em magipack. Os filtros foram expostos a filme de raio X (Amersham, Hyperfilm) a -70°C por 48 horas.

A formamida desionizada utilizada na pré-hibridização e na hibridização foi preparada adicionando-se a 200 ml de formamida aproximadamente 10 g de resina de troca iônica, AG 501-X8 (Bio-Rad). A seguir, a mistura foi agitada com o auxílio de um agitador magnético por 1 hora à temperatura ambiente e filtrada em papel Whatman 1 MM para remover a resina. Finalmente, a formamida foi guardada em frasco escuro a -70°C.

Para reutilização das membranas Hybond-N, as sondas foram removidas através de incubação a 45°C por 30 minutos em NaOH 0,4 M. A seguir, as membranas foram mantidas a 45°C por 30 minutos em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,5, contendo SSC 0,1 vez concentrado e SDS 0,1% (p/v).

IV - RESULTADOS

IV.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO ENDOSPERMA DO ADLAY

As proteínas de reserva do Coix lacryma-jobi L. var. Adlay (Figura 1A e 1B) foram extraídas sequencialmente, sendo que a porcentagem de 2-ME no solvente de extração das prolaminas variou de 0 a 20%. Como pode ser visto na Tabela 1, a quantidade de albuminas e globulinas (F1) gira em torno de 0,5 mg de proteína/100 mg de endosperma; já a quantidade de prolaminas (F2) variou de 2 mg de proteína/100 mg de endosperma quando a proteína foi extraída na ausência de 2-ME a 16,8 mg de proteína/100 mg de endosperma quando a proteína foi extraída com 20% de 2-ME. À medida que a porcentagem de 2-ME ia aumentando no solvente de extração das prolaminas, a quantidade de proteína F2 extraída aumentava com uma concomitante redução das proteínas do resíduo (F3). A quantidade de proteínas na F3 variou de 16 mg de proteína/100 mg de endosperma na ausência de 2-ME no solvente de extração da F2 a 4,4 mg de proteína/100 mg de endosperma quando 20% de 2-ME foi utilizado na extração da F2. Como pode ser visto na Figura 2, as maiores discrepâncias na extração da F2 são observadas quando 0 e 0,7% de 2-ME são utilizados; a partir

Figura 1 - (A) Plantas típicas de *Coix lacryma-jobi* var. Adlay plantadas no campo experimental da UNICAMP. (B) Sementes de *Coix lacryma-jobi* var. Adlay sem e com invólucro de proteção.

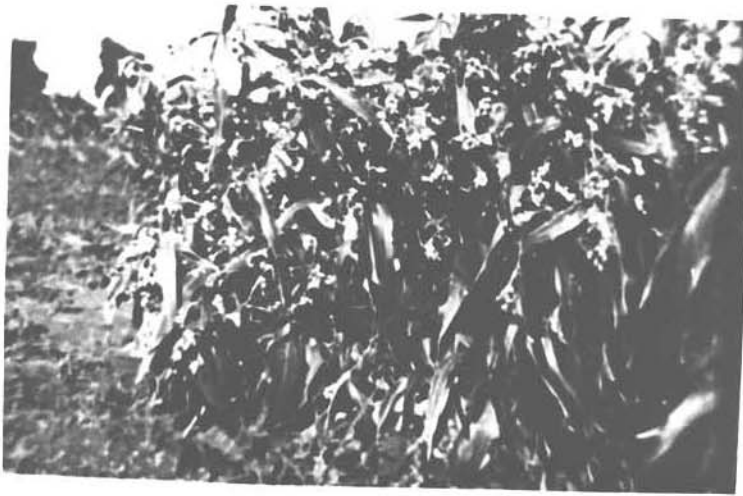
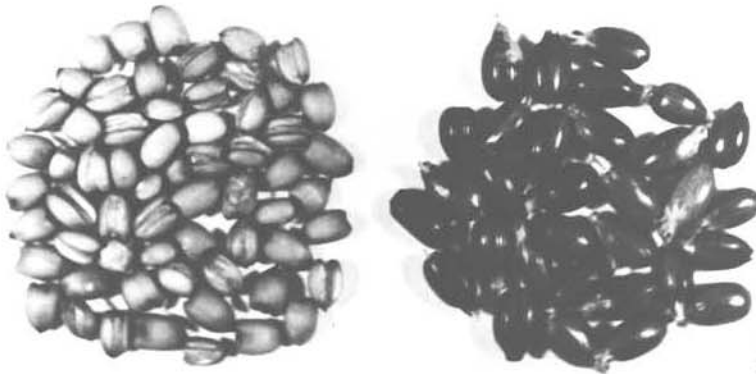
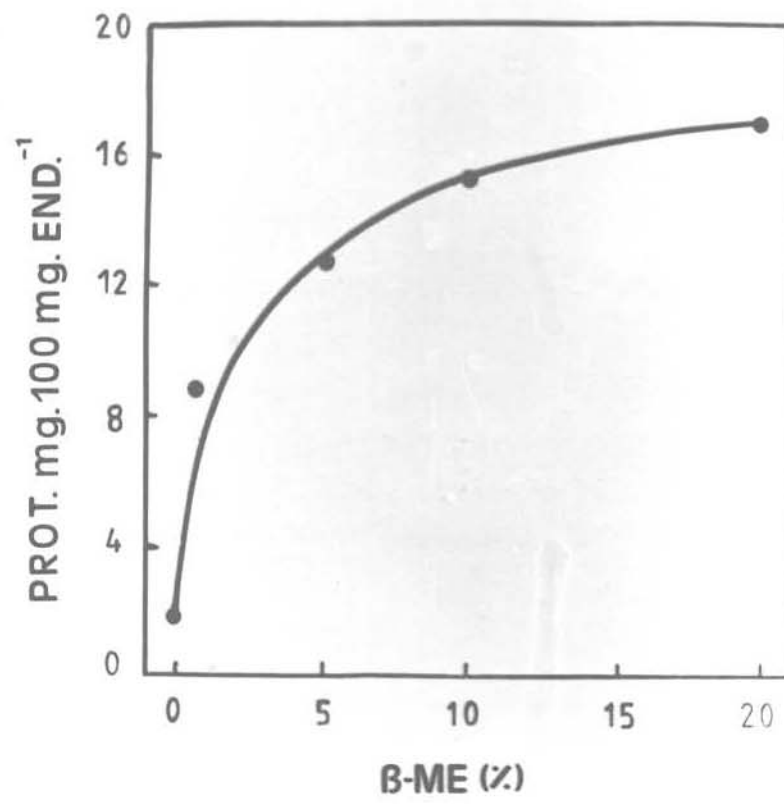
A**B**

Tabela 1 - Distribuição das proteínas nos extratos F1, F2 e F3 do endosperma de Coix lacryma-jobi L. var. Adlay.

PORCENTAGEM DE 2-ME NO SOLVENTE DE F2	FRAÇÃO PROTÉICA	mg PROTEÍNA 100 mg ENDOSPERMA ⁻¹	% DE PROTEÍNA
0	F1	0,5	2,7
	F2	2,0	10,8
	F3	16,0	86,5
0,7	F1	0,5	2,4
	F2	8,8	41,9
	F3	11,7	55,7
5,0	F1	0,5	2,8
	F2	12,3	68,3
	F3	5,2	28,9
10,0	F1	0,4	1,9
	F2	15,2	71,7
	F3	5,6	26,4
20,0	F1	0,4	1,8
	F2	16,8	77,8
	F3	4,4	20,4

Figura 2 - Efeito da concentração de 2-ME na extração das prolaminas do *Coix lacryma-jobi* var. Adlay. As prolaminas do Adlay foram extraídas com isopropanol 55% e concentrações de 0, 0,7, 5, 10 e 20% de 2-ME.



destas concentrações começa a haver uma estabilização da quantidade de proteína extraída.

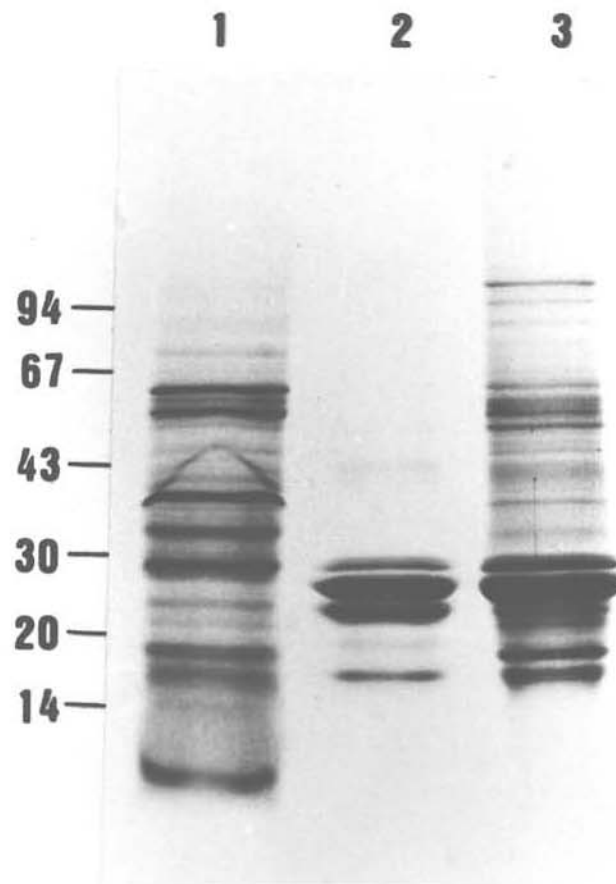
As análises de aminoácidos das três frações protéicas do Adlay foram realizadas em HPLC. Os resultados na Tabela 2 indicam que a F1 é rica em ácido glutâmico (18,1%), ácido aspártico (14,3%), glicina (14,2%) e alanina (11,1%). A F2 é composta principalmente de ácido glutâmico (23,0%) e dos aminoácidos hidrofóbicos alanina (18,0%), leucina (15,8%) e prolina (9,9%). A porcentagem do aminoácido essencial lisina na F2 do Adlay é praticamente inexistente e a de metionina é baixa, ficando ao redor de 0,2%. Do mesmo modo que na F2, os aminoácidos que ocorrem em maior quantidade na F3 são o ácido glutâmico (16,8%), alanina (15,8%), leucina (12,4%) e prolina (9,5%). Apesar da composição de aminoácidos da F3 ser relativamente similar à da F2, a F3 apresenta lisina (0,8%) e o teor de metionina desta fração é 9 vezes maior que o da F2. O teor do aminoácido essencial treonina também é relativamente mais elevado na F3 (4,6%) do que na F2 (2,7%). Um fato interessante é a alta porcentagem de ácido glutâmico nas três frações protéicas. O aminoácido hidrofóbico alanina também ocorre em porcentagens consideráveis nas três frações.

As frações protéicas do Adlay foram analisadas através de SDS-PAGE (Figura 3). Várias classes de cadeias polipeptídicas de pesos moleculares diferentes foram encontradas no padrão de eletroforese da F1. A banda de peso molecular mais alto identificada nesta fração foi a de 110 kDa e

Tabela 2 - Composição de aminoácidos das frações protéicas F1, F2 e F3 extraídas do endosperma do Coix lacryma-jobi L. var. Adlay. Os níveis de aminoácidos individuais foram expressos como porcentagem do conteúdo total de aminoácidos. As proteínas da F2 foram extraídas com solvente contendo 20% de 2-ME e as da F3 foram extraídas com Tris-HCl, 100 mM, pH 7,5, contendo SDS 5% e 2-ME 7,5%.

AMINOÁCIDOS	FRAÇÕES PROTÉICAS		
	F1	F2	F3
Asparagina	0,1	0,1	1,8
Glutamina	0,4	-	-
Ácido Aspártico	14,3	6,2	6,3
Serina	6,9	5,4	6,8
Ácido Glutâmico	16,1	23,0	16,8
Arginina	7,2	1,7	1,0
Glicina	14,2	3,3	8,5
Treonina	5,1	2,7	4,6
Alanina	11,1	18,0	15,8
Prolina	5,1	9,9	9,5
Metionina	-	0,2	1,8
Valina	6,2	5,9	6,8
Fenilalanina	2,7	4,1	3,5
Isoleucina	3,0	3,4	3,6
Leucina	4,2	15,8	12,4
Lisina	2,8	-	0,8

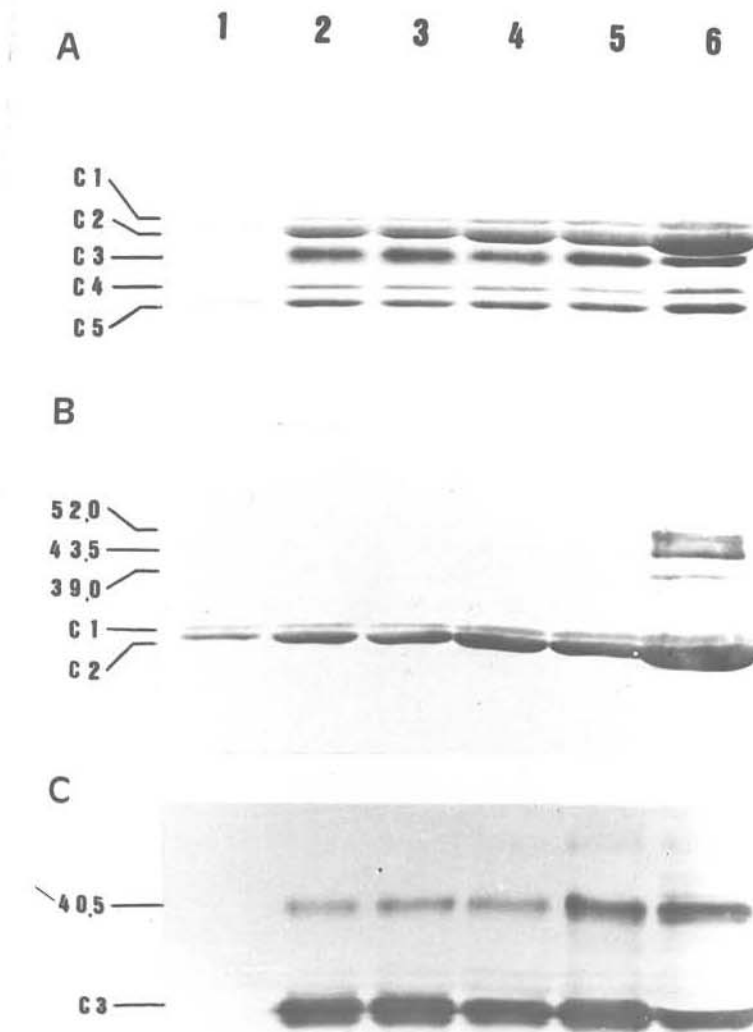
Figura 3 - Análise em SDS-PAGE das proteínas F1, F2 e F3 do endosperma do *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay. (1) F1, (2) F2 e (3) F3. As proteínas foram coradas com 0,25% Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (5:5:1, v/v).



a de menor peso molecular foi a de 9 kDa. O padrão de eletroforese da F3 também demonstrou ser bastante complexo, com a presença de vários polipeptídeos com pesos moleculares entre 110 e 15 kDa. Foi identificada a presença de bandas de prolamina residual no padrão de eletroforese da F3. Ao contrário da F1 e F3, o padrão de eletroforese da F2 é composto por apenas 5 classes de pesos moleculares distintos. Estas classes foram denominadas por um C, que indica a primeira letra do nome da proteína (coixina), e por números de 1 a 5, que representam a ordem (em relação à origem do gel) destas classes no gel. Assim sendo, a classe de maior peso molecular foi designada de C1 (27 kDa) e as outras classes foram designadas, respectivamente, de C2 (25 kDa), C3 (22 kDa), C4 (17,5 kDa) e C5 (15 kDa). Das classes de prolamina, a C2 e a C3 parecem ser as principais, agrupando assim grande parte dos polipeptídeos da coixina, que é a principal proteína de reserva do Adlay.

Com o intuito de determinar o efeito a nível de SDS-PAGE do uso das diversas concentrações de 2-ME na extração da prolamina do Adlay, os diversos extratos de F2 foram submetidos a eletroforese (Figura 4A). Como pode ser visto na Figura 4A, na ausência de 2-ME a quantidade de coixina nas classes C1, C2, C4 e C5 é extremamente reduzida e a classe C3 desaparece por completo. Quando 0,7% de 2-ME é utilizado na extração, há um aumento substancial na quantidade de prolamina das diversas classes, inclusive na classe C3. A medida que a concentração de 2-ME aumenta para 2, 5, 10 e 20% no solvente de extração da proteína, há um aumento da quantidade de proteína

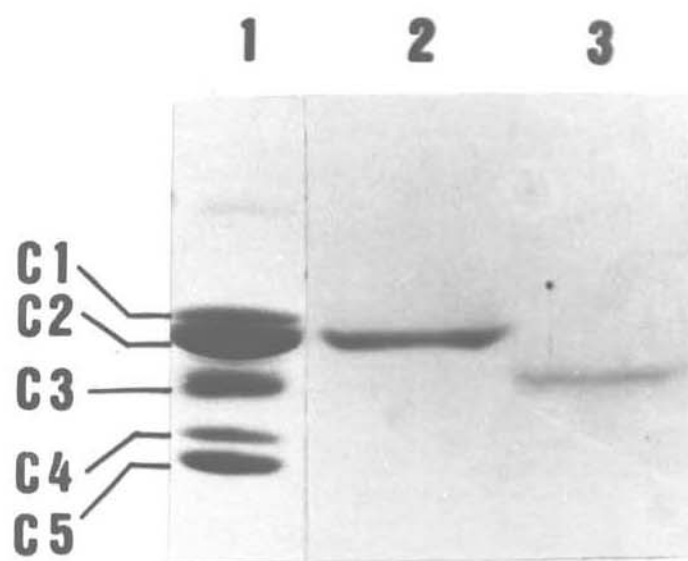
Figura 4 - Análise em SDS-PAGE das prolaminas do Coix lacryma-jobi var. Adlay extraídas com isopropanol 55% contendo (1) 0% de 2-ME, (2) 0,7% de 2-ME, (3) 2,0% de 2-ME, (4) 5,0% de 2-ME, (5) 10,0% de 2-ME e (6) 20,0% de 2-ME. (A) Proteínas coradas com 0,25% de Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (5:5:1, v/v). (B) Análise imunológica das proteínas em uma réplica do gel da Figura 4A. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com o antisoro contra a classe de coixina C2. A membrana foi lavada e incubada com Proteína A ligada a peroxidase por 1 hora. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado pela coloração resultante da reação da peroxidase. (C) O mesmo que em (B), com a diferença que o antisoro utilizado foi o contra a classe de coixina C3.



encontrada nas classes C1, C2, C4 e C5, sendo que o maior aumento é observado na classe C2. Em contraste com o aumento observado para as classes C1, C2, C4 e C5, o aumento de proteína na classe C3 é aparentemente pequeno. O uso de 2-ME na extração das prolaminas do Adlay faz com que proteínas de alto peso molecular sejam extraídas. A presença destas proteínas no gel é mais evidente quando 20% de 2-ME é utilizado no solvente de extração (Figura 4A).

As principais classes da prolamina do Adlay, C2 e C3, foram purificadas através de géis preparativos e eletroeluição. Após a purificação, amostras de cada classe de proteína foram submetidas a SDS-PAGE, onde se constatou que tanto a classe C2 quanto a C3 estavam substancialmente livres de outras proteínas (Figura 5). Antisoros foram preparados contra estas duas classes de coixinas purificadas. O título dos antisoros foram determinados através da técnica de ELISA, sendo que ambos os antisoros reagiram em diluições de até 1/10000. Os antisoros preparados foram utilizados em análises imunológicas (Western blot) das prolaminas extraídas com diferentes concentrações de 2-ME (Figura 4B e 4C). As prolaminas foram transferidas e imobilizadas em filtros de nitrocelulose que foram incubados com os anticorpos contra as coixinas em diluições de 1/500. Os filtros foram incubados com Proteína A ligada a peroxidase e o complexo antígeno-anticorpo foi visualizado através da reação de coloração da peroxidase.

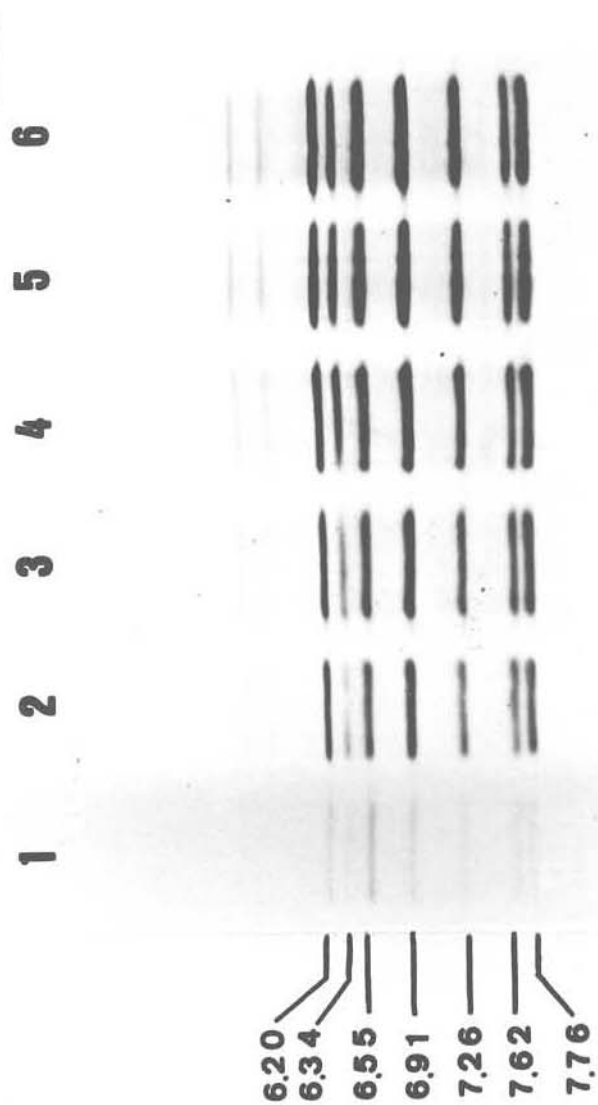
Figura 5 - Análise em SDS-PAGE das classes de coixina purificadas. (1) Extrato total da coixina. (2) Classe C2 purificada. (3) Classe C3 purificada. As proteínas foram coradas com 0,25% de Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (5:5:1, v/v).



Como pode ser visto na Figura 4B, o antisoro contra C2 reconheceu as classes de coixina C1 e C2. A reação do antisoro com a C1 e C2 aumentou de intensidade na medida que maiores quantidades de proteína se acumularam nas respectivas bandas como consequência da presença de maiores concentrações de 2-ME no solvente de extração. O antisoro contra C2 reconheceu também as proteínas de alto peso molecular que foram extraídas na presença de 20% de 2-ME. O peso molecular aparente destas proteínas foi determinado como sendo de 52, 43,5 e 39 kDa (Figura 4B). O antisoro contra C3 reagiu com a banda C3 e apresentou reação cruzada com uma proteína de 40,5 kDa (Figura 4C). Ao contrário da banda C3, os níveis da proteína de 40,5 kDa aumentaram com o aumento das concentrações de 2-ME no solvente de extração, como pode ser constatado pela intensidade da reação do anticorpo com a proteína (Figura 4C).

Como referido anteriormente, quando submetida a SDS-PAGE a prolamina do Adlay subdividiu-se em apenas 5 classes de pesos moleculares distintos. Contudo, quando a proteína extraída em diversas concentrações de 2-ME foi submetida a IEF, ela apresentou uma maior heterogeneidade, subdividindo-se em aproximadamente 10 bandas (Figura 6). Destas 10 bandas, 7 são bandas principais nitidamente visíveis, mesmo quando a proteína foi extraída com 0,7% de 2-ME. O padrão das bandas de IEF da coixina não foi alterado com a utilização das diferentes concentrações de 2-ME na extração da proteína, e mesmo na ausência de 2-ME no solvente de extração, o padrão das bandas se manteve apesar da quantidade de proteína ser drasticamente

Figura 8 - Análise em IEF das prolaminas do *Coix lacryma-jobi* var. Adlay extraídas com isopropanol 55% contendo (1) 0% de 2-ME, (2) 0,7% de 2-ME, (3) 2,0% de 2-ME, (4) 5,0% de 2-ME, (5) 10,0% de 2-ME e (6) 20,0% de 2-ME. As proteínas foram coradas com 0,5% de Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (2:7:1, v/v).

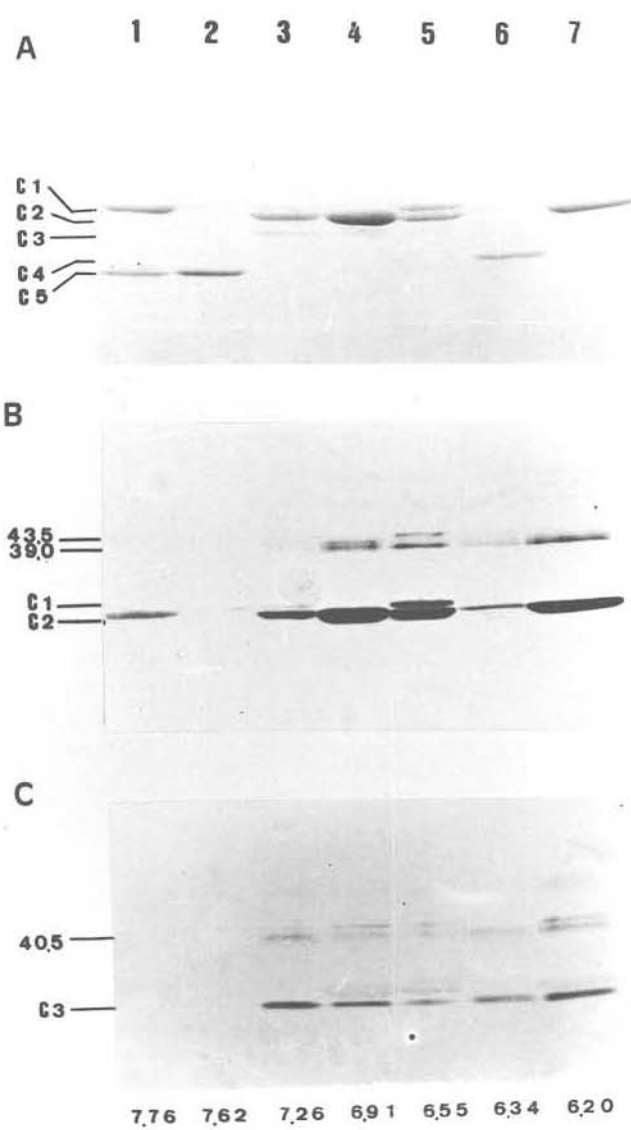


reduzida em todas as bandas. De maneira similar ao que ocorreu em SDS-PAGE, à medida que as concentrações de 2-ME foram elevadas, a intensidade das bandas de IEF aumentou. A faixa de pI em que as 7 bandas de IEF principais se distribuíram foi de 6,20 a 7,76 (Figura 6).

As 7 bandas principais encontradas no padrão de IEF do Adlay foram cortadas do gel e submetidas individualmente a SDS-PAGE para uma análise equivalente a 2-D (Figura 7A). Em SDS-PAGE, as bandas de IEF se subdividiram em mais de uma classe de peso molecular distinto. Assim sendo, a banda de pI 7,76 subdividiu-se em uma banda correspondente a C1 e uma correspondente a C5; a de pI 7,82, com peso molecular correspondente principalmente a C5, apresentou uma banda com resquícios de proteína C1. A banda de pI 7,26 apresentou proteína C2 e resquícios de C1 e C3. A banda de pI 6,91 constituiu-se quase que totalmente de proteína C2 e a de pI 6,55, de C1 e C2. A banda de pI 6,34 é constituída quase que totalmente por proteína C4 com resquícios de C2 e a de pI 6,20 tem principalmente proteína C2. Um fato interessante é que da mesma forma que a banda de pI 7,26, as de pIs 6,91, 6,55, 6,34 e 6,20 também apresentaram resquícios de proteína C3.

Dois géis que constituíam réplicas daquele da Figura 7A foram transferidos para membranas de nitrocelulose para reação com os antisoros contra C2 e C3. Como esperado, o antisoro contra C2 reagiu com proteínas C1 e C2 e apresentou reação cruzada com proteínas de alto peso molecular presentes nas bandas

Figura 7 - Análise em SDS-PAGE das bandas de IEF da prolamina do *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay. (1) banda de pI 7,76, (2) banda de pI 7,82, (3) banda de pI 7,26, (4) banda de pI 8,91, (5) banda de pI 8,55, (6) banda de pI 8,34 e (7) banda de pI 6,20. (A) Gel corado com 0,25% de Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (5:5:1, v/v). (B) Análise imunológica das proteínas em uma réplica do gel da Figura 7A, As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com o antisoro contra a classe de coixina C2. A membrana foi lavada e incubada com Proteína A ligada a peroxidase por 1 hora. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado pela coloração resultante da reação da peroxidase. (C) O mesmo que em (B), com a diferença que o antisoro utilizado foi o contra a classe de coixina C3.



de IEF de pIs 7,26, 6,91, 6,55, 6,34 e 6,20 (Figura 7B). A quantidade das proteínas de alto peso molecular na banda de pI 7,26 deve ser pequena, já que a reação com o antisoro foi mínima (Figura 7B). O antisoro contra C3 reagiu com as bandas de pI 7,26, 6,91, 6,55, 6,34 e 6,20 (Figura 7C) que, como foi visto no gel da Figura 7A, continham resquícios desta proteína. Nestas mesmas bandas de IEF, o antisoro contra C3 apresentou reação cruzada com proteínas de alto peso molecular (Figura 7C). As bandas de alto peso molecular visualizadas nas reações com os antisoros não são evidentes no gel corado com Coomassie Brilliant Blue R 250 (Figura 7A).

IV.2. AS PROTEÍNAS DO ENDOSPERMA E O DNA GENÔMICO DO ADLAY E DO MAYA

IV.2.1. COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO ENDOSPERMA DO ADLAY COM AS DO MAYA

As proteínas de milho (*Zea mays* L.) var. Maya foram extraídas sequencialmente, sendo que 20% de 2-ME foram utilizados na extração da F2. A quantidade de proteína encontrada na F1, F2 e F3 do Maya foi comparada com a quantidade de proteína encontrada nas frações protéicas do Adlay (Tabela 3). Como indica a Tabela 3, a quantidade de proteína na F1 do Maya gira em torno

Tabela 3 - Comparação da distribuição das proteínas do endosperma nos extratos F1, F2 e F3 do Coix lacryma-jobi L. var. Adlay e do Zea mays L. var. Maya. A porcentagem de 2-ME utilizada na extração da F2 foi de 20%.

FRAÇÃO PROTÉICA	ADLAY		MAYA	
	mg PROTEÍNA 100 mg ENDOSPERMA ⁻¹	(%)	mg PROTEÍNA 100 mg ENDOSPERMA ⁻¹	(%)
F1	0,4	1,8	0,4	4,6
F2	16,8	77,8	4,5	51,7
F3	4,4	20,4	3,8	43,7

de 0,4 mg de proteína/100 mg de endosperma, o que é praticamente igual a quantidade de proteína encontrada na F1 do Adlay. A quantidade de proteína na F3 do Maya também é bastante similar à quantidade de proteína encontrada na F3 do Adlay, sendo que a F3 do Maya apresentou 3,8 mg de proteína/100 mg de endosperma e a F3 do Adlay, 4,4 mg de proteína/100 mg de endosperma. A principal diferença na quantidade de proteína do Maya e do Adlay foi encontrada na F2. O Maya apresentou somente 4,5 mg de proteína/100 mg de endosperma na F2, o que é aproximadamente 3,7 vezes menos do que a quantidade encontrada para a F2 do Adlay.

As análises de aminoácidos das frações protéicas do Maya foram realizadas em HPLC e comparadas com as das frações protéicas do Adlay na Tabela 4. A composição de aminoácidos da F1 do Maya é bastante similar à da F1 do Adlay, sendo que, da mesma maneira que no Adlay, os aminoácidos que se apresentam em maiores porcentagens nesta fração são ácido aspártico (13,9%), glicina (13,6%), alanina (11,7%) e ácido glutâmico (11,3%). A composição de aminoácidos da F2 e F3 do Maya também é bastante similar à do Adlay. Do mesmo modo que na F2 do Adlay, o aminoácido que se apresenta em maior porcentagem na F2 do Maya é o ácido glutâmico (20,8%). Seguindo-se ao ácido glutâmico estão os aminoácidos hidrofóbicos leucina (16,9%), que é o segundo aminoácido mais abundante no Maya e terceiro no Adlay; prolina (14,4%) é o terceiro aminoácido mais abundante do Maya e quarto no Adlay; e alanina (13,4%), que corresponde ao quarto aminoácido mais abundante no Maya e segundo no Adlay. A porcentagem dos aminoácidos essenciais lisina e treonina é

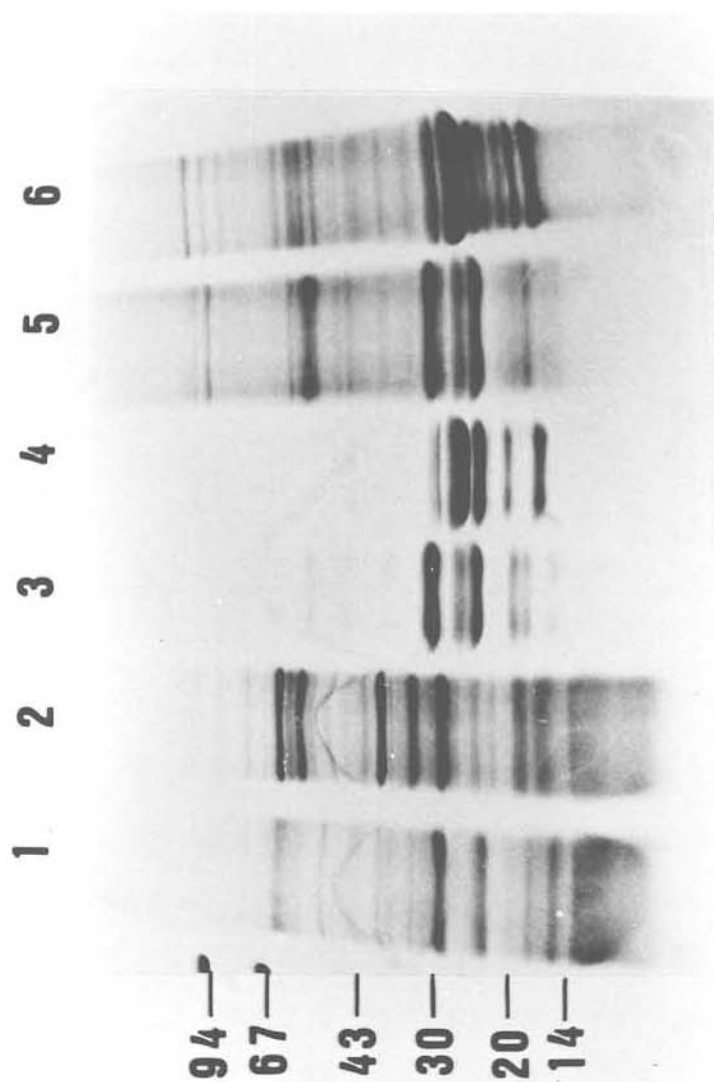
Tabela 4 - Comparação da composição de aminoácidos das frações protéicas F1, F2 e F3 extraídas do endosperma do Coix lacryma-jobi L. var. Adlay com as frações protéicas extraídas do endosperma do Zea mays L. var. Maya. Os níveis de aminoácidos individuais foram expressos como porcentagem do conteúdo total de aminoácidos. As proteínas da F2 foram extraídas com 20% de 2-ME e as da F3 foram extraídas com Tris-HCl, 100 mM, pH 7,5, contendo SDS 5% e 2-ME 7,5%.

AMINOÁCIDOS	FRAÇÕES PROTÉICAS					
	F1		F2		F3	
	ADLAY	MAYA	ADLAY	MAYA	ADLAY	MAYA
Asparagina	0,1	0,1	0,1	0,2	1,8	1,8
Glutamina	0,4	0,7	-	-	-	-
Ácido Aspártico	14,3	13,9	6,2	4,6	6,3	6,7
Serina	6,9	7,1	5,4	6,2	6,8	7,2
Ácido Glutâmico	16,1	11,3	23,0	20,8	16,8	16,2
Arginina	7,2	6,0	1,7	1,4	1,0	1,2
Glicina	14,2	13,6	3,3	5,5	8,5	8,6
Treonina	5,1	4,9	2,7	3,5	4,6	4,7
Alanina	11,1	11,7	18,0	13,4	15,8	11,1
Prolina	5,1	8,0	9,9	14,4	9,5	10,3
Metionina	-	-	0,2	0,2	1,8	0,6
Valina	6,2	5,7	5,9	4,6	6,8	6,8
Fenilalanina	2,7	2,4	4,1	4,5	3,5	3,9
Isoleucina	3,0	3,0	3,4	3,3	3,6	4,1
Leucina	4,2	5,2	15,8	16,9	12,4	12,1
Lisina	2,8	2,3	-	0,2	0,8	1,7

levemente mais elevada na F2 do Maya e a porcentagem de metionina é aparentemente igual nos dois cereais levando-se em consideração os métodos utilizados. Da mesma forma que a F2, a F3 do Maya é rica em ácido glutâmico (16,2%), leucina (12,1%), alanina (11,1%) e prolina (10,3%). As porcentagens destes aminoácidos na F3 do Maya são similares às encontradas na F3 do Adlay. Apesar de baixa, a porcentagem de lisina encontrada na F3 do Maya é aproximadamente duas vezes maior que a encontrada no Adlay. Por outro lado, a porcentagem de metionina no Maya é três vezes menor que no Adlay.

Os padrões em SDS-PAGE das frações protéicas do Maya foram comparados com as do Adlay (Figura 8). A F1 do Maya apresentou um padrão complexo com bandas de peso molecular entre 65 kDa e 9 kDa. Acima da banda de 65 kDa existem umas poucas bandas difíceis de serem visualizadas devido à baixa intensidade delas no gel. Apesar do padrão da F1 do Maya ser de uma maneira geral diferente da do Adlay, existem bandas nos dois materiais que apresentaram os mesmos pesos moleculares. A intensidade destas bandas, contudo, varia nos dois materiais. A F3 do Maya demonstrou uma complexidade similar à encontrada para F3 do Adlay, sendo que algumas bandas de ambos os materiais exibiram os mesmos pesos moleculares. As bandas da F3 do Maya apresentaram pesos moleculares entre 110 kDa a 14,5 kDa. O padrão da F2 do Maya é similar ao da F2 do Adlay, já que ambos apresentam uma baixa heterogeneidade em SDS-PAGE. A F2 do Maya é composta por 7 classes de pesos moleculares distintos.

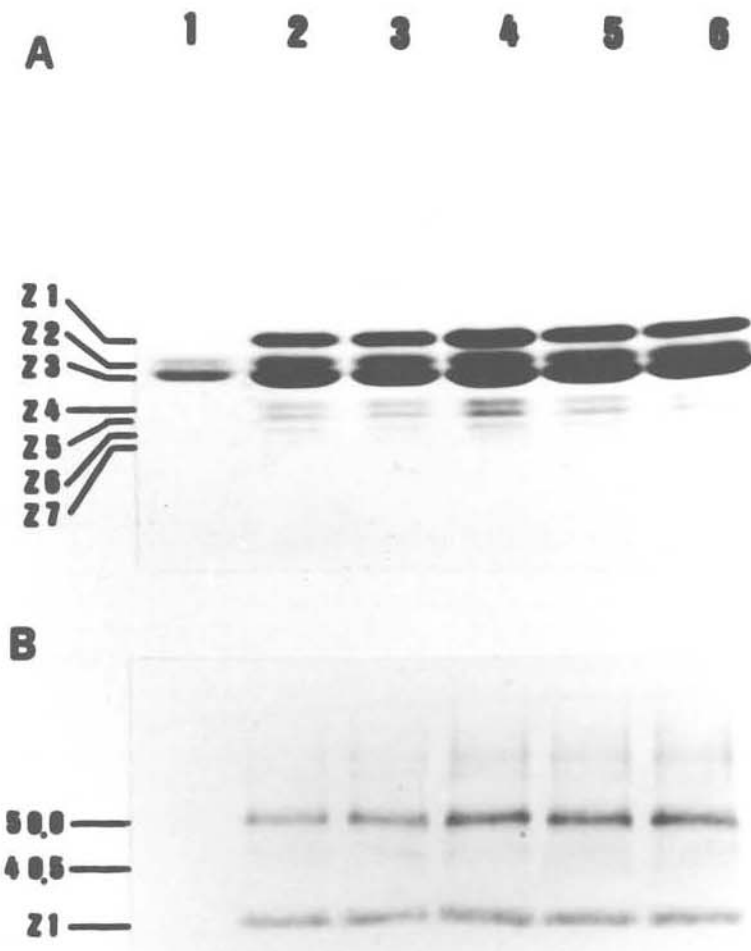
Figura 8 - Comparação em SDS-PAGE das proteínas F1, F2 e F3 do endosperma do *Coix lacryma-jobi* var. Adlay com as do *Zea mays* L. var. Maya. (1) F1 do Maya, (2) F1 do Adlay, (3) F2 do Maya, (4) F2 do Adlay, (5) F3 do Maya e (6) F3 do Adlay. As proteínas foram coradas com 0,25% de Coomassie Brilliant Blue R-250 em metanol/água/ácido acético (5:5:1, v/v).



A nomenclatura dada para as prolaminas do Maya segue o padrão das da coixina. Elas foram denominadas por um Z referente ao nome da proteína (zeína) e um número de designação da posição da banda no gel em relação à origem. Assim sendo, a classe de maior peso molecular aparente (28 kDa) é referida na literatura por zeína de 27 kDa foi denominada de Z1. As outras duas classes principais da zeína do Maya de pesos moleculares aparentes de 25 e 22,5 kDa e referidas na literatura por zeína de 22 e 19 kDa foram denominadas, respectivamente, de Z2 e Z3. As classes de menor peso molecular aparente, que na zeína do Maya são quatro, foram denominadas de Z4, Z5, Z6 e Z7. Apesar do padrão de zeína do Maya e da coixina do Adlay ser o mesmo nos diferentes géis de SDS-PAGE, a posição de algumas bandas de peso molecular aparente menor, ou seja, Z4, Z5 e C4, variou ligeiramente de gel para gel. Os pesos moleculares aparentes da Z4, Z5, Z6 e Z7 foram calculados pelo gel da Figura 8 como sendo de aproximadamente 17 kDa para Z4 e 16 kDa para Z5. Estas duas classes são designadas na literatura de zeína de 15 kDa. A Z6 tem um peso molecular aparente de 15 kDa e a Z7, de 14,5 kDa. Estas classes são designadas na literatura de zeína de 10 kDa.

Da mesma maneira que foi feito para o Adlay, o efeito do uso de diferentes concentrações de 2-ME na extração da zeína do Maya foi determinado através de SDS-PAGE (Figura 9A). Como indica a Figura 9A, na ausência de 2-ME, as classes de zeína Z1, Z4, Z5, Z6 e Z7 não são extraídas e a quantidade de proteína na Z2 e Z3 é reduzida. O comportamento das classes Z1, Z4, Z5, Z6 e Z7 é similar ao da C3 do Adlay, que também não é extraída na

Figura 9 - Análise em SDS-PAGE das prolaminas do *Zea mays* L. var. Maya extraídas com isopropanol 55% contendo (1) 0% de 2-ME, (2) 0,7% de 2-ME, (3) 2,0% de 2-ME, (4) 5,0% de 2-ME, (5) 10,0% de 2-ME e (6) 20,0% de 2-ME. (A) Proteínas coradas com 0,25% de Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (5:5:1, v/v). (B) Análise imunológica das proteínas em uma réplica do gel da Figura 9A. As proteínas do gel foram transferidas para membrana de nylon e incubadas com o antisoro contra a classe de coixina C3. A membrana foi lavada e incubada com Proteína A ligada a peroxidase por 1 hora. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado pela coloração resultante da reação da peroxidase.



ausência de 2-ME (Figura 4A). Apesar de reduzida, a quantidade de proteína na Z2 e Z3 na ausência de 2-ME é maior do que a observada para C1, C2, C4 e C5 do Adlay nestas condições (Figura 4A). Quando 0,7% de 2-ME foi utilizado no solvente de extração da zeína, todas as classes desta prolamina foram extraídas e um aumento substancial de proteína foi observado em Z2 e Z3. A medida que as concentrações de 2-ME foram aumentadas no solvente de extração, houve um aumento relativo da quantidade de proteína, visível principalmente nas classes Z2 e Z3. Da mesma forma que no Adlay, o uso de 2-ME na extração da zeína faz com que proteínas de alto peso molecular sejam extraídas (Figura 9A). Ao contrário do Adlay (Figura 4A), onde as proteínas de alto peso molecular são evidentes principalmente quando 20% de 2-ME é utilizado no solvente de extração, as proteínas de alto peso molecular do Maya apresentam basicamente as mesmas concentrações, independente da concentração de 2-ME no solvente de extração.

O antisoro contra as classes de coixina C2 e C3 foi utilizado na análise imunológica das zeínas extraídas com diferentes concentrações de 2-ME. As proteínas de duas réplicas do gel da Figura 9A foram transferidas para membranas de nylon e incubadas com os antisoros contra as coixinas em diluições de 1/500. As membranas foram incubadas com Proteína A ligada a peroxidase e o complexo antígeno-anticorpo foi visualizado através da reação de coloração da peroxidase. Nenhuma das classes da zeína do Maya apresentou reação com o antisoro contra C2. O antisoro contra C3 reconheceu a classe de zeína Z1. Como pode ser visto na Figura 9B, a intensidade da reação não aumentou à medida

em que a concentração de 2-ME aumentou no solvente de extração, fato também observado para a classe de coixina C3 em reação com o antisoro contra C3 (Figura 4C). O antisoro contra C3 reconheceu também as proteínas de alto peso molecular (Figura 9B).

A zeína do Maya foi submetida a focalização isoelétrica em gel de agarose juntamente com a coixina do Adlay. Como pode ser visto na Figura 10, a zeína apresentou uma grande heterogeneidade em gel de IEF, exibindo um total de aproximadamente 15 bandas, sendo que 8 são bandas principais. Os pIs das bandas de IEF principais do Maya estão entre 7,33 e 5,56. Apesar dos padrões de IEF da prolamina do Adlay e do Maya serem diferentes, existem algumas bandas com pIs comuns nos dois materiais. Entre as bandas principais, as de pIs comuns no Maya e no Adlay são a 7,26, 6,55 e 6,34 (Figura 10).

As 8 bandas principais do padrão de IEF do Maya foram cortadas dos géis e submetidas a SDS-PAGE (Figura 11A). As bandas de pI 7,33, 7,26 e 6,48 são correspondentes à classe de peso molecular da zeína Z2. As bandas de pI 6,55, 6,34, 6,27 e 5,84 subdividiram-se em Z2 e Z3, sendo que as proteínas se acumularam principalmente em Z3. Quanto à banda de pI 5,56, ela subdividiu-se em Z2, Z3 e Z5, sendo que das 3 classes, a que apresentou maior quantidade de proteína foi a Z3. Traços de difícil visualização correspondentes a Z1 foram observados no padrão de SDS-PAGE de várias das bandas de pIs diferentes. Este tipo de comportamento da Z1 é similar ao observado para a C3 do Adlay. É interessante notar que somente uma das classes de menor

Figura 10 - Comparação em IEF das prolaminas do *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay e das do *Zea mays* L. var. Maya. (1) zeína -- Maya, (2) coixina -- Adlay. As proteínas foram extraídas com isopropanol contendo 2% de 2-ME. Após a focalização isoeletrica, as proteínas foram coradas com 0,5% de Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (2:7:1, v/v).

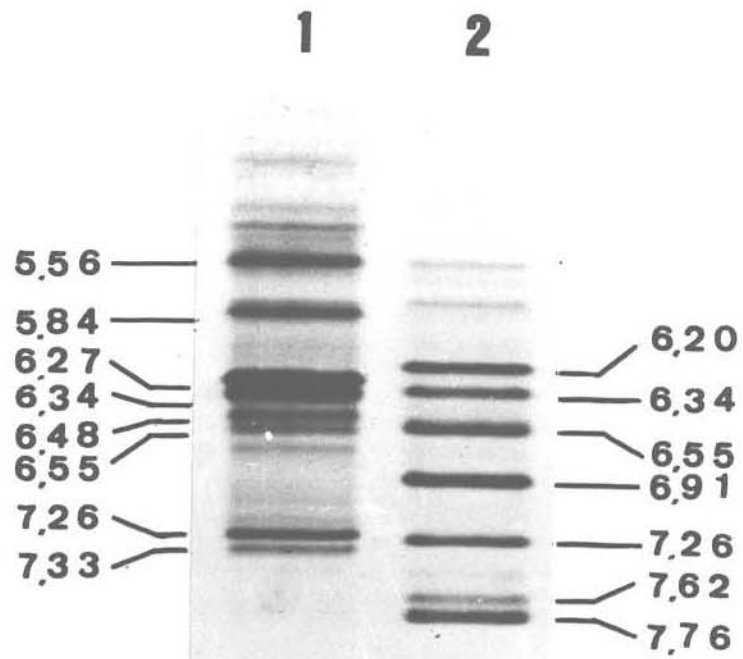
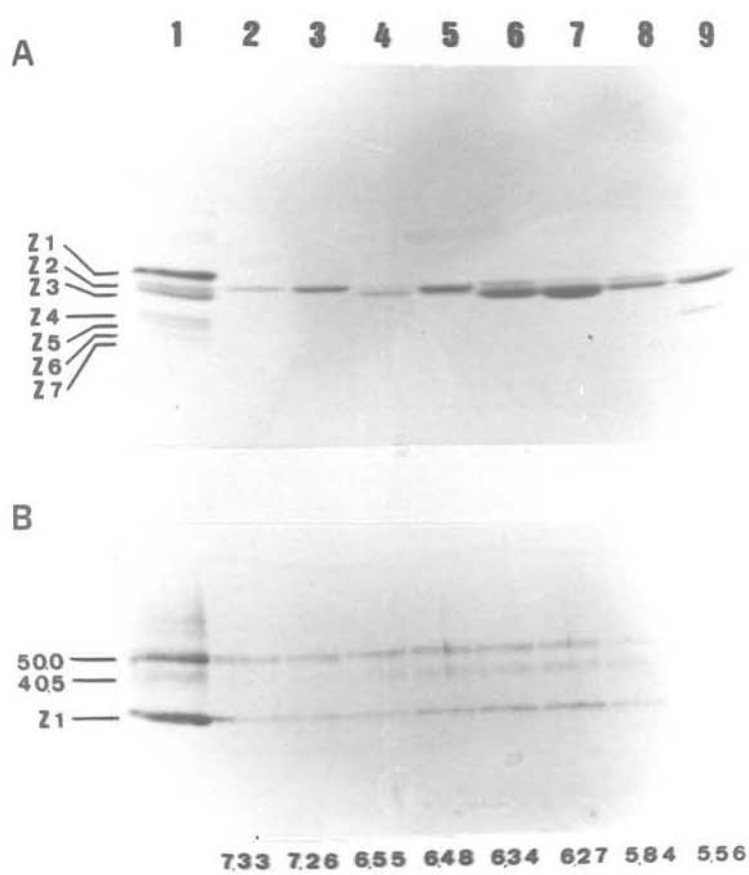


Figura 11 - Análise em SDS-PAGE das bandas de IEF da zeína do *Zea mays* L. var. Maya. (1) extrato total da zeína em solvente contendo 2% de 2-ME, (2) banda de pI 7,33, (3) banda de pI 7,26, (4) banda de pI 6,55, (5) banda de pI 6,48, (6) banda de pI 6,34, (7) banda de pI 6,27, (8) banda de pI 5,84 e (9) banda de pI 5,56. (A) Gel corado com 0,25% de Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (5:5:1, v/v). (B) Análise imunológica das proteínas em uma réplica do gel da Figura 11A. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nylon e incubadas com o antisoro contra C3. A membrana foi lavada e incubada com Proteína A ligada a peroxidase por 1 hora. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado pela coloração resultante da reação da peroxidase.



peso molecular da zeína foi identificada nas bandas principais de IEF do Maya. Ao contrário do Maya, no Adlay as classes de menor peso molecular C4 e C5 foram facilmente identificadas entre as 7 bandas principais de IEF que foram submetidas a SDS-PAGE.

As proteínas de duas réplicas do gel da Figura 11A foram transferidas para membranas de nylon para reação com os antisoros contra as classes de coixina C2 e C3. Como previsto, não foi detectado nenhum tipo de reação entre as bandas de IEF do Maya e o antisoro contra C2. Definitivamente, este antisoro não reconhece nenhuma das classes da zeína. O antisoro contra C3 apresentou reação com todas as bandas de IEF da zeína, sendo que a intensidade da reação variou de banda para banda, o que é um reflexo da quantidade de Z1 presente em cada banda (Figura 11B). A reação foi mais evidente para as bandas de pIs 8,48, 8,34 e 8,27, e foi menos evidente para a banda de pI 5,58. Além da Z1, o antisoro contra C3 reagiu com proteínas de alto peso molecular, sendo que a reação do antisoro com estas proteínas também variou de intensidade, o que pode ser, como aconteceu com a Z1, um reflexo da quantidade destas proteínas em cada uma das bandas de IEF (Figura 11B). O peso molecular aparente destas proteínas no Maya foram calculados como sendo ao redor de 40,5 e 50 kDa. A principal diferença encontrada entre as bandas da zeína do Maya (Figura 11B) e da coixina do Adlay (Figura 7C) nas análises imunológicas é que enquanto todas as bandas principais de IEF da zeína acusaram a presença de Z1, algumas das bandas de IEF da coixina (pIs 7,78 e 7,62) não apresentaram reação com o antisoro contra C3.

IV.2.2. COMPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE
RESTRIÇÃO DO DNA GENÔMICO DO
ADLAY COM OS DO MAYA QUANDO
HIBRIDIZADOS COM AS SONDAS DE
ZEÍNA pZ 22,3 E pZ 19,1

Aproximadamente 5 µg de DNA dos clones de zeína pZ 22,3 e pZ 19,1 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Brian A. Larkins. O clone pZ 22,3 de 5,4 Kb é constituído de um fragmento de 1,02 Kb correspondente ao gene da zeína que codifica a classe de proteína de 22 kDa (Z2) clonado no sítio da Pst I do plasmídeo pBR322. O clone pZ 19,1 de 5,0 Kb é constituído por um fragmento de 0,68 Kb correspondente ao gene da zeína que codifica a classe de proteína de 19 kDa (Z3) clonado no sítio da Pst I do plasmídeo pBR322. O DNA dos clones foi dissolvido em TE e 0,5 µg foi utilizado na transformação da linhagem de E. coli HB101. As transformações com os dois plasmídeos foram feitas isoladamente e várias diluições de células foram plaqueadas em meio contendo os antibióticos estreptomicina e tetraciclina. Neste meio, cresceram somente as bactérias transformadas com o pBR322, que expressa o gene de resistência a tetraciclina.

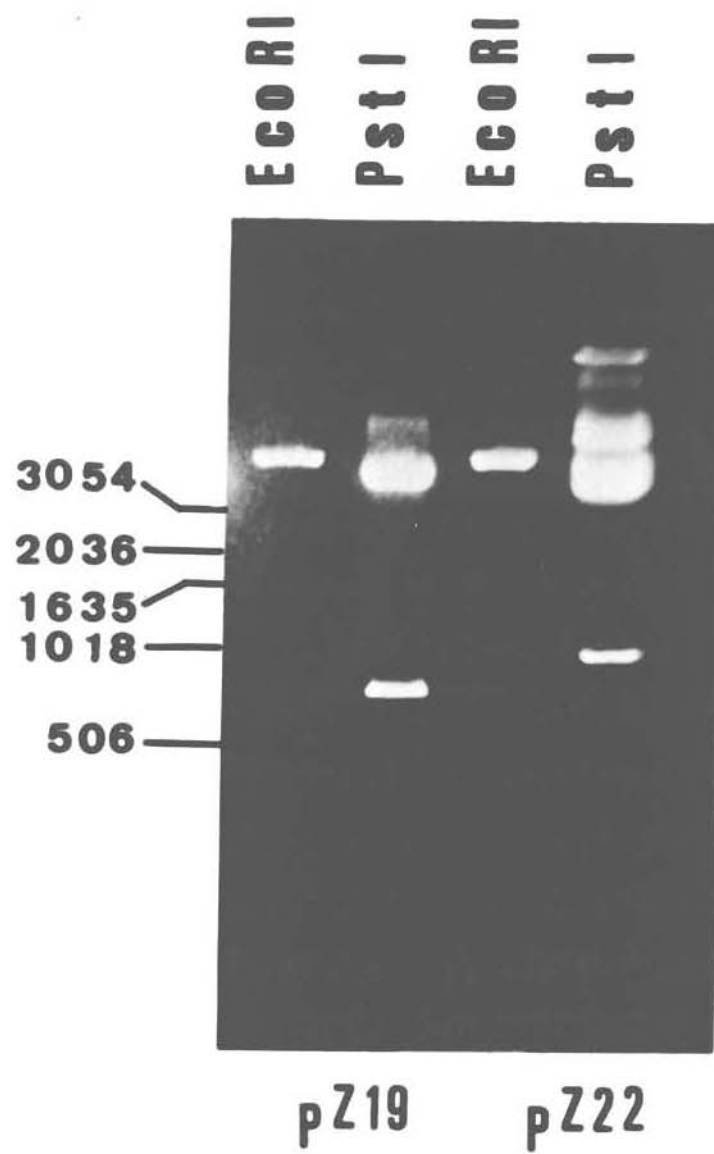
Vários tipos de controles foram feitos para as transformações: 1. As células competentes foram plaqueadas em meio com estreptomicina e, como era esperado, houve crescimento, já que a HB101 tem o gene de resistência a estreptomicina. Estas células também foram plaqueadas em meio contendo tetraciclina, sendo que nenhuma colônia se formou; 2. Após a transformação, as

células foram plaqueadas em meio com estreptomicina e o crescimento foi bom; 3. As células transformadas foram plaqueadas em meio contendo estreptomicina, tetraciclina e ampicilina. Como era esperado, não houve crescimento algum nestas placas, já que os genes da zeína estão clonados no sítio da Pst I no gene que confere resistência a ampicilina ao pBR322, inativando assim este gene.

Após a transformação, o DNA dos clones pZ 22,3 e pZ 19,1 foi extraído e digerido com a enzima de restrição Pst I para que os fragmentos correspondentes aos genes da zeína fossem liberados. O DNA do pZ 22,3 e pZ 19,1 foi digerido também com a enzima de restrição Eco RI para que os plasmídeos fossem linearizados e utilizados como padrão no gel. Após a digestão, amostras de DNA foram submetidas a eletroforese em gel de 1% de agarose em tampão TBE (Figura 12). As amostras de DNA no gel da Figura 12 não apresentaram sinais aparentes de degradação ou contaminação, sendo que os fragmentos liberados demonstraram ser dos tamanhos esperados. Estes fragmentos de DNA foram recuperados do gel, marcados com ^{32}P -dNTP e utilizados nas hibridizações com o DNA genômico do Maya e do Adlay.

O DNA genômico do Maya e do Adlay foi extraído e aliquotas contendo aproximadamente 1 μg de DNA foram submetidas a eletroforese em gel de 0,5% de agarose em tampão TBE. A finalidade deste gel era de detectar se não houve quebras no DNA durante o processo de extração. Como padrão no gel foi utilizado o DNA de alto peso molecular do fago λ (50 Kb). Foi

Figura 12 - Eletroforese em gel de 1% de agarose do DNA digerido das sondas pZ 22,3 e pZ 19,1. (1) pZ 19,1 digerido com Eco RI, (2) pZ 19,1 digerido com Pst I, (3) pZ 22,3 digerido com Eco RI e (4) pZ 22,3 digerido com Pst I.



observado no gel que tanto o DNA genômico do Maya quanto o do Adlay apresentaram uma única banda de aproximadamente 50 Kb, o que indica que não houve quebras durante o processo de extração. A seguir, alíquotas contendo aproximadamente 10 µg de DNA genômico do Maya e do Adlay foram digeridas com as enzimas de restrição Eco RI, Bam HI e Hind III. Após a digestão, os DNAs foram submetidos a eletroforese em gel de 0,8% de agarose em tampão TBE (Figura 13). Como pode ser visto na Figura 13, as amostras de DNA genômico digerido apresentaram um rastro no gel, do qual se destacam bandas de maior ou menor intensidade e que provavelmente representam sequências de DNA repetitivo. Não foi encontrado no gel nenhuma banda de DNA com tamanho alto, o que significa que a digestão do DNA genômico foi satisfatória. Os DNAs do gel da Figura 13 e de um outro gel igual a ele foram transferidos para membranas de nylon e utilizados para hibridizações com o pZ 22,3 e o pZ 19,1. Após as hibridizações, os filtros foram expostos a filmes de raio-X.

Os filmes de raio-X foram revelados e os resultados das hibridizações, analisados. Como indica a Figura 14, vários fragmentos de restrição do DNA do Maya e do Adlay hibridizaram com a sonda pZ 22,3, independentemente da enzima de restrição utilizada. O complexo padrão de bandas obtido indica a existência de múltiplos genes no Maya e no Adlay, que são homólogos a esta sonda. As bandas cuja hibridização foi mais intensa provavelmente contêm mais de uma sequência similar à da sonda. Na hibridização com a sonda pZ 19,1 não foi constatado nenhum tipo de homologia entre o DNA genômico do Adlay e a sonda.

Figura 13 - Eletroforese em gel de 0,8% de agarose dos DNAs genômicos de *Zea mays* L. var. Maya e do *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay digeridos com 10 U de enzima de restrição/ μ g de DNA genômico. (1) DNA genômico do Maya digerido com Eco RI, (2) DNA genômico do Adlay digerido com Eco RI, (3) DNA genômico do Maya digerido com Bam HI, (4) DNA genômico do Adlay digerido com Bam HI, (5) DNA genômico do Maya digerido com Hind III e (6) DNA genômico do Adlay digerido com Hind III.

Eco RI Bam HI Hind III

1 2 3 4 5 6

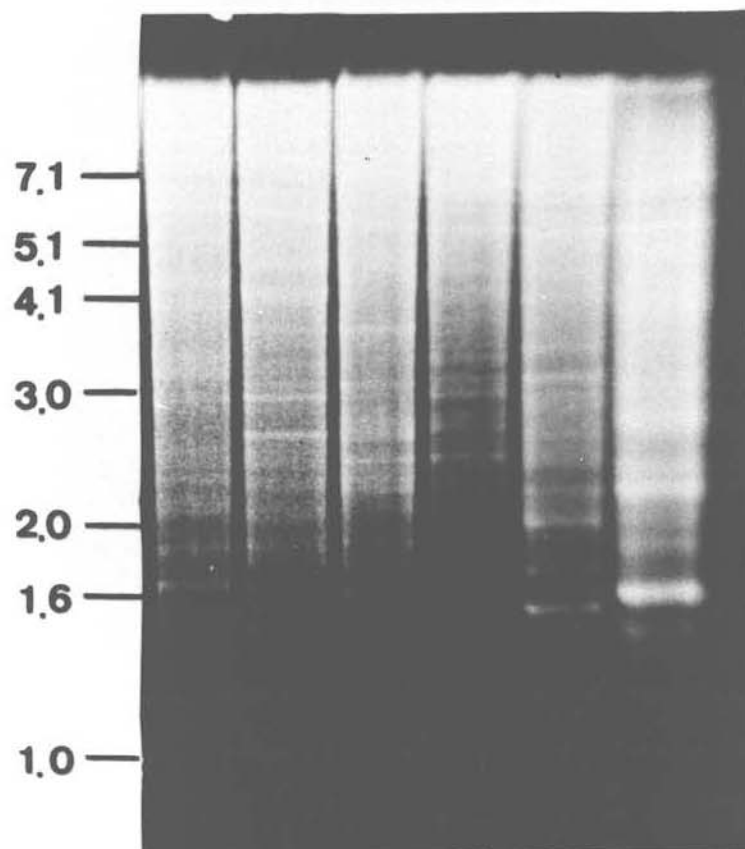
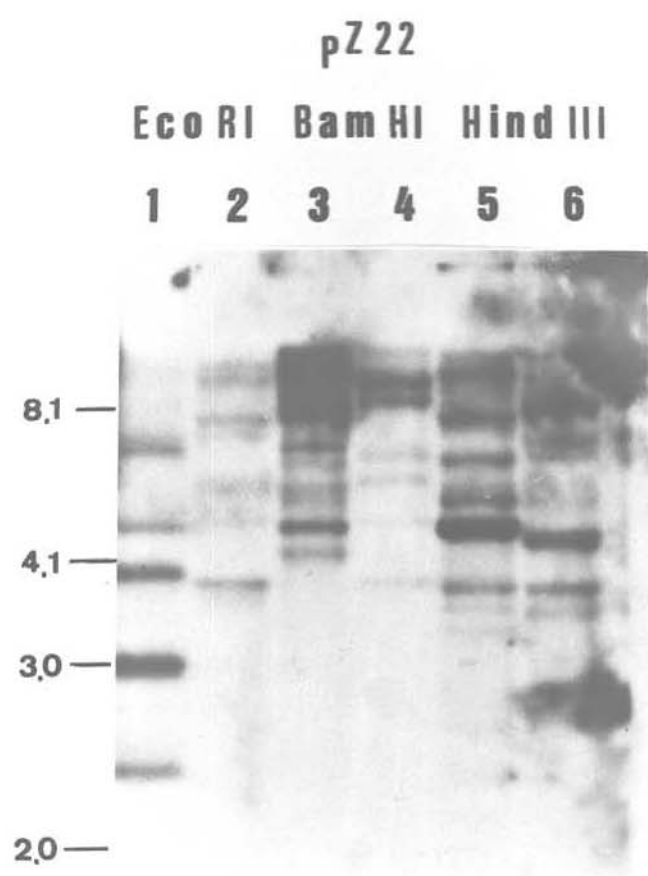


Figura 14 - Padrão de hibridização do DNA genômico do *Zea mays* L. var. Maya e do *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay com a sonda de cDNA da zeína pZ 22,3. (1) DNA do Maya digerido com Eco RI, (2) DNA do Adlay digerido com Eco RI, (3) DNA do Maya digerido com Bam HI, (4) DNA do Adlay digerido com Bam HI, (5) DNA do Maya digerido com Hind III e (6) DNA do Adlay digerido com Hind III.



Contudo, vários fragmentos de restrição do Maya hibridizaram com o pZ 19,1 (Figura 15), indicando que múltiplos genes são homólogos a esta sonda. A hibridização do DNA do Maya com as sondas pZ 22,3 e pZ 19,1 é predominante com fragmentos entre 4,1 e 12,2 Kb, sendo que os fragmentos de DNA do Maya que hibridizaram com o pZ 19,1 estão aparentemente mais agrupados. Baseando-se na alta intensidade destes fragmentos, pode-se inferir que os genes que apresentaram homologia com o pZ 19,1 podem estar agrupados em um mesmo fragmento de DNA.

IV.3. AS PROTEÍNAS E O DNA DE COIX, MILHO E TEOSINTE

IV.3.1. CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO ENDOSPERMA DE TEOSINTE COM AS DE MILHO E COIX

As proteínas do endosperma do Adlay e do Maya foram comparadas com as do Coix lacryma-jobi L. var. Acre, com as da linhagem de milho 1038 e com as dos teosintes Zea mays mexicana e Zea luxurians. Quando a F1 dos diferentes materiais foi submetida a SDS-PAGE (Figura 16A), um padrão de bandas complexo foi observado. Os padrões das F1 do Adlay e do Acre são quase que exatamente iguais, com bandas de peso molecular

Figura 15 - Padrão de hibridização do DNA genômico do *Zea mays* L. var. Maya e do *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay com a sonda de cDNA da zeína pZ 19,1. (1) DNA do Maya digerido com Eco RI, (2) DNA do Adlay digerido com Eco RI, (3) DNA do Maya digerido com Bam HI, (4) DNA do Adlay digerido com Bam HI, (5) DNA do Maya digerido com Hind III e (6) DNA do Adlay digerido com Hind III.

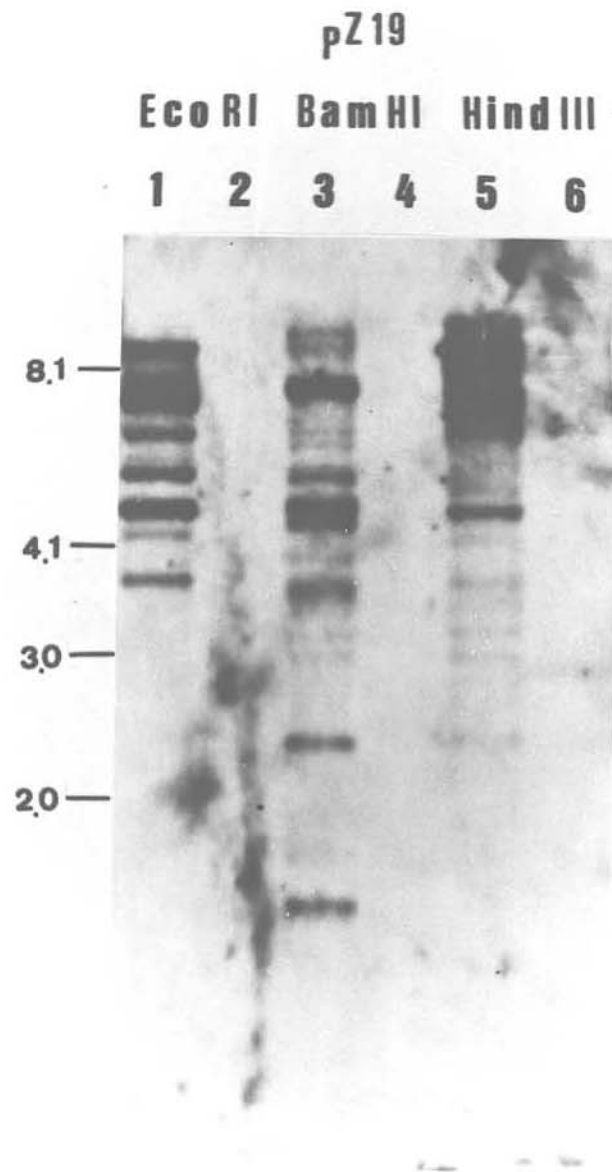
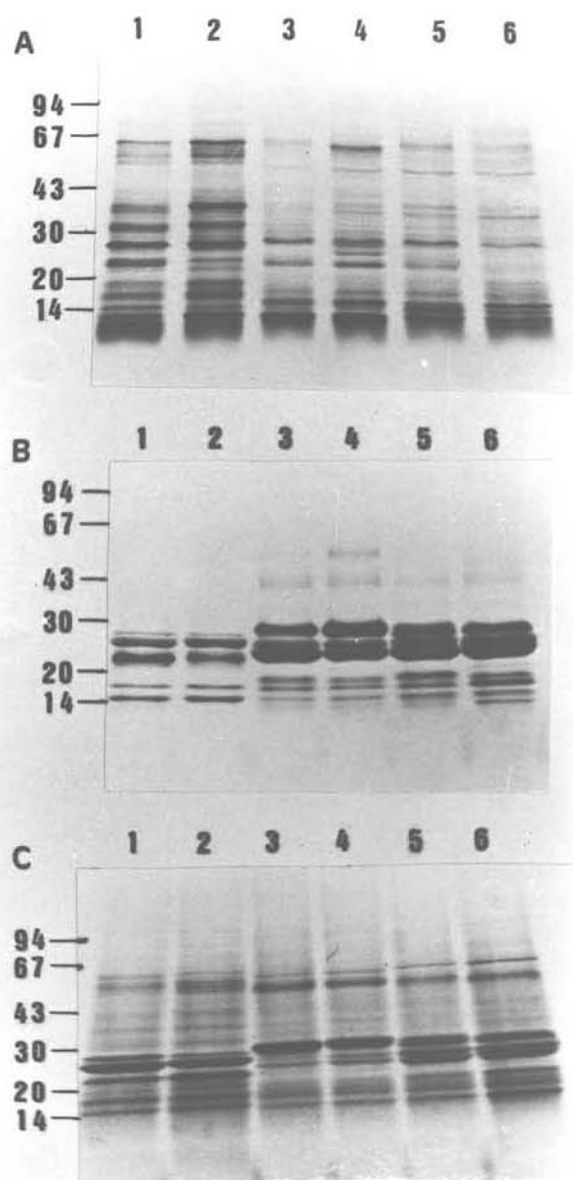


Figura 16 - Análise comparativa em SDS-PAGE das frações protéicas de (1) *Coix lacryma-jobi* L. var. Acre, (2) *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay, (3) *Zea mays* L. var. Maya, (4) *Zea mays* L. L1038, (5) *Zea mays mexicana* e (6) *Zea luxurians*. (A) Análise da F1, (B) Análise da F2 e (C) Análise da F3. Os géis de SDS-PAGE foram corados com 0,25% de Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (5:5:1, v/v).



aparente entre 110 e 9 kDa. O padrão da F1 do Maya também é quase que exatamente igual ao da L1038 e apesar de umas poucas diferenças, pode-se dizer que eles são praticamente iguais aos padrões das F1 dos teosintes, principalmente no que se refere às bandas entre 65 e 9 kDa. Existem algumas bandas do Adlay e do Acre que apresentam peso molecular aparente similar a bandas encontradas nos milhos e teosintes. Contudo, a quantidade de proteína nestas bandas é diferente. O padrão encontrado para a F3 dos diferentes materiais também é bastante complexo, sendo que de maneira similar ao que havia sido observado para F1, o padrão do Acre e do Adlay, assim como os dos milhos e teosintes, são praticamente iguais. As bandas da F3 do Acre e do Adlay estão distribuídas entre 110 e 15 kDa e as dos milhos e teosintes, entre 110 e 14,5 kDa (Figura 16C). Em contraste com a heterogeneidade encontrada nos padrões das F1 e F3, a F2 subdividiu-se em poucas bandas, sendo que mais uma vez o padrão do Adlay e do Acre provaram ser exatamente iguais, o mesmo acontecendo para o padrão de F2 dos milhos e teosintes (Figura 16B). Foram observadas nos padrões de F2 da L1038 e dos teosintes bandas de alto peso molecular similares às de 41 e 50 kDa encontradas no Maya. A razão pela qual não foram observadas bandas de alto peso molecular nos padrões da F2 do Adlay e do Acre é que a extração destas proteínas é baixa nestes materiais quando 2% de 2-ME é utilizado no solvente de extração.

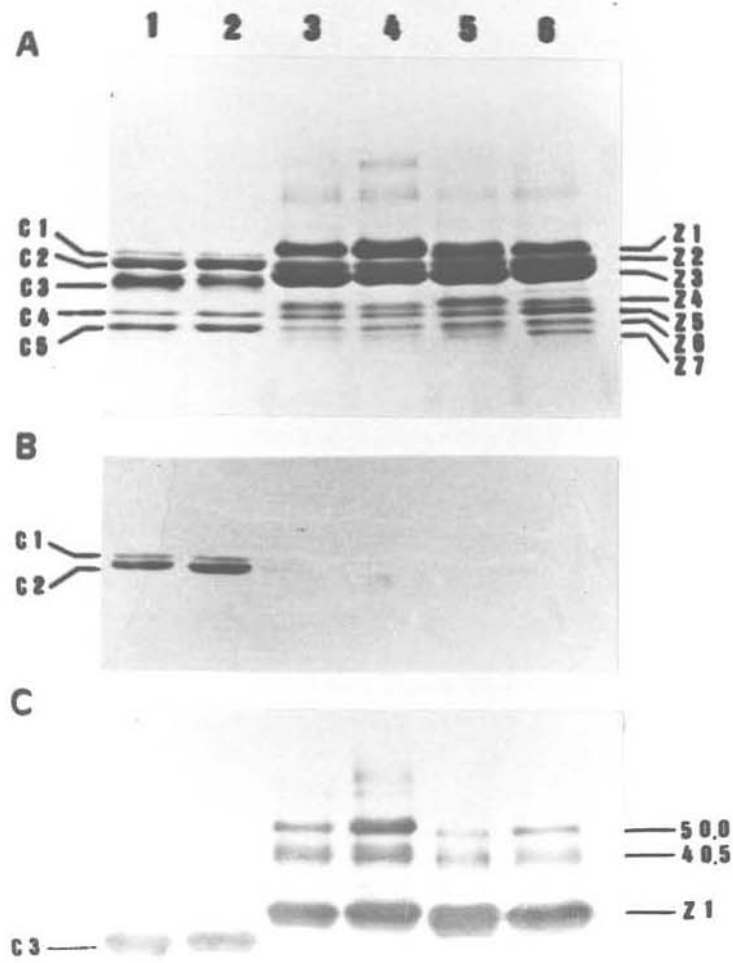
Duas réplicas do gel da Figura 16B foram preparados e as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram

submetidas a reações com os antisoros preparados contra as classes C2 e C3 da coixina do Adlay. Como indica a Figura 17B, o padrão de reação da coixina do Acre com o antisoro contra C2 é exatamente igual ao do Adlay, sendo que somente as classes de coixina C1 e C2 reagem com este antisoro. Não foi observado nenhum tipo de reação entre o antisoro contra C2 e as prolaminas do Maya, L1038, *Zea mays mexicana* e *Zea luxurians*. O antisoro contra C3 reagiu com a classe de prolamina C3 do Acre e do Adlay e com a classe de prolamina Z1 do Maya, L1038, *Zea mays mexicana* e *Zea luxurians* (Figura 17C). O antisoro contra C3 reagiu também com as proteínas de alto peso molecular do Adlay, Acre, Maya, L1038, *Zea mays mexicana* e *Zea luxurians* (Figura 17C).

IV.3.2. ANÁLISE EM IEF DAS PROLAMINAS DE COIX, MILHO E TEOSINTE

A baixa heterogeneidade encontrada nos padrões de SDS-PAGE das prolaminas do Coix, milho e teosinte e a similaridade encontrada entre o padrão do Adlay e do Acre, assim como as similaridades dos padrões dos milhos e teosintes, fizeram com que uma análise detalhada das prolaminas de diferentes materiais fosse realizada. Quando as prolaminas do milho, Coix e teosinte foram submetidas a IEF em gel de agarose contendo anfólitos de pH 5-8 + 3,5-9,5, um complexo padrão de bandas foi observado para cada um dos materiais analisados. Ao contrário do que foi observado no gel de SDS-PAGE, cada material apresentou uma combinação própria de bandas nos seus padrões de IEF.

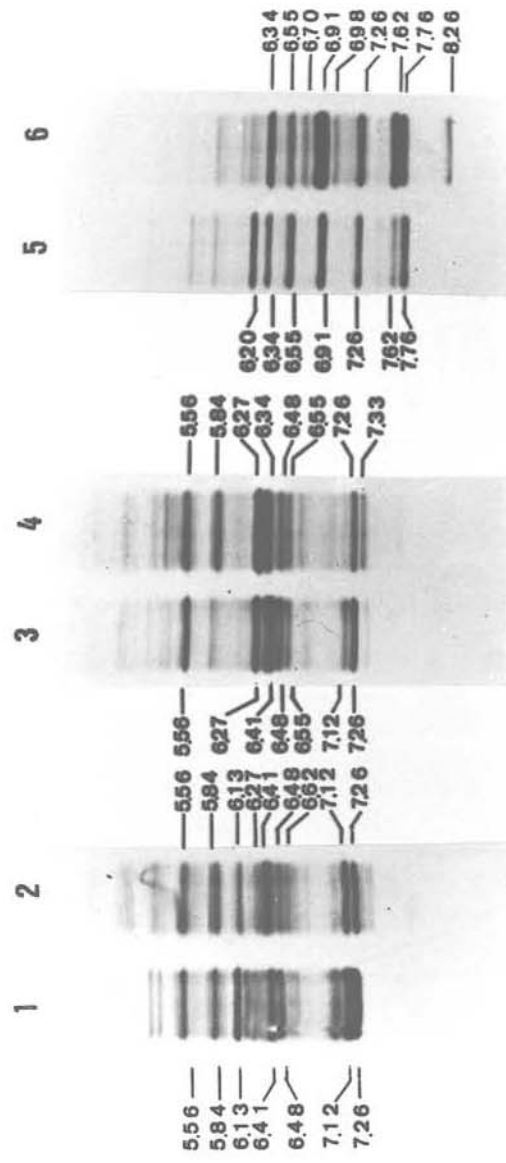
Figura 17 - Análise comparativa das prolaminas do (1) *Coix lacryma-jobi* L. var. Acre, (2) *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay, (3) *Zea mays* L. var. Maya, (4) *Zea mays* L. L1038, (5) *Zea mays* mexicana e (6) *Zea luxurians*. (A) Gel de SDS-PAGE das prolaminas extraídas com 55% de isopropanol e 2% de 2-ME. O gel foi corado com 0,25% de Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (5:5:1, v/v). (B) Análise imunológica das prolaminas em uma réplica do gel da Figura 17A. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com o antisoro contra C2. A membrana foi lavada e incubada com Proteína A ligada a peroxidase por 1 hora. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado pela coloração resultante da reação da peroxidase. (C) O mesmo que em (B), com a diferença que o antisoro utilizado foi o contra a classe de coixina C3.



Um total de 9 bandas principais foi observado no padrão de IEF do Acre (Figura 18). Estas 9 bandas estão distribuídas em uma faixa de pI de 8,26 a 6,34. Como já havia sido observado, existe um total de 7 bandas principais no Adlay distribuídas em uma faixa de pI de 7,76 a 6,20. Apesar do padrão de IEF do Adlay e do Acre serem diferentes, várias bandas dos dois materiais apresentaram os mesmos pIs de 7,76, 7,62, 7,26, 6,91, 6,55 e 6,34. Algumas destas bandas, contudo, variam de intensidade nos dois materiais, sendo que a maior diferença de intensidade foi observada para a banda de pI 6,91, que parece ter uma quantidade de proteína três vezes superior no Acre. Quando a banda de pI 6,91 do Acre foi submetida a SDS-PAGE, ela revelou ser do tipo C2, sendo que a banda de mesmo pI do Adlay também é do tipo C2, o que indica que além destas bandas terem o mesmo pI, elas também pertencem ao mesmo tipo de classe de peso molecular e são provavelmente codificadas por genes similares. No caso do Acre, o gene que codifica para a banda de pI 6,91 sofreu uma duplicação ou simplesmente este gene se expressa mais no Acre do que no Adlay.

No padrão de IEF da linhagem de milho L1038 foi observado um total de 7 bandas principais (Figura 18). Estas bandas estão distribuídas em uma faixa de pI de 7,26 a 5,56. Quando o padrão de IEF da L1038 foi comparado com o do Maya, que tem um total de 8 bandas principais distribuídas em uma faixa de pI de 7,33 a 5,56, constatou-se que no milho as bandas estão mais agrupadas que no Coix em determinadas faixas de pI. Assim sendo, depois de duas bandas de pIs mais básicos de 7,26 e 7,12 na L1038

Figura 18 - Análise em gel de focalização isoeletrica das prolaminas de (1) *Zea luxurians*, (2) *Zea mays mexicana*, (3) *Zea mays* L. L1038, (4) *Zea mays* L. var. Maya, (5) *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay e (6) *Coix lacryma-jobi* L. var. Acre. As prolaminas foram extraídas com isopropanol contendo 2% de 2-ME e após o processo de IEF foram coradas com 0,5% de Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (2:7:1, v/v).



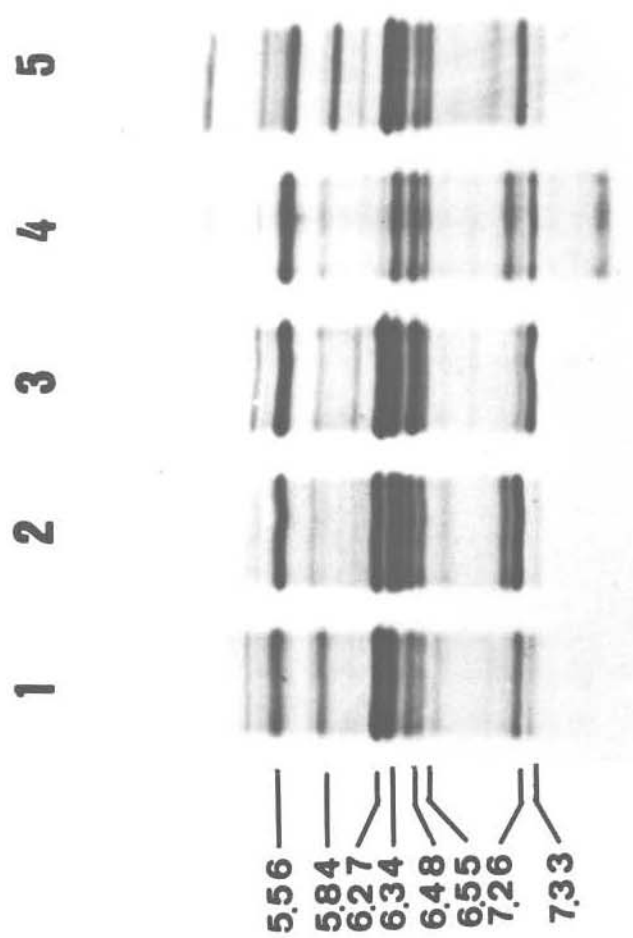
e 7,33 e 7,26 no Maya serem encontradas a uma distância de aproximadamente 25 mm do catodo do gel, foi identificado um agrupamento de 4 bandas principais entre 35 a 40 mm do catodo. Os pIs de 3 das 4 bandas agrupadas são iguais no Maya e na L1038. São eles: 6,55, 6,48 e 6,27. A banda que difere tem pI de 6,34 no Maya e 6,41 na L1038. As bandas de pIs mais ácidos, 5,84 e 5,56, no Maya também foram encontradas na L1038, com a diferença que nesta linhagem a banda de pI 5,84 é uma banda de intensidade média e, sendo assim, não faz parte das 7 que constituem o padrão principal da L1038.

Existe uma certa similaridade entre os padrões de IEF encontrados no Maya e na L1038 e os encontrados nos teosintes. Esta similaridade é mais acentuada no teosinte *Zea mays mexicana*. Foi encontrado no *Zea mays mexicana* um total de 9 bandas principais. As 9 bandas principais de IEF do *Zea mays mexicana* estão distribuídas na mesma faixa de pI de 7,26 a 5,56 em que estão distribuídas as bandas da L1038 (Figura 18). O mesmo agrupamento de 4 bandas encontrado entre 35 a 40 mm do catodo do gel no Maya e na L1038 também foi encontrado no *Zea mays mexicana*. Destas quatro bandas, as de pI 6,48 e 6,27 também são encontradas no Maya e na L1038; a de pI 6,41 também foi encontrada na L1038 e a de pI 6,62 é típica do *Zea mays mexicana*. As duas bandas de pIs mais ácidos, 5,84 e 5,56, encontradas no *Zea mays mexicana*, e que haviam sido previamente identificadas no Maya e na L1038, também foram encontradas no teosinte *Zea luxurians*. Entre os padrões de IEF das prolaminas analisadas, o do *Zea luxurians* foi o que apresentou a maior complexidade

(Figura 18). Foi identificado um total de 7 bandas principais distribuídas na mesma faixa de pI, 7,26 a 5,56, das bandas principais da L1038 e Zea mays mexicana.

Como pode ser constatado, existem algumas bandas de IEF que caracterizaram o Maya, a L1038 e as variedades de Coix e teosinte. Em uma tentativa de se constatar quão representativas estas bandas são, outras linhagens de milho e variedades de Coix e teosinte tiveram suas prolaminas submetidas a IEF. Assim sendo, a zeína do Maya e da L1038 foi comparada com a zeína das linhagens 126-3, 107-1 e 75-3. Ficou constatado que além do Maya e da L1038, as outras linhagens de milho também possuem um padrão de IEF típico e heterogêneo (Figura 19). Entre os padrões de IEF dos milhos, a banda mais básica de pI foi encontrada na linhagem 107-1 a 18 mm do catodo do gel. Quanto à banda de pI mais ácido, ela foi encontrada no padrão de bandas principais da linhagem 75-3 a 58 mm do catodo. Existem indícios da presença de bandas do mesmo pI no padrão de IEF dos outros materiais, assim como de uma banda mais ácida encontrada a 63 mm do catodo em praticamente todos os padrões de IEF dos milhos. Contudo, estas bandas foram praticamente descartadas por serem de intensidade fraca e pouco definidas, o que pode levar a comportamentos ambíguos nos diferentes géis. Apesar de diferentes, os padrões de IEF dos milhos apresentaram certas características em comum. Entre estas características está o grupo de 4 bandas entre 35 a 40 mm do catodo com pIs entre 6,55 e 6,27 e a banda de pI 5,56 encontrada em todos os padrões de IEF

Figura 19 - Comparação em IEF das prolaminas de *Zea mays* L. (1) *Zea mays* L. var. Maya, (2) *Zea mays* L. linhagem 1038, (3) *Zea mays* L. linhagem 126-5, (4) *Zea mays* L. linhagem 107-1 e (5) *Zea mays* L. linhagem 75-3. As prolaminas foram extraídas com isopropanol 55% contendo 2% de 2-ME. Após o IEF, as proteínas foram coradas com 0,5% de Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (2:7:1, v/v).



analisados. É importante salientar que a intensidade destas bandas comuns varia nos diferentes materiais.

O padrão de IEF dos teosintes analisados (Figura 20) demonstrou ser mais complexo que o dos milhos, sendo que a quantidade de bandas, incluindo as principais e as secundárias, parece ser maior nos teosintes. A banda mais básica entre os teosintes foi encontrada a 13 mm do catodo no *Zea mays mexicana* - Batan. Esta banda, apesar de ser de intensidade fraca, é bem definida, o que não acontece com as bandas de pIs mais baixos encontradas a 67 mm do catodo, que como as encontradas a 63 mm do catodo no milho, são bandas fracas e difusas. A 62 mm do catodo do gel foi encontrada uma banda básica mais definida. A intensidade desta banda é maior nos teosintes *Zea mays mexicana* - Central Plateau, *Zea mays parviglumis* - Balsas e *Zea perennis*. Os padrões de IEF dos teosintes apresentam certas similaridades aos dos milhos. Por exemplo, a banda de pI 5,56 encontrada em todos os padrões de IEF dos milhos também foi encontrada em todos os teosintes analisados. O grupo de bandas distribuídos na faixa de pI de 6,55 e 6,27, características do milho, também foram encontradas nos teosintes *Zea mays mexicana* - Chalco "Los Reys", *Zea mays mexicana* - Batan e *Zea mays parviglumis* - Balsas. Os outros 3 teosintes também apresentam bandas nesta faixa de pI, mas o agrupamento de 4 bandas característico do milho e dos teosintes mencionados acima é menos evidente.

Um total de 5 variedades de Coix foi analisado e comparado em IEF (Figura 21). Ao contrário do que foi

Figura 20. - Comparação em IEF das prolaminas de teosintes. (1) *Zea luxurians*, (2) *Zea mays mexicana* - Chalco "Los Reys", (3) *Zea mays mexicana* - Batan, (4) *Zea perennis*, (5) *Zea mays parviglumis* - Balsas e (6) *Zea mays mexicana* - Central Plateau. As prolaminas dos teosintes foram extraídas com isopropanol 55% contendo 2% de 2-ME. Após o IEF, as proteínas foram coradas com 0,5 % de Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (2:7:1, v/v).

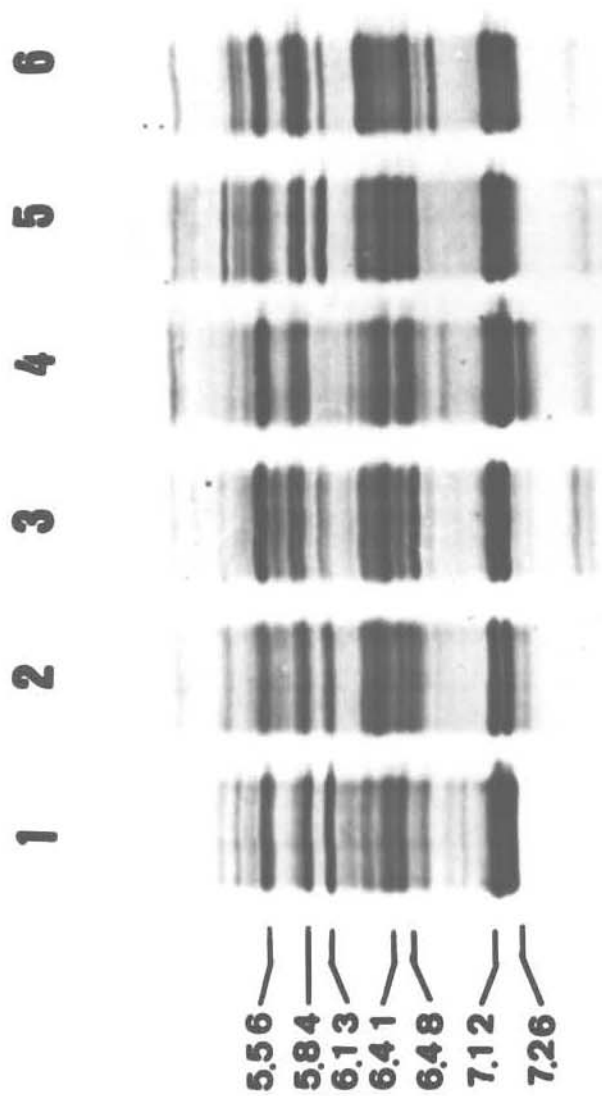
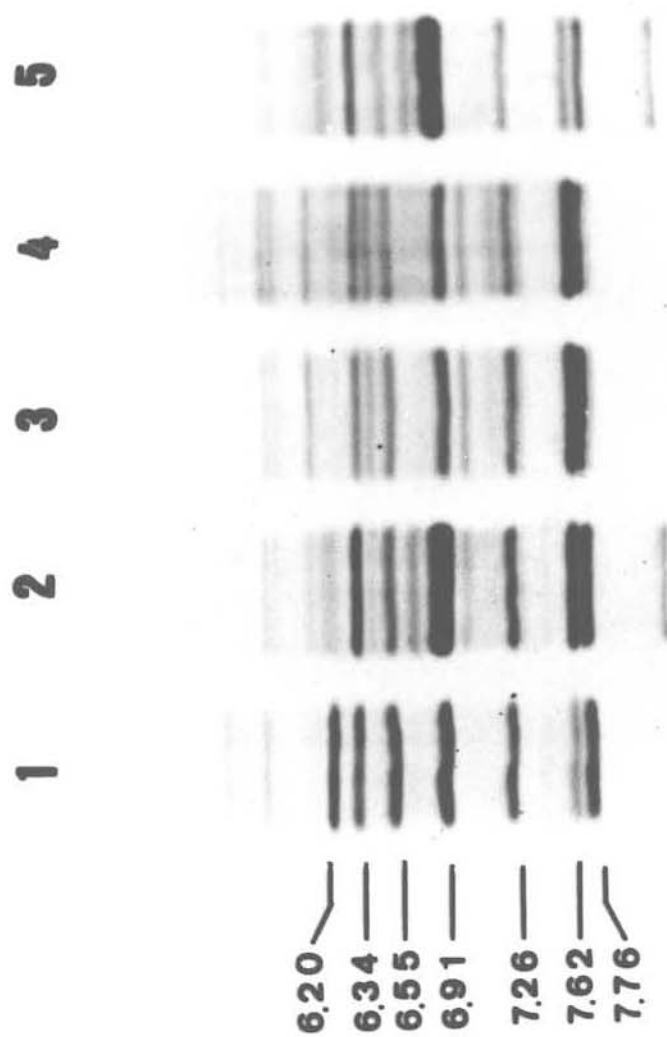


Figura 21 - Comparação em IEF das prolaminas de Coix. (1) Coix lacryma-jobi L. var. Adlay, (2) Coix lacryma-jobi L. var. Acre, (3) Coix lacryma-jobi L. var. Faxina, (4) Coix lacryma-jobi L. var. Rosário e (5) Coix lacryma-jobi L. var. Tailândia. As prolaminas dos Coix foram extraídas com isopropanol 55% contendo 2% de 2-ME. Após o IEF, as proteínas foram coradas com 0,5% de Coomassie Brilliant Blue R 250 em metanol/água/ácido acético (2:7:1, v/v).



observado no milho e teosinte, não existe nenhum agrupamento aparente de bandas no Coix. Outra característica das prolaminas do Coix é a similaridade detectada entre os padrões de IEF deste material. Assim sendo, existe uma grande homologia entre o padrão de IEF do Acre e o do Tailândia. Os padrões de IEF do Faxina e do Rosário são praticamente iguais, podendo ser distinguidos somente por umas poucas bandas de baixa intensidade. A maior parte das bandas encontradas no padrão de bandas principais do Adlay foram identificadas nos outros materiais. Estas bandas são as de pI 7,76, 7,62, 7,26, 6,91, 6,55 e 6,34. A banda de pI 6,91 tem a mesma intensidade no Acre e no Tailândia, o que leva à suposição de que se houve uma duplicação ou simplesmente um aumento da expressão do gene que codifica para este polipeptídeo do Acre, o mesmo deve ter ocorrido para o Tailândia. Entre as bandas encontradas nos padrões de IEF dos Coix, a de pI mais básico foi encontrada nos Coix Acre e Tailândia a aproximadamente 13 mm do catodo. A banda mais ácida é uma banda de intensidade média encontrada no padrão de IEF do Adlay a 52 mm do catodo. Existem indícios de bandas mais ácidas do que esta no padrão de IEF do Adlay e dos outros Coix, mas a intensidade destas bandas é baixa, o que as torna difusas.

IV.3.3. COMPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE
RESTRIÇÃO DO DNA GENÔMICO DE
MILHO E TEOSINTE HIBRIDIZADOS
COM AS SONDAS DE ZEÍNA
pZ 22,3 E pZ 19,1

As análises de eletroforese das prolaminas do milho e teosinte revelaram que existe uma similaridade considerável entre as proteínas destas gramíneas. Com o intuito de se determinar se a similaridade entre estas gramíneas se mantinha a nível de DNA, aproximadamente 10 µg do DNA genômico do Maya, da L1038 e dos teosintes *Zea mays mexicana* e *Zea luxurians* foram digeridos com as enzimas de restrição Eco RI e Bam HI. Os DNAs digeridos com Eco RI e Bam HI foram submetidos a eletroforese em géis separados de 0,8% de agarose (Figura 22 e 23). As bandas mais visíveis no rastro de DNA digerido das Figuras 22 e 23 provavelmente representam sequências de DNA repetitivo e, como pode ser constatado nestes géis, as digestões dos DNAs genômicos foram satisfatórias, já que não há indícios de nenhuma banda de tamanho elevado. Os DNAs dos dois géis foram transferidos para membranas de nylon e hibridizados com as sondas de zeína fornecidas pelo Dr. Brian A. Larkins e preparadas da maneira descrita em IV.2.2. Após a hibridização com a sonda pZ 22,3 e exposição das membranas a filme de raio-X, as membranas foram lavadas, hibridizadas com a sonda pZ 19,1 e expostas a filme de raio-X.

Figura 22 - Eletroforese em gel de 0,8% de agarose do DNA genômico de milho e teosinte digeridos com a enzima de restrição Eco RI. (1) DNA genômico do Zea mays L. var. Maya, (2) DNA genômico do Zea mays L. linhagem L1038, (3) DNA genômico do Zea mays mexicana e (4) DNA genômico do Zea luxurians.

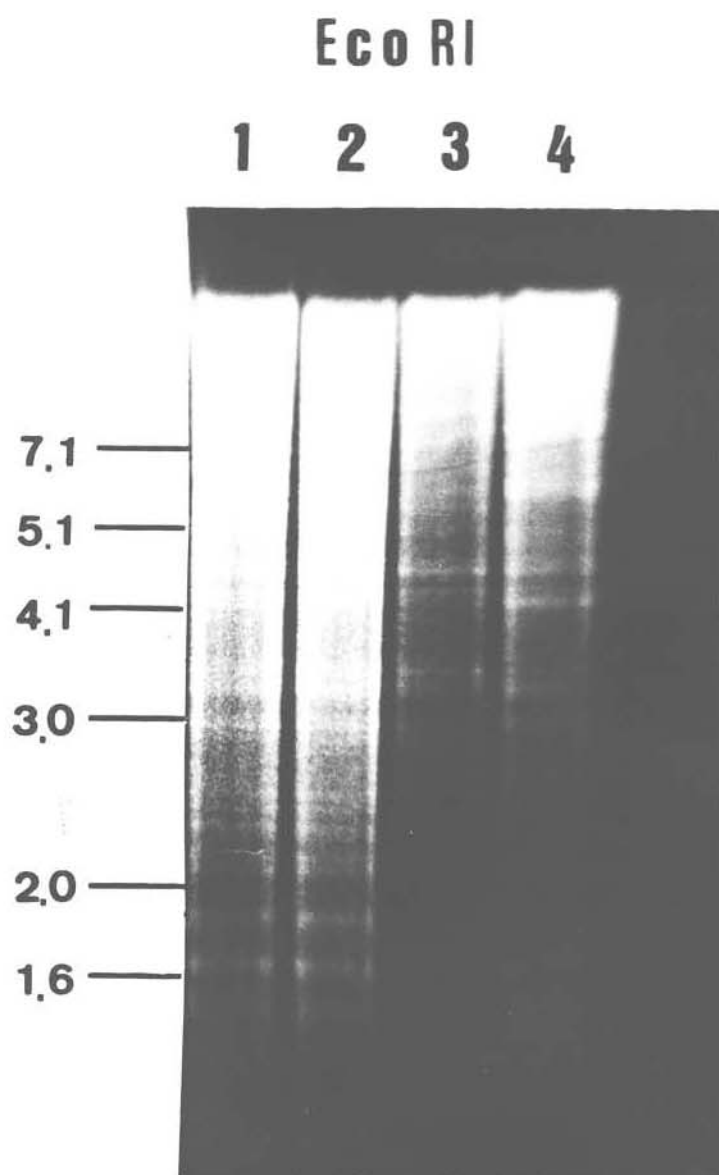
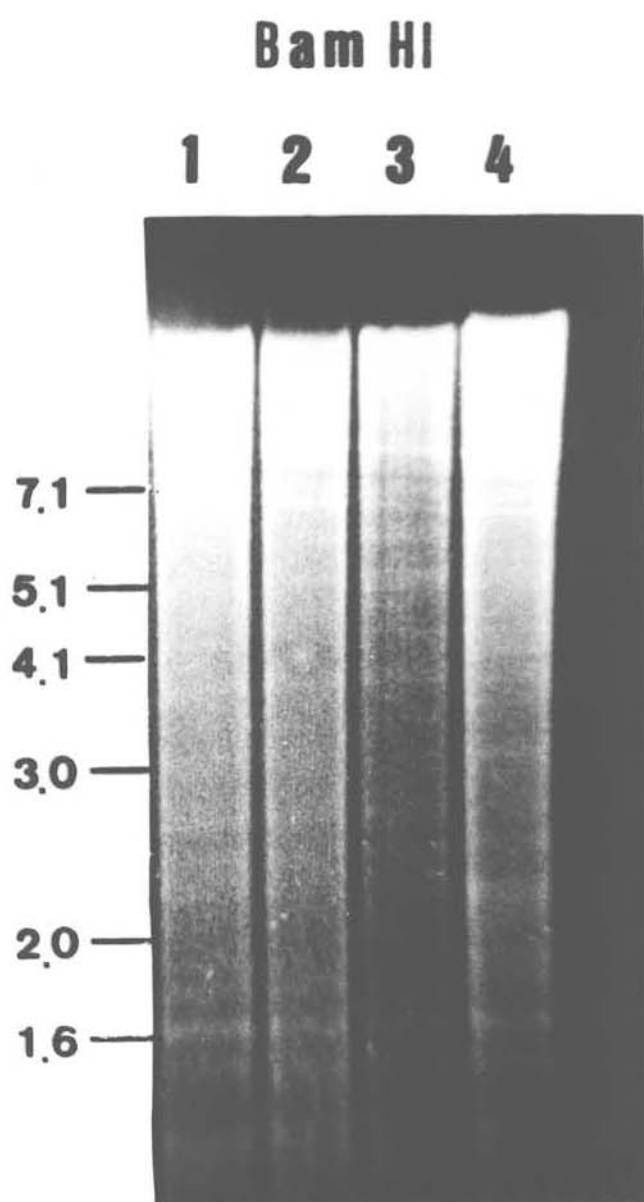


Figura 23 - Eletroforese em gel de 0,8% de agarose do DNA genômico de milho e teosinte digeridos com a enzima de restrição Bam HI. (1) DNA genômico do Zea mays L. var. Maya, (2) DNA genômico do Zea mays L. linhagem L1038, (3) DNA genômico do Zea mays mexicana e (4) DNA genômico do Zea luxurians.



Os filmes de raio-X foram revelados e os resultados, analisados. Como pode ser visto nas Figuras 24, 25, 26 e 27, as sondas pZ 22,3 e pZ 19,1 hibridizaram com múltiplos fragmentos de restrição provenientes das digestões dos DNAs genômicos com as enzimas Eco RI e Bam HI. O complexo padrão de bandas obtidas com as hibridizações indicam a existência de múltiplos genes nos milhos e teosintes que são homólogos às sondas utilizadas. O padrão de bandas obtido para cada uma das hibridizações das sondas com os DNAs genômicos digeridos com Eco RI e Bam HI foi único para cada uma das gramíneas analisadas.

Aproximadamente 8 fragmentos de restrição hibridizaram com a sonda pZ 22,3 em cada uma das gramíneas cujo DNA genômico foi digerido com Eco RI (Figura 24). Na hibridização destes mesmos DNAs digeridos com Eco RI com a sonda pZ 19,1 foram identificadas aproximadamente 7 bandas no padrão de hibridização do Maya, 8 bandas na L1038, 7 bandas no *Zea mays mexicana* e 8 bandas no *Zea luxurians* (Figura 25). Nas digestões dos DNAs genômicos com Bam HI e hibridização com a sonda pZ 22,3 foram identificadas aproximadamente 10 bandas no Maya, 7 bandas na L1038, 10 bandas no *Zea mays mexicana* e 9 bandas no *Zea luxurians* (Figura 26). Quando estes DNAs digeridos com Bam HI foram hibridizados com a sonda pZ 19,1 foram identificadas aproximadamente 9 bandas no Maya, 9 na L1038, 10 no *Zea mays mexicana* e 14 no *Zea luxurians* (Figura 27).

As diferenças de intensidade das bandas que hibridizaram resultam provavelmente de quantidades diferentes de

Figura 24 - Os fragmentos de DNA genômico de milho e teosinte, obtidos através de digestão com a enzima de restrição Eco RI, foram separados através de eletroforese, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com a sonda de zeína pZ 22,3. (1) Padrão de hibridização do DNA do *Zea mays* L. var. Maya, (2) Padrão de hibridização do DNA do *Zea mays* L. linhagem 1038, (3) Padrão de hibridização do DNA do *Zea mays mexicana* e (4) Padrão de hibridização do *Zea luxurians*.

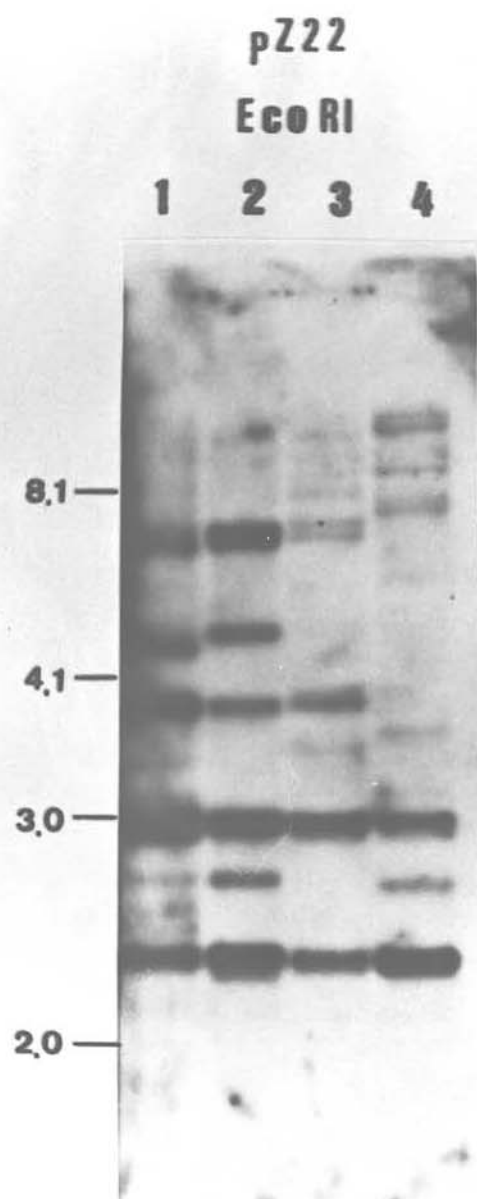


Figura 25 - Os fragmentos de DNA genômico do milho e teosinte, obtidos através de digestão com a enzima de restrição Eco RI, foram separados por eletroforese, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com a sonda pZ 19,1. (1) Padrão de hibridização do DNA do Zea mays L. var. Maya, (2) Padrão de hibridização do Zea mays L. linhagem 1038, (3) Padrão de hibridização do DNA do Zea mays mexicana e (4) Padrão de hibridização do Zea luxurians.

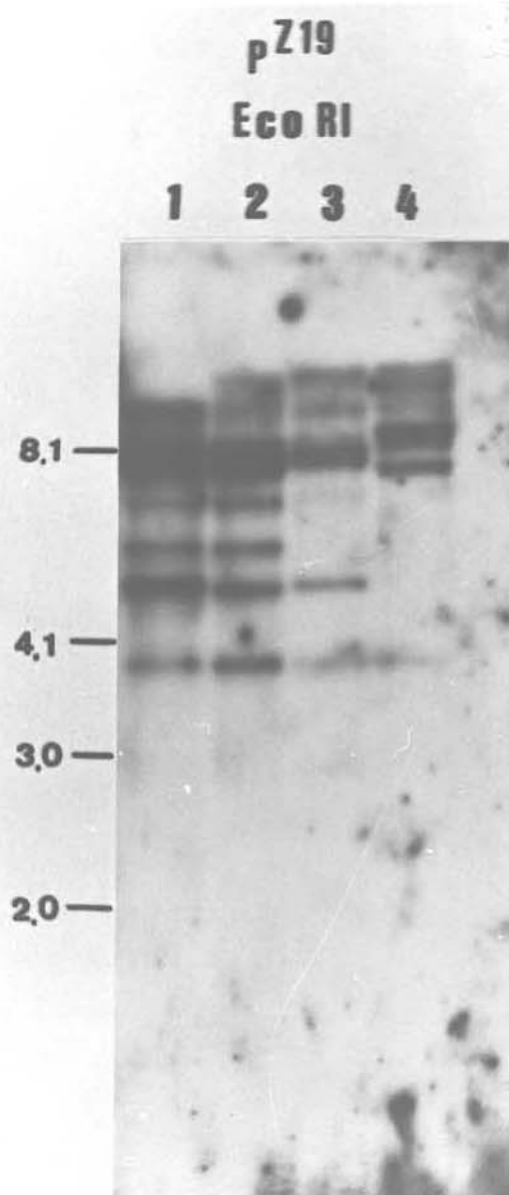


Figura 26 - Os fragmentos de DNA genômico de milho e teosinte, obtidos através de digestão com a enzima de restrição Bam HI, foram separados por eletroforese, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com a sonda pZ 22,3. (1) Padrão de hibridização do DNA do *Zea mays* L. var. Maya, (2) Padrão de hibridização do *Zea mays* L. linhagem 1038, (3) Padrão de hibridização do DNA do *Zea mays* mexicana e (4) Padrão de hibridização do DNA do *Zea luxurians*.

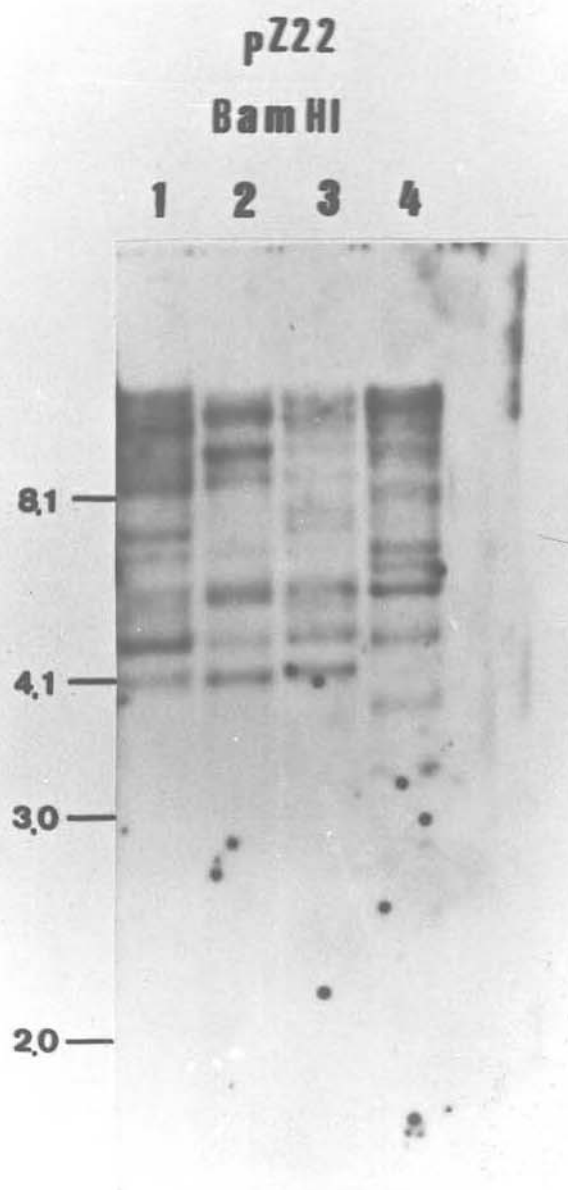
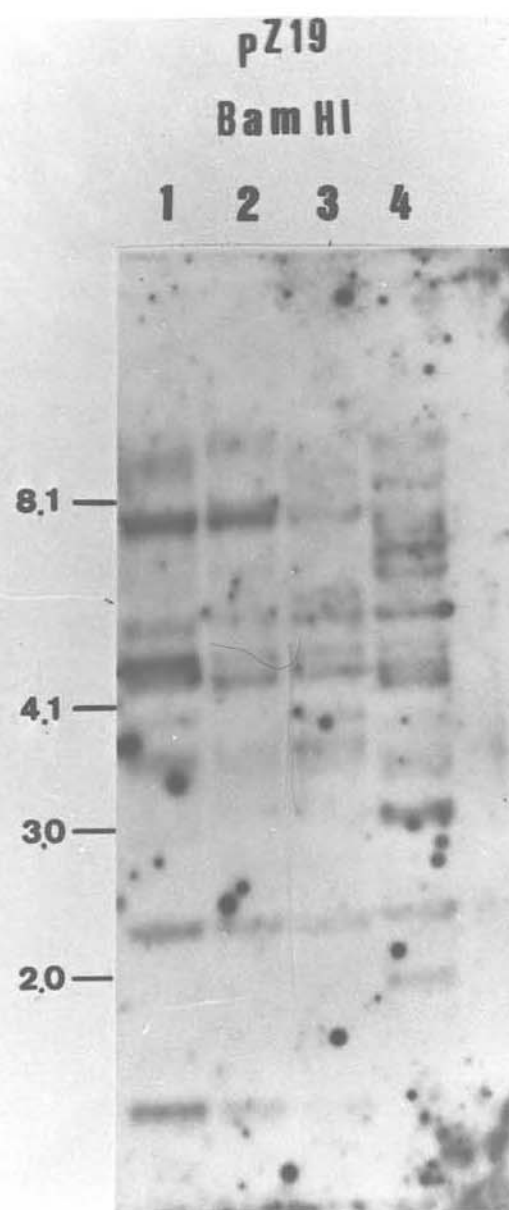


Figura 27 - Os fragmentos de DNA genômico de milho e teosinte, obtidos através de digestão com a enzima de restrição Bam HI, foram separados através de eletroforese, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com a sonda pZ 19,1. (1) Padrão de hibridização do DNA do *Zea mays* L. var. Maya, (2) Padrão de hibridização do DNA do *Zea mays* L. linhagem 1038, (3) Padrão de hibridização do DNA do *Zea mays* mexicana e (4) Padrão de hibridização do DNA do *Zea luxurians*.



sequências homólogas às sondas em cada banda. Assim sendo, as bandas mais intensas provavelmente contêm mais de um fragmento homólogo às sondas e as bandas menos intensas provavelmente representam cópias únicas. É importante salientar que as diferenças de intensidade observadas podem também refletir simplesmente a habilidade das sondas de cDNA de hibridizarem. O fato das bandas obtidas através da digestão do DNA genômico com Bam HI apresentarem uma menor intensidade de hibridização do que as bandas do DNA digerido com Eco RI pode indicar a existência de sítios de Bam HI nos genes de prolaminas do Maya, L1038, *Zea mays mexicana* e *Zea luxurians*.

V - DISCUSSÃO

As sementes são a principal fonte de proteínas na planta, podendo conter, dependendo do genótipo, de 10 a 50% de proteína (SHOTWELL e LARKINS, submetido para publicação). O Coix lacryma-jobi L. é uma gramínea aparentada ao milho que contém aproximadamente 21% de proteína no endosperma. As proteínas do endosperma do Adlay são compostas por albuminas e globulinas, F1; prolaminas, F2; e proteínas residuais, F3. As prolaminas constituem a fração protéica principal do Adlay e foram denominadas de coixina. O fato da coixina, principal proteína de reserva do Adlay, ter apresentado um conteúdo de aminoácidos (Tabela 2) pobre do ponto de vista nutricional faz com que as sementes do Adlay tenham um baixo valor nutritivo.

Ficou patente que a presença de um agente redutor é fundamental para extração da prolamina do Adlay, como indicam os dados da Tabela 1. Mesmo na presença de 20% do agente redutor 2-ME não é possível se extrair toda a prolamina do Adlay e ela permanece como uma contaminação na F3. Esta contaminação é presumivelmente responsável pela semelhança na composição de aminoácidos da F2 e F3 (Tabela 2). A presença de F2 como contaminação na F3 também foi detectada quando as frações protéicas do Adlay foram submetidas a SDS-PAGE (Figura 3). Uma

situação análoga a esta foi observada por LEE et al. (1976) para a zeína do milho. LEE et al. (1976) sugeriram que a zeína que permaneceu como contaminação pode estar presa na matriz de glutelina ou agregada a moléculas de glutelinas através de ligações dissulfeto.

Vários pesquisadores (DI FONZO et al., 1977; GIANAZZA et al., 1976; PAULIS et al., 1978) que trabalharam com a prolamina do milho, zeína, utilizaram 0,6% do agente redutor na extração da proteína. No caso do Adlay, esta porcentagem do agente redutor no solvente de extração não seria adequada para análises quantitativas das prolaminas. Já as análises qualitativas nada sofreriam, pois como pode ser constatado no gel da Figura 4A, mesmo na presença de 0,7% de 2-ME todas as 5 classes de coixina são extraídas. Enquanto que a prolamina do Adlay se subdividiu em apenas 5 classes de pesos moleculares distintos nos géis de SDS-PAGE, a F1 e F3 apresentaram um complexo padrão de distribuição de bandas no gel de SDS-PAGE (Figura 3). O mesmo padrão complexo de F1 e F3 em SDS-PAGE foi observado para as proteínas do milho (LEE et al., 1976; DI FONZO et al., 1977; WILSON et al., 1981). A razão desta complexidade advém do fato destas frações protéicas serem compostas por misturas de proteínas, sendo que a F1 representa as enzimas e pelo menos parte da F3 representa proteínas estruturais.

A F3 é a fração mais difícil de se extrair e caracterizar. A razão que torna esta proteína difícil de se extrair, como foi observado para o milho por WILSON et al.

(1981), é que ela é relativamente insolúvel em virtude da sua localização em membranas, corpúsculos etc. ou devido a interações com outros polipeptídeos. A F3 é difícil de se caracterizar, pois sendo a última fração extraída, ela pode conter contaminação da F1 e certamente, como foi observado no gel da Figura 3, ela contém contaminação da F2. Vários autores (LEE et al., 1976; SODEK e WILSON, 1971) utilizaram soluções de NaOH para extração da glutelina do milho. Contudo, a utilização de NaOH para extração da F3 parece ser ineficiente e, além do mais, este solvente torna difícil a caracterização da proteína em gel de SDS-PAGE. Como foi observado por FULLINGTON et al. (1980) para o trigo, aparentemente tampões contendo SDS e 2-ME extraem virtualmente toda proteína da semente. Após vários testes, quando um tampão Tris-HCl contendo SDS e 2-ME foi utilizado para extração da F3 do Adlay e das gramíneas utilizadas neste trabalho, resultados mais satisfatórios foram obtidos em SDS-PAGE.

Os padrões em SDS-PAGE das coixinas extraídas na ausência e na presença de 2-ME são qualitativamente diferentes, já que a banda C3 não é extraída na ausência de 2-ME (Figura 4A). O comportamento observado para a coxina C3 é similar ao encontrado para o prolamina do milho de 28 kDa, também citada na literatura como RSP (proteína solúvel reduzida), que como a C3 não é extraída na ausência de 2-ME (VITALE et al., 1982; ESEN, 1986). Além da C3, a presença de 2-ME no solvente resulta na extração de proteínas de alto peso molecular, de difícil visualização nos géis de SDS-PAGE corados com Coomassie

Brilliant Blue R 250 (Figura 4A). Estas proteínas de peso molecular mais alto que os das prolaminas também foram observadas no milho. VITALE et al. (1982) isolaram corpúsculos protéicos da linhagem de milho W64A e observaram que, além da γ -zeína, havia proteínas de 50 e 58 kDa que eram insolúveis em água, mas prontamente solúveis na presença de agentes redutores. VITALE et al. (1982) constataram que estas proteínas estão associadas aos corpúsculos protéicos das prolaminas do milho, o que provavelmente pode ser inferido para as proteínas de alto peso molecular encontradas no Adlay. Uma indicação de que as proteínas de alto peso molecular encontradas no Adlay devem ter algum tipo de relacionamento com as prolaminas advém do fato dos antisoros contra as classes de coixina C2 e C3 apresentarem reação cruzada com estas proteínas (Figura 4B e 4C).

Em SDS-PAGE, a F2 do Adlay subdividiu-se em apenas 5 classes (Figura 3) e a complexidade desta fração só foi revelada quando as proteínas foram submetidas a análise sequencial em IEF e SDS-PAGE. Em IEF, a F2 do Adlay subdividiu-se em 7 classes principais (Figura 6), que quando submetidas a SDS-PAGE (Figura 7), revelaram um total de 17 polipeptídeos. Com base nos resultados da Figura 7A, é evidente que as classes de coixina C1, C2, C3 e C5 são heterogêneas, já que elas consistem de várias classes diferentes de IEF. Em contraste, a C4 apresentou somente uma classe em IEF. A resolução minuciosa dos polipeptídeos de coixina em análises sequenciais de IEF e SDS-PAGE pode ser ideal para obtenção de anticorpos contra

polipeptídeos específicos, que podem ser utilizados em estudos de homologia entre proteínas de cereais.

Os antisoros contra C2 e C3 também reagiram com proteínas de alto peso molecular encontradas nos géis de análises sequenciais de IEF e SDS-PAGE das coixinas (Figura 7B e 7C). Experimentos envolvendo milho demonstraram que o antisoro contra zeína de 28 kDa também reagiu com proteínas de alto peso molecular (LUDEVID et al., 1985). De acordo com VITALE et al. (1982), as proteínas de alto peso molecular encontradas no milho têm composição de aminoácidos diferente das zeínas, o que pode descartar a possibilidade das proteínas de alto peso molecular serem agregados de zeína. Inferências similares podem ser feitas para o Adlay e, sendo assim, a reação cruzada dos antisoros contra as coixinas com estas proteínas é uma consequência da homologia que deve existir entre as coixinas e elas. Foi observado também que o antisoro contra zeína de 28 kDa reconhece uma das classes de zeína de baixo peso molecular (14 kDa) (LUDEVID et al., 1985). Apesar da zeína de 28 kDa apresentar certos aspectos em comum com a coixina C3, o antisoro contra zeína de 28 kDa difere do antisoro contra C3, já que ele não reconhece nenhuma das classes de baixo peso molecular das coixinas.

Como pode ser visto nas figuras 4B e 7B, as classes de coixina C1 e C2 responderam ao antisoro contra C2. Esta resposta da classe de coixina C1 ao antisoro contra C2 pode indicar que as coixinas C1 e C2 tenham determinantes antigênicos

comuns. Contudo, é mais provável que a proteína C1 tenha contaminado o antisoro contra C2 devido à proximidade das bandas C1 e C2 nos géis de SDS-PAGE.

As proteínas do endosperma do Adlay foram comparadas com as do endosperma da variedade de milho Maya. Apesar do Adlay ter aproximadamente 21% de proteína no endosperma, enquanto que o Maya tem 8,7%, a composição de aminoácidos das frações protéicas dos dois materiais é bastante similar. Tanto no Adlay quanto no Maya, as prolaminas constituem a principal fração protéica (Tabela 3), sendo que em ambos os materiais esta fração é rica nos aminoácidos alanina, leucina, prolina e ácido glutâmico (Tabela 4). O fato das prolaminas do Adlay e do Maya serem ricas nesses quatro aminoácidos está condizente com os dados obtidos por outros pesquisadores para o milho. MOSSÉ (1966), por exemplo, determinou que ácido glutâmico, leucina, alanina e prolina juntos constituem 70% do total de aminoácidos encontrados na zeína. LEE et al. (1976) determinaram que nos corpúsculos protéicos de zeína estes aminoácidos representam juntos 59,1% do total. PAULIS e WALL (1977) determinaram a composição de aminoácidos do teosinte que, como o Coix e o milho, pertence à tribo Andropogoneae e constataram que ácido glutâmico, leucina, alanina e prolina também são os principais aminoácidos encontrados nas prolaminas deste tipo de gramínea. Com base nestes dados, pode-se inferir que a composição de aminoácidos das prolaminas do milho e das gramíneas aparentadas a ele é bastante similar.

Como foi visto anteriormente, o Adlay tem 21% de proteína no endosperma e o Maya, apenas 8,7%. PAULIS e WALL (1977) determinaram que os teosintes têm entre 18 a 29% de proteína, o que também é bem mais do que eles encontraram para o híbrido do milho comercial SX52, cuja proteína total é de aproximadamente 10,9%. Aparentemente, as espécies selvagens como os teosintes e o Coix possuem um maior teor de proteínas de reserva que o milho. Isto pode indicar que a quantidade de proteína no milho tenha diminuído em função da domesticação que provavelmente relaxou a pressão de seleção em termos de quantidade de proteína na semente.

Em SDS-PAGE, os complexos padrões da F1 do Adlay e do Maya apresentaram algumas bandas de mesmo peso molecular (Figura 8). Somente pelo gel de SDS-PAGE é difícil saber se estas bandas representam o mesmo tipo de enzima presente no Adlay e no Maya. Contudo, se este for o caso, a quantidade destas enzimas varia nos dois materiais, como pode ser constatado pela intensidade das bandas. Enquanto que a F1 e a F3 exibiram um complexo padrão de bandas em SDS-PAGE, a zeína do Maya, da mesma maneira que havia acontecido para a coxina do Adlay, subdividiu-se em apenas algumas classes de pesos moleculares distintos, sendo que o padrão da zeína extraída sem 2-ME é qualitativamente diferente do da zeína extraída em presença de 2-ME (Figura 9A). Apesar da classe de zeína Z2 do Maya ter o mesmo peso molecular aparente da classe de coxina C2 (25 kDa), o antisoro contra C2 não reconheceu a classe Z2 nas análises imunológicas.

Em análises sequenciais de IEF e SDS-PAGE, a zeína do Maya demonstrou uma grande complexidade com certas bandas individuais de IEF, subdividindo-se em 2 ou 3 classes de pesos moleculares aparentes diferentes no gel de SDS-PAGE (Figura 11A). As bandas de IEF de pIs 7,26, 6,55 e 6,34 encontradas no Maya e no Adlay (Figura 10), quando submetidas a SDS-PAGE, revelaram conter proteínas do tipo Z2 no Maya e C2 no Adlay, que são proteínas de mesmo peso molecular aparente. Apesar da homologia em pI e peso molecular aparente, o antisoro contra C2 também não reconheceu estas bandas. Foi levantada a possibilidade, por ESEN et al. (1987), de que certas mudanças na conformação da proteína podem ocorrer quando ela é desnaturada ou ligada a membrana de nitrocelulose, sendo que estas mudanças podem diminuir a afinidade ao anticorpo. Com base nesta informação, pode-se especular que o antisoro contra C2 não reconheceu a classe de zeína Z2 porque não havia nenhum tipo de homologia entre esta zeína e a coixina C2 ou porque algum tipo de modificação estrutural pode ter ocorrido na Z2 quando ela foi desnaturada ou ligada a membrana, podendo esta modificação ter interferido com o reconhecimento do antisoro. Inferências similares podem ser feitas para Z3, Z4, Z5, Z6 e Z7 e o antisoro contra C2.

Ao contrário do antisoro contra C2, o antisoro contra C3 reconheceu a classe de zeína Z1 (28 kDa) e proteínas de alto peso molecular do Maya (Figura 9B e 11B). PRAT et al. (1985) detectaram certa similaridade imunológica entre a zeína de 28 kDa e a de 15 kDa. PEDERSEN et al. (1986) compararam

a sequência de nucleotídeos dos genes que codificam zeína de 28 kDa e 15 kDa e identificaram duas regiões de homologia. Apesar destas similaridades entre as duas classes de zeína, o antisoro contra C3 reconheceu a zeína de 28 kDa e não reconheceu a zeína de 15 kDa. PEDERSEN et al. (1986) mencionaram que apesar das homologias existentes entre as zeínas de 28 kDa e 15 kDa, as estruturas destas proteínas são diferentes e esta diferença pode ser responsável pelo fato do antisoro contra C3 reconhecer a zeína de 28 kDa e não reconhecer a de 15 kDa.

Existem várias razões do ponto de vista evolutivo para o aparecimento de famílias multigênicas, sendo que uma destas razões é a necessidade de se acumular grandes quantidades de um determinado produto em um período relativamente curto do desenvolvimento (DEAN et al., 1987). Por exemplo, as prolaminas do milho têm que ser sintetizadas em um período entre 12 a 50 dias após a polinização no endosperma normal. Quando clones individuais das classes de zeína Z2 e Z3 foram utilizados como sonda em hibridizações com DNA genômico de milho, múltiplos fragmentos de restrição hibridizaram e, como a zeína não contém introns, os resultados sugeriram que a zeína é codificada por inúmeros genes (MARKS e LARKINS, 1982). Resultados similares foram obtidos para o Maya, onde vários fragmentos de restrição do DNA genômico desta variedade de milho hibridizaram com as sondas de zeína pZ 22,3 e pZ 19,1 (Figura 14 e 15). Quanto ao Adlay, múltiplos fragmentos de restrição do DNA genômico desta gramínea apresentaram homologia com a sonda de zeína pZ 22,3, o que sugere que as coixinas são codificadas por vários genes (Figura 14). É

interessante notar, que apesar de não ter sido detectado nenhum tipo de homologia a nível de proteína entre a classe de coixina C2 e a de zeína Z2 nas análises imunológicas, a sonda de zeína pZ 22,3 correspondente à classe de zeína Z2 reconheceu vários fragmentos de restrição do DNA genômico do Adlay.

A comparação em SDS-PAGE da F1 de Coix, milho e teosinte (Figura 16) indicou uma similaridade bastante grande entre os padrões das variedades de Coix lacryma-jobi L. var. Adlay e Acre, o mesmo acontecendo para os padrões da L1038, Maya, Zea mays mexicana e Zea luxurians. Esta similaridade pode indicar que as mesmas enzimas estão presentes nas duas variedades de Coix e que as enzimas presentes no milho também devem estar presentes nos teosintes. Os mesmos tipos de similaridades encontradas para os padrões de F1 do Coix, milho e teosinte foram observados para os padrões da F2 e F3 destas gramíneas. Os padrões de SDS-PAGE das frações protéicas do milho apresentaram uma maior homologia com os padrões das frações protéicas dos teosintes do que com as dos Coix.

Além dos padrões das prolaminas do Adlay e do Acre nos géis de SDS-PAGE serem idênticos, deve existir uma homologia bastante grande entre as coixinas das duas variedades, como foi determinado pelas análises imunológicas com o antisoro contra C2 e o antisoro contra C3 (Figura 17B e 17C). Do mesmo modo que havia ocorrido para o Maya, o antisoro contra C2 não reconheceu nenhuma das classes de prolamina da L1038 e dos teosintes (Figura 17B). O antisoro contra C3 apresentou reação

cruzada com a prolamina Z1 dos milhos e dos teosintes (Figura 17C). Este antisoro apresentou também reação cruzada com proteínas de 40,5 kDa encontradas nas variedades de Coix, nas variedades de teosinte, no Maya e na L1038 e proteínas de 50 kDa encontradas nos milhos e nos teosintes (Figura 17C). O fato do antisoro contra C3 apresentar reação cruzada com a prolamina Z1 do Maya, L1038 e dos teosintes pode ser o resultado, como foi sugerido por DIERKS-VENTLING e COZENS (1982) para zeína, hordeína e gliadina, destas prolaminas desempenharem funções similares no endosperma de milho, Coix e teosinte. DIERKS-VENTLING e COZENS (1982) sugeriram também para zeína, hordeína e gliadina que as similaridades entre as proteínas pode ser um reflexo de evolução convergente determinada por necessidades funcionais similares ou evolução divergente dos mesmos genes ancestrais. Inferências similares às de DIERKS-VENTLING e COZENS (1982) podem ser feitas para a prolamina Z1 dos milhos e teosintes e a prolamina C3 dos Coix.

A homogeneidade encontrada nos padrões de SDS-PAGE das prolaminas do Acre e do Adlay, assim como a encontrada nos padrões do Maya, L1038, *Zea mays mexicana* e *Zea luxurians*, fez com que estas proteínas fossem submetidas a IEF (Figura 18) e subsequentemente comparadas com os padrões de IEF das prolaminas de outras linhagens de milho e variedades de Coix e teosintes (Figuras 19, 20 e 21). Em IEF, cada linhagem e variedade de milho e variedades de Coix e teosinte apresentaram um padrão próprio de bandas. Os padrões de IEF das prolaminas dos milhos apresentaram uma maior semelhança aos padrões de IEF dos

teosintes do que aos dos Coix. De uma maneira geral, as prolaminas de milho, Coix e teosinte demonstraram ser bastante heterogêneas em IEF.

GREENE et al. (1985) sugeriram que a heterogeneidade das prolaminas do trigo refletiam a heterogeneidade dos genes que codificam para estas proteínas. Provavelmente, o mesmo pode ser dito para as prolaminas do Maya, L1038, *Zea mays mexicana* e *Zea luxurians*, já que os DNAs genômicos destes materiais apresentaram um complexo padrão de hibridização com as sondas de zeína pZ 22,3 e pZ 19,1 (Figuras 24, 25, 26 e 27). Esta heterogeneidade indica que famílias multigênicas codificam para as classes de prolaminas Z2 e Z3 do Maya, L1038, *Zea mays mexicana* e *Zea luxurians*. WILSON e LARKINS (1984) sugeriram que as famílias multigênicas de zeína apareceram através da duplicação gênica em um ancestral comum do milho e do teosinte. Com base nos dados de eletroforese, análises imunológicas e hibridizações com as sondas de zeína, pode-se dizer que apesar da controvérsia existente sobre a origem do milho, existe grande homologia entre ele e o teosinte.

VI - CONCLUSÕES

1. O *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay contém aproximadamente 21% de proteína no endosperma, o que é mais que o dobro da proteína encontrada no milho. As prolaminas são as proteínas encontradas em maior quantidade no endosperma do Adlay. Elas são mais eficientemente extraídas na presença de 2-ME, mas mesmo na presença de 20% do agente redutor elas não são totalmente extraídas e contaminam a F3. O Adlay pode ser considerado como tendo um baixo valor nutritivo, já que as prolaminas deste cereal são pobres nos aminoácidos essenciais lisina e triptofano.

2. Entre as frações protéicas encontradas no endosperma do Adlay, a F3 é a mais difícil de se extrair, já que ela é relativamente insolúvel. A utilização de tampões contendo SDS e 2-ME tornam a extração desta fração protéica mais eficaz. O mesmo se aplica para a extração da F3 de milho e teosinte.

3. O complexo padrão de bandas observado para F1 e F3 do Adlay em eletroforese em gel de SDS-PAGE indica que estas frações protéicas são compostas, assim como ocorre no milho e teosinte, por misturas de proteínas.

4. Os padrões de SDS-PAGE das prolaminas do Adlay extraídas na presença e ausência de 2-ME são qualitativamente diferentes, já que a classe de coixina C3, da mesma maneira que a zeína Z1, não é extraída na ausência do agente redutor.

5. A presença do agente redutor no solvente de extração das coixinas resulta na extração de proteínas de peso molecular mais alto que os das coixinas e que apresentam reação cruzada com os antisoros contra as classes de coixina do Adlay C2 e C3. Proteínas de peso molecular mais alto que os das zeínas de milho e teosinte extraídas quando o solvente de extração de prolaminas contém 2-ME também apresentam reação cruzada com o antisoro contra C3.

6. O antisoro contra a classe de coixina C2 não apresenta reação cruzada com prolaminas de milho e teosinte. Já o antisoro contra C3 apresenta reação cruzada com Z1 de milho e teosinte, indicando que deve existir algum tipo de homologia entre C3 e Z1.

7. As prolaminas de Coix, milho e teosinte não são adequadamente analisadas quando submetidas somente a eletroforese em gel de SDS-PAGE. Para que a complexidade da proteína seja revelada é necessário que ela seja submetida a focalização isoelétrica e 2-D.

8. Múltiplos fragmentos de restrição do DNA genômico do Adlay hibridizam com a sonda de cDNA de zeína pZ 22,3, o que sugere que as coixinas são codificadas por múltiplos genes.

9. Um complexo padrão de hibridização foi observado entre fragmentos de restrição do DNA genômico do Maya, L1038, *Zea mays mexicana*, *Zea luxurians* e as sondas de cDNA de zeína pZ 19,1 e pZ 22,3. Isto indica que famílias multigênicas codificam as classes de prolamina Z2 e Z3 dos milhos e teosintes.

10. Com base nos resultados de eletroforese, análises imunológicas e hibridizações de DNA com sondas de cDNA da zeína, pode-se dizer que o milho apresenta maior homologia com teosinte do que com Coix.

VII - S U M Á R I O

As proteínas da semente do Coix lacryma-jobi L. var. Adlay foram extraídas e caracterizadas. O endosperma do Adlay contém aproximadamente 21% de proteína. A principal fração protéica do endosperma do Adlay é uma prolamina denominada coixina, cuja porcentagem varia de 10,8% a 77,8%, dependendo da concentração de 2-ME utilizado no solvente de extração.

As análises de aminoácidos revelaram que as albuminas e globulinas (F1) do endosperma do Adlay são ricas em ácido glutâmico, ácido aspártico, glicina e alanina. As prolaminas (F2) são ricas em ácido glutâmico, alanina, leucina e prolina. As prolaminas não são completamente extraídas, mesmo quando 20% de 2-ME é utilizado no solvente de extração, e permanecem como uma contaminação das proteínas residuais (F3), o que faz com que a composição de aminoácidos da F3 seja similar à da F2.

Análise das frações protéicas do Adlay através de eletroforese em SDS-PAGE demonstrou que a F1 e F3 possuem um padrão bastante complexo de bandas, enquanto que a F2 se subdividiu em apenas cinco bandas de pesos moleculares distintos. Estas cinco bandas foram denominadas de C1, C2, C3, C4 e C5. Anticorpos policlonais foram produzidos contra as bandas de

coixina C2 e C3. Os anticorpos contra C2 reagiram com a banda C2 e apresentaram reação cruzada com proteínas de peso molecular mais elevado que o das coixinas e que só foram extraídas quando 20% de 2-ME foram utilizados no solvente de extração. Anticorpos contra C3 reconheceram a banda C3 e apresentaram reação cruzada com uma proteína de 40,5 kDa extraída quando 2-ME era utilizado no solvente de extração.

A análise das coixinas em focalização isoeletrica (IEF) revelou a presença de sete bandas principais. Quando as bandas individuais de IEF foram submetidas a SDS-PAGE, subdividiram-se em mais de uma classe de peso molecular distinto. As bandas de pI 7,26, 6,91, 6,55, 6,34 e 6,20 apresentaram reação com ambos os antisoros.

As proteínas do endosperma do Adlay foram comparadas com as do Zea mays L. var. Maya. Foi constatado que o Maya possui um total de 8,7% de proteína no endosperma, sendo que 51,7% desta proteína são representados por prolaminas que, no caso do milho, são denominadas de zeína. A análise de aminoácidos da F1, F² e F3 do Maya revelou que existe uma similaridade na composição de aminoácidos das frações protéicas do Maya e do Adlay.

Quando submetidas a SDS-PAGE, a F1 e F3 do Maya apresentaram um complexo padrão de bandas, sendo que algumas das bandas tinham o mesmo peso molecular de bandas encontradas nos padrões de F1 e F3 do Adlay. A F2 do Maya, do mesmo modo que a F2 do Adlay, apresentou uma baixa heterogeneidade em SDS-PAGE.

As sete bandas encontradas no padrão de SDS-PAGE do Maya foram denominadas de Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6 e Z7. As prolaminas do Maya não apresentaram reação cruzada com o antisoro contra a classe de coixina C2. Contudo, o antisoro contra C3 apresentou reação cruzada com Z1 e com proteínas de 40,5 e 50 kDa extraídas na presença de 2-ME.

Em IEF, a zeína do Maya apresentou oito bandas principais que, quando foram submetidas a SDS-PAGE, revelaram ser principalmente do tipo Z2 e/ou Z3. Apesar da difícil visualização no gel de SDS-PAGE, bandas do tipo Z1 se encontram nos mesmos pIs das bandas Z2 e Z3, como foi detectado através de análise imunológica com o antisoro contra C3.

Os DNAs genômicos do Adlay e do Maya foram digeridos com as enzimas de restrição Eco RI, Bam HI e Hind III e submetidos a hibridizações com as sondas de cDNA da zeína pZ 22,3 e pZ 19,1. Enquanto que o DNA do Maya apresentou homologia com ambas as sondas de zeína, o DNA do Adlay só apresentou homologia com a sonda pZ 22,3.

As proteínas do endosperma do Coix lacryma-jobi var. Acre, da linhagem de milho L1038 e dos teosintes *Zea mays mexicana* e *Zea luxurians* foram comparadas com as do Adlay e do Maya. Ficou constatado que os padrões de SDS-PAGE da F1, F2 e F3 do Adlay e do Acre são praticamente iguais. Os padrões de SDS-PAGE da F1, F2 e F3 dos milhos e teosintes também são praticamente iguais. Quando submetida a reações imunológicas, a F2 do Acre apresentou reação cruzada com

os antisoros contra as classes de coixina C2 e C3 do Adlay. Da mesma forma que havia sido observado para F2 do Maya, as F2 da L1038, *Zea mays mexicana* e *Zea luxurians* não apresentaram reação cruzada com o antisoro contra a classe de coixina C2 do Adlay, mas apresentaram reação cruzada com o antisoro contra C3.

A homogeneidade encontrada nos padrões de SDS-PAGE da F2 do Adlay e do Acre e da F2 do Maya, L1038, *Zea mays mexicana* e *Zea luxurians* fez com que estas proteínas fossem submetidas a focalização isoeletrica e, subsequentemente, comparadas com os padrões de IEF de prolaminas de outras linhagens de milho e variedades de Coix e teosinte, onde se observou um padrão individual de bandas para cada um dos materiais analisados.

Os DNAs genômicos do *Zea mays mexicana*, *Zea luxurians*, L1038 e Maya foram digeridos com as enzimas de restrição Eco RI e Bam HI e submetidos a hibridizações com as sondas pZ 22,3 e pZ 19,1. Foi constatado que existe homologia entre os DNAs dos milhos e teosintes e ambas as sondas de cDNA da zeína.

VIII - SUMMARY

The seed proteins of *Coix lacryma-jobi* L. var. Adlay were extracted and characterized. The endosperm of Adlay contains ca. 21% of proteins. The major protein fraction of the endosperm of Adlay is a prolamin, known as coixin. The amount of coixin extracted ranges from 10.8% to 77.8%, depending upon the concentration of 2-mercaptoethanol in the extraction solvent.

Amino acid analysis revealed that the albumins and globulins (F1) from Adlay endosperm are rich in glutamic acid, aspartic acid, glycine and alanine. The prolamins (F2) are rich in glutamic acid, alanine, leucine, and proline. The prolamins are not completely extracted, even when 20% of the 2-ME is used in the extraction solvent. They remain as a contamination of residual proteins (F3). Because of the incomplete extraction of coixin, the amino acid content of F3 proteins is similar to that of F2.

SDS-PAGE analysis of Adlay protein fractions showed that F1 and F3 have a complex pattern of bands, while F2 has only five bands. Those five bands were denominated C1, C2, C3, C4, and C5. Polyclonal antibodies were raised against the C2 and C3 protein bands. The C2 antibodies recognized the C2 band and cross-reacted with proteins of higher molecular weight that

were extracted only when 20% of 2-ME were used in the extraction solvent. The C3 antibodies recognized the C3 band and cross-reacted with a 40.5 kDa protein, extracted when 2-ME was included in the extraction solvent.

Isoelectric focusing (IEF) analysis of coixin revealed the presence of seven major bands. When individual IEF bands were submitted to SDS-PAGE, they subdivided into more than one molecular weight class. The IEF bands with pI 7.26, 6.91, 6.55, 6.34, and 6.20 reacted with both antibodies.

The endosperm proteins of Adlay were compared with those of *Zea mays* L. var. Maya. It was observed that Maya has 8.7% of protein in the endosperm. Approximately 51.7% of that protein are prolamins, which are called zein in corn. Amino acid analysis of Maya F1, F2, and F3 showed that there is a similarity between the amino acid composition of the protein fractions of Maya and Adlay.

When submitted to SDS-PAGE, the F1 and F3 of Maya gave a complex band pattern. Some of the bands observed in the F1 and F3 of Maya had the same molecular weight of bands found in the F1 and F3 of Adlay. Like the F2 of Adlay, the F2 of Maya showed low heterogeneity in SDS-PAGE. The seven bands observed in Maya F2 SDS-PAGE pattern were named Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, and Z7. No cross-reaction was observed between the prolamins of Maya and C2 antibody. However, a cross-reaction was observed between C3 antibody and Z1. Proteins extracted in the

presence of 2-ME with 40.5 and 50 kDa also cross-reacted with C3 antibodies.

A total of eight major bands were observed for Maya in IEF. When submitted to SDS-PAGE, those bands revealed to be mostly Z2 and Z3. Bands Z1 were detected in SDS-PAGE with C3 antibody in the same pI of Z2 and Z3 bands.

The genomic DNAs of Adlay and Maya were digested with the restriction enzymes Eco RI, Bam HI, and Hind III and submitted to hybridizations with zein cDNA probes pZ 22.3 and pZ 19.1. While the DNA of Maya showed homology with both probes, the DNA of Adlay showed homology only with pZ 22.3.

The endosperm proteins of *Coix lacryna-jobi* var. Acre, corn inbred line 1038, and of the teosintes *Zea mays mexicana* and *Zea luxurians* were compared with the ones of Adlay and Maya. It was observed that the SDS-PAGE patterns of the F1, F2, and F3 of Adlay and Acre were practically the same. The SDS-PAGE patterns of the F1, F2, and F3 of the corn and teosintes were also practically the same. When submitted to immunological reactions, a cross-reaction was observed between Acre F2 and C2 and C3 antibodies. As it was found for Maya F2, no cross-reaction was observed for L1038, *Zea mays mexicana*, and *Zea luxurians* F2 and C2 antibody. However, a cross-reaction was observed for the F2 of those materials and C3 antibody.

The lack of heterogeneity observed for the SDS-PAGE pattern of the F2 of Adlay and Acre and the F2 of Maya,

L1038, *Zea mays mexicana*, and *Zea luxurians* was the reason why those proteins were submitted to isoelectric focusing and after that were compared with the IEF pattern of the prolamins of other corn inbred lines and Coix and teosinte varieties. Those comparisons showed an individual pattern for each material analysed.

The genomic DNA of *Zea mays mexicana*, *Zea luxurians*, L1038, and Maya were digested with the restriction enzymes Eco RI and Bam HI and submitted to hybridization with pZ 22.3 and pZ 19.1. It was observed that there is a homology between the DNAs of corn and teosinte and both probes.

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Argos, P., Pedersen, K., Marks, M.D. and Larkins, B.A.
(1982). A Structural Model for Maize Zein Proteins. J. Biol. Chem. 257: 9984-9990.
- 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.
- Baudet, J., Mossé, J., Landry, J. and Moureaux, T. (1966) Etude sur Les Proteines du Mais. J. Composition and Acides Amines des Fractions Azoties du Grain. Ann. Physiol. Veg. 8: 321-329.
- Beadle, G.W. (1980). The Ancestry of Corn. Sci. Amer. 242: 112-119.
- Bergquist, R.R. (1981). Transfer from *Tripsacum dactyloids* to Corn of A Major Gene Locus Conditioning Resistance to *Puccinia sorghi*. Phytopathology 71: 518-520.
- Boundy, J.A., Woychik, J.H., Dimler, R.J. and Wall, J.S. (1967). Protein Composition of Dent, Waxy and High-Amylase Corns. Cereal Chem. 44: 160-169.

Bright, W.J. and Shewry, P.R. (1983). Improvement of Quality in Cereals. In: CRC Critical Reviews in Plant Sciences. Vol 1, Issue 1, pp. 49-93.

Bunce, N.A.C., White, R.P. and Shewry, P.R. (1985). Variation in Estimates of Molecular Weights of Cereal Prolamins by SDS-PAGE. J. Cereal Sci. 3: 131-142.

Burr, F.A. and Burr, B. (1979). Molecular Basis of Zein Protein Synthesis in Maize Endosperm. In: The Plant Seed: Development, Preservation and Germination. I. Rubenstein, R.L. Phillips, C.E. Green and B.G. Gengenbach (eds.). Academic Press, New York, pp. 27-48.

Burr, F.A. and Burr, B. (1982). Three Mutations in *Zea mays* Affecting Zein Accumulation: A Comparison of Zein Polypeptides, *in vitro* Synthesis and Processing mRNAs Levels, and Genomic Organization. J. Cell Biol. 94: 201-206.

Byers, M., Mifflin, B.J. and Smith, S.J. (1983). A Quantitative Comparison of The Extraction of Protein Fractions from Wheat Grain by Different Solvents and of The Polypeptides and Amino Acid Composition of Alcohol Soluble Proteins. J. Sci. Food Agric. 34: 447-462.

Christianson, D.D., Nielsen, H.C., Khoo, U., Wolf, M.J. and Wall, J.S. (1969). Isolation and Chemical

Composition of Protein Bodies and Matrix Proteins in Corn Endosperms. Cereal Chem. 46: 372-381.

Christianson, D.D., Khoo, U., Nielsen, H.C. and Wall, J.S. (1974). Influence of Opaque-2 and Floury-2 Genes on Formation of Proteins in Particulates of Corn Endosperm. Plant Physiol. 53: 851-855.

Dalby, A. (1974). Rapid Method for Determining The Zein Content of Whole Maize Seed or Isolated Endosperm. Cereal Chem. 51: 586-592.

Danner, D.B. (1982). Recovery of DNA Fragments from Gels by Transfer to DEAE-Paper in An Electrophoresis Chamber. Anal. Biochem. 125: 139-142.

Dean, C., Dunsmuir, P. and Bedbrook, J. (1987). The Small Subunit Genes of Petunia: A Well-Characterized Plant Multigene Family. In: Tailoring Genes for Crop Improvement: An Agricultural Perspective. Basic Life Sciences. Vol. 41. G. Bruening, J. Harada, T. Kusuge and A. Hollaender (eds.). Plenum Press, New York, and London, pp. 59-68.

Diaz, N.M. (1985). Caracterização e Utilização do Coix em Panificação. Alimentos e Tecnologia 4: 17-18.

Dierks-Ventling, C. and Cozens, K. (1982). Immunochemical Crossreactivity Between Zein, Hordein and Gliadin.

FEBS Lett. 142: 147-150.

Di Fonzo, N., Fornasari, E., Salamini, F. and Soave, C. (1977). SDS-Protein Subunits in Normal, Opaque-2 and Flourey-2 Maize Endosperms. Maydica 22: 77-88.

Di Fonzo, N., Fornasari, E., Salamini, F., Reggiani, R. and Soave, C. (1980). Interaction of Maize Mutants Flourey-2 and Opaque-7 with Opaque-2 in The Synthesis of Endosperm Proteins. J. of Heredity 71: 397-402.

Di Fonzo, N. Manzocchi, L., Salamini, F. and Soave, C. (1986). Purification and Properties of An Endospermic Protein of Maize Associated with The Opaque-2 and Opaque-6 Genes. Planta 167: 587-594.

Dretzen, G., Bellard, M., Corsi, P.S. and Chambon, P. (1981). A Relative Method for The Recovery of DNA Fragments from Agarose and Acrylamide Gels. Anal. Biochem. 112: 295-298.

Dure, L. III (1985). Embryogenesis and Gene Expression during Seed Formation. Oxford Surveys of Plant Mol. and Cell Biol. 2: 179-197.

Einarsson, S., Josefsson, B. and Lagerkvist, S. (1983). Determination of Amino Acids with 9-Fluorenylmethylchloroformate and Reserved Phase High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromatogr.

282: 609-618.

Esen, A. (1986). Separation of Alcohol-Soluble Proteins (Zeins) from Maize into Three Fractions by Differential Solubility. Plant Physiol. 80: 623-627.

Esen, A., Bietz, J.A., Paulis, J.W. and Wall, J.S. (1981). Fractionation of Alcohol-Soluble Reduced Corn Glutelins on Phosphocellulose and Partial Characterization of Two Proline-Rich Fractions. Cereal Chem. 58: 534-537.

Esen, A., Bietz, J.A., Paulis, J.W. and Wall, J. (1987). A 23.8-kD Alpha-Zein with N-Terminal Sequence and Immunological Properties Similar to 26.7-kD Alpha Zeins. Plant Mol. Biol. 9: 421-442.

Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983). A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. Anal. Biochem. 132: 6-13.

Fullington, J.G., Cole, E.W. and Kasarda, D.D. (1980). Quantitative SDS-PAGE of Total Protein from Different Wheat Varieties. J. Sci. Food Agric. 31: 43-53.

Galili, G., Kawata, E.E. and Larkins, B.A. (1987). Characterization of Polypeptides Corresponding to Clones of Maize Zein mRNAs. Plant Physiol. 84: 291-297.

Galinat, W.C. (1974). Intergenomic Mapping of Maize,

- Teosinte and *Tripsacum*. Evolution 27: 644-655.
- Gay, J.P. (1987). Le Mais. La Recherche 18: 459-466.
- Gentinetta, E., Maggiore, T., Salamini, F., Lorenzo, C., Pioli, F. and Soave, C. (1975). Protein Studies in 46 Opaque-2 Strains with Modified Endosperm Texture. Maydica 20: 145-164.
- Geraghty, D., Peifer, M.A., Rubenstein, J. and Messing, J. (1981). The Primary Structures of A Plant Storage Protein: Zein. Nucleic Acids Res. 9: 5163-5174.
- Gianazza, E., Righetti, P.G., Pioli, F., Galante, E. and Soave, C. (1976). Size and Charge Heterogeneity of Zein in Normal and Opaque-2 Maize Endosperms. Maydica 21: 1-17.
- Gianazza, E., Viglienghi, V., Righetti, P.G., Salamini, F. and Soave, C. (1977). Amino Acid Composition of Zein Molecular Components. Phytochemistry 16: 315-317.
- Greene, F.C., Anderson, O.D., Letts, J.C. and Gautier, M.F. (1985). Control of Wheat Protein Biosynthesis. Cereal Chem. 62(5): 398-405.
- Grosschedl, R. and Birnstiel, M.L. (1980). Identification of Regulatory Sequences in The Prelude Sequences of An H2A Histone Genes by The Study of Specific Deletion Mutants in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 1-32.

Hager, D.A. and Burgess, R.R. (1980). Elution of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels, Removal of Sodium Dodecyl Sulfate, and Renaturation of Enzymatic Activity: Results with Sigma Subunit of *Escherichia Coli* RNA Polymerase, Wheat Germ DNA Topoisomerase, and Other Enzymes. Anal. Biochem. 109: 76-86.

Hake, S. and Walbot, V. (1980). The Genome of *Zea mays*, Its Organization and Homology to Related Grasses. Chromosoma 79: 251-270.

Hansel, L.W., Tsai, C.Y. and Nelson, O.E. (1973). The Effect of The Floury-2 Gene on The Distribution of Protein Fractions and Methionine in Maize Endosperm. Cereal Chem. 50: 383-394.

Heidecker, G. and Messing, J. (1986). Structural Analysis of Plant Genes. Ann. Rev. Plant Physiol. 37: 439-466.

Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981). A Rapid Boiling Method for The Preparation of Bacterial Plasmids. Anal. Biochem. 114: 193-197.

Hu, N.T., Peifer, M.A., Heidecker, G., Messing, J. and Rubenstein, J. (1982). Primary Structure of A Genomic Zein Sequence of Maize. EMBO J. 1: 1337-1342.

Jain, S.K. and Banerjee, D.K. (1974). Preliminary Observations on The Ethnobotany of The Genus *Coix*.

Econ. Bot. 28: 38-42.

Khavkin, E.E., Misharin, S.J., Markov, V.V. and Peshkova, A.A. (1978). Identification of Embryonal Antigens of Maize: Globulins as Primary Reserve Proteins of The Embryo. Planta 143: 11-20.

Kirihara, J.A., Hunsperger, J.P., Mahoney, W.C. and Messing, J.W. (1988). Differential Expression of A Gene for A Methionine-Rich Storage Protein in Maize. Mol. Gen. Genet. 211: 477-484.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Protein during The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Landry, J. and Moureaux, T. (1970). Heterogeneite des Glutelines du Grain de Maize: Extraction Selective et Composition en Acides Amines des Trois Fractions Isolees. Bull. Soc. Chem. Biol. 52: 1021-1037.

Langridge, P., Pintor-Toro, J.A. and Feix, G. (1982). Transcriptional Effects of The Opaque-2 Mutation of *Zea mays* L. Planta 156: 166-170.

Larkins, B.A. (1983). Genetic Engineering of Seed Storage Proteins. In: Genetic Engineering of Plants: An Agricultural Perspective. Kusage, T., Meredith, C. and Hollander, A. (eds.). Plenum Press, New York and London, pp. 93-118.

Larkins, B.A. and Pedersen, K. (1982). Cloning of Maize Zein Genes: In: Maize for Biological Research. W.F. Sheridan (ed.). Plant Molecular Biology Association, Charlottesville, VA., pp. 177-182.

Larkins, B.A., Plarlmutter, N.L. and Hurkman, W.J. (1979). The Mechanisms of Zein Synthesis and Deposition in Protein Bodies of Maize Endosperm. In: The Plant Seed: Development, Preservation and Germination. J. Rubenstein, R.L. Phillips, C.E. Green and B.G. Gengenbach (eds.). Academic Press, New York, pp. 49-65.

Larkins, B.A., Pedersen, K., Marks, M.D. and Wilson, D.R. (1984). The Zein Proteins of Maize Endosperm. TIBS 9: 306-308.

Lee, K.H., Jones, R.A., Dalby, A. and Tsai, C.Y. (1976). Genetic Regulation of Storage Protein Content in Maize Endosperm. Biochem. Genet. 14: 641-659.

Lewin, B. (1983). Constitution of The Eukaryotic Genome. In: Genes. John Wiley and Sons, New York, pp. 325-328.

Ludevid, M.D., Torrent, M., Martinez-Izquierdo, J.A., Puigdomenech, P. and 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. and 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.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Marks, M.D. and Larkins, B.A. (1982). Analysis of Sequence Microheterogeneity among Zein mRNAs. J. Biol. Chem. 257: 9976-9983.
- McKinney, L.L. (1958). Zein. In: The Encyclopedia of Chemistry. G.L. Clarke (ed.). Reinhold, New York, pp. 319-320.
- McKnight, S.L. and Kingsbury, R. (1982). Transcriptional Control Signals of A Eukaryotic Protein-Coding Gene. Science 217: 316-324.
- Mertz, E.T., Batess, L.S. and Nelson, D.E. (1964). Mutant Gene That Changes Protein Composition and Increases Lysine Content of Maize Endosperm. Science 145: 279-280.
- Mifflin, B.J. and Shewry, P.R. (1979). The Biology and Biochemistry of Cereal Seed Prolamins. In: Seed Protein Improvement in Cereals and Grain Legumes. Vol. 1, IAEA, Vienna, pp. 137-158.

Miller, J.H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 31-36.

Misra, P.S., Mertz, E.T. and Glover, D.V. (1975a). Developmental Changes in Endosperm Proteins of High-Lysine Mutants. Cereal Chem. 52: 734-739.

Misra, P.S., Mertz, E.T. and Glover, D.V. (1975). Characteristics of Proteins in Single and Double Endosperm Mutants of Maize. In: High Quality Protein Maize. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, PA, pp. 291-305.

Mossé, J. (1966). Alcohol Soluble Proteins of Cereal Grains. Fed. Proc. 25: 1663-1669.

Muntz, K. (1982). Seed Development. In: Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 14A. A. Pirson and M.H. Zimmerman (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, pp. 505-558.

Nkonge, C. and Ballance, G.M. (1982). A Sensitive Colorimetric Procedure for Nitrogen Determination in Micro-Kjeldahl Digests. J. Agric. Food Chem. 30: 416-420.

Nucca, R., Soave, C., Motto, M. and Salamini, F. (1978). Taxonomic Significance of The Zein Isoelectric Focusing Pattern. Maydica 23: 239-249.

Osborne, T.B. (1897). Amount and Properties of The Proteins of The Maize Kernel. J. Ann. Chem. Soc. 19: 525-532.

Osborne, T.B. (1908). Our Present Knowledge of Plant Proteins. Science 28: 417-427.

Osborne, T.B. (1909). The Vegetable Proteins. Longmans, Green and Co., London.

Osborne, T.B. and Mendel, L.B. (1914). Nutritive Properties of Proteins of The Maize Kernel. J. Biol. Chem. 18: 1-8.

Palmiano, E.P., Almazan, A.M. and Juliano, B.O. (1968). Physiological Properties of Protein of Developing and Mature Rice Grain. Cereal Chem. 45: 1-12.

Paulis, J.W. and Wall, J.S. (1971). Fractionation and Properties of Alkylated-Reduced Corn Glutelin Proteins. Biochem. Biophys. Acta 251: 57-69.

Paulis, J.W. and Wall, J.S. (1977a). Fractionation and Characterization of Alcohol Soluble Reduced Corn Endosperm Glutelin Proteins. Cereal Chem. 54: 1223-1228.

Paulis, J.W. and Wall, J.S. (1977). Comparison of The Protein Compositions of Selected Corns and Their Wild Relatives, Teosinte and Tripsacum. J. Agric. Food Chem. 25: 265-270.

Paulis, J.W., James, C. and Wall, J.S. (1969). Comparison of Glutelin Proteins in Normal and High-Lysine Corn Endosperms. J. Agric. Food Chem. 17: 1301-1305.

Paulis, J.W., Wall, J.S. and Sanderson, J. (1978). Origin of High Methionine Content in Sugary-1 Corn Endosperm. Cereal Chem. 55: 705-712.

Payne, P.I. and Rhodes, A.P. (1982). Cereal Storage Proteins: Structure and Role in Agriculture and Food Technology. Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 14A. A. Pirson and M.H. Zimmerman (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, pp. 346-369.

Pedersen, K., Bloom, K.S., Anderson, J.N., Glover, D.V. and Larkins, B.A. (1980). Analysis of The Complexity and Frequency of Zein Genes in The Maize Genome. Biochemistry 19: 1644-1650.

Pedersen, K., Devereux, J., Wilson, D.R., Sheldon, E. and Larkins, B.A. (1982). Cloning and Sequence Analysis Reveal Structural Variation among Related Zein Genes Maize. Cell 29: 1015-1026.

Pedersen, K., Argos, P., Naravana, S.V.L. and Larkins, B.A. (1986). Sequence Analysis and Characterization of A Maize Gene Encoding A High-Sulfur Zein Protein of Mr 15,000. J. Biol. Chem. 261: 6279-6284.

Pernollet, J.C. and Mossé, J. (1983). Structure and

- Location of Legume and Cereal Seed Storage Proteins. Seed Proteins. Daussant, J., Mossé, J. and Vaughan, J. (eds.). Academic Press, London, pp. 155-191.
- Phillips, R.L. and McClure, B.A. (1985). Elevated Protein-Bound Methionine in Seeds of A Maize Line Resistant to Lysine plus Threonine. Cereal Chem. 62: 213-218.
- Phillips, R.L., Morris, P.R., Wold, F. and Gengenbach, B.G. (1981). Seedling Screening for Lysine-Plusthreonine Resistant Maize. Crop Sci. 21: 601-607.
- Prat, S., Cortadas, J., Puigdomenech, P. and Palau, J. (1985). Nucleic Acid (cDNA) and Amino Acid Sequences of The Maize Endosperm Protein Glutelin-2. Nucleic Acids Res. 13: 1493-1504.
- Righetti, P.G., Gianazza, E., Viotti, A. and Soave, C. (1977). Heterogeneity of Storage Proteins in Maize. Planta 136: 115-123.
- Rivin, C.J., Zimmer, E.A. and Walbot, V. (1982). Isolation of DNA and Recombinants from Maize. In: Maize for Biological Research. Plant Molecular Biology Association, Charlottesville, VA.
- Salamini, F. and Soave, C. (1982). Zein: Genetics and Biochemistry. In: Maize for Biological Research. W.F. Sheridan (ed.). Plant Molec. Biol. Assn., pp. 155-180.

Shotwell, M.A. and Larkins, B.A. (in press). The Biochemistry and Molecular Biology of Seed Storage Proteins. In: The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise. Vol. 15. Molecular Biology. A. Marcus (ed.). Academic Press, London.

Siegel, L.I. and Bresnick, E. (1986). Northern Hibridization Analysis of RNA Using Diethylpyrocarbonate-Treated Nonfat Milk. Anal. Biochem. 159: 82-87.

Soave, C. and Salamini, F. (1984). Organization and Regulation of Zein Genes in Maize Endosperm. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 304: 341-347.

Soave, C., Pioli, F., Viotti, A., Salamini, F. and Righetti, P.G. (1975). Synthesis and Heterogeneity of Endosperm Proteins in Normal and Opaque-2 Maize. Maydica 20: 83-94.

Soave, C., Suman, N., Viotti, A. and Salamini, F. (1978a). Linkage Relationships Between Regulatory and Structural Gene Loci Involved in Zein Synthesis in Maize. Theoret. Appl. Genet. 52: 263-267.

Sodek, L. and Wilson, C.M. (1971). Amino Acid Composition of Proteins Isolated from Normal, Opaque-2, and Floury-2 Corn Endosperms by A Modified Osborne Procedure. J. Agric. Food Chem. 19: 1144-1150.

- Spencer, D. (1984). The Physiological Role of Storage Proteins in Seeds. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 304: 275-285.
- Torres, P. a Bergamin, A. (1951). O Cereal Adlay. Estudo de Seu Valor Agrícola e Nutricional para Aves. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz" 8: 669-685.
- Tsai, C.Y. (1979b). Early Termination of Zein Accumulation in Opaque-2 Maize Mutant. Maydica 24: 129-140.
- Tsai, C.Y. (1983). Genetics of Storage Protein in Maize. In: Plant Breeding Reviews. Vol. I. J. Janick (ed.). Avi. Publ., Westport, CT, pp. 103-138.
- Venkateswarlu, J. and Chaganti, R.S.K. (1973). Job's Tears (*Coix lacryma-jobi* L.). ICAR Tech. Bull. 43-44: 1-54.
- Viotti, A., Sala, E., Alberi, P. and Soave, C. (1978). Heterogeneity of Zein Synthesized in vitro. Plant Sci. Lett. 13: 365-375.
- Vitale, A., Soave, C. and Galante, E. (1980). Peptide Mapping of IEF Zein Components from Maize. Plant Sci. Lett. 18: 57-64.
- Vitale, A., Smaniotto, E., Longhi, A. and Galante, E. (1982). Reduced Soluble Proteins Associated with Maize

Chem. 58: 275-281.

Wilson, D.R. and Larkins, B.A. (1984). Zein Gene Organization in Maize and Related Grasses. J. Mol. Evol. 20: 330-340.

Wolf, M.J., Khoo, U. and Seckinger, H.L. (1967). Subcellular Structure of Endosperm Protein in High-Lysine and Normal Corn. Science 157: 556-557.