

BC/29054

IB/80530



UNICAMP

T/UNICAMP

G213_a



Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Instituto de Biologia
Departamento de Genética e Evolução

**Alterações em Genes de Zeína Induzidas por
Variação Somaclonal**

Marília Gaspar

Orientadora: Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

| |
|---|
| Este exemplar corresponde à redação final da tese submetida pelo(a) candidato (a) <i>Marília Gaspar</i> |
| e aprovada pela Comissão Julgadora. |

19/9/96
Laura m. m. Ottoboni

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Genética de Plantas.

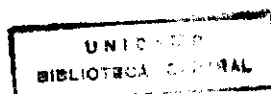
1996

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

G213a Gaspar, Marília
Alterações em genes de zeína induzidas por variação
somaclonal / Marília Gaspar. -- Campinas, SP : [s.n.],
1996.

Orientador: Laura Maria Mariscal Ottoboni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia.

1. Variação (Biologia) - Milho. 2. Genética vegetal -
Milho. 3. Sementes - Qualidade. 4. Metionina. I. Ottoboni,
Laura Maria Mariscal. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.



| | |
|--------------|-----------|
| UNIDADE | IB |
| N.º CHAMADA: | |
| V.º | E. |
| PROG. | 667/96 |
| PREÇO | R\$ 11,00 |
| DATA | 05/11/96 |
| N.º CPD | |

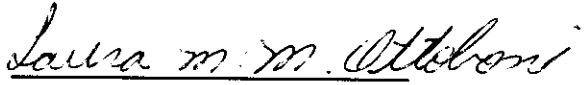
C.N. 00094586-0

LOCAL E DATA: Campinas, 19 de setembro de 1996

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni


Assinatura

Profa. Dra. Christine Haeckel



Assinatura

Prof. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira


Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira


Assinatura

APROVADA

*" Para ser grande, sê inteiro:
Nada teu exagera ou exclui
Sê todo em cada coisa
Põe quanto és
No mínimo que fazes
Assim, em cada lago
A lua toda brilha,
Porque alta vive".*

F. Pessoa

Dedico e ofereço esta tese àqueles que mais amo neste mundo, meus pais Guilherme e Teresa, por estarem ao meu lado me incentivando em todos os momentos e às minhas queridas irmãs, Marina e Camila, minhas companheiras de sempre.

*“Sete, em cores
De repente, o arco-íris se desata
Da água límpida e contente
Do ribeirinho da mata.*

*O sol, ao vênus transparente
Da chuva, de ouro e de prata
Resplandesce, resplendente
No céu, no chão
Na cascata...”.*

Ao querido Marcelo Jager,
arco-íris que colore meus
dias de chuva, pelo carinho
e ajuda em todos os momentos.

Meus mais sinceros agradecimentos...

À Deus, que sempre iluminou meu caminho e jamais me abandonou...

À Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni, por sua orientação e incentivo profissional e, acima de tudo, pela amizade e compreensão que sempre demonstrou;

Às Professoras Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira e Dra. Christine Hackel, pela inestimável contribuição na análise prévia deste trabalho e pela solicitude com que se dispuseram a participar da banca desta tese;

Ao Dr. Celso Eduardo Benedetti por sua minuciosa e dedicada avaliação na pré-banca e pela atenção que sempre demonstrou ao meu trabalho;

Ao Dr. Marcelo Menossi pelo companheirismo e contribuição na banca desta tese;

Ao Prof. Dr. Paulo Arruda pelo suporte técnico que permitiu o desenvolvimento deste projeto,

Aos Professores Dr. Adilson Leite, Dra. Maricilda Palandi Mello e Dr. Sérgio Marangoni, pela participação como membros da banca do exame de qualificação e por suas sugestões, valiosas para a minha formação pedagógica;

À Prof. Dra. Anete Pereira de Souza, pela participação ativa no decorrer deste trabalho e em minha formação profissional;

Ao Prof. Dr. L. J. Greene, do CQP-USP, pela presteza com que realizou as análises de aminoácidos deste trabalho;

À Teresa Marques Novo pelo carinho e amizade de todos os dias e pela ajuda valiosa em todos os passos deste trabalho;

Aos amigos Lyriam e Gonçalo, pelos bons bate-papos nos bares da vida que vão deixar saudades...

Aos companheiros de laboratório Claudete, Rogério, Lysa e Emília, pelo apoio e amizade demonstrado no dia-a-dia;

Ao Márcio pelos ensinamentos sobre fotografias, pelo eterno bom humor e pela boa vontade que sempre demonstrou;

Aos grandes amigos do Laboratório de Plantas Dante, André, Felipe, Silvia, Édson, Germano e Andrés, com os quais compartilhei, dentro e fora do laboratório, momentos que ficarão para sempre guardados em minha memória...

Aos novos colegas do laboratório Karen, Fábio, Ivan, Adriana, Cíntia, Rodrigo e Raul, por trazerem mais alegria a este ambiente de trabalho;

Aos colegas do Laboratório de RFLP Sibov, Luciana, Berenice, Sandra, Suzy, Patrícia, Zilda e Éberson, pelo agradável convívio;

Aos colegas do Laboratório de Genética Animal Maria Elena, Ana Cláudia, Juliana, Rosângela, Nair e Carla pelo carinho com que sempre me trataram;

Aos colegas do Laboratório de Genética Humana Lee, Marcela, Ivy, Lucianinha, Juliana, Janete, Edi e Madá sempre alegres e prestativos;

Aos colegas do Laboratório de Microrganismos Ed, Sandrinha, Henrique e Antônia sempre dispostos a ajudar;

Às colegas do Laboratório de Plantas separadas pela distância de um andar, Míriam e Raquel, pela animação contagiante de sempre;

Às minhas amigas do coração Pan, Fê e Cris, por me ajudarem nos momentos mais difíceis e por tornarem meus dias mais alegres;

Ao Pedro Maurício, por sua ajuda e cuidado no preparo da vidraria;

Ao Seu Chico, pelo cuidado com as plantas no campo e pelas pipocas de fim de tarde;

Às secretárias Sandra, Tânia, Cláudia, Fabiana e Teresa, pela boa vontade e prontidão que sempre demonstraram na resolução dos meus problemas burocráticos;

Aos demais funcionários e professores, que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho;

Ao CNPq e PADCT pelo apoio financeiro.

ABREVIações

| | | | |
|-------------|-------------------------------------|--------------|---|
| °C | Graus Celsius | mm | Milímetro |
| μl | Microlitro | MOPS | [3 - (N - Morfolino) Ácido Propanosulfônico |
| μm | Micrômetro | N | Normalidade |
| 2-Me | 2-Mercaptoetanol | NaCl | Cloreto de Sódio |
| cm | Centímetro | NaOH | Hidróxido de Sódio |
| DEPC | Dietil - pirocarbonato | p/p | Relação peso/peso |
| DTT | Ditiotreitol | PAM | Persulfato de Amônio |
| EDTA | Ácido Etileno Diaminotetracético | pb | Pares de base |
| EtBr | Brometo de Etídeo | PEG | Poliétileno glicol |
| g | Gramas | rpm | Rotações por minuto |
| h | Hora | SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| HCL | Ácido Clorídrico | SN | Sobrenadante |
| kb | Kilobase | SSC | NaCl/Citrato Trissódico |
| kDa | Kilodalton | STE | Tris/EDTA/NaCl |
| kg | Kilograma | TAE | Tris/EDTA/Ácido Acético |
| LiCl | Cloreto de Lítio | TCA | Ácido Tricloroacético |
| M | Molaridade | TE | Tris/EDTA |
| mg | Miligrama | TEMED | N, N, N ¹ , N ¹ - tetrametiletilenodiamina |
| min | Minuto | V | Volts |
| ml | Mililitro | Tris | Tris (Hidroximetil) Aminometano |
| mM | Milimolar | v/v | Relação volume/volume |

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|----|
| RESUMO | 01 |
| SUMMARY | 03 |
| INTRODUÇÃO | 04 |
| 1. Endosperma: Origem e Função | 04 |
| 2. Proteínas da Semente | 05 |
| 3. A Prolamina do Milho: Zeína | 06 |
| 4. Estrutura e Localização dos Genes de Zeína | 10 |
| 5. Controle da Transcrição dos Genes de Zeína | 12 |
| 6. Elementos em <i>Cis</i> Envolvidos na Regulação dos Genes de Zeína | 14 |
| 7. Mutantes que Afetam a Síntese de Zeína | 15 |
| 8. Melhoramento da Qualidade Nutricional do Milho | 17 |
| 9. Variação Somaclonal | 19 |
| 10. Os Somaclones | 22 |
| OBJETIVOS | 25 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 1. Material Vegetal | 27 |
| 2. Metodologias Básicas | 27 |
| 3. Obtenção de Farinha da Semente | 28 |
| 4. Extração de Proteínas da Semente | 28 |
| 4.1 Extração de Zeínas para SDS-PAGE | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 Extração de Zeínas para IEF | 29 |
| 5. Análise das Zeínas em Gel | 29 |
| 5.1 Gel de SDS-PAGE | 29 |
| 5.2 Gel de IEF | 30 |
| 5.3 Gel Equivalente de 2-D | 32 |
| 6. Análise de Aminoácidos | 32 |
| 7. Purificação de Fragmentos de DNA | 32 |
| 8. Experimentos de <i>Southern Blot</i> | 33 |
| 8.1 Extração do DNA Genômico de Folhas | 34 |
| 8.2 Digestão do DNA Genômico e Separação em Gel | 35 |
| 8.3 Transferência Neutra | 35 |
| 8.4 Hibridização | 36 |
| 8.5 Marcação e Purificação das Sondas | 38 |
| 8.6 Sondas Utilizadas | 38 |
| 8.7 Análise dos Polimorfismos | 39 |
| 9. Experimentos de <i>Northern Blot</i> | 42 |
| 9.1 Extração do RNA Total da Semente | 42 |
| 9.2 Preparo das Amostras e Corrida do Gel | 43 |
| 9.3 Transferência | 44 |
| 9.4 Hibridização | 44 |
| 9.5 Sondas Utilizadas | 44 |
| RESULTADOS | 45 |
| 1. Análise da Zeína de Cat100-6, S1587-17 e F1 | 45 |
| 2. Análise de Segregação da População F2 | 45 |
| 3. Determinação das Classes de Zeína Alteradas | 48 |
| 4. Análise de Ligação dos Genes de Zeína Alterados | 48 |
| 5. Mapeamento dos Genes de Zeína Alterados | 48 |
| 6. Análise Fenotípica das Espigas dos Somaclones | 52 |
| 7. Caracterização dos Somaclones por SDS-PAGE | 56 |

| | |
|--|-----------|
| 8. Caracterização dos Somaclones por <i>Southern Blot</i> | 61 |
| 9. Análise do Conteúdo de Aminoácidos | 64 |
| 10. Análise do Nível de RNAm das Classes de Zeína de 14,19 e 22 kDa no Endosperma em Desenvolvimento | 67 |
| DISCUSSÃO | 74 |
| CONCLUSÕES | 86 |
| BIBLIOGRAFIA | 88 |

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 A - Fenótipo do Somaclone S1587 | 23 |
| Figura 1 B - Mutantes de Endosperma do Somaclone S1587 | 24 |
| Figura 2 - Sistema de Transferência | 37 |
| Figura 3 - Sondas de RFLP Utilizadas em F1 | 40 |
| Figura 4 - Sondas de RFLP Utilizadas em F2 | 41 |
| Figura 5 - Análise da Zeína de Cat100-6, S1587-17 e F1 em IEF | 46 |
| Figura 6 - Análise de Segregação da População F2 em Géis de IEF | 47 |
| Figura 7 - Determinação das Classes de Zeína Alteradas em Gel 2-D | 49 |
| Figura 8 - Mapas de Ligação dos Genes de Zeína Alterados | 50 |
| Figura 9 - Hibridização do DNA da População F2 com Sondas de Zeína | 51 |
| Figura 10 - Hibridização do DNA da População F2 com Sondas de RFLP | 53 |
| Figura 11 - Mapa dos Genes de Zeína Alterados | 54 |
| Figura 12 - Análise Fenotípica das Espigas | 55 |
| Figura 13 - Análise dos Somaclones em SDS-PAGE | 57 |
| Figura 14 - Quantificação das Zeínas de 10 e 14 kDa | 58 |
| Figura 15 - Quantificação das Zeínas de 19 e 22 kDa | 59 |
| Figura 16 - Quantificação das Zeínas de 16 e 27 kDa | 60 |
| Figura 17 - Southern Blot dos Somaclones com Sonda de Zeína de 14kDa | 62 |
| Figura 18 - Southern Blot dos Somaclones com Sondas de Zeína de 19 e 22 kDa | 63 |
| Figura 19 - Análise da Expressão do Gene de Zeína de 14 kDa | 68 |
| Figura 20 - Nível de Transcritos do Gene de Zeína de 14 kDa | 69 |

| | |
|--|----|
| Figura 21 - Análise da Expressão do Gene de Zeína de 19 kDa | 70 |
| Figura 22 - Nível de Transcritos do Gene de Zeína de 19 kDa | 71 |
| Figura 23 - Análise da Expressão do Gene de Zeína de 22 kDa | 72 |
| Figura 24 - Nível de Transcritos do Gene de Zeína de 22 kDa | 73 |

TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Composição de Aminoácidos da Farinha do Endosperma | 65 |
| Tabela 2 - Composição de Aminoácidos do Extrato de Zeína | 66 |

RESUMO

A linhagem de milho da raça Cateto, Cat100-6, foi utilizada em cultura *in vitro* para a obtenção de plantas regeneradas a partir de *calli* tipo I. Um dos variantes somaclonais obtidos, S1587, foi autofecundado dando origem a diferentes progênes. Com base em características morfológicas da planta e das sementes, uma das progênes, S1587-17, foi selecionada para estudo de alterações nas proteínas de reserva, zeínas. Análise em IEF das zeínas revelou a presença de cinco bandas polimórficas entre a linhagem Cat100-6 e o somaclone S1587-17. A análise posterior destas bandas em gel de 2-D mostrou que os genes de zeína alterados no somaclone pertencem à classe das zeínas de 19 e 22 kDa.

A análise em IEF de extratos de zeína da população F2 [F1 (Cat100-6 x S1587-17)⊗] agrupou os polipeptídeos alterados em dois *clusters*. A população F2 foi hibridizada com sondas de RFLP dos cromossomos 4 e 7 do milho - onde se localizam os principais *clusters* de zeína de 19 e 22 kDa - permitindo o mapeamento de 6 genes de zeína alterados, no braço curto do cromossomo 4.

Outras oito progênes com alterações em sementes, denominadas S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 e S8, foram selecionadas com base na análise fenotípica das espigas. O perfil eletroforético das zeínas das diferentes progênes em SDS-PAGE mostrou um aumento significativo das zeínas de 14, 22 e 27 kDa, em duas das progênes analisadas, S1 e S7, quando comparadas com a linhagem original. A hibridização do DNA dos diversos somaclones com as sondas de zeína de 14 e 22 kDa revelou um perfil de restrição característico para as progênes S1 e S7, diferenciando-as dos demais somaclones. Posterior análise da farinha do endosperma e do extrato de zeína, dos somaclones S1 e S7, revelou um aumento no conteúdo de vários aminoácidos, entre eles metionina, essencial nas dietas humana e animal. Experimentos de *Northern blot* mostraram um aumento significativo nos transcritos correspondentes ao gene de zeína de 14 kDa nas progênes S1 e S7, quando comparadas com a linhagem Cat100-6.

Estes resultados permitem concluir que o aumento na proteína de 14 kDa, rica em metionina, nos somaclones S1 e S7, se deve a um aumento no nível de transcritos do gene de zeína de 14 kDa, podendo levar, a longo prazo, à descoberta de novos mecanismos reguladores da expressão deste gene.

SUMMARY

Somaclonal variation was observed in plants regenerated from type I *calli* established from a maize inbred line Cat100-6. One of the variants, S1587, was self-pollinated, giving rise to different progenies. Considering the plant and seeds morphological alterations, one of the progenies, S1587-17, was selected for further studies of seed storage proteins, zeins.

IEF analysis of Cat100-6 and S1587-17 showed five polymorphic bands. Two-dimensional analysis of these bands indicated alterations in the zein classes of 19 and 22 kDa. Linkage analysis of altered zein polypeptides was performed by IEF of zein proteins extracted from F2 seeds [F1 (Cat100-6 x S1587-17)⊗]. Three altered polypeptides were grouped in one *cluster*, and two other polypeptides in a second *cluster*. After that, the altered genes were mapped by hybridizing the F2 population DNA with chromosome 4 and 7 RFLP probes. Six altered genes were mapped in the short arm of chromosome 4.

Eight other somaclones, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 and S8, were selected based on seeds morphological alterations. The zeins electrophoretic profile in SDS-PAGE showed an enhancement of the 14, 16, 22 and 27 kDa zeins in two of the progenies analyzed, S1 and S7, when compared with the original line, Cat100-6. *Southern blot* analysis using 14 and 22 kDa cDNA as probes differentiated two progenies, S1 and S7, from the others somaclones. Amino acid analysis of Cat100-6, S1587-17, S1 and S7 revealed increased content of methionine, essential at human and animal nutrition, in the last two somaclones.

Northern blot experiments were carried out with the same probes. Based on the levels of hybridization, it appears that the 14 kDa transcript level in the S1 and S7 progenies is 2-fold higher than in Cat100-6 and S1587-17.

These results indicate that the enhancement in methionine-rich 14 kDa zein is due to an enhancement in the mRNA level of 14 kDa gene, in the somaclones S1 and S7. Understanding the regulation of this gene may result in novel approaches to increase nutritional value of maize seed.

INTRODUÇÃO

1. ENDOSPERMA: ORIGEM E FUNÇÃO

A origem do endosperma está ligada à dupla fertilização, o único processo biológico no qual um núcleo espermático se funde com o óvulo para produzir o embrião, enquanto um segundo núcleo espermático se funde com dois núcleos polares, dando origem ao endosperma triploide. Estes eventos ocorrem no saco embrionário, que se encontra envolto por tecidos maternos (Dumas & Mogensen, 1993).

A principal função do endosperma é armazenar nutrientes que serão utilizados posteriormente durante o desenvolvimento do embrião. Na maioria das dicotiledôneas, o endosperma é absorvido durante o desenvolvimento da semente, e substituído por um tecido de reserva derivado do embrião, os cotilédones. Nas monocotiledôneas e em algumas dicotiledôneas, o endosperma continua a se desenvolver durante a maturação da semente (Aukerman & Schmidt, 1994).

O desenvolvimento do endosperma é caracterizado pelo acúmulo de dois componentes principais, amido e proteínas de reserva, ambos depositados em organelas especiais, os amiloplastos e os corpúsculos protéicos, respectivamente. Na semente madura, o amido pode representar mais de 80% do peso seco da semente, enquanto as proteínas de reserva podem corresponder a mais da metade do conteúdo total de proteínas (Nelson, 1980; Shewry & Tathan, 1990).

Outras proteínas também podem ser acumuladas em altos níveis no endosperma. Entre elas, estão inibidores de proteases, inibidores de α -amilases, lectinas, tioninas, proteínas inativadoras de ribossomos (PIR), e certas enzimas como a sucrose sintetase, urease, etc (Lopes & Larkins, 1993).

2. PROTEÍNAS DA SEMENTE

A abundância das proteínas das sementes e sua importância econômica têm facilitado seu estudo por mais de um século.

Osborne (1924) primeiramente descreveu o fracionamento destas proteínas em várias classes, de acordo com sua solubilidade em diferentes solventes. As proteínas solúveis em água foram denominadas albuminas, as solúveis em soluções salinas foram designadas globulinas; as solúveis em soluções alcóolicas, prolaminas; e as solúveis em soluções ácidas ou básicas, glutaminas. Com o aparecimento de novas metodologias de extração (Bright & Shewry, 1983), foi proposta uma nova classificação para as proteínas das sementes, separando-as em proteínas metabólicas, proteínas estruturais e proteínas de reserva (Byers *et al.*, 1983).

As principais proteínas encontradas em leguminosas são as globulinas (80%), enquanto nos cereais predominam as prolaminas (50-60%) e glutelinas (35-45%). As prolaminas são armazenadas em corpúsculos protéicos, enquanto as glutelinas podem se localizar tanto dentro quanto fora destas organelas (Pernollet & Mosse, 1983). Nos cereais, as albuminas e globulinas estão concentradas no embrião e na camada de aleurona da semente (Payne & Rhodes, 1982).

Aparentemente, as proteínas de reserva não possuem nenhuma função enzimática (Larkins, 1983). As proteínas de reserva das sementes constituem fonte de nitrogênio reduzido e enxofre, requeridos pelo embrião e pela plântula durante os processos de germinação e crescimento. Nestes estágios ocorre a hidrólise das proteínas de reserva, com a consequente liberação dos aminoácidos (Spencer, 1984).

As prolaminas são as proteínas de reserva encontradas em maior quantidade no endosperma dos cereais, com exceção do arroz e da aveia (Mifflin & Shewry, 1979). O alto teor de prolina e glutamina observado nas prolaminas foi o responsável por sua denominação, dada por Osborne, em 1908. O nome dado para as prolaminas dos diferentes cereais é baseado no nome da espécie (Larkins *et al.*, 1984). Assim sendo, a prolamina do milho (*Zea mays* L.), é denominada zeína, a de *Coix* (*Coix lacryma-jobi* L.) é denominada coixina, e assim por diante.

3. A PROLAMINA DO MILHO: ZEÍNA

A zeína é uma família de proteínas altamente hidrofóbicas. Dos estudos feitos por Osborne (1897) e Osborne e Mendel (1914), conclui-se que a zeína é solúvel em álcool, ácido acético e fenol, além de detergentes (Tsai, 1983). Entre as soluções alcóolicas, as mais utilizadas são as de etanol 60 a 70% ou isopropanol 55% em água (Esen, 1986). Outros fatores que afetam a extração das zeínas são a quantidade de lipídeos na farinha, a temperatura da extração e interações entre as proteínas (Esen, 1986). O uso de agentes redutores, como o 2-mercaptoetanol (2-Me), torna a solubilização das zeínas mais eficaz por romper as ligações dissulfeto (Tsai, 1983).

As zeínas foram inicialmente classificadas em α -, β - e γ -zeínas, conforme sua solubilidade em 40-95%, 30-80% e 0-80% de isopropanol, respectivamente. No entanto, esta classificação não reflete a relação estrutural entre as proteínas. Assim sendo, o sequenciamento de um gene de zeína, previamente descrito como pertencente a classe das β -zeínas, revelou uma estrutura completamente diferente e resultou na criação de uma quarta classe de zeínas, as δ -zeínas (Kirihiro *et al.*, 1988).

As zeínas podem ser separadas em diferentes classes de acordo com seu tamanho em géis de poliácridamida contendo SDS (SDS-PAGE) (Lee *et al.*, 1976). Os polipeptídeos de zeína mais abundantes têm peso molecular aparente de 19 e 22 kDa, enquanto os outros componentes possuem peso molecular de 27, 16, 14 e 10 kDa. Polipeptídeos de 12 e 58 kDa são detectados em SDS-PAGE, quando as zeínas são extraídas segundo o método descrito por Wallace *et al.* (1990). A proteína de 58 kDa aparenta ser um dímero da zeína de 27 kDa (Lopes & Larkins, 1991). Com o surgimento de técnicas mais avançadas de preparação e separação, como o HPLC (High Precision Liquid Chromatography), grupos adicionais de proteínas menores tem sido identificados (Wilson, 1991).

Quando a zeína total é submetida a análise em géis de isoeletrofocalização (IEF), pelo menos 15 componentes são visualizados (Soave *et al.*, 1975; Righetti *et al.*, 1977), os quais podem diferir quantitativa e

qualitativamente entre as linhagens de milho. Esta extensa heterogeneidade não é considerada um artefato de técnica, visto que os vários polipeptídeos diferem em sua estrutura primária (Bietz *et al.*, 1979; Vitale *et al.*, 1980), e que os produtos sintetizados *in vitro* a partir de RNA mensageiro (RNAm) de zeína exibem a mesma heterogeneidade das zeínas nativas (Viotti *et al.*, 1978). As zeínas de 19 e 22 kDa são responsáveis por grande parte da heterogeneidade observada quando a zeína total é submetida a IEF (Heidecker & Messing, 1986). As demais classes de zeína produzem padrões de uma única banda em IEF (Lee *et al.*, 1976; Righetti *et al.*, 1977).

Bandas individuais de IEF correspondem a produtos de genes estruturais distintos (Soave *et al.*, 1978). Com base nesta característica, a técnica de IEF tem sido utilizada no mapeamento cromossômico dos genes de zeína (Soave & Salamini, 1984; Wilson, 1989). Devido a natureza triplóide do endosperma, a presença de uma banda pode representar uma, duas, ou três doses do gene. Variações no aparecimento e intensidade destas bandas permitem analisar a segregação de genes responsáveis pelo acúmulo de zeína (Benner *et al.*, 1989), e determinar a ligação entre estes genes (Wilson *et al.*, 1989).

As α -zeínas, constituídas pelas proteínas com pesos moleculares aparentes de 19 e 22 kDa, correspondem a aproximadamente 70% do total das prolaminas do endosperma do milho. As zeínas de 19 e 22 kDa possuem uma composição de aminoácidos similar, sendo que os mais abundantes são a glutamina (20%), leucina (20%), alanina (14%) e prolina (9%) (Larkins *et al.*, 1984).

A estrutura primária destas proteínas foi primeiramente determinada por Geraghty *et al.* (1981), com base no sequenciamento de um clone de cDNA da zeína de 22 kDa. Entre as características observadas na sequência de aminoácidos das α -zeínas, está o aparecimento de repetições de dipeptídeos, sendo que o dipeptídeo Ala-Ala aparece 7 vezes; o dipeptídeo Leu-Leu 8 vezes; e o dipeptídeo Gln-Gln, 14 vezes. Outra característica importante é a presença de uma sequência de 20 aminoácidos que se repete diversas vezes na região carboxi-terminal da proteína (Geraghty *et al.*, 1981; Marks & Larkins, 1982). Uma

análise mais detalhada desta região revelou que os polipeptídeos de 19 kDa contém nove destas repetições, enquanto os polipeptídeos de 22 kDa possuem dez, explicando a diferença de tamanho entre os dois grupos de α -zeínas (Messing, 1987).

Uma análise das características físicas (potencial de hidratação, polaridade e propensão à formação de *loops* e hélices) dos aminoácidos compreendendo os nove segmentos repetidos das α -zeínas, mostrou que estes correspondem a α -hélices, ladeadas por regiões de *loop*, ricas em glutamina. Resíduos polares e hidrofóbicos, distribuídos ao longo das hélices, permitem a formação de pontes de hidrogênio inter e intra moleculares e de interações de van der Waals entre as hélices vizinhas, de modo que as moléculas de zeína podem se agregar em planos moleculares em forma de cilindro, explicando os densos depósitos envoltos por membrana formados pelas proteínas nas sementes de milho (Argos *et al.*, 1982).

Um novo modelo, considerando a existência de dez sequências repetidas ao invés das nove anteriormente descritas, foi proposto por Garrat *et al.* em 1993, baseado na análise da sequência de aminoácidos de seis clones de α -prolaminas. Neste modelo, as α -hélices formam um arranjo hexagonal, consistente com o empacotamento das proteínas e com a oligomerização verificada nos corpúsculos protéicos.

As β e δ zeínas correspondem às proteínas de 14 e 10 kDa e, juntas, constituem 10% da zeína total. As classes de zeína de 14 e 10 kDa são caracterizadas pelo alto conteúdo de aminoácidos contendo enxofre, principalmente metionina e cisteína (Gianazza *et al.*, 1977).

Pedersen *et al.* (1986) determinaram a sequência de aminoácidos da zeína de 14 kDa através do sequenciamento do clone genômico gZ15A. Verificou-se que a proteína contém 160 aminoácidos, sendo que 18 resíduos são de metionina e 7 de cisteína. Na zeína de 14 kDa, o conteúdo de metionina corresponde a 11% do total de aminoácidos. Nenhuma sequência repetitiva de peptídeos foi identificada na zeína de 14 kDa, não tendo sido também encontrada

homologia de sequência entre as zeínas de 19 e 22 kDa e a zeína de 14 kDa (Pedersen *et al.*, 1986).

A zeína de 10 kDa tem uma composição de aminoácidos semelhante à da zeína de 14 kDa (Gianazza *et al.*, 1977). A determinação da sequência de nucleotídeos foi feita por Kiriwara *et al.* (1988), constatando-se que a zeína de 10 kDa é composta por 129 aminoácidos, que não contém sequências repetidas, porém possuem na região central entre 17 e 29 resíduos de metionina, em sua maioria pares Met-Met, separados por dois ou três outros resíduos. O conteúdo de metionina na δ -zeína de 10 kDa corresponde a 22,5% do total de aminoácidos desta proteína (Kiriwara *et al.*, 1988).

A classe das γ -zeínas contribui com 20% do conteúdo total de zeínas (Esen, 1986), sendo composta pelos polipeptídeos de 16 e 27 kDa (Prat *et al.*, 1987). O grupo das γ -zeínas é rico em enxofre e solúvel em soluções aquosas e solventes alcóolicos, na presença de um agente redutor. A zeína de 16 kDa tem propriedades de solubilidade semelhantes às da β -zeína (Esen, 1986). Uma das características da zeína de 27 kDa é o seu alto teor de prolina (25%) (Shotwell & Larkins, 1989). Análises de sequência do cDNA (Prat *et al.*, 1985) e do DNA genômico (Boronat *et al.*, 1986) das γ -zeínas, revelaram que estas proteínas contêm três domínios estruturais característicos: (1) uma região amino-terminal rica em prolina e repetida em *tandem* após o peptídeo sinal, (2) um domínio de ligação prolina-aaX e (3) uma região carboxi-terminal hidrofóbica rica em cisteína.

A síntese das zeínas ocorre durante o desenvolvimento da semente, e se inicia ao redor de 12 dias após a polinização (DAP), terminando com a maturidade da semente, aproximadamente aos 50 DAP (Jones *et al.*, 1977). O acúmulo do RNAm durante o desenvolvimento da semente segue a mesma escala temporal das proteínas (Bianchi & Viotti, 1988).

As zeínas são sintetizadas por polirribossomos presentes na membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) e se agregam formando os corpúsculos protéicos, órgãos vesiculares de estocagem do endosperma, com diâmetro de 1-2 μ m (Burr & Burr, 1976; Larkins & Hurkman, 1978). Todas as classes de zeína são

precedidas por um peptídeo sinal, responsável pelo direcionamento das mesmas para o lúmen do RER (Burr & Burr, 1978; Ludevid *et al.*, 1984), local onde as proteínas assumem sua conformação dobrada e onde se formam as pontes dissulfeto (Shewry & Tathan, 1995). A concentração de zeínas parece diminuir em direção ao centro da semente, visto que no centro os corpúsculos protéicos tornam-se menores e menos frequentes (Burr & Burr, 1979).

O acúmulo das proteínas de reserva em corpos celulares é uma adaptação que, provavelmente, previne sua exposição à ação de enzimas envolvidas no metabolismo. Outras vantagens seriam o empacotamento facilitado, fornecido por um ambiente de proteínas com propriedades bioquímicas semelhantes e com capacidades interativas, e o fato das proteínas serem depositadas em uma condição relativamente não-hidratada, o que facilitaria a dessecação da semente (Lopes & Larkins, 1993).

4. ESTRUTURA E LOCALIZAÇÃO DOS GENES DE ZEÍNA

A heterogeneidade de carga das α -zeínas sugere que múltiplos genes codificam para estas proteínas (Marks & Larkins, 1982). Foram identificados de 75 a 100 genes, que se encontram organizados em famílias multigênicas (Hagen & Rubenstein, 1981), sendo que aproximadamente 50 genes pertencem à classe de zeína de 19 kDa, e ao redor de 25 genes correspondem à classe de zeína de 22 kDa (Wilson & Larkins, 1984). Esta descoberta foi obtida por análise de *Southern* do DNA total de milho, hibridizado com sondas de cDNA das classes de zeína de 19 e 22 kDa (Wienand & Feix, 1980; Hagen & Rubenstein, 1981). Existem várias possibilidades de arranjos no genoma para membros de uma família multigênica. Eles podem estar dispersos por todo o genoma ou organizados em *clusters*, tanto em um arranjo único em *tandem*, como em arranjos em *tandem* localizados relativamente distantes um do outro, no mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes (Li *et al.*, 1985).

Os *clusters* de α -zeína foram mapeados geneticamente nos cromossomos 4 e 7, com um único gene encontrado no cromossomo 10 (Soave & Salamini,

1984). O significado biológico do arranjo em *clusters* dos genes de zeína ainda não está completamente claro. Tem sido proposto que estes arranjos facilitam eventos de conversão e amplificação gênica, resultando nos altos níveis de expressão dos genes de zeína no endosperma (Messing, 1987).

A discrepância entre o número de genes de α -zeína e o número de polipeptídeos de zeína (10-15) observados em uma determinada linhagem, sugere que a maioria destes genes são pseudogenes. De fato, vários genes de α -zeína isolados contém códons de terminação na sua sequência codificadora, podendo corresponder a pseudogenes (Liu & Rubenstein, 1992; Thompson *et al.*, 1992).

Embora os polipeptídeos de zeína de 19 e 22 kDa possuam uma estrutura semelhante, as duas classes diferem significativamente ao nível de nucleotídeos. Em estudo realizado por Marks *et al.* (1985), a comparação da sequência de três cDNAs codificando para genes de zeína de 22 kDa, mostrou somente 60 a 65% de identidade com cinco cDNAs codificando para genes de zeína de 19 kDa. A classe das α -zeínas não é estreitamente relacionada às outras classes de zeína, apresentando menos de 40% de identidade com as β -, δ - e γ -zeínas (Marks *et al.*, 1985; Pedersen *et al.*, 1986; Shewry & Tatham, 1990).

Tem sido proposto que os genes de zeína de 22 kDa se originaram dos genes de zeína de 19 kDa por duplicação e divergência (Marks *et al.*, 1985). No entanto, evidências obtidas de uma espécie de gramínea relacionada, *Coix lacryma-jobi* L., parecem indicar o oposto. Leite *et al.* (1990), realizaram hibridizações com sonda de um gene de zeína de 22 kDa e identificaram genes de coixina homólogos aos genes desta classe de zeína. Porém, quando um gene de zeína de 19 kDa foi utilizado como sonda, não foram encontrados genes homólogos em *Coix*. Com base nestes resultados, os autores sugerem que um ancestral do gene de 22 kDa sofreu uma duplicação, dando origem ao gene de 19 kDa, e que este evento ocorreu após a divergência entre milho e *Coix* (Leite *et al.*, 1990).

No caso dos genes codificando para as classes de zeína de 10, 14, 16 e 27 kDa, somente um ou poucos genes foram detectados no genoma. Foram

encontradas entre uma e três cópias do gene de zeína de 14 kDa, no cromossomo 7 do milho (Wilson & Larkins, 1984). A zeína de 10 kDa é codificada por um único gene, *dzs10*, localizado no braço longo do cromossomo 9 (Benner *et al.*, 1989). O gene de zeína de 27 kDa ocorre em uma única cópia, ou como uma duplicação em *tandem* de 12 Kb, dependendo da variedade de milho estudada (Das & Messing, 1987), e somente um único gene de zeína de 16 kDa foi identificado (Das *et al.*, 1991).

Comparações entre o cDNA e clones genômicos das diversas classes de zeína indicaram que estes genes, ao contrário da maioria dos genes de eucariotos, não contém introns. Até o momento, não foram identificados genes de zeína que contenham introns (Hagen & Rubenstein, 1981; Hu *et al.*, 1982; Pederson *et al.*, 1982; 1986; Spina *et al.*, 1983; Kridl *et al.*, 1984; Kiriara *et al.*, 1988; Heidecker *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1992)

5. CONTROLE DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES DE ZEÍNA

Os mecanismos que regulam a expressão dos genes de proteína de reserva estão começando a ser descobertos. Uma das mais importantes observações é que as proteínas de reserva são principalmente reguladas ao nível de transcrição (Higgins, 1984; Kodrzycki, 1989). Portanto, o foco da pesquisa atual é direcionado para a descoberta de sequências reguladoras em *cis* no DNA, e de fatores protéicos em *trans*, que controlem a transcrição destas proteínas no endosperma em desenvolvimento (Motto *et al.*, 1989; Schmidt, 1993; Ueda & Messing, 1993). Mecanismos pós-transcripcionais também parecem estar operando, mas poucos trabalhos têm sido realizados nesta área. No entanto, um *locus* regulatório, *dzr1*, que regula o acúmulo da zeína de 10 kDa por um mecanismo pós-transcripcional, foi identificado e mapeado no braço curto do cromossomo 4 (Benner *et al.*, 1989; Chaudhuri & Messing, 1995). Este locus é o responsável por um aumento nos níveis de proteína e RNAm da zeína de 10 kDa, na linhagem de milho BSSS-53 (Cruz-Alvarez *et al.*, 1991; Schickler *et al.*, 1993).

Embora a transcrição dos vários genes de zeína seja coordenadamente regulada nos diversos estágios do desenvolvimento do endosperma, o nível de expressão desses genes varia entre as famílias gênicas. Algumas famílias possuem um conteúdo de RNAm estável maior que o de outras famílias mas, em geral, existe uma boa correlação entre o nível de RNAm e o número aparente de genes em cada família (Marks *et al.*, 1984). Uma exceção parece ser o gene codificando para o polipeptídeo de 14 kDa. Experimentos de *Dot blot*, realizados com a linhagem padrão W64, mostraram que o nível de transcritos produzido por este gene é três vezes maior do que o produzido pelas famílias multigênicas de 19 e 22 kDa, sugerindo que o mesmo é transcrito numa taxa maior no endosperma em desenvolvimento, ou que seus RNAs mensageiros são mais estáveis (Marks *et al.*, 1986).

Estudos transcripcionais *in vitro* e *in vivo*, realizados em sistemas heterólogos, têm se mostrado de alcance limitado na análise de regulação das zeínas, devido a diferenças de composição e especificidade dos complexos regulatórios dos hospedeiros heterólogos (Feix & Quayle, 1993). Já o estudo da expressão de genes de zeína em sistemas homólogos fornece resultados mais significativos. A atividade dos promotores de zeína foi detectada em experimentos de transformação transiente de protoplastos (Schwall & Feix, 1988), e em células de endosperma em cultura (Quayle *et al.*, 1991; Ueda & Messing, 1991). A regulação aparenta ser tecido-específica, visto que o mesmo promotor de zeína não é ativo quando transformado em uma linhagem de células não derivadas do endosperma (Schwall & Feix, 1988; Quayle *et al.*, 1991).

Células de endosperma em cultura, assim como a técnica de transformação por bombardeamento de partículas (Klein *et al.*, 1987), têm se mostrado úteis na descoberta de novos elementos reguladores em *cis* nos promotores dos genes de zeína. Embora a maioria dos estudos feitos tenha utilizado promotores dos genes de 19 kDa (Schwall & Feix, 1988; Quayle *et al.*, 1991; Ueda & Messing, 1991), estudos mais recentes têm focalizado os promotores dos genes de zeína de 22 kDa (Schmidt *et al.*, 1992; Ueda *et al.*, 1992). Os genes de zeína de 22 kDa são regulados diferentemente dos genes de zeína de 19 kDa.

6. ELEMENTOS EM C/S ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DOS GENES DE ZEÍNA

Os genes de zeína de 19 e 22 kDa possuem um arranjo complexo na região promotora, consistindo de dois promotores, um denominado promotor 2 (P2), posicionado imediatamente antes dos genes, e outro localizado 900 a 1000 pb acima, denominado promotor 1 (P1). Cada promotor possui dois sítios de início de transcrição e sequências TATA e CAAT (Benoist *et al.*, 1980). Experimentos *in vitro* utilizando oócitos de *Xenopus* mostraram a produção de transcritos iniciados em ambos os promotores, embora uma preferência pelo P2 tenha sido evidenciada (Langridge & Feix, 1983). Entretanto, utilizando-se extratos de células *HeLa*, somente transcritos correspondentes ao início da transcrição em P1 foram produzidos, enquanto em algas *Acetabularia*, o promotor 2 se mostrou inativo (Brown *et al.*, 1986). A presença de dois promotores pode estar relacionada com os altos níveis de expressão dos genes de zeína no endosperma.

Além de uma estrutura de promotor característica, as regiões 5' e 3' dos genes de zeína possuem sequências consenso, típicas dos genes de eucariotos, incluindo os boxes TATA e CAAT, na região flanqueadora 5', e o sinal de poliadenilação AATAAA, na região 3' (Pedersen *et al.*, 1982; Kridl *et al.*, 1984; Liu & Rubenstein, 1992).

A região de maior similaridade encontrada entre os genes de zeína de 19 e 22 kDa, é a sequência conservada, ACATGTGTAAAGGT. Este motivo de 14 pb está posicionado entre -300 e -350, relativo ao códon de iniciação ATG nestes promotores, sendo denominado elemento -300 ou *prolamin box*, e possui alta homologia com uma sequência *enhancer* do vírus SV40 (Zenke *et al.*, 1986). Uma porção desta sequência, TGTAAG, contendo 7 pb, é também encontrada nos promotores dos genes de β - e γ -zeína, assim como nos promotores dos genes de

prolaminas isolados de outros cereais, incluindo trigo, cevada, sorgo e *Coix* (Forde *et al.*, 1985; De Rose *et al.*, 1989; Ottoboni *et al.*, 1993).

A presença de sequências conservadas em diferentes espécies sugere que estas possuem um papel regulatório (Liu & Rubenstein, 1992). Foi proposto que estas sequências atuam na expressão tecido-específica dos genes de zeína. Esta hipótese foi sustentada pela ligação de alguns fatores protéicos, presentes no endosperma, à região do *prolamin box* de um gene de zeína de 19 kDa (Maier *et al.*, 1988).

7. MUTANTES QUE AFETAM A SÍNTESE DE ZEÍNA

Outra abordagem, utilizada na análise da regulação da transcrição dos genes de zeína, é a descoberta de elementos reguladores em *trans*, através do estudo de mutantes que afetam a síntese de zeína. Todos estes mutantes tem um fenótipo similar, com um endosperma opaco, macio e esbranquiçado (Mertz *et al.*, 1964; Nelson *et al.*, 1965). O fenótipo opaco destes mutantes é correlacionado com uma diminuição do acúmulo de zeína no endosperma, quando comparado com o tipo selvagem (Lee *et al.*, 1976).

A mutação recessiva *o2* foi identificada por Singleton e Jones na década de 30 (Emerson *et al.*, 1935), mas seu efeito no acúmulo de proteínas da semente foi determinado por Mertz *et al.* em 1964. Ficou demonstrado que a mutação era responsável por um melhor balanço do conteúdo de aminoácidos na semente devido, principalmente, a um aumento no teor de lisina. Isto se deve a uma redução da porcentagem de zeína no endosperma, e aumento de outras frações protéicas, geralmente denominadas não zeínas, que são ricas em lisina e triptofano (Shotwell & Larkins, 1989). Apesar do aumento de aproximadamente 50% no conteúdo de lisina, outros efeitos fenotípicos estão associados a esta mutação, como baixa produtividade, endosperma quebradiço e maior susceptibilidade ao ataque de microorganismos e insetos (Ortega & Bates, 1983), o que veio a dificultar a utilização do mutante *o2* em escala comercial.

Os clones *o2* isolados (Schmidt *et al.*, 1987; Motto *et al.*, 1988) contém cinco introns e seis exons (Maddaloni *et al.*, 1989), e estão localizados no braço curto do cromossomo 7, próximos aos genes que codificam para a zeína de 19 kDa (Soave & Salamini, 1984). O gene *o2* codifica para uma proteína do tipo zíper de leucina (*b-Zip*), característica de protooncogenes de mamíferos (*Jun* e *Fos*) e de fatores de transcrição em fungos (*GCN4*) (Pabo & Sauer, 1992). Esta proteína interage com sequências específicas do promotor dos genes de α -zeína de 22 kDa ativando sua transcrição (Schmidt *et al.*, 1992). O decréscimo no conteúdo da zeína de 22 kDa no mutante *o2*, se dá em função de um decréscimo na taxa de transcrição, resultando em ausência total ou parcial dos RNAm específicos desta classe de zeína (Kodrzycki *et al.*, 1989).

Mutações nos *loci opaco 2 (o2)* e endosperma defectivo B-30 (*DeB-30*), causam uma redução preferencial da classe de zeína de 22 kDa (Lee *et al.*, 1976; Jones *et al.*, 1977; Salamini *et al.*, 1979). No entanto, estudos recentes demonstraram que o *locus o2* afeta, em uma menor extensão, a classe de zeína de 14 kDa (Cord Neto *et al.*, 1995). A quantidade de proteína das classes de 16 e 27 kDa também é afetada pela mutação *o2*, dependendo do *background* genético da linhagem (Geetha *et al.*, 1991).

O *locus* regulatório *opaco 7 (o7)*, localizado no braço longo do cromossomo 10 (Soave & Salamini 1984), causa uma diminuição na classe de zeína de 19 kDa (Di Fonzo *et al.*, 1980), enquanto os mutantes *floury 2 (fl2)*, *opaco 6 (o6)* e *Mucronato (Mc)* afetam igualmente as classes de zeína de 19 e 22 kDa (Jones, 1978; Salamini *et al.*, 1983; Motto *et al.*, 1989).

Existem duas outras proteínas cujo padrão de acúmulo é alterado por estes mutantes. Uma proteína de 32 kDa, denominada *b-32*, é encontrada em abundância no citoplasma solúvel do endosperma, e sua expressão é dramaticamente reduzida nos mutantes *o2* e *o6* em comparação com o tipo selvagem (Soave *et al.*, 1981). Já a proteína de 70 kDa, denominada *b-70*, tem sua expressão aumentada nos mutantes *fl2*, *Mc* e *De-B30* (Marocco *et al.*, 1991).

8. MELHORAMENTO DA QUALIDADE NUTRICIONAL DO MILHO

A cada ano, a colheita mundial de cereais atinge 1,7 bilhões de toneladas de grãos (Keris *et al.* 1985). O consumo direto de sementes de cereais e legumes corresponde a aproximadamente 70% dos requerimentos alimentares mundiais (FAO, 1970). No entanto, a maioria das sementes não constitui um recurso balanceado de proteínas, devido a deficiência em um ou mais aminoácidos essenciais nas proteínas de reserva. Para manter uma dieta balanceada, o homem requer oito aminoácidos dos alimentos (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina), por não ser capaz de sintetizá-los no organismo (Deutscher, 1978).

O milho é um dos cereais mais importantes no que diz respeito a alimentação mundial, respondendo sozinho por 25% do consumo direto e indireto de alimentos pelo homem (FAO, 1988). No Brasil, a produção deste cereal corresponde a mais de 30% da produção total de grãos (Pinazza, 1993). No entanto, o milho é deficiente nos aminoácidos lisina, triptofano e metionina, essenciais na alimentação do homem e outros animais monogástricos (Nelson, 1979).

Tem sido difícil produzir melhoramentos significativos no conteúdo de aminoácidos das plantas produtoras de sementes, devido à complexidade genética das plantas e ao fato de que um aumento no conteúdo de determinado aminoácido pode acarretar uma perda em outros caracteres agrônômicos importantes (Lopes & Larkins, 1993).

A descoberta e caracterização do mutante *opaco 2* trouxe certa expectativa aos melhoristas de milho, mas suas características agrônômicas indesejáveis dificultaram sua utilização comercial. Logo após a caracterização inicial do milho *o2*, foram identificados genes que melhoravam o fenótipo do mutante, dando a este uma aparência normal (Paez *et al.*, 1969). Estes genes são denominados modificadores *opaco 2*. A habilidade destes genes em converter o endosperma *opaco* e quebradiço destes mutantes em um fenótipo normal, forneceu a base para o desenvolvimento de mutantes *opaco 2*

modificados, que possuem uma concentração normal de proteínas e um endosperma vítreo, assim como um conteúdo de lisina duas vezes maior que nos genótipos normais (Ortega & Bates, 1983).

Através de um longo processo de retrocruzamentos e seleção recorrente, melhoristas do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo, CIMMYT, combinaram a mutação *o2* com modificadores genéticos, para gerar variedades similares ao milho normal que mantivessem o alto conteúdo de proteínas. Estes genótipos são denominados " Quality Protein Maize" ou QPM (Vasal *et al.*, 1980; Vasal, 1984).

Phillips *et al.* (1981), reportaram a descoberta de uma linhagem de milho, BSSS-53, com um conteúdo 30% maior de metionina, comparando-se com outras linhagens testadas. Análises de *Northern blot*, mostraram um aumento do nível de RNAm da zeína de 10 kDa, nas sementes em desenvolvimento da linhagem BSSS-53, fornecendo a base molecular para um aumento da produção desta proteína (Kiriwara *et al.*, 1988). Análises de *Southern blot* indicaram que existem somente um ou dois genes de zeína de 10 kDa no genoma da linhagem de milho BSSS-53 (Kiriwara *et al.*, 1988).

Tem-se tentado melhorar a qualidade nutricional de plantas produtoras de sementes por transferência heteróloga de genes de proteínas de reserva de outras plantas. Ohtani *et al.* (1991) reportaram a utilização de um gene quimérico contendo sequências codificadoras dos genes de α -zeína. Estas sequências foram modificadas por mutagênese sítio específica, resultando em um maior conteúdo de lisina, sendo a seguir clonadas sob ação do promotor de β -faseolina para transformação de sementes de tabaco. No entanto, somente pequenas quantidades de proteína foram acumuladas na semente. Análises do RNAm nos polissomos das sementes em desenvolvimento, sugeriram que os RNAs foram traduzidos eficientemente, mas que as novas zeínas sintetizadas eram instáveis.

Um trabalho mais recente, realizado por Bagga *et al.* (1995), mostrou progressos significativos na introdução de genes de zeína em plantas de tabaco. A sequência codificadora da zeína de 14 kDa, sob o controle do promotor

constitutivo 35S, foi utilizada na transformação de folha, semente, raiz e caule de tabaco. Os resultados obtidos demonstraram que o gene de zeína de 14 kDa é transcrito eficientemente nas sementes e nos tecidos vegetativos, e que o nível destes transcritos na planta transgênica é maior do que nas sementes de cereais.

A construção de genes sintéticos é outra alternativa para o melhoramento da qualidade nutricional dos cereais. Yang *et al.* (1989) utilizaram um fragmento de gene sintético, contendo 292 pares de base, e codificando para uma proteína composta de aproximadamente 80% de aminoácidos essenciais, na transformação de plantas de batata, por *Agrobacterium rhizogenes*. No entanto, os níveis de expressão da proteína detectados foram bastante baixos (0,02 - 0,35% do total de proteínas da planta).

Levando-se em conta os problemas encontrados na construção de genes sintéticos, e na expressão dos mesmos em sistemas heterólogos, a descoberta de novos mutantes, com níveis de aminoácidos essenciais mais elevados e sem características agrônômicas indesejáveis, é de grande importância no melhoramento. Uma alternativa para o melhoramento nutricional é o uso de procedimentos capazes de gerar variabilidade genética, como a variação somaclonal.

9. VARIAÇÃO SOMACLONAL

A cultura de tecidos é capaz de gerar variabilidade genética de maneira rápida e sem tecnologia sofisticada, através da obtenção de plantas regeneradas. Este fenômeno, conhecido como variação somaclonal, tem importância significativa no melhoramento de plantas e foi observado em milho (Edallo *et al.*, 1981), arroz (Shaeffer, 1982), aveia (McCoy *et al.*, 1982), cevada (Orton, 1980) e trigo (Larkin *et al.*, 1984), entre outros. O termo variação somaclonal foi criado por Larkin e Scowcroft, em 1981, para designar a variação genética herdada pela progênie dos primeiros regenerantes.

Chaleff (1981) propôs o símbolo R para o regenerante, com R1 representando a progênie de sementes da primeira planta regenerada e R2, R3, etc, para as sucessivas gerações de sementes resultantes de autocruzamento. Cruzamentos de plantas regeneradas com o pai homocigoto foram designados R x P e a progênie de tal cruzamento é denominada F1.

Linhagens selecionadas em cultura de tecidos são chamadas variantes até que a causa da mudança fenotípica seja esclarecida. O termo mutante é usado somente quando evidências genéticas ou moleculares de mutação são confirmadas (Meins, 1983).

Tem-se questionado se a variação somaclonal é resultado de diferenças pré-existentes nas células somáticas (Skirvin & Janick, 1976), ou se é induzida por componentes do meio de cultura (Lorz & Scowcroft, 1983). Müller *et al.* (1990), verificaram um maior grau de instabilidade genética em plantas de arroz mantidas por um período mais longo em cultura (67 dias), quando comparadas com plantas mantidas por 28 dias em cultura.

Mutações são a principal causa de mudanças fenotípicas, tendo sido confirmadas após a regeneração das plantas, pela transmissão sexual do gene alterado e pelo modo de herança (Maliga, 1980). Mudanças epigenéticas podem ser induzidas pelas condições de cultura e não são úteis em melhoramento, por não serem expressas nas progênies de plantas regeneradas (Evans & Sharp, 1986).

A variação somaclonal causa modificações genéticas que vão desde simples mudanças em um único par de bases até alterações genéticas mais complexas, como variação no número e estrutura dos cromossomos (McCoy *et al.*, 1982), mixoploidia de células somáticas diferenciadas (Vasil *et al.*, 1983) e ativação de elementos de transposição (Planckaert & Walbot, 1989). A variação somaclonal pode ocorrer também devido a uma amplificação ou deleção do número de cópias de um gene, translocação de um gene e modificação dos padrões de metilação (Brown, 1989).

A ausência de um método simples, rápido e direto para medir a extensão da variação somaclonal, constitui um grande obstáculo em seu estudo (Orton,

1983). Ao nível fenotípico, a extensão da variação somaclonal é geralmente dada pela determinação da porcentagem de plantas aberrantes. A variação somaclonal pode também ser determinada ao nível molecular e citológico. A maioria destas determinações é trabalhosa e, por ser em geral qualitativa, é também necessário determinar o número de plantas alteradas e, conseqüentemente, analisar um grande número delas (De Klerk, 1990).

Alguns caracteres de importância agrônômica frequentemente demonstram variação somaclonal herdável. Entre estes estão altura, maturidade, cor da semente, variação em enzimas e variação nas proteínas de reserva (Cooper *et al.*, 1986).

As gliadinas, proteínas de reserva de trigo, são codificadas por famílias multigênicas. Variações herdáveis no padrão eletroforético das gliadinas, em somaclones derivados da linhagem Yaqui 50E, foram verificadas por Larkin *et al.* (1984). Uma média de 3 mudanças por indivíduo da progênie R2 foi observada. Estas mudanças na expressão de proteínas desta família multigênica foram independentemente confirmadas em diferentes genótipos por Cooper *et al.* (1986). Em ambos os casos houve bandas de proteínas deletadas e bandas de proteínas em novas posições. Pôde-se postular que rearranjos induzidos por cultura podem alterar a regulação da expressão, sendo que um gene da família multigênica, que era previamente expresso, se encontra reprimido e um gene inicialmente silencioso seja, então, expresso.

Com o desenvolvimento da análise genética molecular de genes de eucariotos, tornou-se evidente que um grande número de produtos gênicos são codificados por famílias multigênicas. Mesmo fenótipos para os quais dados genéticos e de produtos gênicos eram sugestivos de codificação por um único gene, provaram ser relacionados a pequenas famílias multigênicas (Scarpulla *et al.*, 1982). Também se verificou que a multiplicidade dos genes excede a multiplicidade dos produtos gênicos expressos. Este é o caso da complexa família de genes codificando para as proteínas de reserva de milho, zeínas (Burr *et al.*, 1982).

A capacidade de gerar variantes somaclonais é, portanto, uma ferramenta valiosa na análise destas famílias gênicas que codificam para genes de importância agrônômica (zeínas, gliadinas, glutelinas, α -amilases).

10. OS SOMACLONES

A linhagem de milho Cat-100-6, obtida a partir de vários ciclos de autofecundação de plantas da raça Cateto, foi utilizada em cultura *in vitro* para a obtenção de plantas regeneradas a partir de *calli* do tipo I (Prioli, 1987). As plantas regeneradas foram plantadas no campo experimental do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP. Uma análise fenotípica destas plantas permitiu observar diversas características que as diferenciavam da linhagem original. Entre os diversos regenerantes obtidos, um deles, denominado S1587, se destacou por sua elevada estatura e vigor (Fig. 1 A). A análise posterior de progênes derivadas do somaclone S1587 por autofecundação, revelou a presença de mutantes de endosperma (Fig. 1 B) (Targon *et al.*, 1991).

Uma das progênes resultantes de autofecundação do somaclone S1587, denominada S1587-17, foi selecionada para estudos de tolerância ao alumínio por possuir um alto nível de sensibilidade ao alumínio tóxico (Moon *et al.*, submetido a publicação). No caso específico da análise das zeínas, a seleção desta planta se deu baseada principalmente na existência de mutantes de endosperma que já haviam sido caracterizados, fornecendo indícios de alterações nas proteínas de reserva.

Além do somaclone S1587-17, outras oito progênes foram selecionadas para um estudo comparativo das alterações nas proteínas de reserva, com base na caracterização fenotípica das espigas. Este material se constitui, portanto, de grande importância na análise de proteínas de reserva e na caracterização de progênes com uma melhor qualidade nutricional.



Figura 1 A - Fenótipo do Somaclone S1587

Vista panorâmica do campo experimental do Departamento de Genética e Evolução - UNICAMP. Em destaque é possível observar o alto vigor do variante somaclonal S1587 e, ao lado, outros regenerantes obtidos por cultura de tecidos.



Figura 1 B - Mutante de Endosperma do Somaclone S1587

Exemplo de mutante de endosperma observado em progênies do variante somaclonal S1587.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo inicial, caracterizar alterações ocorridas nos genes de zeína, no variante somaclonal de milho, S1587-17, comparando-o com a linhagem original Cat100-6, e mapear os possíveis genes de α -zeína alterados no somaclone.

Em uma segunda etapa, a seleção de outros oito somaclones com base em alterações fenotípicas das sementes, objetivou a caracterização de novos materiais vegetais que demonstrassem alterações nas demais classes de zeína, com enfoque em melhoramento da qualidade nutricional.

Para alcançar tais objetivos, foram realizadas as seguintes etapas:

1. Utilização de IEF para a detecção de polipeptídeos alterados e para análise de segregação destes na população F2.
2. Análise dos polipeptídeos alterados em gel de 2-D para verificação das classes de zeína afetadas.
3. Análise de ligação dos polipeptídeos alterados que segregaram na população F2, através da utilização do programa Mapmaker.
4. Mapeamento dos genes de zeína alterados, através de hibridizações com sondas de RFLP próximas aos *clusters* de α -zeínas dos cromossomos 4 e 7.
5. Seleção de novos somaclones a partir de análise fenotípica das espigas.
6. Análise do perfil eletroforético das zeínas dos diferentes materiais em SDS-PAGE.

7. Análise do perfil de restrição das classes de zeína de 14, 19 e 22 kDa da linhagem original e dos somaclones por *Southern blot*.

8. Análise do conteúdo de aminoácidos das progênies que mostraram alterações significativas na classe de zeína de 14 kDa e 22 kDa.

9. Verificação do padrão de expressão dos genes de zeínas de 14, 19 e 22 kDa nos diferentes estágios do desenvolvimento da semente, através de experimentos de *Northern blot*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

Plantas da linhagem de milho “flint”, Cat100-6, derivada de uma população da raça Cateto, foram obtidas à partir do Banco de Germoplasma de Milho do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas. Além da linhagem original, foram selecionadas plantas obtidas por variação somaclonal através da passagem em cultura de tecidos da linhagem Cat100-6 (Prioli, 1987), denominadas S1587-17, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 e S8. Foram utilizadas plantas na sétima geração de autofecundação (R7).

Plantas F1, derivadas do cruzamento entre a linhagem original Cat100-6 e a progênie S1587-17, foram autofecundadas para obtenção de uma população segregante F2.

2. METODOLOGIAS BÁSICAS

As metodologias básicas de rotina laboratorial, abaixo relacionadas, foram realizadas segundo Sambrook *et al.*, 1989.

- Preparo de soluções e meios de cultura bacteriana
- Preparo de células competentes
- Transformação de *E. Coli*-DH5 α
- Mini-preparação de plasmídeos
- Digestão do DNA com enzimas de restrição

3. OBTENÇÃO DE FARINHA DA SEMENTE

Aproximadamente 30 sementes de Cat100-6 e dos nove variantes somaclonais foram umedecidas em água destilada por 30 min para a remoção do embrião e aleurona, sendo a seguir moídas em um moinho de bola (Tecnal, TE350) por aproximadamente 2 minutos, até a formação de uma farinha fina.

A farinha obtida foi desengordurada por tratamento com acetona. Após adição de 5 volumes de acetona, os tubos foram agitados com o auxílio de um vortex. Centrifugou-se a 3.500 rpm em centrífuga de mesa (Beckman, GPR) por 5 min e descartou-se o SN. O procedimento foi repetido.

Após o tratamento, a farinha das diferentes amostras foi colocada em placas de Petri, para secar a temperatura ambiente.

4. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA SEMENTE

4.1 Extração de Zeínas para SDS-PAGE

A extração das zeínas das sementes da linhagem original e dos nove somaclones foi feita de acordo com a metodologia descrita por Wallace *et al.*, 1990, com algumas modificações, como descrito a seguir.

Cem miligramas de farinha das sementes dos diferentes materiais vegetais foram homogeneizados, com o auxílio de vortex, em 1 ml de tampão de extração contendo borato de sódio 0,0125 M pH10; 1% de SDS e 2% de 2-Me. As amostras foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação constante e, a seguir, centrifugadas por 15 min a 12.000 rpm em microcentrífuga. O SN foi transferido para tubo falcon de 15 ml. A extração foi repetida por mais duas vezes e o SN adicionado ao tubo falcon.

As zeínas foram então separadas das demais frações protéicas da semente, não zeínas, através da adição de etanol absoluto ao SN, em uma concentração final de 70%. Após incubação em gelo por 30 minutos, interrompida por agitação em vortex a cada dez minutos, centrifugou-se a 3.000 rpm por 20 min em centrífuga de mesa (Beckman, GPR). O SN, correspondente às zeínas, foi transferido para novo tubo e estocado a 4°C.

4.2 Extração de Zeínas para IEF

Trinta miligramas de farinha das sementes de Cat100-6, S1587-17, F1 e F2 foram pesados em tubo eppendorf, adicionando-se, a seguir, 150 µl de solução de extração contendo 55% de isopropanol e 2% de 2-Me.

Depois de homogeneizado em vortex por aproximadamente um minuto, o material foi mantido sob agitação constante a temperatura ambiente, durante a noite. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm em microcentrífuga por 10 min. O SN, correspondente as zeínas, foi transferido para novo tubo eppendorf e estocado a 4°C.

5. ANÁLISE DAS ZEÍNAS EM GEL

5.1 Gel de SDS-PAGE

A análise comparativa do perfil eletroforético das zeínas na linhagem original Cat100-6 e nos somaclones foi realizada em géis de SDS-PAGE 15%, segundo modificações da metodologia de Laemmli (1970).

O gel de resolução foi preparado a partir de 12 ml de uma solução estoque de acrilamida e bis-acrilamida (29,2:0,8 p/p); 3 ml de tampão de resolução (Tris-HCl 3M pH 8,8); 240 µl de SDS 10%; 168 µl de PAM 10%; 16,8 µl de TEMED e 8,57 ml de água milli-Q, e vertido em placas de vidro separadas por espaçadores de 1,5 mm, imediatamente após a adição dos catalizadores da reação.

Após 60 minutos, correspondentes ao período de polimerização do gel, adicionou-se o gel de empacotamento consistindo de 1ml da solução estoque de acrilamida e bis-acrilamida, 2 ml de tampão de empacotamento (Tris-HCl 0,5M pH 6,8); 80 µl de SDS 10%; 56 µl de PAM 10%; 5,6 µl de TEMED e 4,8 ml de água milli-Q.

Antes da aplicação no gel, 40 µl de cada amostra, quantidade correspondente a 0,5 mg de farinha, foram desnaturados por 5 min a 100°C, na

presença de 60 µl do tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8; 2% de SDS; 5% de 2-Me; 10% de glicerol; 0,02% de azul de bromofenol).

A corrida foi realizada em cuba de eletroforese (Bio-Rad) contendo tampão Tris-Glicina (0,3% de Trizma Base; 0,1% de SDS e 1,4% de glicina). A voltagem aplicada foi de 110 V, até a saída do azul de bromofenol do gel.

O gel foi corado por 2 h em solução de 0,25% de Coomassie Blue R250 (Sigma) em metanol/ácido acético/água (45:10:45 v/v) e descorado em solução de metanol/ácido acético/água (30:10:60 v/v).

O peso molecular aparente das proteínas foi calculado com base nos métodos descritos por Plikaytis *et al.* (1986), com o auxílio do programa Eletroforese, tendo como base o padrão de peso molecular na faixa de 14 a 200 kDa (Gibco-BRL).

A determinação do conteúdo de zeínas no gel foi feita por análise densitométrica em densitômetro a laser (UltraScan XL, LKB).

5.2 Gel de Isoeletrofocalização (IEF)

A detecção de polipeptídeos de zeína alterados na linhagem original e no somaclone S1587-17, assim como a análise do padrão de segregação destes na população F2, foram realizadas em géis de IEF segundo a metodologia descrita por Wilson (1984).

Às placas de vidro foram aderidas chapas de GelBond (FMC) de 0.2 mm de espessura, de modo a ficar um lado hidrofílico e outro hidrofóbico em contato com o gel. As placas foram separadas com espaçador de borracha, em forma de U, com 0.75 mm de espessura.

Para o preparo do gel, adicionou-se 0,3 g de agarose (Isogel, LKB) a 18 ml de água milli-Q e dissolveu-se em banho a 100°C por 10 min. A temperatura do banho foi abaixada para 60°C e adicionou-se 1,2 ml de uma solução estoque de DTT 1 M. A seguir, foram adicionados 0,3 ml de anfólito pH 3,5-9,5 (BioRad) e 1,2 ml de anfólito pH 5-8 (BioRad). Por fim, adicionou-se 9 g de uréia e misturou-

se com bastão de vidro até a completa dissolução. O volume final foi completado para 30 ml com água milli-Q.

Depois de colocado na placa com auxílio de pipeta de vidro pré-aquecida, o gel foi mantido a 4°C por aproximadamente 12 h até a sua total polimerização. Após a polimerização do gel, as placas de vidro foram separadas, ficando o gel em contato com a GelBond hidrofílica. O gel foi colocado na placa horizontal da cuba de focalização isoeletrica do aparelho Multiphor II (LKB), previamente resfriada a 10°C. Foram então aplicados 5 µl de cada amostra no gel, em um espaçador de amostras de borracha vedado com óleo de silicone. NaOH 1 M foi o eletrólito utilizado no catodo do gel. No anodo foi utilizado ácido acético 0,5 M.

A corrida eletroforética foi dividida em três etapas conforme a voltagem: na primeira etapa, aplicou-se uma voltagem de 200V durante 15 min para a entrada das amostras no gel. Retirou-se então o espaçador de aplicação de amostras e, em uma segunda etapa, aplicou-se uma voltagem de 600V por 25 min. Na etapa final, a voltagem aplicada foi de 1.000V por uma hora.

Após o término da corrida, o gel foi colocado em uma solução de ácido acético/TCA/água (5:3:92 v/v) para a fixação das proteínas. O gel foi lavado brevemente com água destilada, seco com o auxílio de papel de filtro e corado com 0,5% de Coomassie Blue R 250 (Sigma) diluído em uma solução de metanol/ácido acético/água (20:10:70 v/v). O gel foi descorado com a mesma solução utilizada na dissolução do corante.

Os pontos isoeletricos (pIs) das diversas bandas foram determinados com o auxílio de proteínas padrão (Sigma) de pIs conhecidos.

5.3 Gel Equivalente de 2-D

Esta metodologia foi utilizada para a determinação do peso molecular dos polipeptídeos alterados analisados em IEF.

As bandas de interesse detectadas no gel de IEF foram cortadas com o auxílio de um bisturi, colocadas em tubos eppendorf contendo 20 µl de tampão de amostra, sendo a seguir solubilizadas em banho a 100°C por 5 min. As amostras foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 15%, como descrito no ítem 5.1.

A eletroforese foi realizada a 100V por aproximadamente 6 h. Os procedimentos de coloração, descoloração do gel e cálculo do peso molecular foram idênticos aos descritos no ítem 5.1.

6. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

A análise do conteúdo de aminoácidos da farinha e do extrato de zeína de Cat100-6, S1587-17, S1 e S7, foi realizada pelo Centro de Química de Proteínas (CQP), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, empregando-se a metodologia descrita a seguir.

As amostras foram hidrolizadas em HCl 6N por 22 h a 110°C. Após a evaporação do ácido, as proteínas foram diluídas em tampão citrato de sódio 0,27N pH 2,2, contendo 15% de PEG, agitadas em vortex e centrifugadas em tubos contendo filtro de celulose de 0,45 microns e mantidas a 4°C para posterior análise.

Para a análise foi utilizado o sistema de cromatografia de troca iônica de duas colunas com resina PC6A (Pierce Chemical Company, USA). Na coluna curta, contendo 13 cm da resina de 0,63 cm de diâmetro interno, foram eluídos e detectados os aminoácidos de caráter básico, através da utilização de tampão citrato de sódio 0,37N pH 5,25, a uma temperatura entre 55 e 75°C. Na coluna longa, com 36 cm de resina de 0,63 cm de diâmetro interno, foram eluídos e detectados os aminoácidos ácidos e neutros, utilizando-se tampão citrato de sódio 0,2N pH 3,25 a 55°C e um tampão de mesma molaridade, pH 4,25 a uma temperatura de 75°C.

7. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

A purificação dos fragmentos de DNA, utilizados como sonda nos experimentos de hibridização de DNA ou RNA, foi realizada segundo modificação da metodologia descrita por Heery *et al.*, 1990.

Os plasmídeos contendo os insertos foram digeridos com enzimas de restrição que liberam o fragmento de interesse e submetidos a eletroforese em gel de 0,8% de agarose em TAE (Tris-HCl 400mM pH 8,0; ácido acético 50mM; EDTA 7,7mM pH 8,0) 1 vez concentrado (TAE 1x), como descrito por Sambrook *et al.*, 1989.

Os fragmentos de interesse foram retirados do gel e colocados em tubo eppendorf com o fundo furado, contendo 2-3 mm de lã de vidro siliconizada. O eppendorf foi posicionado no topo de outro eppendorf e colocado a -20°C por 20 minutos, sendo a seguir centrifugado por 10 min a 6.000 rpm em microcentrífuga. O líquido eluído, contendo o fragmento de DNA, foi precipitado com 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol a -20°C por 2 h.

A seguir, centrifugou-se por 15 min a 12.000 rpm em microcentrífuga, sendo o precipitado ressuspendido em 20 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) e estocado a -20°C.

Os fragmentos de DNA foram quantificados em gel de 0,8% de agarose em TAE 1x, com base no padrão de peso molecular λ/Hind III (Gibco-BRL) e estocados a -20°C.

8. EXPERIMENTOS DE SOUTHERN BLOT

A metodologia de *Southern blot* foi utilizada para a análise comparativa dos diferentes materiais vegetais e para o mapeamento dos genes de zeína alterados.



8.1 Extração do DNA Genômico de Folhas

O DNA foi extraído segundo metodologia descrita no manual do Laboratório de Genética Molecular Aplicada do CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo) (Hoisington, 1993), como descrito a seguir.

O DNA das diferentes plantas analisadas foi preparado a partir do tecido foliar congelado, liofilizado e moído em moinho (Tecator Cyclotec Sample Mill, Fisher) até a formação de um pó fino.

Adicionou-se 9 ml de tampão de extração (Tris HCl 100mM pH 7,5; NaCl 700 mM; EDTA 50 mM; 2-Me 140 mM; 1% de CTAB) a tubos falcon de 15 ml contendo 300 mg de cada tecido foliar liofilizado, misturando-se gentilmente com bastão de vidro. Incubou-se a 65°C por 90 min sob agitação constante.

Após 10 min à temperatura ambiente, adicionou-se 4,5 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v) e agitou-se por inversão por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min em centrifuga de mesa. A extração com clorofórmio/álcool isoamílico foi repetida e a fase aquosa coletada foi transferida para tubos novos. Após a adição de 25 µl de RNAase A (10 mg/ml), cada amostra foi mantida por 90 min a temperatura ambiente.

Adicionou-se 6 ml de isopropanol gelado e misturou-se por inversão. O DNA precipitado foi coletado com o auxílio de ganchos de vidro e colocado em tubos contendo 2 ml da solução de lavagem 1 (76% de etanol; acetato de sódio 0,2 M) por aproximadamente 20 min. O DNA foi lavado brevemente na solução de lavagem 2 (76% de etanol; acetato de amônio 10 mM) e transferido para tubo eppendorf contendo 1,5 ml de TE. As amostras permaneceram sob agitação constante durante a noite para a completa dissolução.

A quantificação e o controle de qualidade do DNA foram feitos por espectrofotometria (espectrofotômetro DU-65, Beckman) e análise em gel de 0,8% de agarose em TAE 1x. O DNA foi armazenado a 4°C.

8.2 Digestão do DNA Genômico e Separação em Gel

Quinze μg dos DNAs isolados foram digeridos com um excesso de 5x das enzimas de restrição Eco RI, Hind III, Bam HI e Eco RV (Gibco-BRL), na presença de espermidina 2,5mM, em um volume final de 300 μl , a 37°C durante a noite. Dez μl de cada amostra foram aplicados em gel de 0,8% de agarose em TAE 1x, para verificação da digestão.

O DNA foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol absoluto, por 1 hora a -70°C. Centrifugou-se por 15 min a 12.000 rpm em microcentrífuga e descartou-se o SN. O precipitado foi lavado em 500 μl de etanol 70%, seco a vácuo em liofilizador por aproximadamente 5 min e ressuspendido em 30 μl de TE.

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de 0.8% de agarose em tampão TAE 1x, juntamente com o padrão de peso molecular λ Hind III/ ϕ x174 Hae III ou 1Kb Ladder (Gibco-BRL). A corrida do gel foi realizada a 25V por aproximadamente 16 h. O gel foi corado por 20 min em uma solução de EtBr 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e fotografado juntamente com uma régua milimetrada, com a finalidade de se dispor de uma referência do tamanho real.

8.3 Transferência Neutra

A imobilização do DNA em membranas de nylon foi realizada segundo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989), com algumas modificações descritas a seguir.

O DNA foi depurinado colocando-se o gel em solução de HCl 0,25 N por 10 min. A desnaturação foi feita em uma solução de NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 N por 30 min. O gel foi neutralizado colocando-se em uma solução contendo NaCl 1,5 M; Tris-HCl 1 M pH 7,4 por 30 min. Os diferentes tratamentos foram intercalados com lavagens do gel em água destilada.

A transferência foi realizada através do sistema esquematizado na figura 2. Colocou-se o gel invertido sobre uma ponte contendo três folhas de papel Whatman (3MM) de tamanho apropriado, umedecidas em SSC (NaCl 0,15 M;

citrato trissódico 0,015 M) 10 vezes concentrado (SSC 10x), e colocadas em uma plataforma, dentro de uma cuba contendo o tampão de transferência SSC 10x. A membrana, previamente umedecida em água milli-Q e em SSC 10x, foi colocada em contato com o gel, e sobre ela foram colocadas três folhas de papel Whatman (3MM) de tamanho idêntico ao do gel, também umedecidas em solução de transferência. Por fim, colocou-se uma pilha de aproximadamente 7 cm de papel de germinação sobre o gel, e um peso variando entre 0,5 a 1 kg, conforme o tamanho do gel. A transferência transcorreu por 16 h .

Após a transferência, a membrana foi lavada em solução de SSC 2x, para a remoção de vestígios de agarose e colocada para queimar por 2 h a 80°C.

8.4 Hibridização

As membranas foram pré-hibridizadas e hibridizadas segundo especificações do fabricante (Amersham), com modificações baseadas em metodologia descrita por Sambrook *et al.*, (1989).

Depois de umedecida em solução de SSC 2x, a membrana foi colocada em tubo de vidro para hibridização. Adicionou-se a solução de pré-hibridização, previamente aquecida a 42°C, consistindo de SSC 5x; Denhardt's (1% de Ficoll, 1% de Polivinil e 1% de albumina bovina fração V em água)10x; Tris-HCl 20 mM pH 7,5; 1% de SDS; 50% de formamida e 100 µg/ml de solução de esperma de salmão desnaturado. A pré-hibridização transcorreu a 42°C durante a noite.

A solução de pré-hibridização foi então descartada e adicionou-se a solução de hibridização (SSC 5x; Denhardt's 2x; Tris-HCl 20 mM pH 7,5; 1% de SDS; 50% de formamida; 5% de Sulfato de Dextran; 100 µg/ml de solução desnaturada de DNA de esperma de salmão), previamente aquecida a 42°C e contendo a sonda marcada radioativamente. A hibridização foi realizada a 42°C durante a noite.

Após a hibridização, a membrana foi lavada por 2 vezes de 15 min cada, em solução contendo SSC 2x e 0,1% de SDS, a temperatura ambiente. A seguir

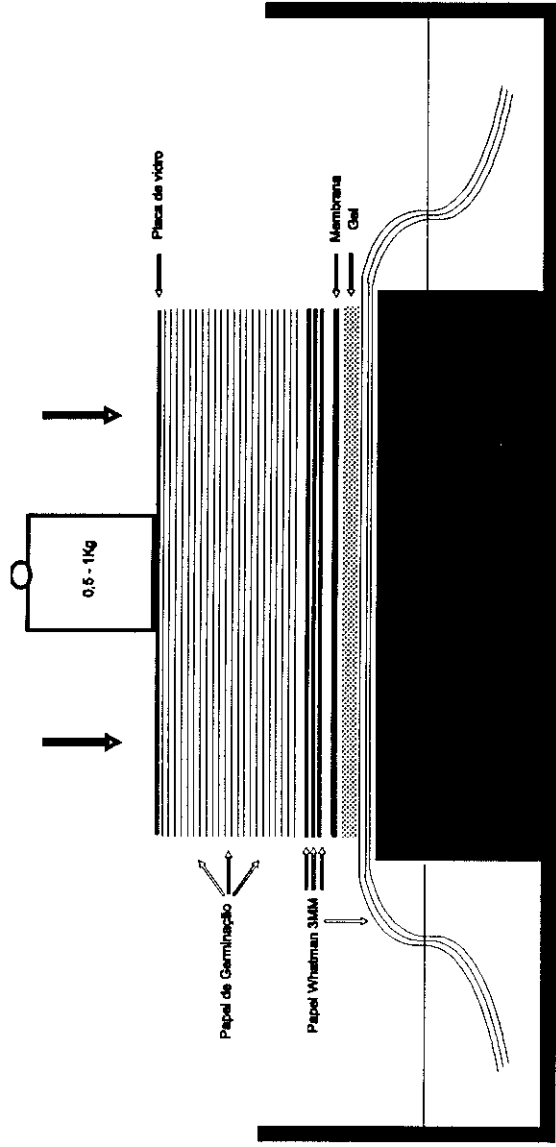


Figura 2 - Sistema de Transferência

Esquema da montagem do aparato de transferência utilizado nas metodologias de *Southern* e *Northern blot*

a membrana foi lavada 2 vezes em solução de maior estringência, contendo SSC 0,1x e 0,1% de SDS, a 60°C, sendo o período de cada lavagem de 30 min.

Após as lavagens, a membrana foi exposta pelo tempo necessário à filmes de raio-X (Kodak X-Omat), a -70°C, em cassetes contendo intensificadores.

8.5 Marcação e Purificação de Sondas de DNA

Os fragmentos de DNA utilizados como sonda foram marcados radioativamente segundo as especificações do kit de marcação (Prime-a-Gene, Promega). A remoção dos nucleotídeos não incorporados se deu através da passagem da sonda marcada em coluna de Sephadex G50 (Sigma) equilibrada com STE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; EDTA 1 mM; NaCl 0,1 M). Depois de removidos os nucleotídeos, a sonda foi desnaturada por 5 min a 100°C e colocada imediatamente em gelo, antes de ser adicionada à solução de hibridização.

8.6 Sondas Utilizadas

O mapeamento dos genes de zeína foi feito através da análise de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

As membranas contendo os DNAs do Cat100-6, S1587-17 e do F1, foram hibridizadas com 21 sondas dos cromossomos 4 e 7 do milho, com o intuito de se verificar a melhor combinação de sonda/enzima através do polimorfismo obtido (Fig. 3).

Posteriormente, membranas contendo os DNAs de Cat100-6, S1587-17, F1 e da população segregante F2, foram hibridizadas com as 10 sondas selecionadas, próximas aos clusters de zeína dos cromossomos 4 e 7, para análise de segregação dos polimorfismos obtidos (Fig. 4).

As sondas de RFLP utilizadas foram obtidas do Brookhaven National Laboratory, EUA (BNL) e da Universidade de Missouri, Columbia, EUA (UMC). As sondas php utilizadas foram cedidas pela Dra. Theresa A. Musket, da

Universidade de Missouri, Columbia, EUA. Foram também utilizados como sonda, cDNAs dos genes das zeínas de 14, 19 e 22 kDa e do mutante de endosperma *floury2* (*fl2*), gentilmente cedidos pelo Dr. Brian Larkins da Universidade do Arizona, Tucson, EUA. O cDNA correspondente ao gene regulador *opaco-2* (*o2*) foi cedido pelo Dr. Robert Schimidt, da Universidade da California, San Diego, EUA.

8.7 Análise dos Polimorfismos

Os polimorfismos obtidos com as diferentes sondas, em hibridizações com o DNA da população F2, foram analisados com o auxílio do programa Mapmaker (Lander *et al.*, 1987) versão 3.0, utilizando-se análise de três pontos, LOD mínimo de 3.0 e frequência máxima de recombinação de 0.4.

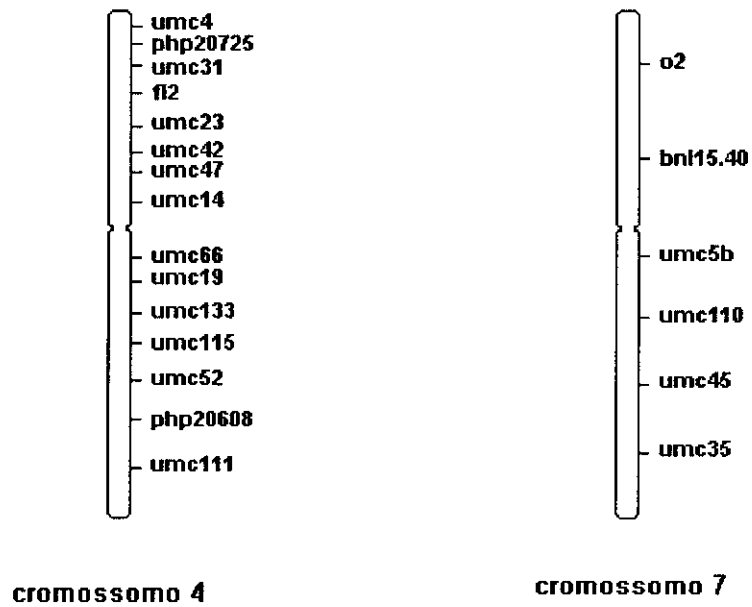


Figura 3 - Sondas de RFLP utilizadas em F1

Esquema da localização das sondas de RFLP dos cromossomos 4 e 7, utilizadas em hibridizações de membranas contendo o DNA dos pais e da população F1, para verificar a melhor combinação sonda/enzima a ser utilizada no mapeamento dos genes.

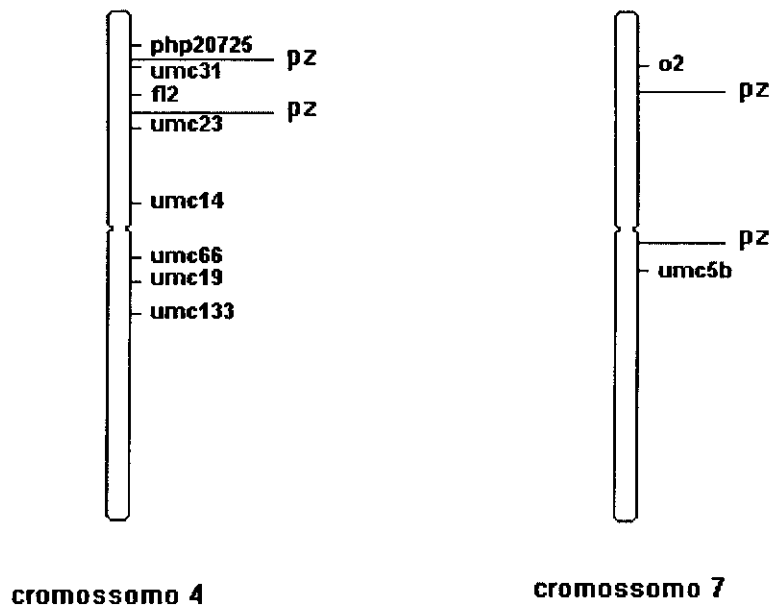


Figura 4 - Sondas de RFLP Utilizadas em F2

Esquema das sondas de RFLP dos cromossomos 4 e 7, próximas aos *clusters* de zeína, que foram selecionadas para o mapeamento dos genes de zeína na população F2. A localização aproximada dos *clusters* de zeína está indicada pela sigla pz (polipeptídeos de zeína).

9. EXPERIMENTOS DE *NORTHERN* BLOT

A metodologia de *Northern blot* foi utilizada para uma análise da expressão dos genes de zeína de 14, 19 e 22 kDa. Para isso, foram utilizadas sementes da linhagem Cat100-6 e dos somaclones S1587-17, S1 e S7 em diferentes estágios do desenvolvimento (10, 14, 18, 22 e 28 DAP).

9.1 Extração do RNA Total da Semente

O material utilizado na preparação dos RNAs foi previamente tratado com o intuito de se inativar as possíveis RNases presentes. A vidraria foi queimada em estufa a 180°C por 24 h. A água e as soluções utilizadas foram tratadas com DEPC. As cubas de eletroforese e de transferência, e quaisquer outros materiais de acrílico ou plástico utilizados, foram tratados com peróxido de hidrogênio 3% durante 15 min e depois enxaguados com água DEPC.

O RNA total foi extraído segundo metodologia descrita por Prescott & Martin (1987), com algumas modificações, como descrito a seguir.

Aproximadamente 30 sementes de cada material foram maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. O pó foi transferido para tubo falcon de 50 ml e homogeneizado em 10 ml de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 9,0 contendo 150 mM de LiCl; 5 mM de EDTA; 5% de SDS).

Acrescentou-se 10 ml de fenol equilibrado em tampão Tris-HCl 0,2 M pH 7,5/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 v/v). Misturou-se bem por inversão, e centrifugou-se por 10 minutos, a 3.000 rpm, em centrífuga de mesa. A fase aquosa foi submetida a nova extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico.

Após nova centrifugação, 8 ml da fase aquosa foram transferidos para tubos de 50 ml e precipitados com 3,2 ml de LiCl 8 M a -20°C por 2 h. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 20 min em rotor JA-20 (Beckman). O SN foi descartado e o precipitado ressuspenso em 4,8 ml de água tratada com DEPC, com o auxílio de vortex.

Adicionou-se 1,6 ml de LiCl 8 M e incubou-se por 1 h a -20°C. Centrifugou-se por 20 min a 10.000 rpm (rotor JA-20) e descartou-se o SN. O precipitado foi ressuspensionado em 800 µl de água DEPC e o volume final dividido em dois tubos eppendorf. A cada tubo adicionou-se 40 µl de acetato de sódio 3 M pH 5,2 (0,1 volumes) e 1,1 ml de etanol absoluto (2,5 volumes). Incubou-se a -20°C durante a noite.

Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm em microcentrífuga por 30 min e o precipitado formado foi lavado com 500 µl de etanol 70%, seco a temperatura ambiente por 10 min e dissolvido em 100 µl de água DEPC. Juntou-se o volume dos dois eppendorfs e estocou-se o RNA a -70°C.

A quantificação e o controle de qualidade do RNA foram feitos por espectrofotometria e corrida em gel de 1% de agarose contendo formaldeído 0,66 M (Fourney *et al.*, 1988).

9.2 Preparo das Amostras e Corrida do Gel

Foram utilizados 6 µg de RNA total de cada amostra por gel. O volume de todas as amostras foi completado para 5 µl com água DEPC e a cada amostra adicionou-se 14,5 µl de uma solução contendo 1 µl de MOPS/EDTA (MOPS 0,2 M pH 7,0; acetato de sódio 50 mM; EDTA 10 mM) 10X; 3,5 µl de formaldeído 37%; 10 µl de formamida 50% deionizada. As amostras foram desnaturadas a 65°C por 15 min e colocadas em gelo por aproximadamente 5 min. Adicionou-se 1 µl de EtBr (1mg/ml) e 0,1 volumes de tampão de amostra consistindo de EDTA 1 mM; 50% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol.

As amostras, juntamente com os padrões de RNA de alto (0,24 a 9,5 Kb) e baixo (0,16 a 1,77 Kb) peso molecular (Gibco-BRL), foram aplicadas em gel de 1% de agarose contendo 10% de MOPS/EDTA 10X e 0,66 M de formaldeído. A corrida do gel foi realizada a 90 V até que a frente de corante atingisse dois terços do tamanho do gel. O gel foi fotografado juntamente com uma régua milimetrada.

9.3 Transferência

A transferência do RNA para membranas de nylon se deu segundo o protocolo de Fourny *et al.*, 1988.

O gel foi colocado em solução de transferência (SSC 10x) por 20 min sob agitação contínua. A membrana foi umedecida por 5 min em água DEPC e por 5 min em SSC 10x e a seguir procedeu-se a montagem do sistema de transferência, como esquematizado na figura 2. A transferência se processou por aproximadamente 18 h. A membrana foi então lavada em solução de SSC 2x e queimada por 2 h a 80°C.

9.4 Hibridização

As condições de pré-hibridização, hibridização e lavagem das membranas foram as mesmas anteriormente descritas no item 8.4 para os experimentos de *Southern blot*. As membranas foram expostas a filmes de raio-X (Amersham) pelo tempo necessário, a -70°C.

Foi feita análise densitométrica dos *Northern*s em densitômetro a laser (UltraScan XL, LKB), para quantificação da expressão nos diferentes materiais.

9.5 Sondas Utilizadas

Foram utilizados como sonda os cDNAs dos genes de zeína de 14, 19 e 22 kDa já citados no item 8.6.

RESULTADOS

1. Análise da Zeína de Cat100-6, S1587-17 e F1

Extratos de zeína total de Cat100-6, S1587-17 e F1 foram submetidos à análise em géis de IEF em agarose, pH 5-8, com o intuito de se realizar uma análise comparativa entre a linhagem original e o somaclone (Fig. 5). Dois perfis distintos foram produzidos, permitindo a identificação de 5 polipeptídeos de zeína alterados. Os polipeptídeos designados 1 (pI 7,3), 3 (pI 7,0) e 4 (pI 6,6) foram encontrados somente na linhagem original, enquanto os polipeptídeos 2 e 5, de pIs 7,1 e 6,3 foram detectados somente no somaclone S1587-17. A geração F1 apresentou todas as bandas.

2. Análise de Segregação da População F2

A população F2 foi utilizada para análise de segregação e ligação dos polipeptídeos de zeína alterados. A zeína total foi extraída de 112 sementes da população F2 e submetida à análise em géis de IEF em agarose (Fig. 6). Verificou-se a presença de um novo polipeptídeo, denominado polipeptídeo 6, presente em alguns indivíduos da população F2, e não encontrado anteriormente nos pais.

A análise de segregação mostrou que cinco destes polipeptídeos (1, 2, 3, 4 e 6) segregam na população F2, exceto o polipeptídeo 5, detectado apenas nos parentais, sendo de difícil detecção na população F2.

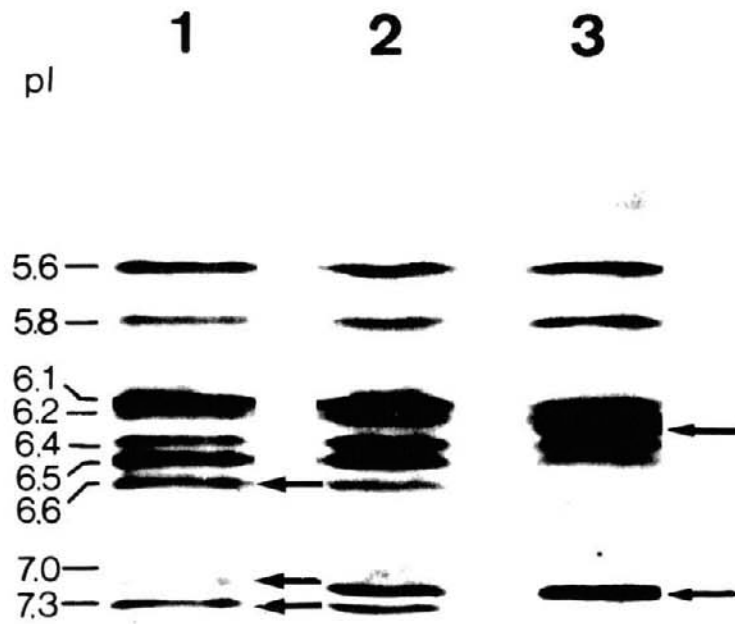


Figura 5 - Análise da Zeína de Cat100-6, S1587-17 e F1 em IEF

Gel de IEF em agarose, pH 5-8, de zeína total extraída do endosperma das sementes de Cat100-6 (1), F1 (2) e S1587-17 (3). As setas indicam bandas polimórficas detectadas nas duas linhagens. Os números à esquerda indicam os pontos isoelétricos de cada banda.

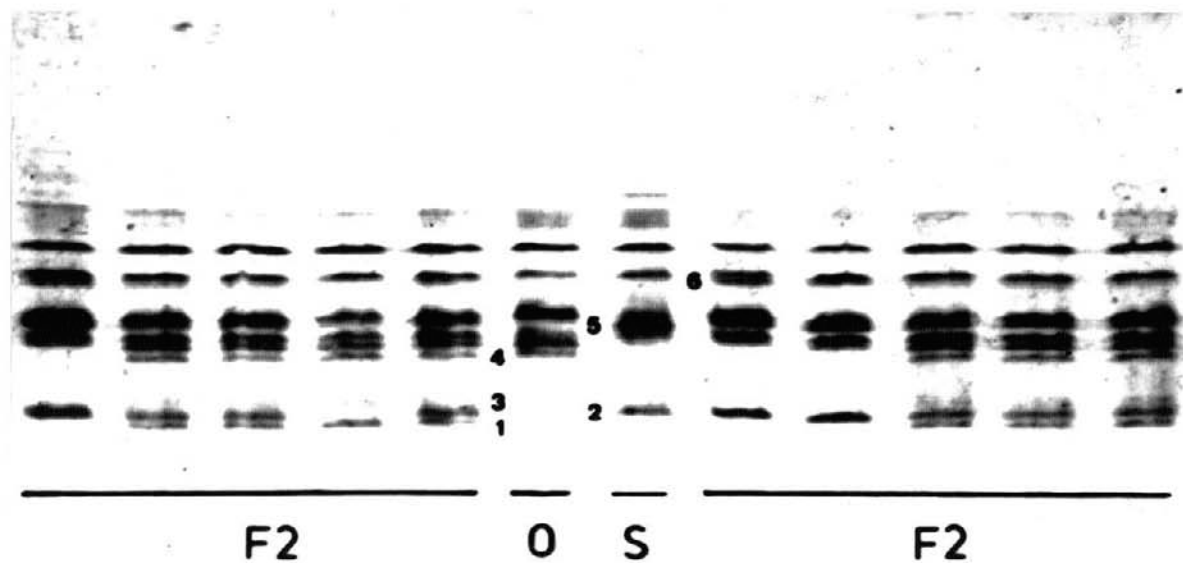


Figura 6 - Análise de Segregação da População F2 em Géis de IEF

Gel de IEF em agarose, pH 5-8, contendo extrato total de zeína de Cat100-6 (O), S1587-17 (S), e de 10 das 112 sementes da população F2 analisadas. Os números de 1 a 5 indicam os polipeptídeos visualizados no gel de IEF reportado na figura 5. O número 6 indica um novo polipeptídeo, que foi visualizado somente na população F2.

3. Determinação das Classes de Zeína Alteradas

As bandas polimórficas detectadas em IEF foram submetidas a SDS-PAGE 15%, em uma análise equivalente a um gel de 2-D (Fig. 7). Este tipo de análise permite determinar o peso molecular aparente de cada polipeptídeo detectado por gel de IEF. Verificou-se que a maioria dos polipeptídeos alterados (1, 2, 3, 5 e 6) pertence à classe de zeína de 22 kDa. Somente o polipeptídeo 4 corresponde a classe de zeína de 19 kDa. Foram observados componentes de menor tamanho e intensidade, juntamente com os polipeptídeos 3 e 5, que podem ser provenientes de contaminação no processo de isolamento das bandas, uma vez que as mesmas se encontram bastante próximas no gel.

4. Análise de Ligação dos Genes de Zeína Alterados

Os cinco polipeptídeos que segregaram na população F2 (1, 2, 3, 4 e 6), foram utilizados na determinação de ligação, realizada com o auxílio do programa Mapmaker (Lander *et al.*, 1987), versão 2.0. Utilizando-se como parâmetros um LOD de 3 e frequência máxima de recombinação de 0,4, dois mapas de ligação foram obtidos sendo que, em um deles, foram agrupados os genes 1 (22 kDa), 3 (22 kDa) e 4 (19 kDa), enquanto os genes 2 e 6, ambos de 22 kDa, foram agrupados separadamente em outro mapa (Fig. 8). Como os genes de zeína de 19 e 22 kDa se localizam principalmente nos cromossomos 4 e 7 do milho, é possível que estes grupos de ligação estejam localizados nestes cromossomos.

5. Mapeamento dos Genes de Zeína Alterados

O mapeamento genético dos genes alterados foi realizado através de hibridizações do DNA genômico de 56 amostras da população F2, digerido com as enzimas de restrição Eco RI, Hind III, Bam HI e Eco RV, com sondas de cDNA dos genes de zeína de 19 (Fig. 9 A) e 22 kDa (Fig. 9 B). As sondas utilizadas correspondem aos genes alterados nos parentais, como verificado previamente em análise de duas dimensões.

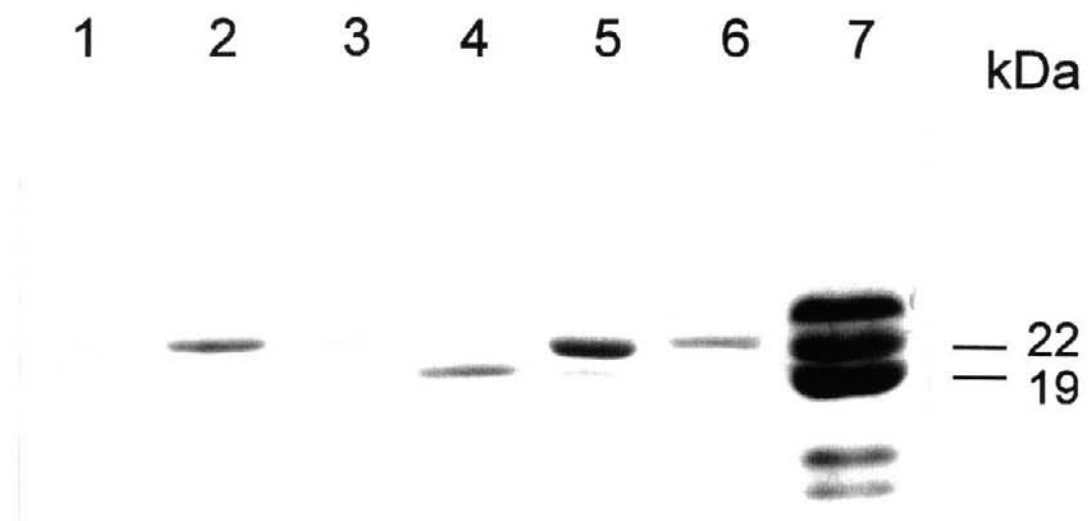


Figura 7 - Determinação das Classes de Zeína Alteradas em Gel de 2-D

Gel de SDS-PAGE 15% das seis bandas polimórficas detectadas em IEF: (1) Banda 1, (2) banda 2, (3) banda 3, (4) banda 4, (5) banda 5, (6) banda 6. Os pesos moleculares das bandas de zeína foram determinados por comparação com a amostra Cat100-6 (7) e estão indicados pelos números à direita do gel.

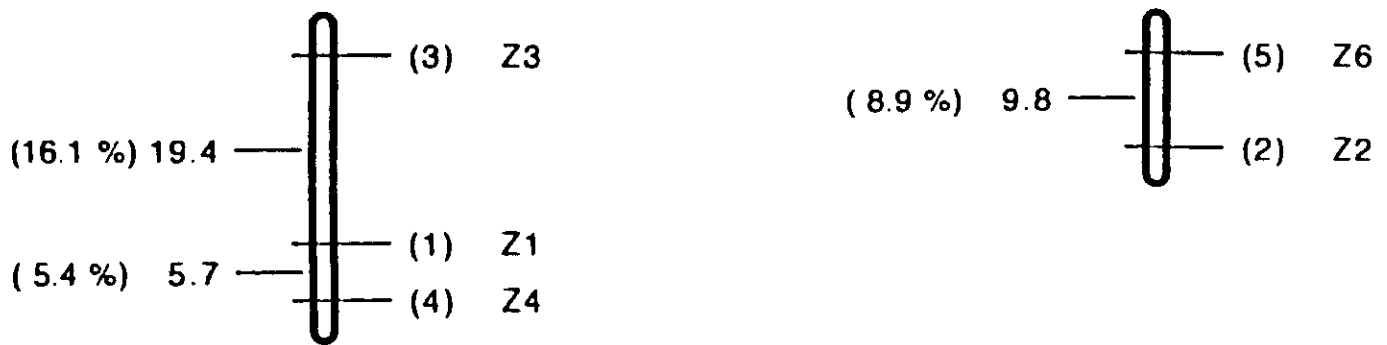
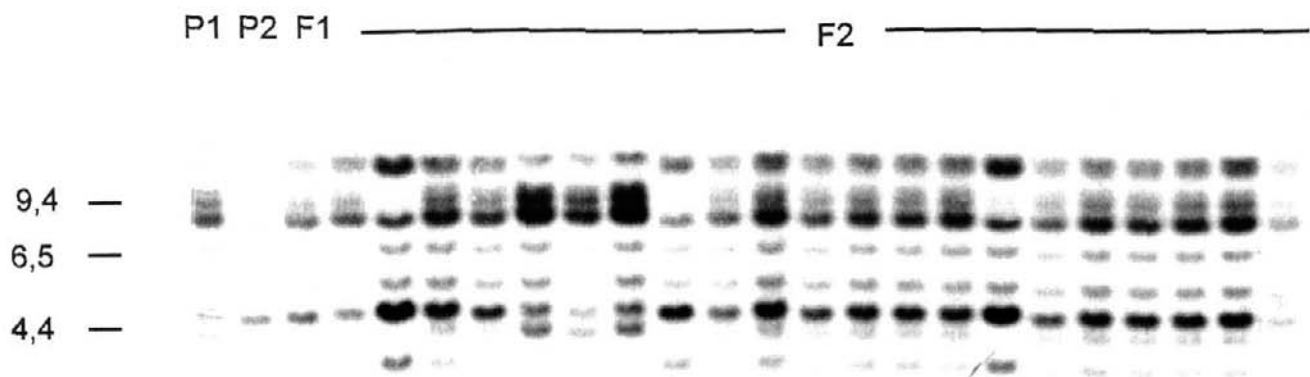
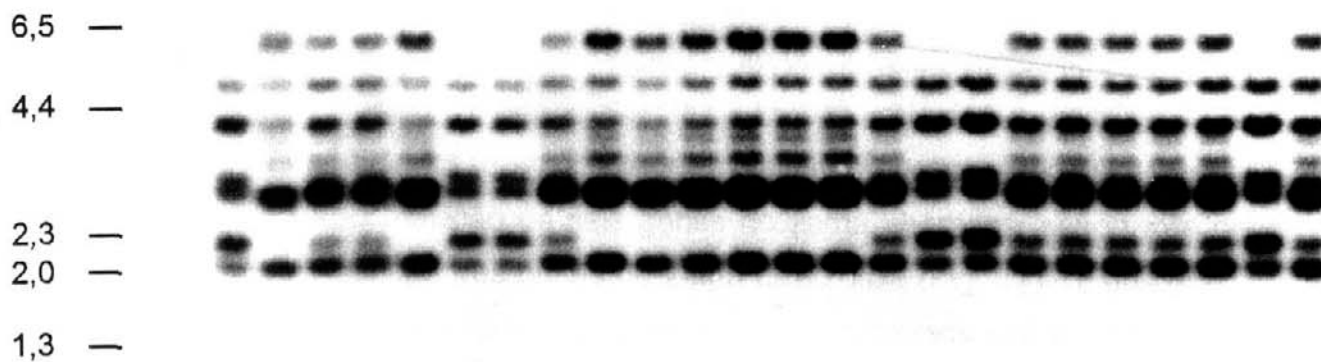


Figura 8 - Mapas de Ligação dos Genes de Zeína Alterados

Mapas de ligação dos polipeptídeos alterados, obtidos com o auxílio do programa Mapmaker (Lander *et al.*, 1987) versão 2.0. Os polipeptídeos 1 (z1), 3 (z3) e 4 (z4) são vistos em um *cluster*, enquanto os polipeptídeos 2 (z2) e 6 (z6) são visualizados em um segundo *cluster*. Os números entre parênteses indicam a porcentagem de recombinação. Os números à esquerda do cromossomo indicam a distância em centimorgans.



A



B

Figura 9 - Hibridização do DNA da População F2 com Sondas de Zeína

Hibridização de 15 µg do DNA de Cat100-6, S1587-17, F1 e da população F2, digeridos com a enzima de restrição Eco RI, com as sondas de cDNA das zeínas de 19 (Fig. A) e 22 kDa (Fig. B). Estão representadas na figura somente 21 das 56 amostras de F2 analisadas. O padrão de peso molecular λ Hind III/ ϕ x174Hae III (Gibco BRL) está indicado pelos números a esquerda do gel.

A hibridização com os genes de zeína de 19 e 22 kDa produziu padrões contendo múltiplas bandas. As três principais bandas polimórficas produzidas por hibridização com a sonda de 19 kDa possuem peso molecular aproximado de 14,5, 5,1 e 4,5 kb, respectivamente. No perfil de restrição obtido com a sonda de zeína de 22 kDa destacam-se três bandas polimórficas sendo que a primeira tem peso molecular aproximado de 6 Kb, a segunda de 3 kb e uma terceira de 1,7 kb.

Dez sondas de RFLP dos cromossomos 4 e 7 do milho foram hibridizadas com as mesmas membranas, contendo o DNA dos pais, de indivíduos da geração F1 e da população F2, para detecção de possíveis marcadores, de localização conhecida no genoma do milho, co-segregando com os genes de zeína alterados. Com exceção da sonda *fl2*, as demais sondas produziram padrões simples, com uma única banda em cada parental, sendo que as duas bandas foram visualizadas nos indivíduos heterozigotos. São exemplificados nas figuras 10 A e B dois dos marcadores utilizados no mapeamento, *php20725*, localizado no cromossomo 4 e a sonda correspondente ao gene *o2*, localizada no cromossomo 7.

A análise de três pontos através do programa Mapmaker, versão 3.0, forneceu a localização de seis genes de zeína alterados, sendo três genes de zeína de 19 kDa e três genes de zeína de 22 kDa (Fig. 11). Estes genes foram mapeados no braço curto do cromossomo 4, próximos aos marcadores *fl2*, *umc 31* e *php 20725*. Foram obtidos mais de um mapa, com a posição dos genes e marcadores variando em cada um. No entanto, o mapa cuja posição dos marcadores é a mais provável, foi selecionado.

6. Análise Fenotípica das Espigas dos Somaclones

Uma análise fenotípica das espigas permitiu a identificação de outros 8 somaclones, além do S1587-17 já estudado, cuja aparência das sementes diferia da linhagem original. De um modo geral, as sementes de todos os somaclones possuem um fenótipo mais opaco que o das sementes da linhagem original.

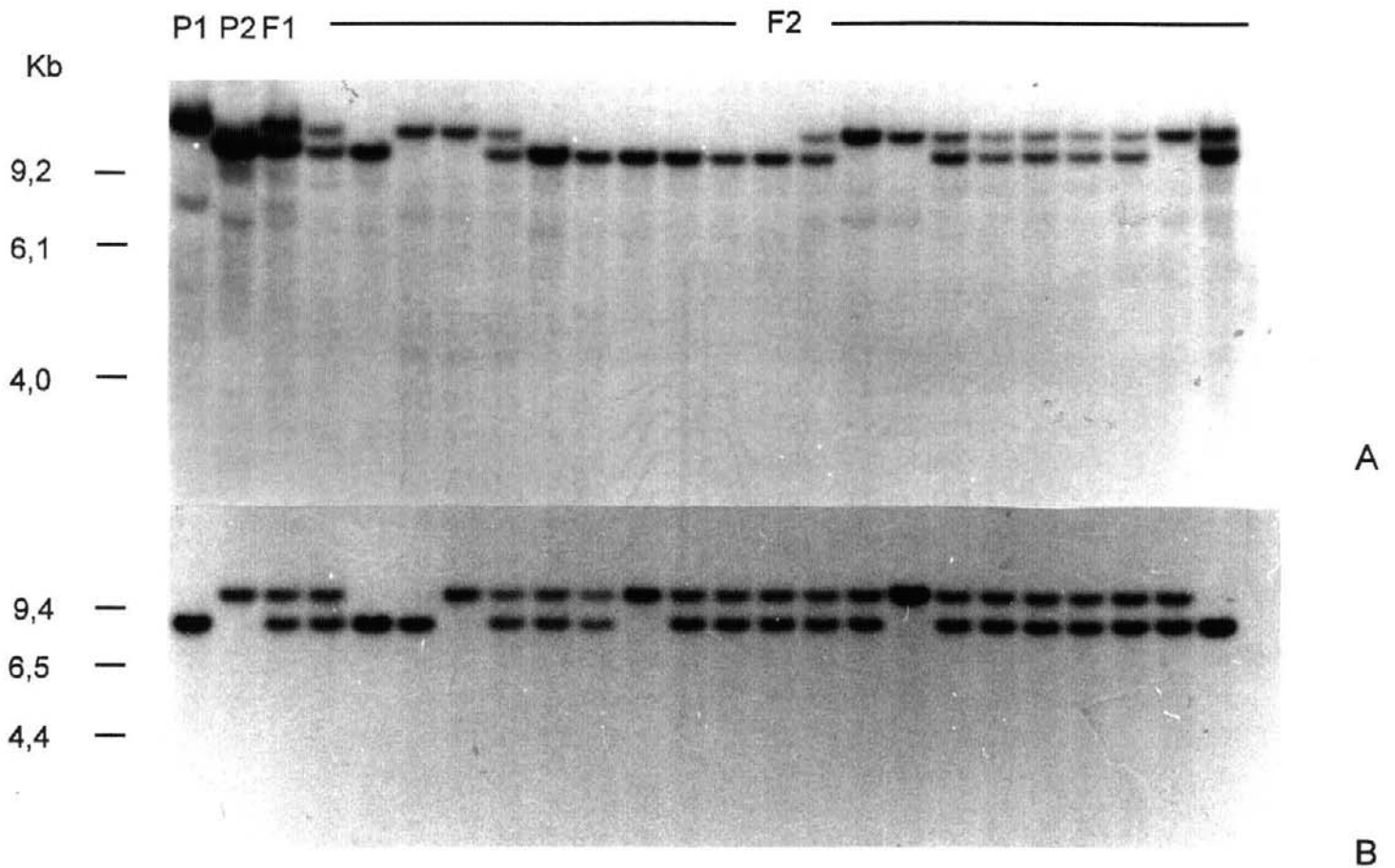


Figura 10 - Hibridização do DNA da População F2 com Sondas de RFLP

Hibridização de 15 μ g do DNA dos pais, de F1 e de 21 indivíduos da população F2, digeridos com Eco RI, com duas das dez sondas utilizadas no mapeamento dos genes. A sonda *php 20725* (Fig. A) está localizada no braço curto do cromossomo 4 e a sonda *opaco-2* (Fig. B) está localizada no braço curto do cromossomo 7. O padrão de peso molecular (Ladder 1 Kb na Fig. A e λ Hind III/ ϕ x174Hae III na Fig. B) está indicado pelos números à esquerda do gel.

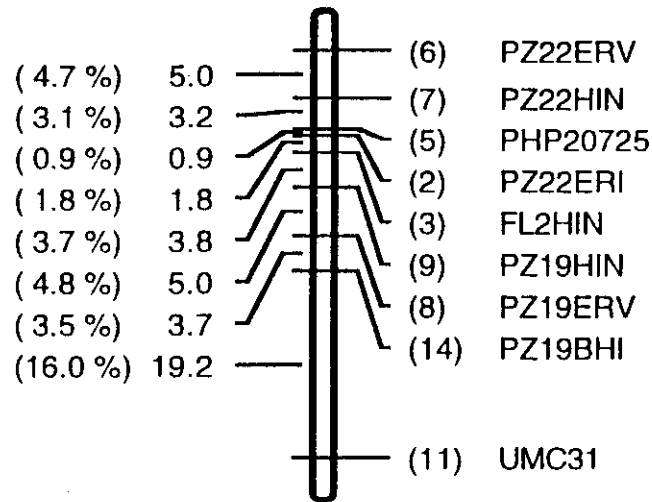


Figura 11 - Mapa dos Genes de Zeína Alterados

Diagrama do cromossomo 4 do milho indicando a posição dos genes estruturais de zeína mapeados (PZ19 e PZ22), em relação aos marcadores moleculares utilizados no mapeamento (UMC31, FL2, PHP 20725). Para a construção do diagrama, os resultados da população segregante foram analisados com o auxílio do programa Mapmaker (Lander *et al.*, 1987) versão 3.0. Os números entre parênteses indicam a porcentagem de recombinação, e os números à esquerda do cromossomo, a distância em centimorgans.

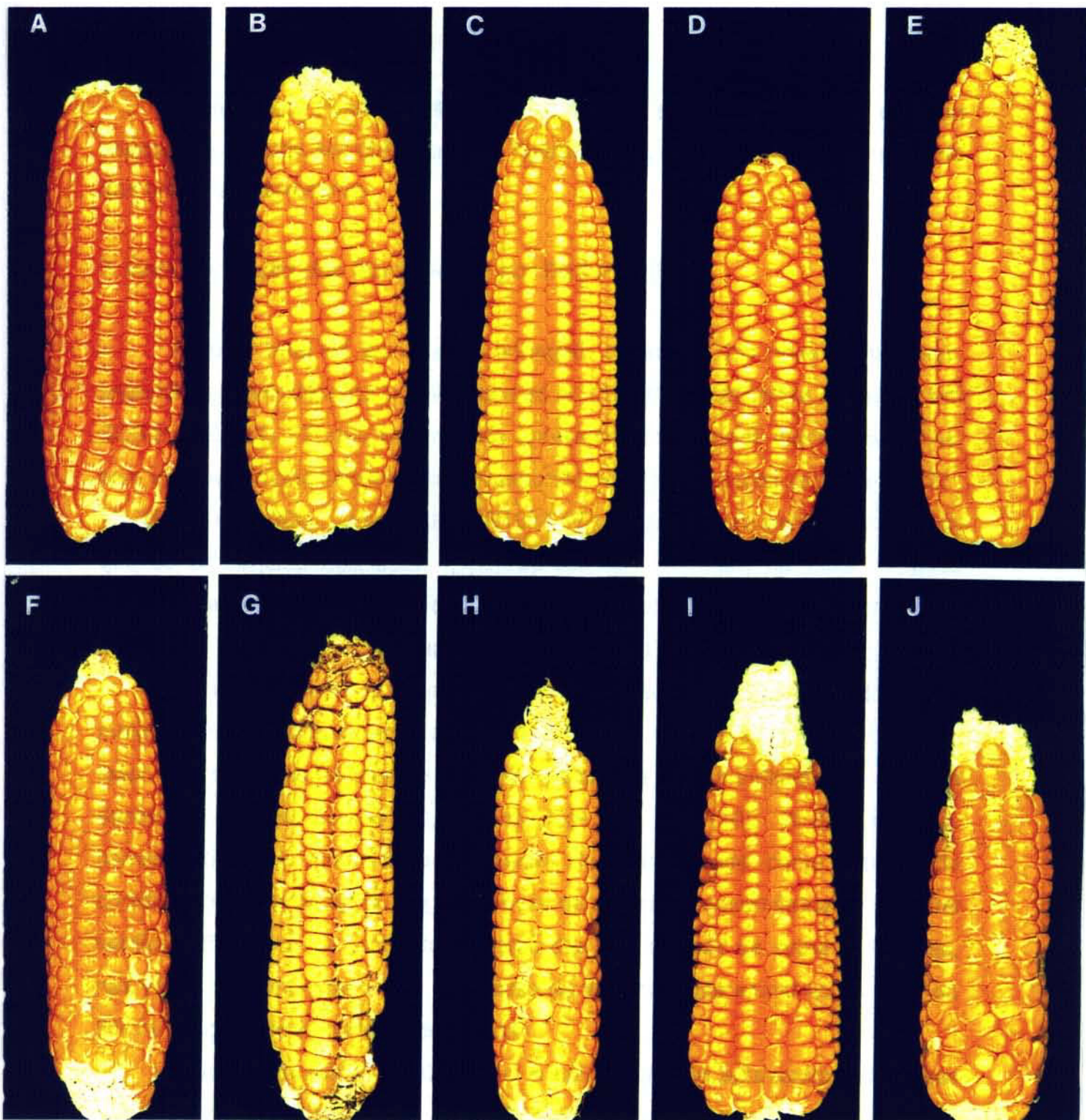


Figura 12 - Análise Fenotípica das Espigas

Espiga da linhagem Cat100-6 (fig. A), do somaclone S1587-17 (fig. B) e dos somaclones S1 a S8 (figs. C a J). Algumas sementes alteradas podem ser visualizadas em F, H e J.

Além disso, foram identificadas sementes alteradas em mais de uma espiga, como pode ser observado na figura 12, aspecto de interesse no estudo das proteínas de reserva.

7. Caracterização dos Somaclones por SDS-PAGE

A zeína total foi extraída da linhagem original e dos nove somaclones, segundo método descrito por Wallace *et al.* (1990), e submetida a análise em SDS-PAGE 15%. Todas as amostras apresentaram um perfil típico das zeínas, com a presença das seis bandas correspondentes às classes de zeína de 27, 22, 19, 16, 14 e 10 kDa. O somaclone S1587-17 apresentou um perfil eletroforético que se diferenciou dos demais, por apresentar um rastro na faixa de peso molecular abaixo de 16 kDa. No entanto, mesmo com a presença deste rastro, as bandas de 16, 14 e 10 kDa foram visualizadas nesta amostra (Fig. 13).

Algumas bandas apresentaram variação de intensidade nos diferentes materiais, tendo esta variação sido medida através de leitura em densitômetro a *laser*. Foram feitas leituras de dois geis para cada banda individual, e a média destas leituras foi plotada em gráficos (Figs. 14, 15 e 16). A área do pico, correspondente a intensidade da banda, foi considerada como medida do conteúdo de cada proteína no gel. Através da análise densitométrica foi possível verificar diferenças no conteúdo de cinco das seis classes de zeína analisadas, nas várias progênies de milho. A análise de variância das amostras ao nível de 5% foi obtida através do teste de Duncan.

A classe de zeína de 10 kDa foi a única que não apresentou diferenças significativas. Duas progênies, S1 e S7, apresentaram duas vezes mais zeína de 14 kDa quando comparadas com a linhagem original Cat100-6 e com os demais somaclones.

O conteúdo da γ -zeína de 16 kDa variou pouco entre os vários somaclones, sendo que 4 deles, S1, S2, S4 e S7, tiveram um maior aumento

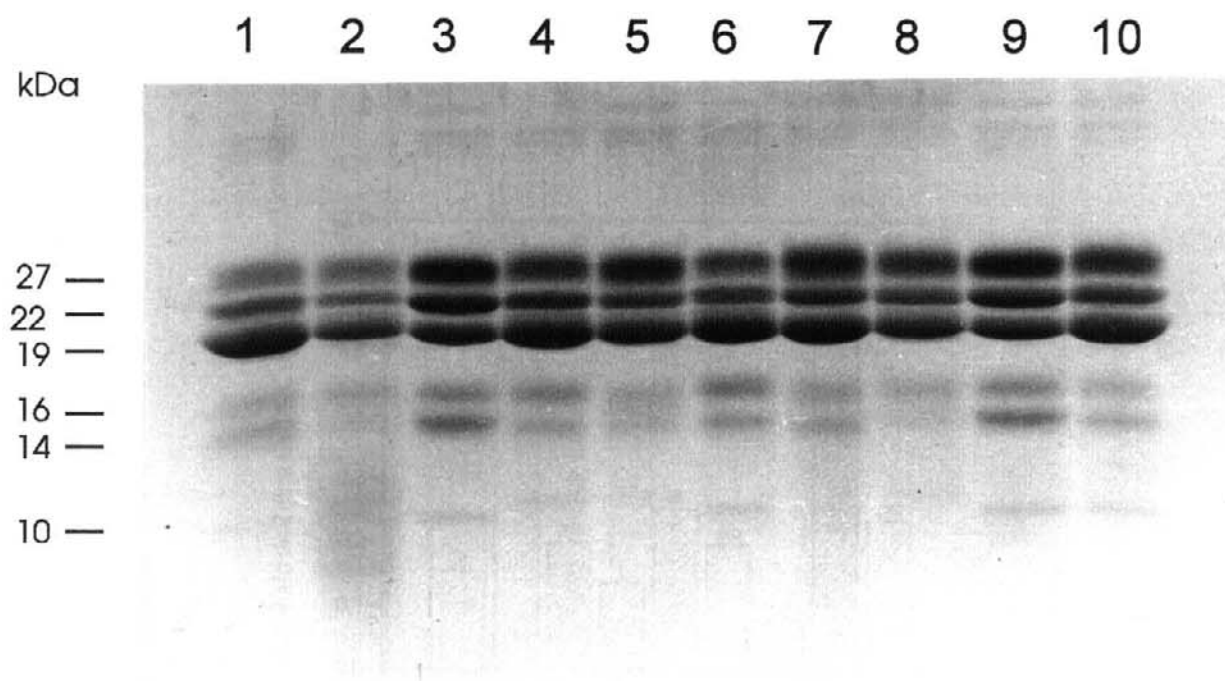


Figura 13 - Análise dos Somaclones em SDS-PAGE

Análise em gel de SDS-PAGE 15% da zeína total extraída do endosperma de Cat100-6 (1), S1587-17 (2) e dos somaclones S1 a S8 (3 a 10). O peso molecular aproximado de cada banda está indicado pelos números à esquerda do gel.

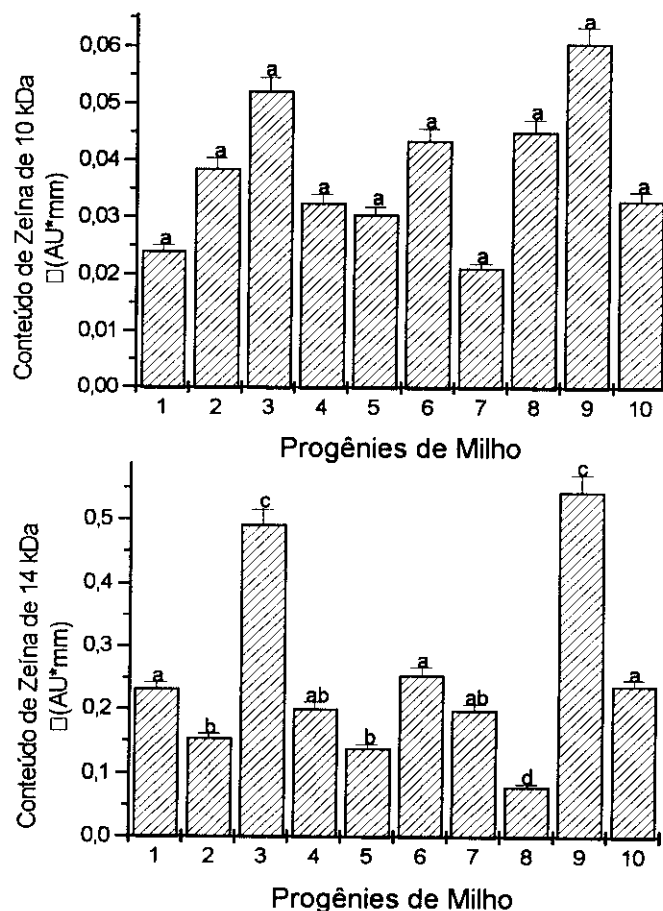


Figura 14 - Quantificação das Zeínas de 10 e 14 kDa

Os gráficos acima correspondem a análise densitométrica das zeínas de 10 e 14 kDa. As diferentes progênie de milho estão identificadas pelos números 1 a 10, sendo que 1 e 2 correspondem à linhagem Cat100-6 e ao somaclone S1587-17, e 3 a 10 aos somaclones S1 a S8. O desvio padrão na leitura de dois géis é indicado por barras de erro, e as letras sobre as barras indicam a variância das amostras.

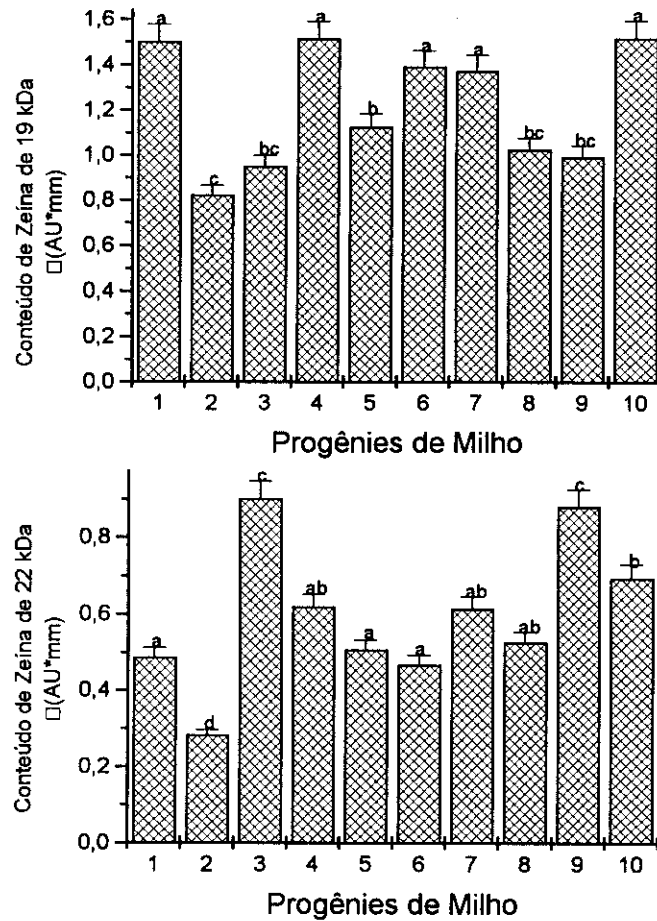


Figura 15 - Quantificação das Zeínas de 19 e 22 kDa

Os gráficos acima correspondem a análise densitométrica das zeínas de 19 e 22 kDa. As diferentes progênies de milho estão identificadas pelos números 1 a 10, sendo que 1 e 2 correspondem à linhagem Cat100-6 e ao somaclone S1587-17, e 3 a 10 aos somaclones S1 a S8. O desvio padrão na leitura de dois géis é indicado por barras de erro, e as letras sobre as barras indicam a variância das amostras.

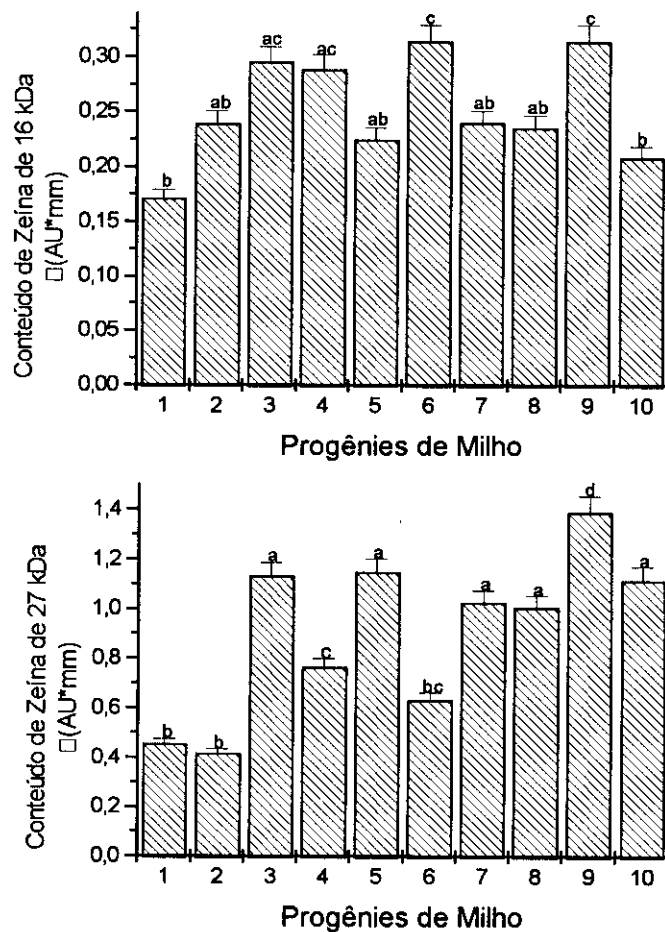


Figura 16 - Quantificação das Zeínas de 16 e 27 kDa

Os gráficos acima correspondem a análise densitométrica das zeínas de 16 e 27 kDa. As diferentes progênes de milho estão identificadas pelos números 1 a 10, sendo que 1 e 2 correspondem à linhagem Cat100-6 e ao somaclone S1587-17, e 3 a 10 aos somaclones S1 a S8. O desvio padrão na leitura de dois géis é indicado por barras de erro, e as letras sobre as barras indicam a variância das amostras.

quando comparados com a linhagem Cat100-6. Já o conteúdo da γ -zeína de 27 kDa foi o mesmo na linhagem Cat100-6 e no somaclone S1587-17, aumentando aproximadamente 1,5 vez no somaclone S4; 2 vezes no somaclone S2; 2,5 vezes nos somaclones S1, S3, S5, S6 e S8, e 3 vezes no somaclone S7.

Quanto ao conteúdo das α -zeínas, a zeína de 22 kDa mostrou um grau de variação maior entre os diferentes materiais, sendo que novamente os somaclones S1 e S7 se diferenciaram dos demais, com o dobro de proteína se comparados com a linhagem original. O somaclone S1587-17 apresentou o menor conteúdo da zeína de 22kDa, aproximadamente 1,5 vez menor do que o verificado para a linhagem Cat100-6. As amostras que apresentaram o maior conteúdo de zeína de 19 kDa foram a linhagem Cat100-6 e os somaclones S2, S4, S5 e S8.

8. Caracterização dos Somaclones por *Southern Blot*

Hibridizações do DNA genômico de Cat100-6, F1 e dos somaclones, com as sondas de zeína de 14 kDa (Fig. 17) e 22 kDa (Fig. 18), permitiram diferenciar as progênies S1 e S7 dos demais somaclones. Na hibridização do DNA digerido com Eco RI, com a sonda de 14 kDa, S1, S7 e a linhagem original apresentaram uma banda de aproximadamente 6,5 Kb. Os somaclones S1587-17, S2, S3 , S4 e S8 apresentaram uma banda de mesmo tamanho (1,1 Kb), e os somaclones S5 e S6 apresentaram bandas diferentes entre si e entre os demais somaclones, com 2,1 Kb e 9,8 Kb, respectivamente. Já na hibridização do DNA digerido com Hind III, com a mesma sonda, as progênies apresentaram o mesmo comportamento, com exceção da linhagem Cat100-6, que se diferenciou dos somaclones S1 e S7, com uma banda de aproximadamente 8,5 kb.

Os resultados da hibridização com a sonda de 22 kDa diferiram dos resultados obtidos com a sonda de 14 kDa. Neste experimento, os somaclones S5 e S8 apresentaram um mesmo perfil de restrição, semelhante ao do S1587-17; os somaclones S2 e S3 apresentaram um perfil idêntico, diferindo dos demais, enquanto o somaclone S4 apresentou perfil igual ao da linhagem original

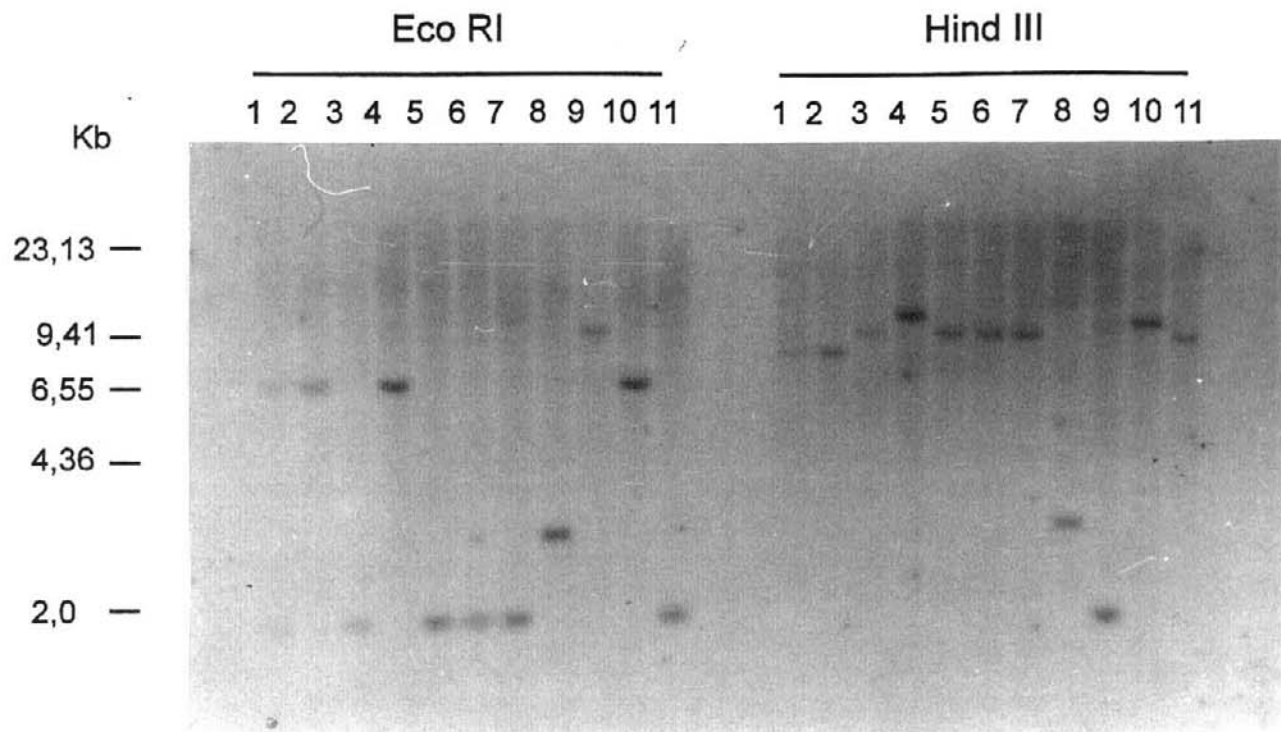


Figura 17 - Análise de *Southern blot* de Cat100-6 e dos Somaclones com Sonda de Zeína de 14 kDa

Hibridização das membranas contendo 10 μ g do DNA de F1(1), Cat100-6 (2), S1587-17 (3) e dos somaclones S1 a S8 (4 a 11), digeridos com as enzimas de restrição Eco RI e Hind III, com a sonda de cDNA da zeína de 14 kDa. O padrão de peso molecular, λ Hind III/ ϕ

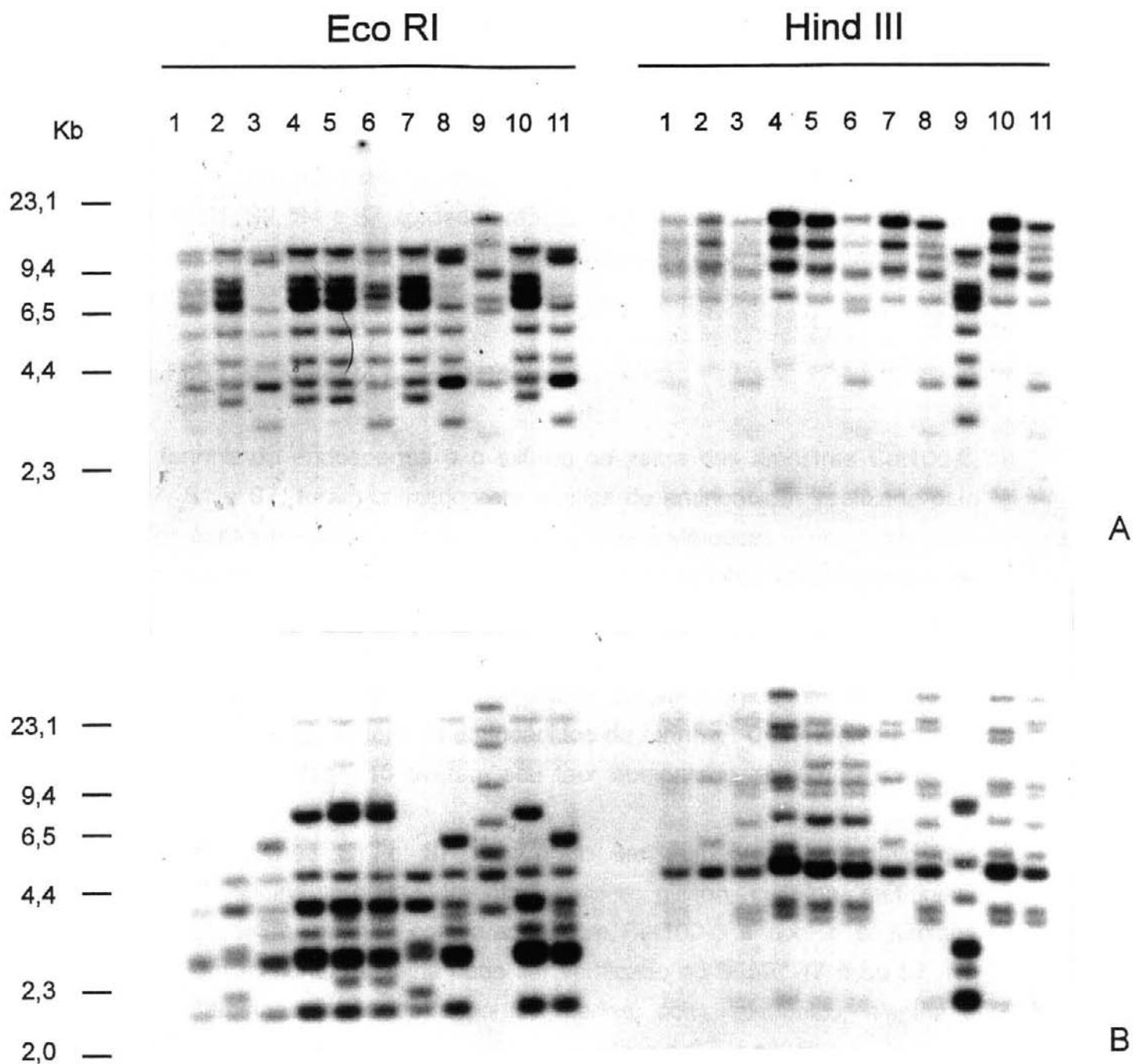


Figura 18 - Southern Blot da Linhagem Cat100-6 e dos Somaclones com Sondas de Zeína de 19 e 22 kDa

Hibridização das membranas contendo 10 μ g do DNA de F1(1), Cat100-6 (2), S1587-17 (3) e dos somaclones S1 a S8 (4 a 11), digeridos com as enzimas de restrição Eco RI e Hind III, com as sondas de cDNA da zeínas de 19 kDa (Fig. A) e 22 kDa (Fig. B). O padrão de peso molecular, λ Hind III/ ϕ x174Hae III (Gibco BRL), está indicado pelos números à esquerda.

Cat 100-6. O perfil de S6 não se relacionou com nenhum outro, e o perfil de S1 e S7, conforme mencionado anteriormente, destacou-se dos demais.

Por fim, na hibridização com a sonda de 19 kDa (Fig. 18 A), os somaclones S1, S2, S4 e S7 apresentaram um perfil idêntico ao de Cat100-6; S5 e S8 se comportaram como a progênie S1587-17, e S3 e S6 apresentaram perfis diferenciados.

9. Análise do Conteúdo de Aminoácidos

A farinha do endosperma e o extrato de zeína das amostras Cat100-6, S1587-17, S1 e S7, foram utilizados em análise de aminoácidos realizada pelo CQP- USP, conforme descrito no item 6 do Material e Métodos.

Os resultados da análise de aminoácidos da farinha, representados na tabela 1, mostram diferenças significativas em 16 dos aminoácidos analisados, sendo que o único aminoácido cujo conteúdo não variou significativamente foi fenilalanina. De um modo geral, o somaclone S7 apresentou um aumento no conteúdo de um maior número de aminoácidos da farinha. Dos 17 aminoácidos detectados pela análise, 16 tiveram seu teor aumentado em S7, 9 em S1 e somente um, em S1587-17.

Os somaclones S1 e S7 mostraram um aumento significativo dos aminoácidos histidina, arginina, treonina, prolina, glicina, cisteína, metionina, isoleucina e tirosina, quando comparados com Cat100-6 e com o somaclone S1587-17. Um aumento de lisina pôde ser verificado no S1587-17 e no S7. No entanto, os aminoácidos ácido aspártico, serina, ácido glutâmico, alanina e leucina tiveram seu conteúdo aumentado somente em S7, enquanto valina teve um aumento em todos os somaclones quando comparados com a linhagem original.

A análise de aminoácidos do extrato de zeína (Tab. 2) mostrou variações em somente 9 dos 17 aminoácidos analisados. Cat100-6 foi a amostra com maior conteúdo dos aminoácidos lisina, ácido aspártico e alanina. Os somaclones S1 e S7 mostraram um aumento do conteúdo de histidina, ácido glutâmico, cisteína e metionina, quando comparados com a linhagem original e com S1587-17. Este último teve um aumento dos aminoácidos isoleucina e fenilalanina, juntamente

| AA | Cat 100-6 | | S1587-17 | | S1 | | S7 | |
|-------|-------------------|------|-------------------|------|-------------------|------|-------------------|------|
| | $\mu\text{mol/g}$ | % | $\mu\text{mol/g}$ | % | $\mu\text{mol/g}$ | % | $\mu\text{mol/g}$ | % |
| *Lys | 10,25 | 1.0 | 12,10 | 1.3 | 11,75 | 1.1 | 12,60 | 1.0 |
| *His | 17,35 | 1.8 | 17,60 | 1.9 | 22,75 | 2.1 | 27,15 | 2.1 |
| *Arg | 19,05 | 1.9 | 19,25 | 2.0 | 23,80 | 2.2 | 28,20 | 2.2 |
| *Asp | 54,60 | 5.6 | 56,55 | 6.0 | 53,75 | 5.0 | 61,75 | 4.9 |
| *Thr | 32,00 | 3.3 | 32,10 | 3.4 | 36,40 | 3.4 | 43,05 | 3.4 |
| *Ser | 62,90 | 6.4 | 56,40 | 6.0 | 62,60 | 5.8 | 72,60 | 5.8 |
| *Glu | 188,80 | 19.3 | 177,35 | 18.8 | 198,40 | 18.5 | 235,70 | 18.7 |
| *Pro | 110,55 | 11.3 | 100,10 | 10.6 | 127,65 | 11.9 | 140,50 | 11.1 |
| *Gly | 42,80 | 4.4 | 43,45 | 4.6 | 53,00 | 4.9 | 60,65 | 4.8 |
| *Ala | 126,55 | 12.9 | 120,40 | 12.8 | 127,50 | 11.9 | 146,85 | 11.7 |
| *Cys | 07,10 | 0.7 | 04,95 | 0.5 | 10,95 | 1.0 | 18,30 | 1.4 |
| *Val | 37,40 | 3.8 | 44,40 | 4.7 | 52,60 | 4.9 | 60,85 | 4.8 |
| *Met | 14,75 | 1.5 | 12,85 | 1.4 | 25,30 | 2.4 | 29,60 | 2.3 |
| *Ile | 29,95 | 3.1 | 31,90 | 3.4 | 35,10 | 3.3 | 47,65 | 3.8 |
| *Leu | 154,65 | 15.8 | 147,75 | 15.7 | 156,45 | 14.6 | 188,70 | 15.0 |
| *Tyr | 27,45 | 2.8 | 25,55 | 2.7 | 33,85 | 3.2 | 37,75 | 3.0 |
| Phe | 41,85 | 4.3 | 40,00 | 4.2 | 38,90 | 3.6 | 47,55 | 3.8 |
| Trp | n.d. | - | n.d. | - | n.d. | - | n.d. | - |
| Total | 978,0 | 100 | 942,7 | 100 | 1070,75 | 100 | 1259,4 | 100 |

Tabela 1 - Composição de Aminoácidos da Farinha do Endosperma

Resultado da análise de aminoácidos da farinha do endosperma de Cat100-6, S1587-17, S1 e S7. Os valores mostrados na tabela 1 correspondem à média de duas repetições, e estão expressos em μmol de cada aa. por grama de farinha analisada, e em % de cada aminoácido analisado pelo total de aminoácidos analisados. O * indica os aminoácidos que apresentaram variação significativa ao nível de 5%, determinada pelo teste de Duncan.

| AA | Cat 100-6 | | S1587-17 | | S1 | | S7 | |
|-------|-----------|------|----------|------|--------|------|--------|------|
| | µmol/g | % | µmol/g | % | µmol/g | % | µmol/g | % |
| *Lys | 0,508 | 0.2 | 0,468 | 0.2 | 0,284 | 0.1 | 0,332 | 0.1 |
| *His | 4,472 | 1.5 | 4,604 | 1.6 | 5,536 | 1.9 | 6,060 | 2.0 |
| Arg | 4,072 | 1.4 | 4,108 | 1.5 | 4,296 | 1.5 | 4,476 | 1.5 |
| *Asp | 14,328 | 4.8 | 13,508 | 4.8 | 11,212 | 4.0 | 12,552 | 4.2 |
| Thr | 10,536 | 3.5 | 10,496 | 3.7 | 9,184 | 3.2 | 10,572 | 3.6 |
| Ser | 19,172 | 6.5 | 16,976 | 6.0 | 16,800 | 5.9 | 17,996 | 6.1 |
| *Glu | 47,628 | 16.0 | 47,052 | 16.8 | 57,272 | 20.2 | 56,548 | 19.2 |
| Pro | 36,088 | 12.2 | 33,548 | 11.9 | 35,524 | 12.5 | 36,072 | 12.2 |
| Gly | 10,096 | 3.4 | 9,148 | 3.3 | 10,424 | 3.7 | 10,764 | 3.6 |
| *Ala | 45,488 | 15.3 | 38,080 | 13.6 | 36,224 | 12.8 | 39,600 | 13.4 |
| *Cys | 2,280 | 0.8 | 1,024 | 0.4 | 3,536 | 1.2 | 4,184 | 1.4 |
| Val | 11,288 | 3.8 | 13,036 | 4.6 | 10,988 | 3.9 | 12,444 | 4.2 |
| *Met | 3,088 | 1.0 | 2,528 | 0.9 | 4,000 | 1.4 | 4,308 | 1.5 |
| *Ile | 10,280 | 3.5 | 11,244 | 4.0 | 8,352 | 2.9 | 8,704 | 2.9 |
| Leu | 51,152 | 17.2 | 49,644 | 17.7 | 47,068 | 16.6 | 48,156 | 16.3 |
| Tyr | 10,924 | 3.7 | 10,364 | 3.7 | 9,808 | 3.5 | 9,876 | 3.3 |
| *Phe | 15,316 | 5.2 | 14,692 | 5.2 | 12,404 | 4.4 | 12,252 | 4.1 |
| Trp | n.d. | - | n.d. | - | n.d. | - | n.d. | - |
| Total | 205,0 | 100 | 280,5 | 100 | 282,9 | 100 | 294,9 | 100 |

Tabela 2 - Composição de Aminoácidos do Extrato de Zeína.

Resultado da análise de aminoácidos do extrato de zeína de Cat100-6, S1587-17, S1 e S7. Os valores mostrados na tabela 2 correspondem à média de duas repetições, e estão expressos em µmoles de cada aa. por grama de farinha analisada, e em % de cada aminoácido pelo total de aminoácidos analisados. O * indica os aminoácidos que apresentaram variação significativa ao nível de 5%, determinada pelo teste de Duncan.

com S1 e Cat100-6, respectivamente.

É interessante notar que histidina, cisteína e metionina aumentaram nos somaclones S1 e S7 tanto na farinha do endosperma quanto no extrato de zeína, e que estes dois somaclones apresentaram aumento no conteúdo de um maior número de aminoácidos, tanto na análise de farinha do endosperma quanto na análise do extrato de zeína.

10. Análise do Nível de RNA Mensageiro das Classes de Zeína de 14, 19 e 22 kDa no Endosperma em Desenvolvimento

Quando o RNA total, extraído do endosperma em desenvolvimento da linhagem Cat100-6, e dos somaclones S1587-17, S1 e S7, foi hibridizado com a sonda de zeína de 14 kDa (Fig. 19), verificou-se uma maior expressão deste gene nos somaclones S1 e S7, quando comparados com a linhagem original e com S1587-17. A expressão deste gene em Cat100-6 foi tardia, se iniciando aparentemente em 18 DAP, enquanto nos somaclones o início da expressão foi em 10 DAP. Todos os materiais analisados apresentaram um pico de expressão em 18 DAP sendo que, no estágio de 28 DAP, a expressão caiu mais de 50% em Cat100-6 e S1587-17, se mantendo praticamente estável nos somaclones S1 e S7. A análise densitométrica das bandas do *Northern* mostrou que a quantidade de transcritos do gene de zeína de 14 kDa é, em média, 3 vezes maior nas progênies S1 e S7, em relação a Cat100-6, e 4 vezes maior que em S1587-17, nos cinco estágios do desenvolvimento analisados (Fig. 20).

A expressão do gene de zeína de 19 kDa variou pouco entre os quatro materiais analisados, com ausência de transcritos em 10 DAP e um nível quase que constante nos demais estágios do desenvolvimento (Fig. 21). A análise em densitômetro permitiu definir uma maior taxa de transcrição em Cat100-6. S1587-17 apresentou a menor taxa de transcrição deste gene, e S1 e S7 produziram um nível intermediário, com pouca variação entre eles (Fig. 22).

Quanto ao gene de zeína de 22 kDa, novamente as progênies S1 e S7 apresentaram um maior acúmulo de RNAm (Fig. 23). A expressão deste gene em Cat100-6 foi 1,5 vez menor do que em S1587-17 e aproximadamente duas vezes menor que nos somaclones S1 e S7. O pico de expressão para a linhagem Cat100-6 e para S1 se deu em 22 DAP, enquanto para S1587-17 ficou ao redor de 14 DAP, e para S7 ao redor de 28 DAP (Fig. 24).

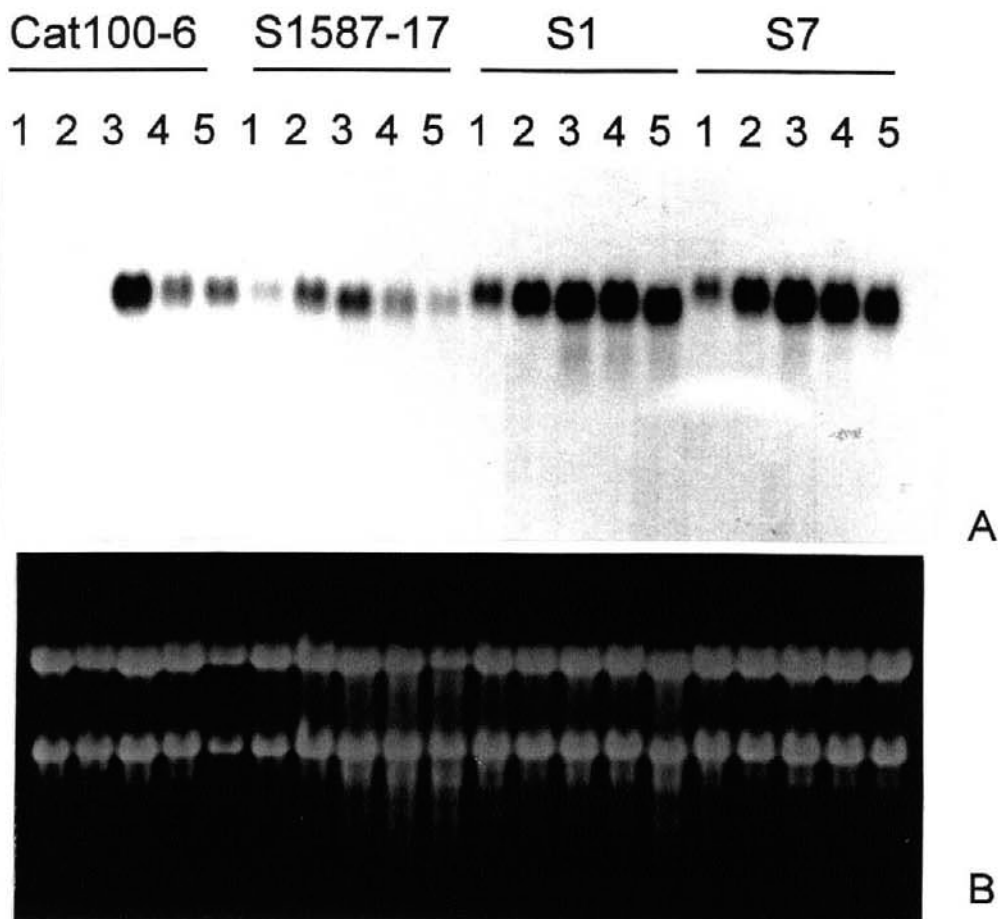


Figura 19 - Análise da Expressão do Gene de Zeína de 14 kDa

Northern blot contendo 6 μ g de RNA total da linhagem Cat100-6 e dos somaclones S1587-17, S1 e S7 em diferentes estágios do desenvolvimento da semente (1) 10 DAP (2), 14 DAP, (3) 18 DAP, (4) 22 DAP e (5) 28 DAP, hibridizado com a sonda de cDNA da zeína de 14 kDa (Fig. A). O gel corado com brometo de etídeo (Fig. B) é mostrado, indicando quantidades equivalentes de RNA aplicadas em cada canaleta.

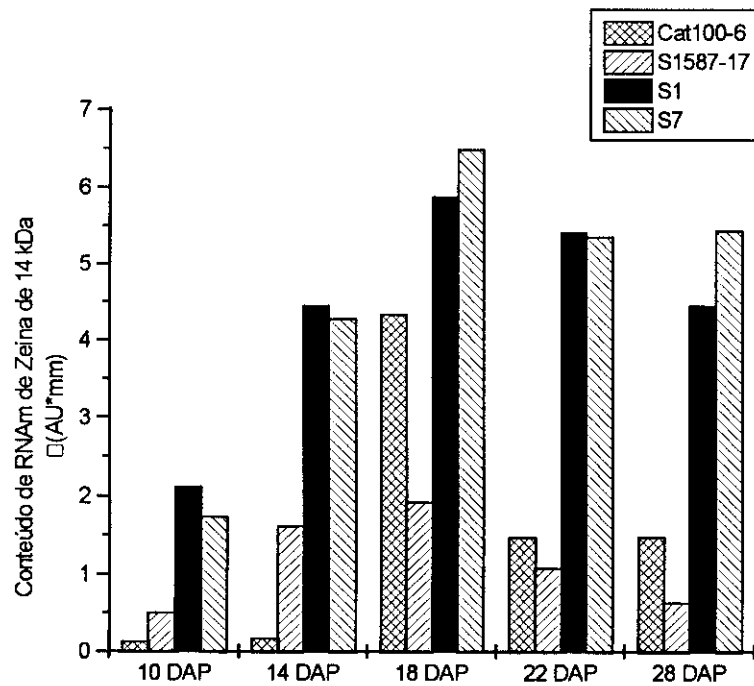


Figura 20 - Nível de Transcritos da Zeína de 14 kDa

Nível de transcritos correspondentes à zeína de 14 kDa, produzidos em Cat100-6, S1587-17, S1 e S7, nos cinco estágios do desenvolvimento analisados. O gráfico foi construído com base na área dos picos, obtidos pela leitura de intensidade das bandas do *Northern blot* em densitômetro a laser.

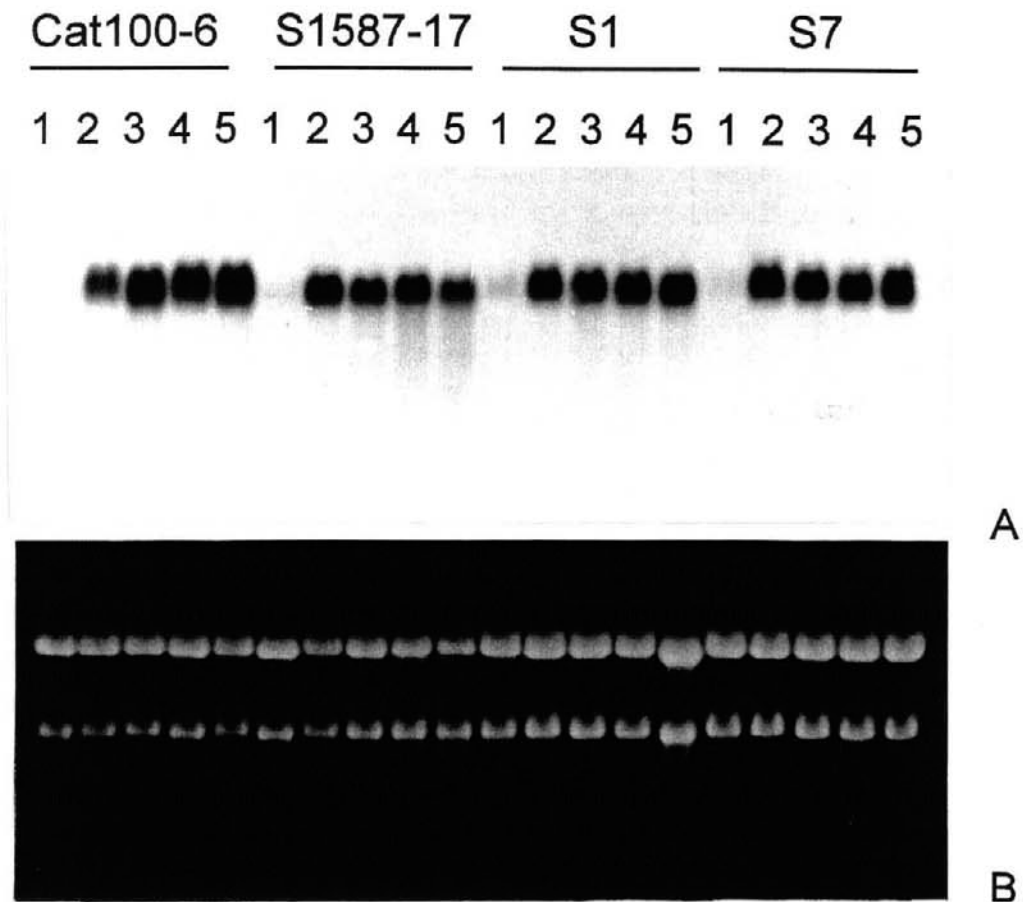


Figura 21 - Análise da Expressão do Gene de Zeína de 19 kDa

Northern blot contendo 6 μg de RNA total da linhagem Cat100-6 e dos somaclones S1587-17, S1 e S7 em diferentes estágios do desenvolvimento da semente (1) 10 DAP (2), 14 DAP, (3) 18 DAP, (4) 22 DAP e (5) 28 DAP, hibridizado com a sonda de cDNA da zeína de 19 kDa (Fig. A). O gel corado com brometo de etídeo (Fig. B) é mostrado, indicando quantidades equivalentes de RNA aplicada em cada canaleta.

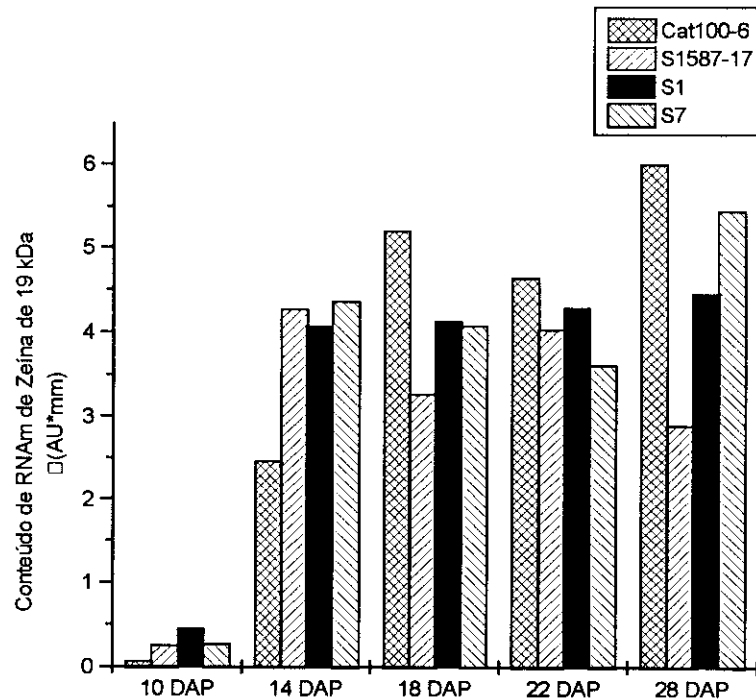


Figura 22 - Nível de Transcritos da Zeína de 19 kDa

Nível de transcritos correspondentes à zeína de 19 kDa, produzidos em Cat100-6, S1587-17, S1 e S7, nos cinco estágios do desenvolvimento analisados. O gráfico foi construído com base na área dos picos, obtidos pela leitura de intensidade das bandas do *Northern blot* em densitômetro a *laser*.

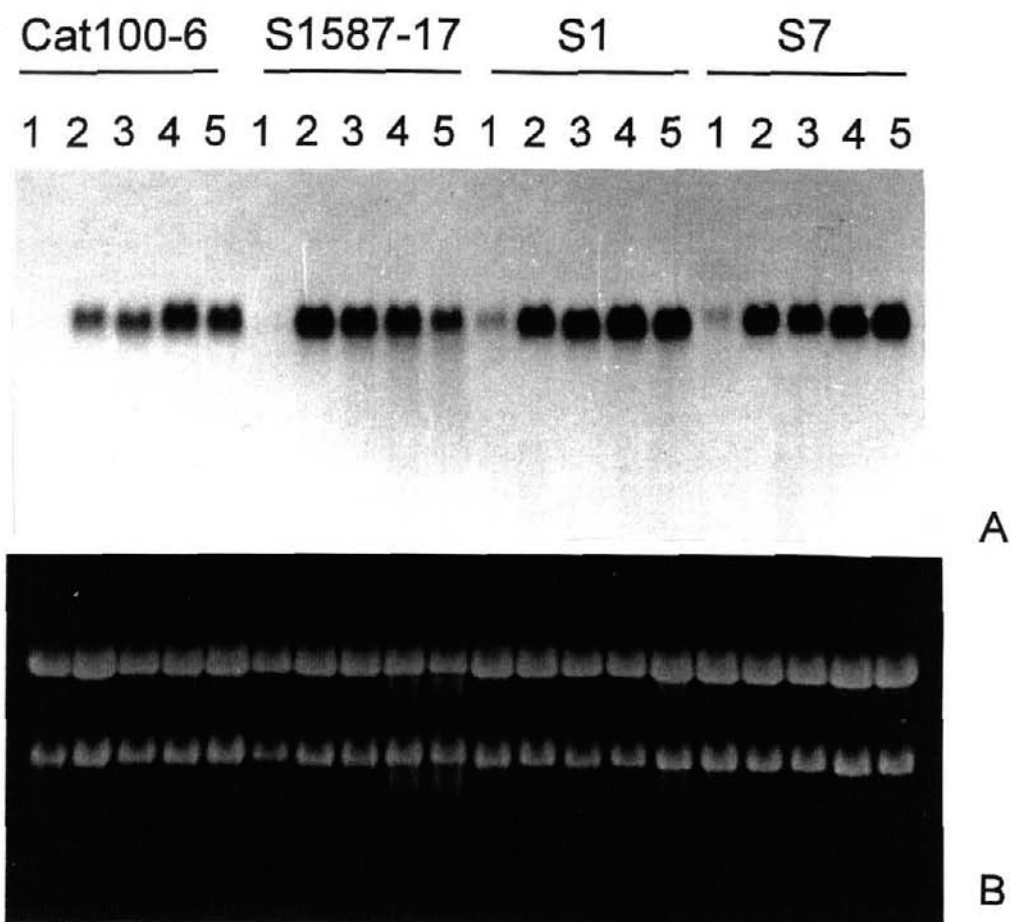


Figura 23 - Análise da Expressão do Gene de Zeína de 22 kDa

Northern blot contendo 6 μ g de RNA total da linhagem Cat100-6 e dos somaclones S1587-17, S1 e S7 em diferentes estágios do desenvolvimento da semente (1) 10 DAP (2), 14 DAP, (3) 18 DAP, (4) 22 DAP e (5) 28 DAP, hibridizado com a sonda de cDNA da zeína de 22 kDa (Fig. A). O gel corado com brometo de etídeo (Fig. B) é mostrado, indicando quantidades equivalentes de RNA aplicada em cada canaleta.

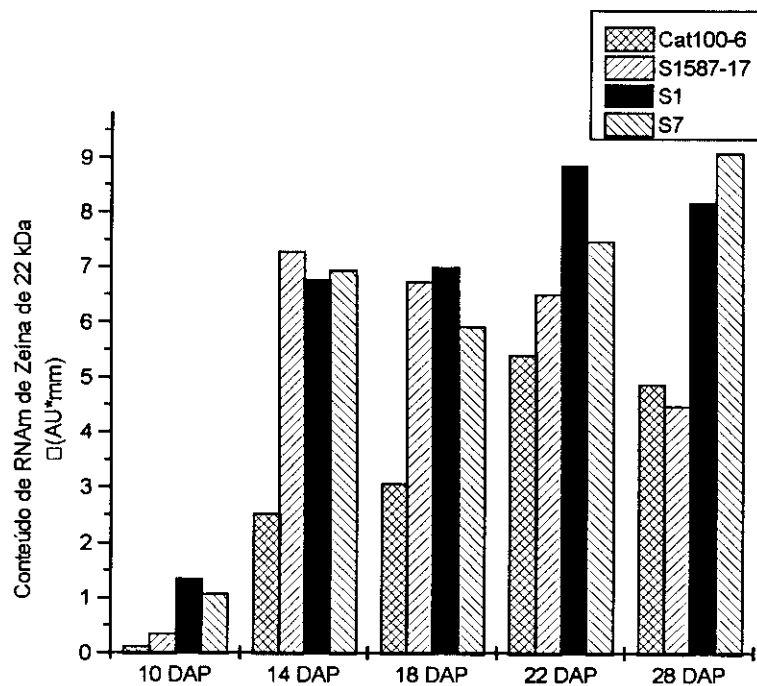


Figura 24 - Nível de Transcritos da Zeína de 22 kDa

Nível de transcritos correspondentes à zeína de 22 kDa, produzidos em Cat100-6, S1587-17, S1 e S7, nos cinco estágios do desenvolvimento analisados. O gráfico foi construído com base na área dos picos, obtidos pela leitura de intensidade das bandas do *Northern blot* em densitômetro a laser.

DISCUSSÃO

A obtenção de mutantes de milho com alterações nas proteínas de reserva, zeínas, se constitui de grande interesse em estudos de regulação desta família multigênica, visando a obtenção de novas variedades com maior teor de proteínas e aminoácidos essenciais.

Assim sendo, a presença de um material vegetal no laboratório, já caracterizado em estudos anteriores (Prioli, 1987; Targon *et al.*, 1991), mostrando a presença de sementes alteradas, serviu de ponto de partida para análise de alterações nos genes de zeína.

Mutações repetidas e duplicações gênicas têm sido reportadas para a família multigênica das zeínas. Diversas técnicas, entre elas a de isoeletrofocalização (IEF), permitem a detecção destas alterações. Cada genótipo de milho, quando resolvido em IEF, mostra um padrão específico de zeína, ou *fingerprint*, geralmente com pequenas diferenças quanto ao ponto isoelétrico, que podem ser úteis não somente na identificação de genótipos, mas também para detectar possíveis contaminações que possam ocorrer entre variedades de milho (Ottoboni & Steffensen, 1987).

A análise do somaclone S1587-17, da linhagem original Cat100-6 e de indivíduos da geração F1 em IEF mostrou dois perfis distintos, com 5 polipeptídeos de zeína alterados, sendo que três foram visualizados em Cat100-6, e dois no somaclone S1587-17 (Fig. 5). A geração F1, como era de se esperar, apresentou todas as bandas, visto que cada polipeptídeo corresponde ao produto de um gene estrutural, sendo herdado pelas gerações subsequentes (Soave *et al.*, 1978). Uma maior variabilidade é verificada quando as zeínas são analisadas por HPLC de fase reversa (Wilson, 1991), no entanto, alguns dos picos de HPLC consistem de mais do que uma zeína quando examinados por IEF. Embora a técnica de HPLC permita a detecção de um maior número de polipeptídeos, que nem sempre são visualizados em IEF, o maior inconveniente no uso rotineiro desta técnica, na análise de zeínas, é o caro equipamento requerido. A reprodutibilidade exata requer uma mistura de tampões cuidadosa,

que podem se alterar com o tempo (Wilson, 1990). Já o inconveniente da técnica de IEF seria a variação das distâncias de separação com o uso de diferentes anfólitos, mas este fato pode ser considerado irrelevante, visto que o padrão eletroforético se mantém.

No endosperma triplóide, a quantidade individual de cada zeína depende do número de genes que estão presentes. A ligação entre genes de zeína nos cromossomos 4 e 7 foi determinada utilizando-se IEF em poliacrilamida (Soave *et al.*, 1981, 1982). Já a análise das zeínas em IEF em agarose fornece um padrão de bandas mais definido, permitindo uma maior precisão na identificação das mesmas (Wilson, 1984). Além disso, a técnica de IEF parece ser o melhor sistema para se ter um panorama rápido de várias linhagens, pois um grande número de amostras pode ser analisado em um único gel (Wilson, 1985). Levando-se estes fatos em consideração, a metodologia de IEF foi escolhida para análise de segregação e ligação dos polipeptídeos de zeína alterados. A zeína total, extraída de sementes da população F2, foi submetida a análise em géis de IEF em agarose. Verificou-se a presença de um novo polipeptídeo, denominado polipeptídeo 6, presente em alguns indivíduos da população F2, e não encontrado anteriormente nos pais. Isto talvez se deva a natureza triplóide do endosperma, visto que o óvulo de um parental contribui com dois conjuntos idênticos de genes, enquanto o pólen de outro parental contribui com apenas um conjunto (Soave & Salamini, 1984).

Cada amostra no gel foi analisada quanto a ausência e presença das 6 bandas polimórficas detectadas. A presença de uma banda é dominante sobre sua ausência, e a quantidade do componente em F1 é relacionada com a dose do gene presente (Soave & Salamini, 1984). Deve-se ressaltar que, como o endosperma é um tecido triplóide, a presença de uma banda pode significar uma, duas ou três doses do gene, mas não foram realizadas análises para a dosagem, já que a ausência e presença de bandas se constitui em parâmetro suficiente para a determinação de ligação dos genes de zeína alterados (Wilson, 1992).

A heterogeneidade detectada em IEF requer o uso combinado de eletroforese em SDS-PAGE, numa análise equivalente a 2-D, que permite

determinar o peso molecular individual de cada polipeptídeo. Além disso, uma banda única de IEF, quando submetida a SDS-PAGE, pode revelar duas ou mais bandas de pesos moleculares diferentes, que não podiam ser detectadas em IEF por possuírem um mesmo pI (Wilson, 1986).

Conforme verificado por análise de 2-D, cinco dos seis polipeptídeos alterados pertencem a classe de zeína de 22 kDa, enquanto somente um polipeptídeo corresponde a classe de zeína de 19 kDa. Os componentes menores, observados juntamente com os polipeptídeos 3 e 5 podem ser provenientes de contaminação no processo de isolamento da banda sendo que, existem outras bandas que se encontram bastante próximas no gel, ou a banda única de IEF pode corresponder a mais de um polipeptídeo, de peso molecular diferenciado.

Os mapas de ligação, obtidos através da análise de segregação dos polipeptídeos alterados, mostraram os genes 1 (22 kDa), 3 (22 kDa) e 4 (19 kDa) agrupados em um *cluster* e os genes 2 e 6, ambos pertencentes a classe de zeína de 22 kDa, agrupados separadamente em outro *cluster*. O fato de não terem sido utilizados marcadores moleculares de localização conhecida no genoma, que co-segrem com os polipeptídeos de zeína, não permitiu uma localização precisa destes genes. No entanto, os genes alterados pertencem as classes de zeína de 19 e 22 kDa, conforme determinado anteriormente por análise de 2-D, e já se sabe que os *clusters* destes genes se localizam nos cromossomos 4 e 7 do milho (Soave & Salamini, 1984). Este dado forneceu um indício da localização dos genes de zeína alterados e facilitou a seleção das sondas a serem utilizadas no mapeamento dos genes por RFLP.

A determinação da ligação dos genes de zeína e seu mapeamento em cromossomos, através de IEF, tem sido bastante utilizada por ser uma técnica simples e que não requer muito tempo (Wilson, 1989). Entretanto, algumas zeínas que diferem atualmente, provavelmente não foram separadas por IEF, de modo que o mapeamento utilizando-se o DNA pode diferir do mapeamento feito com proteínas. Evidências crescentes sugerem que marcadores do tipo RFLP revelam mais polimorfismo entre genótipos que os marcadores protéicos

(Helentjaris *et al.*, 1986; Helentjaris, 1987; Burr *et al.*, 1983). Os marcadores RFLP são praticamente ilimitados em número, estáveis e, em sua maioria, herdados como marcadores mendelianos co-dominantes, livres de efeitos pleiotrópicos (Evola *et al.*, 1986; Helentjaris *et al.*, 1985). O grande número de *loci* de RFLP polimórficos no genoma do milho (Burr *et al.*, 1983; Helentjaris *et al.*, 1985; Evola *et al.*, 1986) permite a construção rápida de mapas de ligação (Helentjaris *et al.*, 1986; Coe *et al.*, 1988; Burr *et al.*, 1988).

O mapeamento dos genes de zeína alterados, através da hibridização com sondas de RFLP dos cromossomos 4 e 7 do milho, utilizou 56 indivíduos da população F2. A hibridização do DNA digerido com Eco RI, Hind III, Bam HI e Eco RV, com a sonda de cDNA dos genes de zeína de 19 e 22 kDa, produziu padrões de restrição distintos. Isto pode ser explicado pelo fato das enzimas cortarem os genes em diferentes regiões, sendo que a região estrutural dos genes de α -prolaminas não possui sítios para a enzima de restrição Eco RI (Larkins *et al.*, 1984). A análise do padrão de restrição do DNA dos pais permitiu identificar o surgimento de algumas bandas e o desaparecimento de outras. Estas diferenças podem ser devidas a mutações que alteram, eliminam ou adicionam sítios alvos de enzimas de restrição, ou também a duplicação ou deleção de um ou mais genes nestes materiais.

O polimorfismo obtido na hibridização com sondas de RFLP, co-segregando com o polimorfismo obtido em hibridização com os genes de zeína, permitiu a localização de 6 genes de zeína no braço curto do cromossomo 4, próximos aos marcadores moleculares php20725, umc31 e #2. Dos genes mapeados, três pertencem a família das zeínas de 19 kDa e três pertencem a família das zeínas de 22 kDa.

Os genes codificando para as zeínas de 19 e 22 kDa foram mapeados em *loci* distanciados nos cromossomos 4, 7 e 10 (Soave *et al.*, 1978; Salamini & Soave, 1982). O mapeamento realizado por Soave & Salamini (1984), utilizando marcadores protéicos, localizou vinte genes de α -zeína no total, sendo 10 no cromossomo 4 (oito no braço curto e 2 no braço longo), 9 no braço curto do cromossomo 7 e um no braço longo do cromossomo 10. Esta organização

mostra a presença de sítios ou *clusters* contendo genes codificando para polipeptídeos de zeína de pesos moleculares diferenciados (19 e 22 kDa), principalmente no braço curto do cromossomo 4, próximo ao marcador *f12*. Os autores identificaram 4 genes de zeína de 22 kDa e 3 genes de zeína de 19 kDa nesta região. A localização de 3 genes de zeína de 19 e 3 de 22 kDa no braço curto do cromossomo 4, próximos ao marcador *f12*, utilizando-se a linhagem Cat100-6 e o mutante de milho S1587-17, condiz com a descrita por Soave e Salamini (1984). Este resultado mostra, portanto, que a localização dos genes de zeína mapeados não foi alterada no somaclone S1587-17.

Quanto ao número de genes mapeados, este pode variar conforme a linhagem de milho analisada. Estimativas para o número genes de zeína vão de menos de 20 (Pedersen *et al.*, 1980) a mais de 150 genes (Viotti *et al.*, 1979). Wilson & Larkins (1984) utilizaram clones de cDNA de α -zeína em experimentos de *Southern* e estimaram que existem aproximadamente 50 genes de zeína de 19 kDa e 25 genes de zeína de 22 kDa na linhagem W64A. No caso das linhagens de milho utilizadas em nosso trabalho, foram mapeados seis genes alterados. Um sétimo gene, pertencente a classe de zeína de 19 kDa e identificado por digestão com a enzima Eco RI, não se mostrou ligado aos marcadores utilizados, podendo estar localizado em outro cromossomo, ou até mesmo em um agrupamento diferente no cromossomo 4. No entanto, o polimorfismo de restrição obtido pela hibridização da sonda de 22 kDa com o DNA de F2 digerido com Bam HI, mostrou alteração em uma única banda de difícil leitura, não tendo sido utilizado no mapeamento. Caso este polimorfismo cosegregasse com os marcadores utilizados, um quarto gene de zeína de 22 kDa teria sido mapeado nesta região, correspondendo ao número de genes mapeados próximos a estes marcadores e à classe de zeína a que estes genes pertencem, descritos por Soave e Salamini (1984).

Spena *et al.* (1982) sugere que a presença de genes diferentes em um mesmo agrupamento é consequência do surgimento de variantes de peso molecular, devido a ocorrência de mutações *nonsense*, resultando na terminação prematura da transcrição. Os genes de zeína possuem uma alta taxa (32%) de

códons que podem mudar para códons de terminação em uma única alteração, sendo que a frequência de geração de códons de terminação nestes genes é duas vezes maior (6,8%) que para a maioria dos genes (Heidcker & Messing, 1986).

Técnicas simples, tais como coloração com iodo e análise da morfologia e transparência da semente, são utilizadas na seleção de mutantes de milho, cuja síntese de carboidratos ou proteínas de reserva tenha sido afetada. Isto levou a caracterização genética de *loci* que afetam a síntese de proteínas de reserva, como as zeínas, e de enzimas envolvidas na biossíntese de amido, como a glucosil transferase ou sucrose sintetase, além das enzimas responsáveis pela síntese de antocianina (Heidecker & Messing, 1986).

Como as principais alterações em genes de zeína, detectadas e mapeadas no somaclone S1587-17, foram nas classes de 19 e 22 kDa, outros oito somaclones, denominados S1 a S8, foram selecionados com base em alterações morfológicas das sementes, com o objetivo de se detectar alterações nos genes correspondentes às demais classes de zeína. Sendo as zeínas de 19 e 22 kDa as principais responsáveis pela extensa heterogeneidade de carga, observada quando se submete a zeína total a IEF (Heidecker & Messing, 1986), e sabendo-se que as demais classes de zeína correspondem a uma única banda em IEF (Lee *et al.*, 1976; Righetti *et al.*, 1977), podem ter ocorrido alterações nas classes de zeína de 10, 14, 16 e 27 kDa em S1587-17 que não foram detectadas por esta metodologia.

A análise destes somaclones em SDS-PAGE, juntamente com a linhagem original, e posterior análise densitométrica, permitiu detectar alterações no conteúdo das diferentes classes de zeína, com exceção da zeína de 10 kDa, cujo conteúdo não variou significativamente entre os somaclones e Cat100-6. No entanto, a banda correspondente a esta proteína é fracamente visualizada no gel, visto que a mesma é pouco abundante no endosperma do milho. Isto talvez possa ter prejudicado sua análise densitométrica. Ainda assim, a aplicação de uma quantidade maior de proteína total no gel, prejudicaria a visualização de proteínas mais abundantes, como as zeínas de 27, 22 e 19 kDa.

É interessante notar que duas progênies S1 e S7, apresentaram um aumento de aproximadamente 100% da zeína de 14 kDa, rica em metionina, quando comparados com Cat100-6, se destacando das demais progênies analisadas.

O somaclone S1587-17 teve um redução de aproximadamente 60% no conteúdo da zeína de 22 kDa e também apresentou uma redução bastante acentuada no conteúdo da zeína de 19 kDa, comparado-se com a linhagem original. A alteração destas proteínas no somaclone S1587-17, pode estar relacionada com as modificações nos genes de zeína de 19 e 22 kDa, anteriormente descritas neste trabalho. No entanto, é difícil relacionar a diminuição destas proteínas com uma alteração no número de cópias do gene, visto que nem sempre os genes que são amplificados ou deletados são expressos, podendo corresponder a pseudogenes. Uma diminuição do conteúdo de zeína de 22 kDa é observada nos mutantes *o2* e *f12* (Lee *et al.*, 1976; Jones *et al.*, 1977; Jones, 1978). Já a classe de zeína de 19 kDa é afetada principalmente pelos mutantes *o7* e *f12* (DiFonzo *et al.*, 1980; Jones, 1978). A diminuição da classe de zeína de 22 kDa no mutante *o2* se deve a um diminuição do RNAm correspondente (Burr & Burr, 1982; Langridge *et al.*, 1982), e não é atribuída a defeitos em síntese, transporte ou processamento da proteína (Burr & Burr, 1982).

O somaclone S7 foi o que apresentou um maior conteúdo da zeína de 27 kDa, três vezes maior que o encontrado em Cat100-6. Os demais somaclones, com exceção de S1587-17, também tiveram um aumento na γ -zeína de 27 kDa, que variou de 1,5 a 2,5 vezes em relação a Cat100-6. O desenvolvimento de um endosperma vítreo em mutantes opaco, verificado em milhos QPM, tem sido relacionado com um aumento de duas a três vezes no conteúdo da γ -zeína de 27 kDa (Wallace *et al.*, 1990). Em cruzamentos recíprocos entre mutantes *o2* de endosperma vítreo e opaco, o grau de modificação é altamente correlacionado com a dosagem de genes modificadores e a quantidade de γ -zeína (Lopes & Larkins, 1991; Geetha *et al.*, 1991). Isto sugere que os modificadores promovem o acúmulo de γ -zeína, estando envolvido na formação de um endosperma vítreo.

O fato dos somaclones S1 e S7 apresentarem um perfil de restrição idêntico, diferindo dos demais perfis em análise de *Southern* das zeínas de 14 e 22 kDa, se relaciona com os dados de SDS-PAGE, onde foi verificado um aumento no conteúdo destas duas proteínas nestes mutantes, também diferenciando-os dos demais. O comportamento diferenciado destes mutantes, resultando em um aumento da zeína de 14 kDa assim como a diminuição do conteúdo da zeína de 22 kDa no mutante S1587-17, direcionou a escolha destas amostras para um estudo da composição de aminoácidos da farinha e da zeína total.

É interessante notar que dos oito aminoácidos essenciais requeridos pelo homem e por outros animais monogástricos, 6 tiveram seu conteúdo aumentado na farinha: lisina em S1587-17; leucina em S7; treonina, metionina e isoleucina em S1 e S7 e valina em todos os somaclones. Na análise do extrato de zeína, Cat100-6 foi a amostra com o maior conteúdo de lisina. Os somaclones S1 e S7 mostraram um aumento também no extrato de zeína, do aminoácido metionina, enquanto isoleucina aumentou em S1587-17 e S1, e fenilalanina em S1587-17 e Cat100-6. O aumento de lisina no endosperma do somaclone S1587-17 pode ser relacionado com a diminuição do conteúdo da zeína de 22 kDa verificado em SDS-PAGE. O mesmo se aplica aos somaclones S1 e S7, que tiveram um aumento de metionina tanto na farinha quanto na zeína, assim como um aumento da zeína de 14 kDa, rica em metionina. Mais uma vez é possível encontrar relação entre os dados de análise de aminoácidos e os dados de proteína, visto que S7 mostrou aumento de cisteína, assim como da zeína de 27 kDa, rica neste aminoácido.

O aumento de metionina, histidina, cisteína e ácido glutâmico na fração zeína se refletiu em um aumento destes aminoácidos no endosperma. Entretanto, o aumento destes aminoácidos na farinha não se deve somente a um aumento dos mesmos na zeína, visto que a comparação das duas análises permite determinar um aumento destes aminoácidos também na fração que corresponde às demais proteínas.

Levando-se em conta o fato de que aproximadamente 50% do total das proteínas na semente madura correspondem às prolaminas, que são deficientes em aminoácidos essenciais como lisina, triptofano e metionina, o milho é um recurso subótimo para a alimentação do homem. A deficiência em lisina e triptofano é suprida com alimentos derivados da soja. No entanto, este recurso é limitante em metionina, que é adicionada à dieta através de produtos de fermentação bacteriana. Assim sendo, a análise genética das proteínas de reserva ricas em metionina pode fornecer informações úteis no melhoramento da qualidade nutricional do milho.

Phillips *et al.* (1981) reportaram a utilização de uma linhagem de milho BSSS-53, cujo conteúdo de metionina é 30% maior do que na linhagem W23. Esta linhagem foi utilizada em análise de aminoácidos das diferentes frações proteicas do endosperma e verificou-se que a variação no conteúdo de metionina deve-se, principalmente, a um aumento da classe de zeína de 10 kDa, e diminuição no conteúdo da zeína de 22 kDa (Phillips & McClure, 1985). Esta mesma linhagem foi utilizada no mapeamento do gene que codifica para a zeína de 10 kDa (Kiriara & Messing, 1988) e na localização de um *locus* que regula a expressão deste gene no braço curto do cromossomo 4 (Benner *et al.*, 1989; Chaudhri & Messing, 1995). Este *locus*, *dzt1*, parece ser o responsável por um aumento na síntese da zeína de 10 kDa que, conseqüentemente, leva a um aumento de metionina. Evidências de aumento de metionina devido a presença de um gene regulador da zeína de 14 kDa não foram reportadas. Isto talvez se deva ao fato de todos os trabalhos realizados utilizarem uma mesma linhagem, a BSSS-53.

As linhagens normais de milho Oh43 e W23 contém 2,4 e 3,05 g de metionina/100 g de proteína total, respectivamente (Misra *et al.*, 1974; Phillips & McClure, 1985). A linhagem normal de milho Cat100-6 utilizada em nosso trabalho apresenta aproximadamente 2,3 g de metionina em 100g de proteína total. Verificou-se que os somaclones S1 e S7 possuem um aumento de aproximadamente 45% no conteúdo de metionina do endosperma, e de aproximadamente 25% no conteúdo de metionina da fração zeína, em relação a

Cat100-6. Parte deste aumento, portanto, se deve também às outras frações protéicas, não zeínas. Quanto ao aumento de metionina na zeína, este se deve a um aumento no conteúdo da proteína de 14 kDa verificado nestes materiais, como descrito anteriormente. Para confirmar um aumento na expressão do gene correspondente à proteína de 14 kDa, analisou-se o nível de transcritos do gene da β -zeína através de *Northern blot*.

A linhagem original e os somaclones S1587-17, S1 e S7 foram utilizados em experimentos de *Northern blot* para se analisar a expressão dos genes de zeína de 14, 19 e 22 kDa ao longo do desenvolvimento. A data de início em 10 DAP foi escolhida com base do início da transcrição dos genes de zeína em 12 DAP, descrita por Jones *et al.* (1977). Embora o mesmo autor tenha determinado o término da síntese em 50 DAP, o último estágio analisado em nosso trabalho foi o de 28 DAP, com base em observações descritas por Marks *et al.* (1985), de que após este estágio, o nível de RNA declina gradualmente.

O resultado da análise de *Northern blot* com o gene de zeína de 14 kDa mostra que os somaclones S1 e S7 tiveram um aumento de aproximadamente três vezes na quantidade de transcritos do gene de zeína de 14 kDa, quando comparados com Cat100-6. A expressão deste gene se iniciou em 10 DAP, em S1 e S7, e somente em 18 DAP na linhagem original. Este início de transcrição em 18 DAP, com um alto conteúdo de transcritos, não se relaciona com os dados descritos por Kirihara *et al.* (1988), utilizando a linhagem W23 na hibridização com o gene de zeína de 14 kDa. Como o RNA estava presente em todos os estágios do desenvolvimento, o que pode ser confirmado pelos géis correspondentes, corados com brometo de etídeo, a ausência de ao menos uma pequena quantidade de transcritos em 14 DAP pode ser explicada por um artefato da técnica de hibridização. Além do início de transcrição tardio, Cat100-6 teve uma queda de aproximadamente 50% na expressão em 28 DAP, enquanto nos somaclones S1 e S7 a expressão se manteve estável neste estágio. Este comportamento, com um alto nível de transcritos observado nos mutantes S1 e S7 em 28 DAP, está de acordo com o observado por Kirihara *et al.* (1988), na linhagem BSSS-53. Os dados obtidos por *Northern* indicam, portanto, que o

grande aumento no conteúdo de metionina de S1 e S7, pode estar relacionado com o aumento da proteína de 14 kDa, rica em metionina, e com o aumento do nível de transcritos deste gene nestes materiais, o que faz destes mutantes um recurso para a análise da regulação do gene de zeína de 14 kDa, ainda pouco estudado.

Análise de *Northern* da zeína de 19 kDa mostrou uma variação pouco significativa entre a linhagem Cat100-6 e os somaclones. O gráfico produzido por análise densitométrica mostra uma maior quantidade de transcritos em Cat100-6. As oscilações no nível de transcritos nos estágios do desenvolvimento 18, 22 e 28 DAP não foram significativas, e podem ser explicadas por pequenas diferenças na quantidade de RNA destas amostras aplicadas no gel.

Já a análise de *Northern blot* da zeína de 22 kDa, de Cat100-6 e dos três somaclones, mostra uma menor expressão deste gene na linhagem original e em S1587-17, o que pode ser relacionado com uma menor quantidade da proteína verificada nestas amostras por SDS-PAGE e com o aumento de lisina, observado na análise de aminoácidos do endosperma de S1587-17 e na análise do extrato de zeína de Cat100-6. As alterações verificadas nos genes de zeína de 22 kDa, tanto ao nível de proteínas expressas, quanto ao nível da taxa de transcrição destes genes, podem estar relacionadas com regulação pelo *locus o2*, visto que a sonda *o2* utilizada no mapeamento mostrou-se polimórfica para os dois materiais. No entanto, seria necessária a análise de *Northern* deste gene para verificar se ocorreria diferença de expressão em Cat100-6 e em S1587-17.

As alterações do gene de zeína de 14 kDa em S1 e S7 não parecem estar relacionadas com uma mutação no gene *o2*, visto que os mutantes *o2* apresentam uma diminuição na taxa de síntese desta zeína, de aproximadamente 60%, como reportado por Cord Neto *et al.* (1995). Enquanto as mutações *o2* e *fl2* resultam em um decréscimo no conteúdo de zeínas, nas sementes dos somaclones S1 e S7 uma classe de zeína, a de 14 kDa, é aumentada. O mecanismo que levou a um aumento no conteúdo desta proteína e na taxa de transcrição não foi elucidado. Uma futura análise do promotor deste gene nestes materiais pode levar à descoberta de sequências reguladoras responsáveis por

este aumento. Embora não tenham sido identificados *loci* regulatórios para este gene, esta hipótese não pode ser de todo descartada. A implementação de uma população F2, obtida a partir de cruzamento entre a linhagem original Cat100-6 e um dos somaclones, S1 ou S7, em experimentos de mapeamento, pode levar a localização do gene alterado e de seu possível *locus* regulatório.

A descoberta destes mutantes, com alterações nos genes de zeína de 14 kDa pode levar, a longo prazo, à descoberta de novos mecanismos responsáveis pelo aumento da expressão desta proteína, com consequente aumento no conteúdo de metionina, contribuindo para o melhoramento nutricional do milho.

CONCLUSÕES

1. As principais classes de zeína alteradas no somaclone S1587-17 foram as α -zeínas de 19 e 22 kDa.
2. Cinco genes de zeína de 19 e 22 kDa foram agrupados em dois grupos de ligação, por análise de segregação da população F2 em IEF. Os polipeptídeos 1 (22 kDa), 3 (22 kDa) e 4 (19 kDa) foram agrupados em um *cluster*, separados dos polipeptídeos 2 e 6, ambos de 22 kDa, e agrupados em um segundo *cluster*.
3. Seis genes de zeína alterados em S1587-17, sendo três deles pertencentes à família das zeínas de 19 kDa e três correspondentes à família das zeínas de 22 kDa, foram mapeados no braço curto do cromossomo 4, próximos aos marcadores moleculares UMC 31, php20725 e *fl2*. A localização destes genes não foi alterada no somaclone S1587-17.
4. A análise fenotípica de alterações nas sementes, combinada com a técnica de SDS-PAGE, permitiu a identificação de mutantes com alterações significativas nas classes de zeína de 14, 22 e 27 kDa. Foram identificados dois mutantes, S1 e S7, com um aumento de aproximadamente 100% na proteína de 14 kDa, quando comparados com a linhagem da qual foram derivados, Cat100-6. O somaclone S7 mostrou também um aumento de aproximadamente 3 vezes no conteúdo da γ -zeína de 27 kDa, enquanto o somaclone S1587-17 teve uma diminuição de aproximadamente 60% no conteúdo da zeína de 22 kDa, em comparação com Cat100-6.
5. O perfil de restrição, obtido por análise de *Southern* com as sondas de zeína de 14 e 22 kDa, diferenciou os somaclones S1 e S7 dos demais somaclones.

6. Os somaclones S1 e S7 apresentaram um alto conteúdo de metionina no endosperma e na fração protéica zeína. Houve um aumento de aproximadamente 45% no conteúdo deste aminoácido essencial, com relação a linhagem de milho Cat100-6. Este aumento se deve, provavelmente, a uma maior quantidade da proteína de 14 kDa, rica em metionina, encontrada nestes mutantes.

7. Os somaclones de milho S1 e S7 apresentaram um aumento de 3 vezes na taxa de transcrição do gene de zeína de 14 kDa, quando comparados com a linhagem original Cat100-6, acarretando um aumento da produção da proteína.

8. O somaclone S1587-17 apresentou um baixo nível de transcritos do gene de zeína de 22 kDa, explicando o baixo conteúdo desta proteína encontrado neste mutante.

9. A caracterização destes mutantes com alterações nas proteínas de reserva é de fundamental importância no estudo de regulação dos genes de zeína, permitindo, a longo prazo, a obtenção de sementes mais ricas em proteínas e aminoácidos essenciais.

BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Aukerman, M.J. and Schmidt, R.J. (1994).** Regulation of α -zein gene expression during maize endosperm development. *Res. Probl. Cell Diff.* 20:209-233.
- Bagga, S., Adams, H., Kemp, J.D. and Gopalan, C.S. (1995).** Accumulation of 15-kilodalton zein in novel protein bodies in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 107:13-23.
- Benner, M.S., Phillips, R.L., Kiriara, J.A. and Messing, J.W. (1989).** Genetic analysis of methionine-rich storage protein accumulation in maize. *Theor. Appl. Genet.* 78:761-767.
- Benoist, C., O'Hare, K., Breathnach, R. and Chambon, P. (1980).** The ovalbumin gene-sequence of putative control regions. *Nucl. Acids Res.* 8:127-142.
- Bianchi, M.W. and Viotti, A. (1988).** DNA methylation and tissue-specific transcription of the storage protein genes of maize. *Plant Mol. Biol.* 11:203-214.
- Bietz, J.A., Paulis, J.W. and Wall, J.S. (1979).** Zein subunit homology revealed through amino-terminal sequence analysis. *Cereal Chem.* 56:327-332.
- Boronat, A., Martínez, M.C., Reina, M., Puigdomènech, P. and Palau, J. (1986).** Isolation and sequencing of a 28 kDa glutelin-2 gene from maize: Common elements in the 5' flanking regions among zein and glutelin genes. *Plant Sci.* 47:95-102.
- Bright, W.J. and Shewry, P.R. (1983).** Improvement of quality in cereals. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 1:49-93.

- Brown, J.W.S., Wandelt, C., Feix, G., Neuhaus, G. and Schweiger, H.G. (1986).** The upstream regions of zein genes: Sequence analysis and expression in the unicellular alga *Acetabularia*. *Eur. J. Cell Biol.* 42:161-170.
- Brown, P.T.H. (1989).** DNA methylation in plants and its role in tissue culture. *Genome* 31:717-729.
- Burr, B. and Burr, F. (1976).** Zein synthesis in maize endosperm by polyribosomes attached to protein bodies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73:515-519.
- Burr, B. and Burr, F.A. (1978).** *In vitro* uptake and processing of prezein and others maize preproteins by maize membranes. *J. Cell Biol.* 90:427-434.
- Burr, B., Burr, F.A., St John, T.P., Thomas, M. and Davis, R.W. (1982).** Zein storage protein gene family in maize. *J. Mol. Biol.* 154:33-49.
- Burr, B., Burr, F.A., Thompson, K.H., Albertsen, M.C. and Stuber, C.W. (1988).** Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics* 188:519-526.
- Burr, B., Evola, S.V., Burr, F.A. and Beckmann, J.S. (1983).** The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding. In: Setlow, J.K. and Hollaender, A. (eds.) *Genetic Engineering*, vol. 5. Plenum Press, NY, pp. 45-59.
- 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.
- 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.

- Chaleff, R.S.** (1981). Genetics of higher plants. In: Applications of Cell Culture, Cambridge Univ. Press, N.Y.
- Chaudhuri, S. and Messing, J.** (1995). RFLP mapping of the maize *dzr1 locus*, which regulates methionine-rich 10 kDa zein accumulation. *Mol. Gen. Genet.* 246:707-715.
- Coe, E.H., Neuffer, M.G., Hoisington, D.A.** (1988). The genetics of corn. In: Sprague, G.F. and Dudley, J.W. (eds.) Corn and Corn Improvement, 3rd ed. Am. Soc. Agron., Madison, Wis., pp. 81-258.
- Cooper, D.B., Sears, R.G., Lookhart, G.L. and Jones, B.L.** (1986). Heritable somaclonal variation in gliadin proteins of wheat plants derived from immature embryo callus culture. *Theor. Appl. Genet.* 71:784-790.
- Cord Neto, G., Yunes, J.A., da Silva, M.J., Vettore, A.L., Arruda, P. and Leite, A.** (1995). The involvement of *opaque-2* on β -prolamin gene regulation in maize and *Coix* suggests a more general role for this transcriptional activator. *Plant Mol. Biol.* 27:1015-1029.
- Cruz-Alvarez, M., Kirihara, J.A. and Messing, J.** (1991). Post-transcriptional regulation of methionine content in maize kernels. *Mol. Gen. Genet.* 225:331-339.
- Das, O. P., Poliak, E., Ward, K. and Messing, J.** (1991). A new allele of the duplicated 27 kD zein *locus* of maize generated by homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* 19:3325-3330.
- Das, O.P. and Messing, J.W.** (1987). Allelic variation and differential expression at the 27-kilodalton zein *locus* in maize. *Mol. Cell. Biol.* 7:4490-4497.
- De Klerk, G.J.** (1990). How to measure somaclonal variation. *Acta Bot. Neerl.* 39:129-144.

- De Rose, R.T., Ma, D.-P., Kwon, I.-S., Hasnain, S.E., Klassy, R.C. and Hall, T.C.** (1989). Characterization of the kafirin gene family from sorghum reveals extensive homology with zein from maize. *Plant Mol. Biol.* 12:245-256.
- Deutscher, D.** (1978). The current status of breeding for protein quality in corn. In: Friedman, M. (ed) *Nutritional Improvement of Food and Feed Grains*, pp. 281-300.
- Di Fonzo, N., Fornasari, E., Salamini, F., Reggiani, R. and Soave, C.** (1980). Interaction of maize mutants *floury-2* and *opaque-7* with *opaque-2* in the synthesis of endosperm proteins. *J. Hered.* 71:397-402.
- Dumas, C. and Mogensen, H.L.** (1993). Gametes and fertilization: Maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants. *Plant Cell* 5:1337-1348.
- Edallo, S., Zucchini, C., Prenzin, M. and Salamini, F.** (1981). Chromosomal variation and frequency of spontaneous mutation associated with *in vitro* culture and plant regeneration in maize. *Maydica* 26:39-56.
- Emerson, R.A., Beadle, G.W. and Fraser, A.C.** (1935). A summary of linkage group in maize. *Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Men.* 180.
- Esen, A.** (1986). Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. *Plant Physiol.* 80: 623-627.
- Evans, D.A. and Sharp, W.R.** (1986). Applications of somaclonal variation. *Biotechnology* 4:528-532.
- Evola, S.V., Burr, F.A. and Burr, B.** (1986). The suitability of restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in maize. *Theor. Appl. Genet.* 71: 765-771.
- Feix, G. and Quayle, T.** (1993). Structure and expression of zein genes of maize. *Crit. Rev. Plant Sci.* 12:11-127.
- Food and Agriculture Organization** (1970). *Nutritional Studies*, vol. 24. FAO, Rome.

- Food and Agriculture Organization** (1988). Production, vol. 42. FAO, Rome.
- Forde, B.G., Hayworth, A., Pywell, J. and Kries, M.** (1985). Nucleotide sequence of a B1 hordein gene and the identification of possible upstream regulatory elements in endosperm storage protein genes from barley, wheat, and maize. *Nucleic Acids Res.* 13:7327-7339.
- Fourney, R.M., Miyakoshi, J., Day III, R.S. and Peterson, M.C.** (1988). Northern blotting: Efficient RNA staining and transfer. *Focus* 10:5-7.
- Garratt, R., Oliva, G., Caracelli, I., Leite, A. and Arruda, P.** (1993). Studies of the zein-like α -prolamins based on an analysis of amino acid sequences: Implications for their evolution and three-dimensional structure. In: *Proteins: Structure, Function and Genetics* 15:88-99.
- Geetha, K.B., Lending, C.R., Lopes, M.A., Wallace, J.C. and Larkins, B.A.** (1991). *Opaque-2* modifiers increase γ -zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. *Plant Cell* 3:1207-1219.
- 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., Viglienghi, V., Righetti, P.G., Salamini, F. and Soave, C.** (1977). Amino acid composition of zein molecular components. *Phytochemistry* 16:315-317.
- Hagen, G. and Rubenstein, I.** (1981). Complex organization of zein genes in maize. *Gene* 13:239-249.
- Heery, D.M., Gannon, F. and Powell, R.** (1990) A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *TIG* 6:173.
- Heidecker, G. and Messing, J.** (1986). Structural analysis of plant genes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 37:439-466.

- Heidecker, G., Chaudhuri, S. and Messing, J. (1991).** Highly clustered zein gene sequences reveal evolutionary history of the multigene family. *Genomics* 10:716-732.
- Helentjaris, T. (1987).** A genetic linkage map for maize based on RFLPs. *TIG* 3:217-221.
- Helentjaris, T., King, G. Slocum, M., Siedenstrang, C. and Wegman, S. (1985).** Restriction fragment length polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol. Biol.* 5:109-118.
- Helentjaris, T., Slocum, M., Weight, s., Schaefer, A. and Nienhuis, J. (1986).** Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 72:761-769.
- Higgins, T.J.V. (1984).** Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:191-221.
- Hoisington, D. (1993).** Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 2nd. ed., Mexico, D.F.:CIMMYT.
- 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.
- Jones, R.A. (1978).** Effects of *floury-2 locus* on zein accumulation and RNA metabolism during maize endosperm development. *Biochem. Genet.* 16:27-380.
- Jones, R.A., Larkins, B.A. and Tsai, C.Y. (1977).** Storage protein synthesis in maize. III. Developmental changes in membrane-bound polyribosome composition and in vitro protein synthesis of normal and *opaque-2* mutant of maize. *Plant Physiol.* 59:733-737.

- Keris, M., Shewry, B.G., Forde, G. and Mifflin, J. (1985).** Structure and evolution of seed storage proteins and their genes with particular reference to those of wheat, barley and rye. *Oxford Survey Plant Mol. Cell Biol.* 2:253-317.
- 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.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. and Sanford, J.C. (1987).** High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73.
- Kodrycki, R., Boston, R.S. and Larkins, B.A. (1989).** The *opaque-2* mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *Plant Cell* 1:105-114.
- Kridl, J.C., Vieira, J., Rubenstein, I. and Messing, J. (1984).** Nucleotide sequence analysis of zein genomic clone with a short open reading frame. *Gene* 28:113-118.
- Kriz, A.L., Boston, R.S. and Larkins, B.A. (1987).** Structural and transcriptional analysis of DNA sequences flanking genes that encode 19 kilodalton zeins. *Mol. Gen. Genet.* 297:90-98.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahanson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E. and Newburg, L. (1987).** Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.
- Langridge, P. and Feix, G. (1983).** A zein gene of maize is transcribed from two widely separated promoter regions. *Cell* 34:1015-1022.
- Langridge, P., Eibel, H., Brown, J.W.S. and Feix, G. (1984).** Transcription from maize storage protein gene promoters in yeast. *EMBO J.* 3:2467-2471.

- 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.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. (1981).** Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214.
- Larkin, P.J., Ryan, S.A., Brettell, R.I.S. and Scowcroft, W.R. (1984).** Heritable somaclonal variation in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 67:443-455.
- Larkins, B.A. (1983).** Genetic Engineering of Plants. In: Kusage, T., Meredith, C. and Hollander, A.(eds.) *Genetic Engineering of Plants: An Agricultural Perspective.* Plenum Press, New York and London, pp. 93-118.
- Larkins, B.A. and Hurkman, W.I. (1978).** Synthesis and deposition of zein in protein bodies of maize endosperm. *Plant Physiol.* 62:256-263.
- 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.* 14:641-650.
- Leite, A., Ottoboni, L.M.M., Targon, M.L.P.N., Silva, M.J., Turcinelli, S.R. and Arruda, P. (1990).** Phylogenetic relationship of zeins and Coixins as determined by immunological cross-reactivity and *Southern blot* analysis. *Plant Mol. Biol.* 14:743-751.
- Li, W.-H., Luo, C.-C. and Wu, C.-I. (1985).** Evolution of DNA sequences. In: MacIntyre, R.J.(ed.). *Molecular Evolutionary Genetics.* Plenum Press, NY, pp 1-84.
- Liu, C.N. and Rubenstein, I. (1992).** Molecular characterization of two types of 22 kilodalton α -zein genes in a gene cluster in maize. *Mol. Gen. Genet.* 234:244-253.

- Lopes, M.A. and Larkins, B.A. (1993).** Endosperm Origin, Development, and Function. *Plant Cell* 5:1383-1399.
- Lopes, M.A. and Larkins, B.A. (1991).** Gamma-Zein content is related to endosperm modifications in Quality Protein Maize. *Crop Sci.* 31:1655-1662.
- Lorz, H. and Scowcroft, W.R. (1983).** Variability among plants and their progeny regenerated from protoplasts of *Su/su* heterozygotes of *Nicotiana tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* 66:67-75.
- Ludevid, M.D., Torrent, M., Martinez-Izquierdo, J.A., Puigdomènech, P. and Palau, J. (1984).** Subcellular localization of glutelin-2 in maize (*Zea mays* L.). *Plant Mol. Biol.* 3:227-234.
- Maddaloni, M. Di Fonzo, N., Hartings, H., Lazzaroni, N., Salamini, F., Thompson, R. and Motto, M. (1989).** The sequence of the zein regulatory gene *opaque-2 (O2)* of *Zea mays*. *Nucleic Acids Res.* 17:7532.
- Maier, U.G., Brown, J.W.S., Toloczki, C. and Feix, G. (1988).** Binding of a nuclear factor to a consensus sequence in the 5' flanking region of zein genes from maize. *EMBO J.* 6:17-22.
- Maliga, P. (1980).** Isolation, characterization, and utilization of mutant cell lines in higher plants. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11A:225-250.
- Marks M.D., Pedersen, K., Wilson, D.R., DiFonzo, N. and Larkins, B.A. (1984).** Molecular biology of the maize seed storage proteins. In: *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* 3:9-18.
- Marks, M.D. and Larkins, B.A. (1982).** Analysis of sequence microheterogeneity among zein mRNAs. *J. Biol. Chem.* 257:9976-9983.
- Marks, M.D., Lindell, J.S. and Larkins, B.A. (1985).** Nucleotide sequence analysis of zein mRNAs from maize endosperm. *J. Biol. Chem.* 260:16451-16459.

- Marks, M.D., Lindell, J.S. and Larkins, B.A. (1986).** Quantitative analysis of the accumulation of zein-mRNA during maize endosperm development. *J. Biol. Chem.* 260:16445-16450.
- Marocco, A., Santucci, A., Cerioli, S., Motto, M., Di Fonzo, N., Thompson, R. and Salamini, F. (1991).** Three high-lysine mutations control the level of ATP-binding HSP70-like proteins in the maize endosperm. *Plant Cell* 3:507-515.
- McCoy, T.J., Phillips, R.L. and Rines, H.W. (1982).** Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures: High frequency of partial chromosome loss. *Can. J. Genet. Cytol.* 24:37-50.
- Meins, F. (1983).** Heritable variation in plant tissue culture. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34:327-346.
- Mertz, E.T., Bates, L.S. and Nelson, O.E. (1964).** Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145:279-280.
- Messing, J. (1987).** The genes encoding seed storage proteins in higher plants. In: Rigby, P.W.J.(ed.). *Genetic Engineering*, vol.6. Academic Press, Orlando, pp. 1-46.
- Miflin, B.J. and Shewry, P.R. (1979).** The biology and biochemistry of cereal seed prolamins. In: IAEA (eds.). *Seed Protein Improvement in Cereals and Grain Legumes*, Vol. 1, Vienna, pp. 137-158.
- Misra, P.S., Mertz, E.T. and Glover, D.V. (1974).** Characteristics of proteins in single and double endosperm mutants of maize. In:Hutchinson, D. (ed.) *High-Quality Protein Maize*, pp. 291-305.
- Moon, D.H., Ottoboni, L.M.M., de Souza, A.P., Sibov, S.T., Gaspar, M. and Arruda, P.** Somaclonal variation-induced aluminum-sensitive mutant from an aluminum-tolerant maize inbred line. Submitted to *Plant Cell Reports*.

- Motto, M., DiFonzo, N., Hartings, H., Maddaloni, M., Salamini, F., Soave, C. and Thompson, R.D. (1989).** Regulatory genes affecting maize storage protein synthesis. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell. Biol.* 6:87-114.
- Motto, M., Maddaloni, M., Ponziani, G., Brembilla, M., Marotta, R., Di Fonzo, N., Soave, C., Thompson, R. and Salamini, F. (1988).** Molecular cloning of the *o2-m5* allele of *Zea mays* using transposon marking. *Mol. Gen. Genet.* 212:488-494.
- Müller, E., Brown, P.T.H., Hartke, S. and Lörz, H. (1990).** DNA variation in tissue-culture-derived rice plants. *Theor. Appl. Genet.* 80:673-679.
- Nelson, O.E. (1979).** Inheritance of amino acid content in cereals. In: IAEA (eds.). *Seed Protein Improvement in Cereals and Grain Legumes*, vol. 1, Vienna, pp 79-88.
- Nelson, O.E. (1980).** Genetic control of polysaccharide and storage protein synthesis in the endosperm of barley, maize, and sorghum. In: Pomeranz, Y.(ed.). *Advances in Cereal Science and Technology*, vol. 3. American Association of Cereal Chemists, St Paul, pp 41-71.
- Nelson, O.E., Metz, E.T. and Bates, L.S. (1965).** Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. *Science* 150:1469-1470.
- Ohtani, T., Galili, G., Wallace, J. C., Thompson, G.A. and Larkins, B.A. (1991).** Normal and lysine-containing zeins are unstable in transgenic tobacco seeds. *Plant Mol. Biol.* 16:117-128, 1991.
- Ortega, E.I. and Bates, L.S. (1983).** Biochemical and agronomic studies of two modified hard-endosperm *opaque-2* maize (*Zea mays* L.) populations. *Cereal Chem.* 60:107-111.
- Orton, T.J. (1980).** Chromosomal variability in tissue cultures and regenerated plants of *Hordeum*. *Theor. Appl. Genet.* 56:101-112.

- Orton, T.J.** (1983). Spontaneous electrophoretic and chromosomal variability in *callus* cultures and regenerated plants of celery. *Theor. Appl. Genet.* 67:17-24.
- Osborne, T.B.** (1897). Amount and Properties of the proteins of 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.** (1924). *The vegetable proteins.* Longmans, Green, London.
- Osborne, T.B. and Mendel, L.B.** (1914). Nutritive properties of proteins of the maize kernel. *J. Biol. Chem.* 18:1-6.
- Ottoboni, L.M.M. and Steffensen, D.M.** (1987). Localization of zein genes in maize. *Biochem. Genet.* 25:123-142.
- Ottoboni, L.M.M., Leite, A., Yunes, J.A., Targon, M.L., de Souza Filho, G.A. and Arruda, P.** (1993). Sequence analysis of 22 kDa-like α -Coixin genes and their comparison with homologous zein and kafirin genes reveals highly conserved protein structure and regulatory elements. *Plant Mol. Biol.* 21:765-778.
- Pabo, C.O. and Sauer, R.T.** (1992). Transcriptional factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.* 61:1053-1095.
- Paez, A.V., Helm, J.L. and Zuber, M.S.** (1969). Lysine content of *opaque-2* maize kernels having different phenotypes. *Crop Sci.* 9:251-252.
- 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., 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.
- Pedersen, K., Argos, P., Navarana, S.V.L. 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 structure variation among related zein genes in maize. *Cell* 29:1015-1026.
- Pernollet, J.C. and Mosse, J. (1983).** Structure and location of legume and cereal seed storage protein. *Seed Proteins (Phytochem. Soc. Europe Symp. Series)* 20:155-187.
- Phillips, R.L. and McClure, B.A. (1985).** Elevated protein-bound methionine in seeds of 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-plus-threonine resistant maize. *Crop Sci.* 21:601-607.
- Pinazza, L.A. (1993).** Perspectivas da cultura do milho e do sorgo no Brasil. In: Büll, L.T., Cantarella, H. (eds). *Cultura do milho: Fatores que afetam a produtividade*, pp. 1-10, Potafos, Piracicaba.
- Planckaert, F. and Walbot, V. (1989).** Molecular and genetic characterization of Mu transposable elements in *Zea mays*: Behavior in *callus* culture and regenerated plants. *Genetic* 123:567-578.
- Plikaytis, B.D., Carlone, G.M., Edwards, P. and Mayer, W. (1986).** Robust estimation of standart curves for protein molecular weight and linear-duplex DNA based-pair number after gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 152:346-364.

- Prat, S., Cortadas, J., Puigdomènech, P. and Palau, J. (1985).** Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of the maize endosperm protein glutelin-2. *Biopolymers* 33:1019-1028.
- Prat, S., Pèrez-Grau, L. and Puigdomènech, P. (1987).** Multiple variability in the sequence of a family of maize endosperm proteins. *Gene* 52:41-49.
- Preccott, A. and Martim, C. (1987).** Rapid method for quantitative assessment of levels of specific mRNAs. *Plant Mol. Biol. Report* 4:219-224.
- Prioli, L.M. (1987).** Cultura de tecidos e células, controle genético da embriogênese somática e variação somaclonal em milho (*Zea mays* L.). IB - UNICAMP (tese de doutorado).
- Quattrocchio, F., Tolk, M.A., Coraggio, I., Mol, J.N., Viotti, A. and Koes, R.E. (1990).** The maize zein gene zE19 contains two distinct promoters which are independently activated in endosperm and anthers of transgenic *Petunia* plants. *Plant Mol. Biol.* 15:81-93.
- Quayle, T.J.A., Hetz, W. and Feix, G. (1991).** Characterization of a maize endosperm culture expressing zein genes and its use in transient transformation assays. *Plant Cell Rep.* 9:544-548.
- Righetti, P.G., Gianazza, E., Viotti, A. and Soave, C. (1977).** Heterogeneity of storage proteins in maize. *Planta* 136:115-123.
- Salamini, F., DiFonzo, N., Fornasari, E., Gentinetta, E., Reggiani, R. and Soave, C. (1983).** Mucronate, *Mc*, a dominant gene of maize which interacts with *opaque-2* to suppress zein synthesis. *Theor. Appl. Genet.* 65:123-128.
- Salamini, F., DiFonzo, N., Gentinetta, E. and Soave, C. (1979).** A dominant mutation interfering with protein accumulation in maize seeds. In: IAEA (eds.) *Seed Improvement in Cereals and Grain Legumes*, vol.1, Vienna, pp. 97-108.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Scarpula, R.C., Agne, K. and Wu, R. (1982).** Cytochrome C gene-related sequences in mammalian genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 79:739-743.
- Schickler, H., Benner, M.S. and Messing, J.W. (1993).** Repression of the high-methionine zein gene in the maize inbred line Mo17. *Plant J.* 3:221-229.
- Schmidt, R.J. (1993).** *Opaque-2* and zein gene expression. In: Control of Plant Gene Expression, Verma, D.P.S. (ed.), Boca Raton, CRC Press, pp. 337-355.
- Schmidt, R.J., Burr, F.A. and Burr, B. (1987).** Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus *opaque-2*. *Science* 238:960-963.
- Schmidt, R.J., Ketudat, M., Aukerman, M.J. and Hoschek, G. (1992).** *Opaque-2* is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. *Plant Cell* 4:689-700.
- Schwall, M. and Feix, G. (1988).** Zein promoter activity in transiently transformed protoplasts from maize. *Plant Sci.* 56:161-166.
- Shaeffer, G.W. (1982).** Recovery of heritable variability in anther-derived doubled-haploid rice. *Crop. Sci.* 22:1160-1164.
- Shewry, P.R. and Tatham, A.S. (1995).** Seed storage proteins: structure and biosynthesis. *Plant Cell* 7:945-956.
- Shewry, P.R. and Tatham, A.S. (1990).** The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem. J.* 267:1-12.
- Shotwell, M.A. and Larkins, B.A. (1989).** The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. In: Marcus, A. (ed.). *Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise*, vol. 15, New York, Acad. Press, pp. 296-345.

- Skirvin, R.M. and Janick, J. (1976).** Velvet Rose Pelargonium, a scented geranium. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 11:61-62.
- Soave, C. and Salamini, F. (1984).** Organization and regulation of zein genes in maize endosperm. Philos. Trans. R. Soc. London 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., Reggiani, R., Di Fonzo, N. and Salamini, F. (1982).** Genes for zein subunits on maize chromosome 4. Biochem. Genet. 20:1027-1238.
- Soave, C., Suman, N., Viotti, A. and Salamini, F. (1978).** Organization and regulation of zein genes in maize endosperm. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B 304:341-347.
- Soave, C., Tardani, L., Di Fonzo, N. and Salamini, F. (1981).** Zein level in maize endosperm depends on a protein under control of the *opaque-2* and *opaque-6 loci*. Cell 27:403-410.
- Spena, A., Viotti, A. and Pirrotta, V. (1982).** A homologous repetitive block structure underlies the heterogeneity of heavy and light chain zein genes. EMBO J. 1:1589-1594.
- Spena, A., Viotti, A. and Pirrotta, V. (1983).** Two adjacent genomic zein sequence: Structure, organization, and tissue-specific restriction pattern. J. Mol. Biol. 169:799-811.
- Spencer, D. (1984).** The physiological role of storage proteins in seeds. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 304:275-285.

- Swarup, S., Timmermans, M.C.P., Chaudhuri, S and Messing, J.W. (1995).** Determinants of the high-methionine trait in wild and exotic germplasm may have escaped selection during early cultivation of maize. *Plant J.* 8:359-368.
- Targon, M.L.N., Leite, A., Ottoboni, L.M.M., Malacrida, S.A., Silva, M.J., Turcinelli, S.R. and Arruda, P. (1991).** Somaclonal variation , its possible origins and consequence. In: *Biothecnology for Plant Production*, pp. 47-58.
- Thompson, G.A., Siemieniak, D.R., Sieu, L.C., Slightom, J.L. and Larkins, B.A. (1992).** Sequence analysis of linked maize 22 kDa alpha-zein genes. *Plant Mol. Biol.* 18:827:833.
- Tsai, C.Y. (1983).** Genetics of Storage Protein in Maize. In: Janick, J.(ed.). *Plant Breeding Reviews*. Vol. 1, Avi. Publ., Westport, CT, pp. 103-138.
- Ueda, T. and Messing, J. (1991).** A homologous expression system for cloned zein genes. *Theor. Appl. Genet.* 82:93-100.
- Ueda, T. and Messing, J. (1993).** Manipulation of amino acid balance in maize seeds. *Genet. Eng.* 15:109-130.
- Ueda, T., Wawerczak, W., Ward, K., Sher, N., Ketudat, M., Schmidt, R.J. and Messing, J. (1992).** Mutations of the 22- and 27-kD zein promoters affect transactivation by the *opaque-2* protein. *Plant Cell* 4:701-709.
- Vasal, S.K. (1984).** Approaches and methodology in the development of QPM hybrids. In: *Maize and Sorghum Natl. Meet. Proc.* pp. 419-430.
- Vasal, S.K., Villegas, E., Bjarnason, M., Gelaw, B. and Goertz, P. (1980).** Genetic modifiers and breeding strategies in developing hard endosperm *opaque-2* materials. In: Pollmer, W.G. and Phillips, R.H. (eds.). *Improvement of Quality Traits of Maize for Grain and Silage Use*. London, pp. 37-73.

- Vasil, I.K., Vasil, V., Iu, C.Y., Ozias-Akins, P., Haydu, Z. and Wang, D.Y. (1983).** Somatic embryogenesis in cereals and grasses. In: Variability in Plants Regenerated from Tissue Culture. E.D. Earle and Y. Demarly (eds.), Praeger, NY, pp.3-21.
- Viotti, A., Sala, E., Alberi, P. and Soave, C. (1978),** Heterogeneity of zein synthesized in vitro. *Plant Sci. Lett.* 13:365-375.
- Viotti, A., Sala, E., Marotta, R., Alberi, P., Balducci, C. and Soave, C. (1979).** Genes and mRNA coding for zein polypeptides in *Zea mays*. *Eur. J. Biochem.* 102:211-222.
- Vitale, A., Soave, C. and Galante, E. (1980).** Peptide mapping of IEF components from maize. *Plant Sci. Lett.* 18:57-64.
- Wallace, J.C., Lopes, M.A., Paiva, E. and Larkins, B.A. (1990).** New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of γ -zein in modified *opaque-2* maize. *Plant Physiol.* 92:191-196.
- Wienand, U. and Feix, G. (1980).** Zein specific restriction fragments of maize DNA. *FEBS Lett.* 116:14-16.
- Wilson, C.M. (1984).** Isoelectric focusing of zein in agarose. *Cereal Chem.* 61:198-200.
- Wilson, C.M. (1985).** Mapping of zein polypeptides after isoelectric focusing on agarose gels. *Biochem. Genet.* 23:115-124.
- Wilson, C.M. (1991).** Multiple zeins from maize endosperm characterized by reversed phase high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* 95:777- 786.
- Wilson, C.M. (1992).** Zein diversity in Reid, Lancaster, and Illinois chemical corn strains revealed by isoelectric focusing. *Crop Sci.* 32:869-873.

Wilson, C.M., Sprague, G.F. and Nelsen, T.C. (1989). Linkage among zein genes determined by isoelectric focusing. *Theor. Appl. Genet* 77:217-226.

Wilson, D. and Larkins, B.A. (1984). Zein gene organization in maize and related grasses. *J. Mol. Evol* 20:330-340.

Yang, M.S., Espinoza, N.O., Dodds, J.H. and Jaynes, J.M. (1989). Expression of a synthetic gene for improved quality in transformed potato plants. *Plant Sci*:64:99-111.

Zenke, M., Grudström, T., Matthes, H., Wintzerith, M., Schatz, C., Wildeman, A. and Chambon, P. (1986). Multiple sequence motifs are involved in *SV40* enhancer function. *EMBO J.* 5:387-397.