

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

UNICAMP



INSTITUTO DE BIOLOGIA

ESTUDO SOBRE A ENZIMA LISINA  $\alpha$ -CETOGLUTARATO  
REDUTASE NO MILHO

*Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida  
pela candidata Isabel Cristina Leite e aprovada pela Comissão Julgadora.  
10/08/88*

IZABEL CRISTINA LEITE

ORIENTADOR: PROF. DR. LADASLAV SODEK

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia-UNICAMP, para a obtenção  
do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS.

CAMPINAS-SP.

1988

UNICAMP

CONTRAI

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. *LADASLAV SODEK*, pela orientação precisa e segura, pela compreensão e amizade a nós dedicada, o que foi fundamental para o cumprimento dessa etapa tão importante da nossa carreira.

Ao Dr. *PAULO ARRUDA*, pela colaboração prestada durante o desenvolvimento do presente trabalho, orientação e cessão do laboratório e de material.

Ao DEPARTAMENTO DE FISILOGIA VEGETAL da Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade que tivemos de nos formarmos humana e profissionalmente.

Ao DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA por ter permitido o nosso afastamento, e pelo apoio em todos os momentos.

Aos COLEGAS e FUNCIONÁRIOS do Departamento de Fisiologia Vegetal e do Barracão de Genética, pela agradável convivência e apoio constante que muito nos ajudaram no desenvolvimento do presente trabalho.

À COORDENAÇÃO DO APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES por nos ter concedido Bolsa através do seu Programa Institucional de Capacitação de Docente - P.I.C.D.

À REGINA CÉLIA BRANDÃO MACHADO e MARIA RENATA MIGLINO pela amizade e pelo esmero nos serviços de datilografia.

# Í N D I C E

	Página
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....	1
1.1. Importância nutricional do milho .....	1
1.2. Natureza do aumento de lisina no milho opaco-2 ...	3
1.3. Proteínas de reserva do milho .....	6
1.4. Transporte e metabolismo de nitrogênio .....	10
1.5. Biossíntese de lisina .....	12
1.6. Catabolismo de lisina .....	15
1.7. Objetivos .....	19
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
2.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo .....	20
2.2. Métodos Analíticos .....	22
2.2.1. Preparo dos extratos e ensaios .....	22
2.2.2. Presença de inibidores endógenos da LKR ...	23
2.2.3. Fracionamento de proteínas .....	23
2.2.4. Dosagem de proteína .....	25
2.2.4.1. Digestão das amostras (Micro-Kjel	
dahl) .....	25
2.2.4.2. Colorimetria .....	27
3. RESULTADOS .....	29
3.1. Caracterização da lisina-cetoglutarato redutase	
(LKR) em milho normal .....	29
3.2. Otimização do ensaio .....	30
a. Oxidação não específica do NADPH .....	30
b. Tempo de reação .....	31

c. Quantidade de enzima .....	31
d. Especificidade da enzima .....	33
3.3. Atividade da LKR em plântulas .....	35
3.3.1. Atividade da LKR em plântulas de milho nor <u>mal</u> .....	35
3.3.2. Atividade da LKR em plântulas de milho opa <u>co-2</u> .....	35
3.3.3. Atividade da LKR em plântulas de milho nor <u>mal</u> germinadas em meio contendo diferentes concentrações de lisina .....	36
3.3.4. Atividade da LKR em plântulas de milho, usan <u>do</u> NADH como doador de eletrons .....	37
3.4. Presença de inibidores endógenos da LKR em plântu <u>las</u> .....	38
3.5. Presença de inibidores endógenos da LKR em endosper <u>ma</u> de milho opaco-2 .....	39
3.6. Padrão de atividade da LKR em endosperma de milho durante o desenvolvimento .....	41
3.7. Fracionamento de proteína .....	42
4. DISCUSSÃO .....	49
5. RESUMO .....	56
6. SUMMARY .....	58
7. LITERATURA CITADA .....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Composição de aminoácidos de proteínas do embrião e endosperma de milho (SODEK, 1973) .....	2
2	Classificação, quantidade e teor de lisina da proteína do endosperma de milho (SODEK, 1973) ...	4
3	Condições climáticas para Campinas (lat. 22°54'S, long. 47°5'W), no verão 1983-1984 (dados fornecidos pelo IAC) .....	21
4	Oxidação de NADPH por extrato de endosperma imaturo de milho normal na presença e na ausência de lisina e $\alpha$ -cetogluturato .....	30
5	Taxa de oxidação de NADPH em ensaios de lisina cetogluturato redutase com extratos de endosperma imaturo de milho normal, crus e dessalinizados em coluna de Sephadex G-25 .....	31
6	Comparação de NADPH e NADH como doadores de elétrons da enzima lisina cetogluturato redutase, utilizando-se extrato de endosperma imaturo de milho normal .....	33
7	Atividade da lisina cetogluturato redutase para diferentes tecidos vegetais, aos 4 dias .....	36
8	Taxa de oxidação de NADPH em ensaios de LKR com extratos de plântulas de milho opaco-2, aos dias.	37
9	Comparação de NADPH e NADH como doadores de elétrons da enzima LKR extraída de plântulas de milho, feijão e soja, aos 5 dias .....	38

10	Efeito da mistura de extratos de endosperma imaturo e de plântulas de milho na atividade da LKR ..	40
11	Efeito da mistura de extratos de endosperma imaturo de milho normal e opaco-2 sobre a atividade da LKR .....	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1a	Biossíntese da lisina via ácido diaminopimélico (MOLLER, 1975) .....	13
1b	Biossíntese de lisina via ácido aminoadípico (MOLLER, 1975) .....	14
2	Metabolismo de lisina em fungos e mamíferos (WADE <i>et alii</i> , 1980) .....	16
3	Esquema da metodologia utilizada para a extração da fração proteica contendo a enzima lisina cetoglutatarato redutase .....	24
4	Esquema da metodologia utilizada para o fracionamento de proteína .....	26
5	Oxidação de NADPH ( $\Delta$ da absorb. 340nm) aos 15, 30 e 45 min. de incubação do extrato de endosperma imaturo de milho normal .....	32
6	Oxidação de NADPH ( $\Delta$ da absorb. 340nm/30 min. ) em ensaios com diferentes concentrações da enzima, utilizando-se extrato de endosperma imaturo de milho normal .....	34
7	Curva de atividade da lisina cetoglutatarato redutase em endosperma de duas linhagens de milho ( <i>Zea mays</i> L.) nas versões normal e opaco-2, dos 10 aos 52DAP (dias após a polinização) .....	43
8	Teor das diferentes frações proteicas em endosperma de milho, durante o desenvolvimento, para as linhagens 160 e 1038 nas versões normal e opaco-2. Fração I (albuminas + globulinas) ....	45

9	Teor de diferentes frações proteicas em endosperma de milho, durante o desenvolvimento, para as <u>li</u> nhagens 160 e 1038 nas versões normal e opaco-2. Fração II (zeína) .....	46
10	Teor das diferentes frações proteicas em <u>endosper</u> ma de milho, durante o desenvolvimento, para as <u>li</u> nhagens 160 e 1038 nas versões normal e opaco-2. Fração III (glutelinas) .....	47

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Importância nutricional do milho

O estudo das proteínas de milho, assim como proteínas de outros cereais, tem sido grandemente estimulado pela importância econômica e nutricional dessa cultura, pois os cereais constituem a principal fonte de proteína para os animais e para o homem, na maior parte do mundo (KAUL, 1973).

O valor do milho como uma fonte de alimento é revelado pela sua composição. Ele é rico em todas as três principais classes de alimento, ou seja: carboidratos (83,0 g/100g de peso da matéria seca de grãos), óleo (4,9g/100 de peso da matéria seca de grãos) e proteínas (10,6g/100g de peso da matéria seca de grãos), de acordo com SODEK (1973). Dos três principais componentes, somente a proteína é nutricionalmente deficiente. O problema é que tecidos animais não sintetizam certos aminoácidos necessários para a síntese de proteínas, por isso uma ingestão adequada desses aminoácidos essenciais é necessária. Quando o milho é a única fon

te de proteína na dieta, o indivíduo obtém quantidades insuficientes do aminoácido essencial lisina (Tabela 1). Observando a composição de aminoácidos das proteínas, do embrião e do endosperma, vemos que a proteína do endosperma é responsável pelo baixo nível de lisina no milho. A proteína do endosperma contém apenas 1,7% de lisina, o que está bem abaixo do valor 4,2% estimado pela FAO-Food and Agricultural Organization of the United Nations (1957), referente ao requerimento de lisina para o homem. A proteína do embrião geralmente contém mais lisina que o nível requerido e é também mais balanceada em aminoácidos essenciais, o que eleva o valor nutritivo do grão.

TABELA 1 - Composição de aminoácidos de proteínas do embrião e endosperma de milho (SODEK, 1973).

Aminoácidos	mol (%)	
	Endosperma	Embrião
Lisina	1,7	6,3
Treonina	3,5	4,3
Valina	5,5	7,2
Metionina	1,7	1,2
Isoleucina	3,9	3,5
Leucina	15,2	7,0
Fenilalanina	4,0	3,4

Assim, o milho, embora não seja deficiente em quantidade de proteína, o é em qualidade, e um estado de desnutrição resulta quando o milho é a única fonte de proteína. Isto é particularmente notado em crianças em crescimento.

É evidente então que o melhoramento da qualidade da proteína do milho seria de imenso benefício.

Já em 1964, MERTZ *et alii* demonstraram que o gene mutante opaco-2 altera consideravelmente a composição de aminoácidos do endosperma de milho, principalmente com relação à lisina, que praticamente dobra. O opaco-2 é um gene recessivo, descoberto por Singleton & Jones (DALBY & DAVIES, 1967), que manifesta-se fenoti

picamente apenas em estado de homozigose nos núcleos triplóides de endosperma de milho, onde ele dá um carater opaco à semente madura; que geralmente é translúcida.

O benefício desta alteração de lisina em termos nutritivos logo foi evidenciado por MERTZ *et alii* (1965). Este grupo verificou que quando ratos foram alimentados com uma dieta contendo 90% de milho opaco-2 (4,7g de lisina/16g de N), o ganho médio de peso em 28 dias foi de 97g, enquanto que para ratos alimentados com um híbrido normal (2,8g de lisina/16g de N) o ganho médio de peso foi 27g.

O alto valor nutritivo do milho opaco-2 foi confirmado em seres humanos. Assim, o mesmo tem sido usado com sucesso como a única fonte de proteína para crianças pré-escolares em vários continentes (MAFFIA *et alii*, 1976). Na Guatemala quase substituiu o leite para crianças de 2 a 6 anos de idade (BRESSANI, 1966); na Colômbia propiciou recuperação completa de crianças com severa desnutrição proteica (BYRNES, 1969; PRADILLA *et alii*, 1975), e na Índia foi semelhante ao leite nas respostas clínicas e bioquímicas de crianças recuperando-se de severa desnutrição (REDDY & GUP

TA, 1974).

## 1.2. Natureza do aumento de lisina no milho opaco-2

Descobrir a natureza do aumento em lisina no endosperma de milho opaco-2 foi o motivo de vários trabalhos nos dez anos

que sucederam a sua descoberta. Estes trabalhos procuravam constatar se o gene opaco-2 alterava o conteúdo de lisina de alguma proteína de reserva, ou se alterava a proporção de proteínas com diferentes teores de lisina. Para esclarecer esta questão, as proteínas do endosperma eram fracionadas e os teores de lisina de cada fração comparados para milho opaco-2 e normal. Este trabalho exigiu o aperfeiçoamento de técnicas de separação das proteínas, uma vez que a técnica de OSBORNE (1897) não permitia a separação completa das diferentes classes de proteínas. De acordo com OSBORNE (1897), as proteínas são classificadas em função da sua solubilidade em diversos solventes (Tabela 2). Pelos dados resumidos nesta tabela para o endosperma de milho, pode-se observar que as principais proteínas são as prolaminas (zeínas) e glutelinas, representando cerca de 40 e 35% do N total respectivamente, enquanto que as albuminas e globulinas representam apenas uma pequena fração do N total. Estas classes de proteínas apresentam uma composição em aminoácidos bastante característica, notadamente a zeína, que mostra uma ausência quase total do aminoácido lisina (Tabela 2).

TABELA 2 - Classificação, quantidade e teor de lisina da proteína do endosperma de milho (SODEK, 1973).

Solvente	Fração	% do N total		lisina (mol%)
		Normal	Opaco-2	
H <sub>2</sub> O	Albuminas	3	5	5,5
NaCl (0,5M)	Globulinas	2	4	5,1
Etanol (70%)	Prolaminas	40	22	0,1
NaOH (0,2%)	Glutelinas	35	45	3,8

Utilizando a técnica de OSBORNE (1897) para extrair as proteínas do endosperma de milho normal e opaco-2, MOSSÉ *et alii* (1966) foram os primeiros a demonstrar que o gene opaco-2 reduz drasticamente o nível de zeína, a proteína deficiente em lisina. Entretanto, a ação do gene opaco-2 não ficou totalmente esclarecida pois a glutelina do opaco-2 apresentou um teor de lisina mais elevado do que a glutelina extraída de milho normal. Esta discrepância na composição de glutelina foi atribuída à ineficiência do método para extrair zeína (DIMLER, 1966), de forma que em milho opaco-2 a contaminação da fração de glutelina com zeína foi menor do que para milho normal, em função do nível reduzido de zeína no endosperma. Posteriormente, PAULIS *et alii* (1969) purificaram glutelina extraída de milho normal e opaco-2 e constataram que a proteína das duas fontes apresentava uma composição em aminoácidos praticamente igual.

Com o aperfeiçoamento das técnicas de extração das proteínas do milho (MOUREAUX & LANDRY, 1968), foi possível constatar que a composição em aminoácidos de todas as classes de proteína extraídas do endosperma de milho normal e opaco-2 é bastante parecida (SODEK & WILSON, 1971a, MOUREAUX & LANDRY, 1972a, 1972b). Portanto, concluiu-se que o elevado nível de lisina no endosperma de milho opaco-2 se devia exclusivamente a alterações na proporção de proteínas com diferentes teores de lisina, principalmente à redução na síntese de zeína. Outros pesquisadores (MISRA *et alii*, 1972; LODHA *et alii*, 1974) também chegaram a esta conclusão. Muitos de outros cereais como cevada (MUNCK *et alii*, 1970; INGVERSEN *et alii*, 1973) e sorgo (SINGH & AXTELL, 1973), com elevado nível de lisina também apresentaram alterações semelhantes nas proteínas de reserva.

Além do seu efeito sobre as proteínas do endosperma de milho, o gene opaco-2 altera drasticamente o nível de aminoácidos

livres (SODEK & WILSON, 1971a). Estudando o conteúdo de aminoácidos livres de 14 endospermas mutantes de milho e suas combinações duplo-mutantes com opaco-2 em 4 linhas isogênicas, bem como certas combinações híbridas dessas linhas, MISRA *et alii* (1975) verificaram que em todas as combinações estudadas a presença do gene opaco-2 aumentou invariavelmente o nível de aminoácidos livres. Verificaram ainda que tanto lisina quanto aminoácidos livres nos mutantes duplos são superiores aos mutantes simples correspondentes, indicando assim que a introdução do gene opaco-2 numa grande variedade de genótipos mutantes simples e normais, tanto isogênicos quanto híbridos, tem um profundo efeito no "pool" metabólico de aminoácidos livres no endosperma. Apesar disso, tem sido dada relativamente pouca ênfase à associação da composição de aminoácidos livres com a síntese de proteína nos grãos (SODEK & WILSON, 1971a; BRANDT, 1975). Assim, ARRUDA *et alii* (1978) numa tentativa de correlacionar composição de aminoácidos livres e síntese proteica em endosperma de milho comparando o normal com um duplo mutante (sugary-1, opaco-2) com alto teor de lisina, verificaram que o conteúdo de zeína apresentou surpreendentes diferenças nos dois genótipos, sendo 7,7 e 6,0 vezes maior no endosperma normal aos 24 e 47 dias após a polinização, respectivamente. Esta redução na síntese de zeína no duplo-mutante foi associada a um acúmulo de aminoácidos livres, principalmente alanina, glutamina, ácido glutâmico, asparagina e ácido aspártico, que são componentes importantes da zeína.

### 1.3. Proteínas de reserva do milho

Durante o desenvolvimento da semente de cereais, as proteínas de reserva são sintetizadas nas células do endosperma e depositadas em grânulos bem definidos, delimitados por uma membrana simples e descontínua (ASHTON, 1976) denominados corpúsculos pro

teicos (DUVICK, 1961; CHRISTIANSON *et alii*, 1974; KHOO & WOLF, 1970; INGVERSEN, 1975; BURR & BURR, 1977). Cerca de 95% da proteína do corpúsculo proteico é constituída de zeína (RIGHETTI *et alii*, 1977). O aparecimento desses corpúsculos proteicos coincide com o início da síntese de zeína e a sua taxa máxima de crescimento está positivamente correlacionada com a máxima taxa de síntese de zeína (DUVICK, 1961). Em mutantes ricos em lisina, o número e o tamanho dos corpúsculos proteicos são drasticamente reduzidos (LEE *et alii*, 1976; CHRISTIANSON *et alii*, 1974) ou praticamente ausentes (WOLF *et alii*, 1969; BAENZIGER & GLOVER, 1977).

No milho, a quantidade de proteína por grão começa aumentar rapidamente cerca de 10 a 15 dias após a polinização ( TSAI *et alii*, 1978). A síntese de duas classes de proteínas de reserva, zeínas e glutelinas, concorre para a maior parte do aumento, embora o conteúdo de globulinas também aumente levemente durante o desenvolvimento do grão. A fração albumina contém principalmente proteínas enzimáticas e aumenta rapidamente até um conteúdo máximo, ao redor de 25 dias após a polinização, mas diminui durante os estágios finais do desenvolvimento. Muitas das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, síntese de amido, e metabolismo de nitrogênio, aumentam a atividade antes ou ao mesmo tempo que o período de enchimento dos grãos ( TSAI *et alii*, 1970; SODEK & SILVA, 1977; TSAI *et alii*, 1978).

As diferentes classes de proteínas do endosperma são sintetizadas em padrões diferentes, durante o desenvolvimento da semente. De acordo com BRESSANI & CONDE (1961); MURPHY & DALBY (1971); MOUREAUX & LANDRY (1972a); DALBY & TSAI (1975); ARRUDA *et alii* (1978), nos primeiros estágios, entre 10 e 20 dias após a polinização, observa-se no endosperma uma grande quantidade de albuminas, globulinas e aminoácidos livres. Com o desenvolvimento da semente, as classes proteicas de maior conteúdo no endosperma

(zeínas e glutelinas) aumentam rapidamente (BRESSANI & CONDE, 1961; MURPHY & DALBY, 1971; SODEK, 1973; DALBY & TSAI, 1974; DALBY & TSAI, 1975; MISRA *et alii*, 1975; ARRUDA *et alii*, 1978; TSAI *et alii*, 1978), sendo que existem evidências de que essas proteínas são sintetizadas às expensas das proteínas salino solúveis (BRESSANI & CONDE, 1961; SODEK & WILSON, 1970; MOUREAUX & LANDRY, 1972).

As mutações no endosperma de milho atuam em geral durante o desenvolvimento da semente, alterando os padrões de síntese de proteínas e aminoácidos ou de amido. No mutante mais estudado, o opaco-2 como já mencionado, a quantidade de zeína do endosperma é drasticamente diminuída, enquanto que as albuminas + globulinas e principalmente a glutelina é proporcionalmente aumentada (MERTZ *et alii*, 1964; JIMENEZ, 1966; MOSSÉ, 1966; SODEK & WILSON, 1971a; TSAI & DALBY, 1974; DALBY & TSAI, 1975; MISRA *et alii*, 1975; LEE *et alii*, 1976; BAENZIGER & GLOVER, 1977; LODHA *et alii*, 1977).

No estado de homocigoto triploide, os mutantes opaco-2, opaco-7, floury-2 e floury-3 também são caracterizados por uma marcante redução no conteúdo de zeína (variando de 50 a 80%). Para o floury-2, como o opaco-2, há geralmente um aumento nas glutelinas, bem como nas albuminas e globulinas (MERTZ *et alii*, 1964; JIMENEZ, 1966; HANSEL *et alii*, 1973). Por outro lado, o opaco-6, opaco-7 e floury-3, enquanto reduzem o conteúdo de zeína, causam uma pequena redução nas glutelinas (MA & NELSON, 1975).

Muito pouco é conhecido sobre o mecanismo de supressão da síntese de zeína pelo gene opaco-2. Sugeriu-se que a maior atividade da ribonuclease no endosperma de grãos de milho opaco-2 em desenvolvimento, comparada com a do milho normal pode ser responsável pelo desaparecimento completo do RNA do endosperma durante o penúltimo estágio de maturação do grão. O acúmulo de zeína no opaco-2 ocorre somente durante as primeiras duas ou três semanas após a polinização, enquanto no normal continua por um período

muito mais longo (MEHTA *et alii*, 1973).

A zeína é geralmente extraída de endosperma de milho por solventes alcóolicos. Entretanto, após a extração alcóolica, quantidades variáveis de zeína permanecem na fração glutelina. Esta zeína residual, chamada zeína-2 ou G-1 por diferentes autores (LANDRY & MOUREAUX, 1970; SODEK & WILSON, 1971a; LEE *et alii*, 1976), pode ser solubilizada por solventes alcóolicos com redução prévia das pontes S-S com 2-mercaptoetanol.

Demonstrou-se que a zeína é constituída por uma classe de macromoléculas heterogêneas em tamanho e carga (SOAVE *et alii*, 1975; GIANAZZA *et alii*, 1976; LEE *et alii*, 1976; TIGHETTI *et alii*, 1977). Do ponto de vista de massa, as zeínas são resolvidas por eletroforese em SDS essencialmente em quatro cadeias de polipeptídeos: 23.000 (Z.23); 21.000 (Z.21); 13.500 (Z.13,5) e 9.600 daltons (Z.9,6). As bandas mais pesadas são sempre os mais abundantes polipeptídeos (mais que 70% do total), de acordo com GIANAZZA *et alii* (1976). Do ponto de vista de carga, as zeínas parecem completamente heterogêneas por focalização isoelétrica (IEF) e são resolvidas em no mínimo 15 componentes isoelétricos entre pH 5 e 9 (SOAVE *et alii*, 1975; GIANAZZA *et alii*, 1976).

O padrão de acúmulo de zeína em endosperma de milho durante o desenvolvimento pode ser expresso de dois modos. Em relação ao peso seco não há aparentemente nenhum aumento na zeína a partir de 30 dias após a polinização, nem no endosperma normal, nem nas suas sublinhagens mutantes. Entretanto, quando as alterações na zeína são relacionadas ao grão individual, o aumento de zeína nas linhagens normais continua até muito mais tarde no desenvolvimento, embora os mutantes mostrem pouco ou nenhum aumento na zeína após 30 dias (TSAI & DALBY, 1974).

DI FONZO *et alii* (1977), estudando a cinética de acúmulo de proteína total, albuminas + globulinas (A + G), zeínas (Z1 e

Z2) e glutelinas (G2 e G3), durante o desenvolvimento do endosperma de milho normal, opaco-2 e flourey-2, observaram que os mutantes afetaram drasticamente a quantidade da fração Z1 e que a fração Z2 não foi inibida pelos alelos mutantes. Também, de acordo com os resultados obtidos por SODEK & WILSON (1971a), a zeína-1 foi grandemente diminuída, enquanto zeína-2 foi muito menos afetada pelo gene opaco-2. A mutação opaco-2 também teve apenas um pequeno efeito na quantidade de zeína adicional (equivalente a zeína-2) extraída por álcool quente (MOSSÉ, 1966) ou pela inclusão de acetato de sódio ao álcool (PAULIS *et alii*, 1969).

O modo como o gene opaco-2 opera é desconhecido, mas parece pouco provável que um único gene tanto diminua a síntese de zeína quanto estimule a síntese de outras classes de proteínas. Os aumentos nas proteínas que não zeínas podem ser uma resposta a um aumento nos aminoácidos disponíveis. A extensão da resposta pode diferir em diferentes linhagens de milho (SODEK & WILSON, 1970).

#### 1.4. Transporte e metabolismo de nitrogênio nas sementes

A origem dos aminoácidos utilizados para a síntese de proteínas em sementes tornou-se um assunto cujo interesse tem aumentado nos últimos anos. Essencialmente dois mecanismos são possíveis: os aminoácidos chegariam já prontos via corrente de translocação ou eles seriam sintetizados nas sementes em desenvolvimento (SODEK & SILVA, 1977). Os aminoácidos que chegam já prontos se originam tanto da hidrólise de proteínas da folha durante a senescência como do tecido foliar fotossinteticamente ativo, ou ainda, da assimilação do sistema radicular (BEEVERS, 1976). A composição de aminoácidos derivada dos tecidos ativos supõem-se que seja determinada pelo controle *feed-back*, enquanto que a dos derivados de hidrólise proteica não o são (MIFLIN & CHESHIRE, 1974).

Tanto por causa desse controle quanto por causa da translocação seletiva, o número de aminoácidos transportados no floema para as sementes em desenvolvimento, está aparentemente confinado ao ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico, glutamina e possivelmente alanina (SCHUMACHER, 1967). Neste aspecto, ARRUDA & SILVA (1979) relatam que para o milho os valores encontrados também indicam a importância desses aminoácidos, porém uma maior predominância da glutamina (cerca de 40% de N total).

Uma interconversão maciça de aminoácidos é portanto necessária na semente para restabelecer o balanço.

PATE *et alii* (1974) e ATKINS *et alii* (1975), estudando leguminosas, demonstraram que, aparentemente, todos os aminoácidos proteicos estão presentes na corrente de translocação, embora em forma desbalanceada, suprimindo os frutos em desenvolvimento. Isto fornece evidências para a operação, ao menos parcial, da alternativa que considera que os aminoácidos chegariam já prontos. Além disso, mostrou-se que vários aminoácidos são translocados e incorporados completamente intactos às proteínas de reserva da semente (LAWRENCE & GRANT, 1964; FINLAYSON & McCONNELL, 1969; SODEK & WILSON, 1970; ATKINS *et alii*, 1975).

Por outro lado, estudos com N<sup>15</sup> realizados por ATKINS *et alii* (1975), LEWIS & PATE (1973) e LEWIS (1975) mostram que o N-amida dos dois principais compostos nitrogenados que entram nas sementes (asparagina e glutamina) é imediatamente transferido para o grupo amino de outros aminoácidos. Isto sugere uma importante função para a biossíntese dos aminoácidos em sementes em desenvolvimento, e realmente BILINSKI & McCONNELL (1957), PATE *et alii* (1975), SODEK (1976), em trabalhos com C<sup>14</sup>, estabeleceram que as vias biossintéticas dos aminoácidos proteicos são ativas em sementes em desenvolvimento.

### 1.5. Biossíntese de lisina

Existem duas vias distintas da biossíntese de lisina na natureza: a via do ácido diaminopimélico (DAP) encontrada em plantas superiores, algas, bactérias e alguns fungos inferiores (VOGEL *et alii*, 1970), e a via do ácido 2-aminoadípico (AAA) e sacaropina, encontrada em representantes de fungos dos grupos ascomycetos, basideomicetos, ficomicetos, que foram testados por WADE *et alii* (1977).

Um esquema das vias biossintéticas mencionadas é apresentado nas Figuras 1a e 1b.

Estudos "in vivo" da incorporação de precursores radioativos para lisina indicam que plantas superiores utilizam a via metabólica do diaminopimelato (Vogel, 1965 apud MAZELIS, 1977; MOLLER, 1974).

Em estudos realizados por SODEK (1976) sobre o destino dos precursores radioativos da biossíntese de lisina, seguindo sua injeção direta no endosperma, são apresentadas evidências de que a síntese de lisina e de outros aminoácidos proteicos ocorre no endosperma de milho em desenvolvimento. Semelhantes evidências foram demonstradas por McCONNELL (BILINSKI & McCONNELL, 1957; McCONNELL, 1969), no endosperma de trigo em desenvolvimento, seguindo a injeção de precursores no colmo.

Existem fortes evidências, tanto por marcadores (MOLLER, 1974) quanto enzimáticas (CHESHIRE & MIFLIN, 1975) que a biossíntese de lisina em plantas superiores segue a via do DAP (ácido diaminopimélico), e os resultados obtidos por SODEK (1976) demonstram que a síntese de lisina no endosperma de milho é consistente com este ponto de vista.

Os resultados obtidos por SODEK (1978), que evidenciam a atividade da enzima diaminopimelato descarboxilase em endosperma

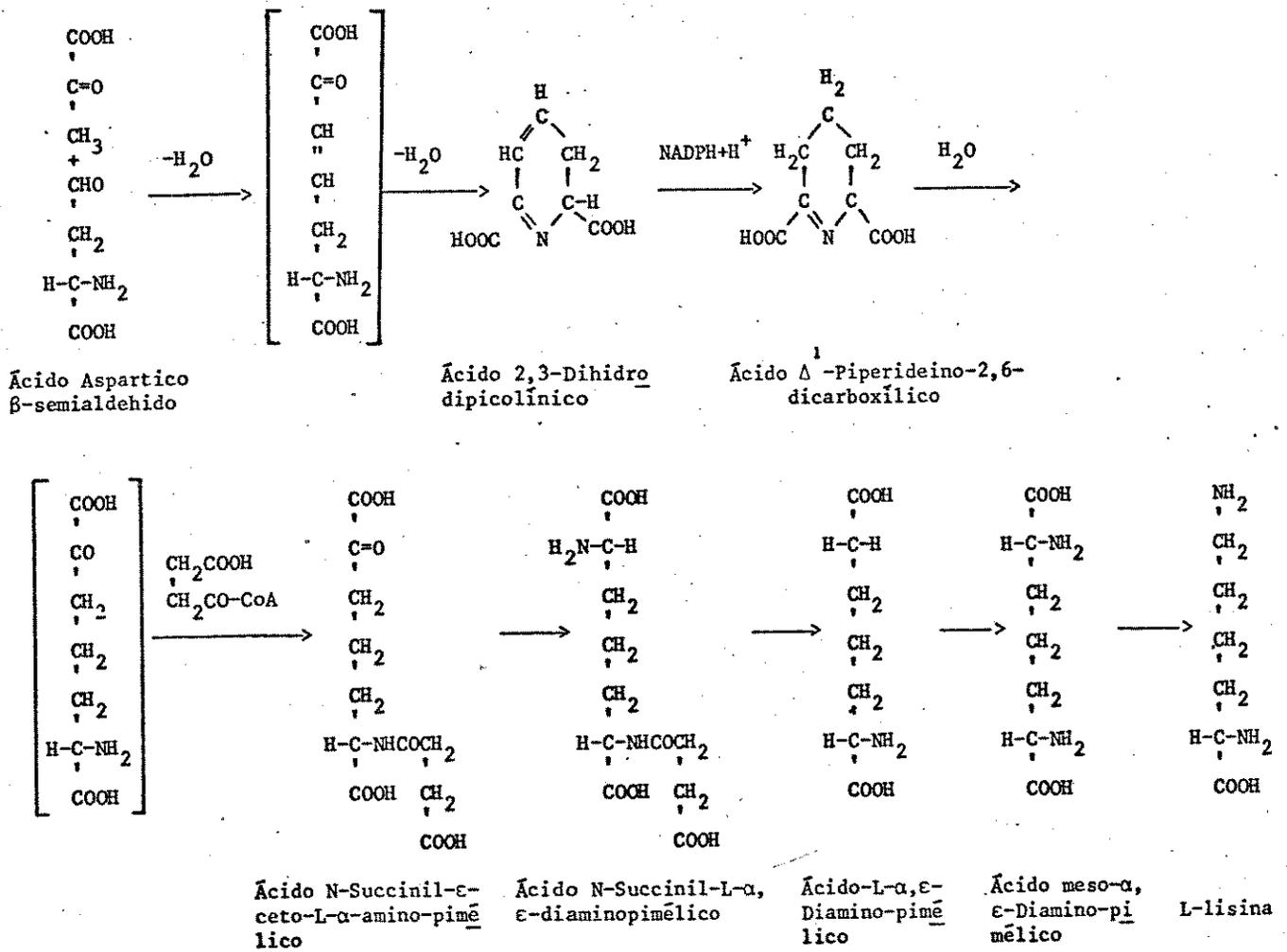


FIGURA 1a - Biossíntese da lisina via ácido diaminopimélico (MOL-  
LER, 1975).

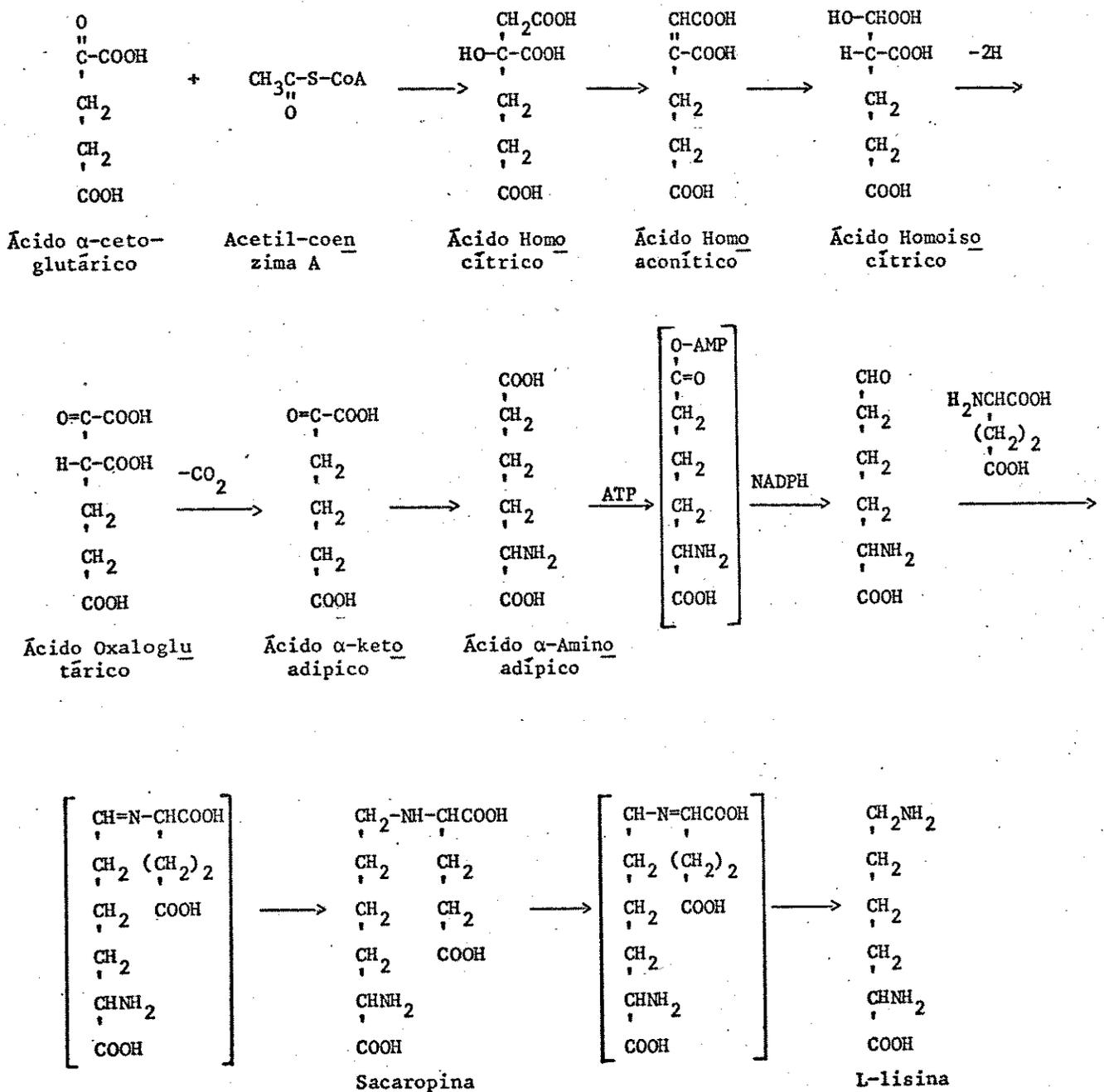


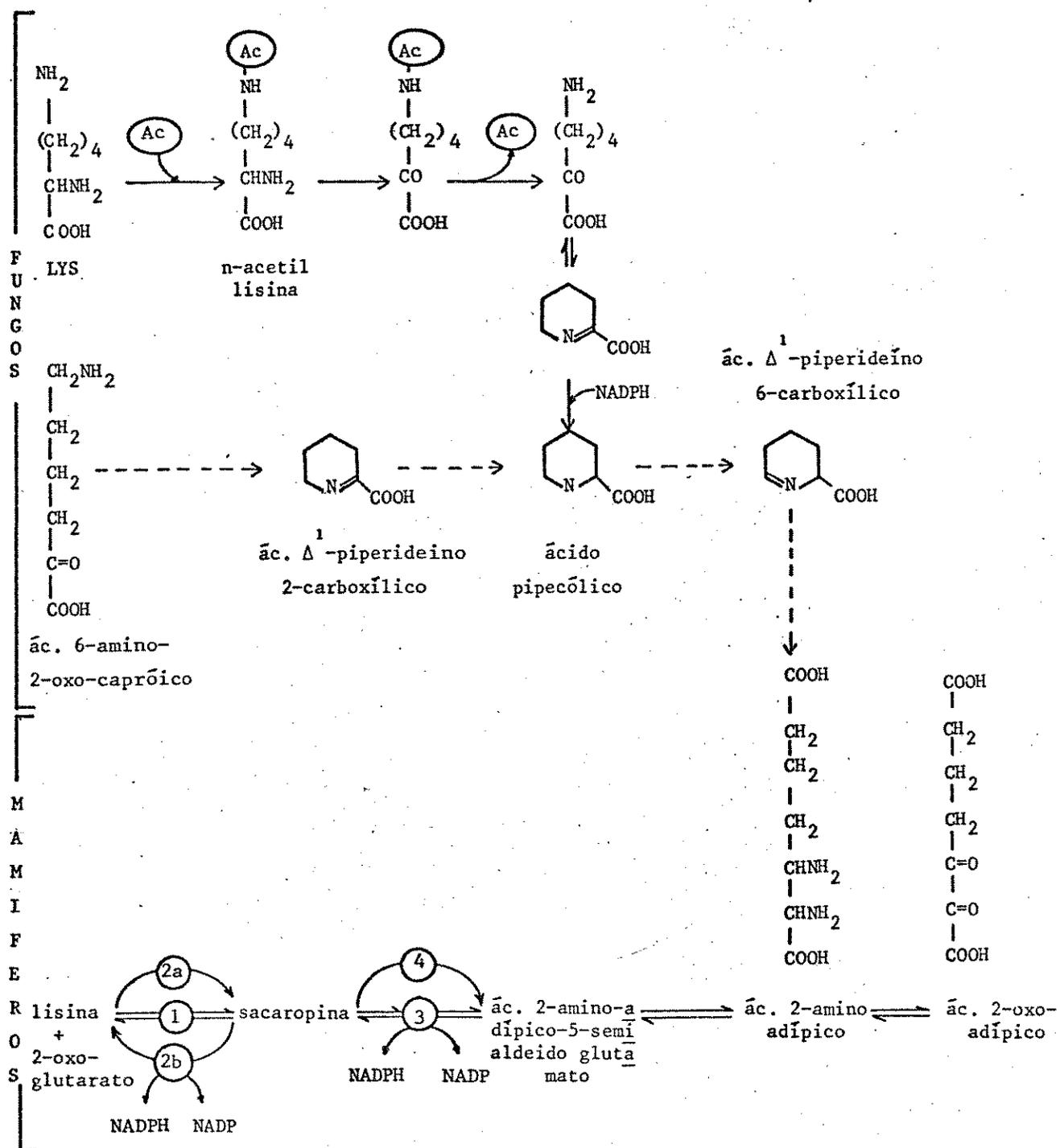
FIGURA 1b - Biossíntese de lisina via ácido aminoadípico (MOL  
LER, 1975).

de milho, estão também de acordo com a hipótese que a biossíntese de lisina em plantas superiores segue a via metabólica do ácido diaminopimélico (DAP).

### 1.6. Catabolismo de lisina

Uma diversidade de caminhos metabólicos existe, não apenas para a biossíntese mas para o catabolismo também. Pelo menos três vias catabólicas têm sido propostas em diferentes organismos (Figura 2). A diferença entre estes três caminhos está nos passos iniciais até o intermediário ácido 2-aminoadípico; a partir daí, a via é única. Quanto ao início do caminho, em animais, as evidências apontam para o caminho envolvendo a sacaropina como intermediária (FELLOWS & LEWIS, 1973). Para alguns fungos, GUENGERICH & BROQUIST (1976) descreveram uma via envolvendo a 6-N-acetil-lisina. De acordo com ROTHSTEIN & MILLER (1954) e SCHWEET *et alii* (1955), outros fungos utilizam ácido 6-amino-2-oxicapróico no catabolismo de lisina. Para complicar ainda mais a situação em fungos, WADE *et alii* (1980) sugeriram uma outra via envolvendo sacaropina, ou seja, o caminho inverso da via biossintética de lisina em fungos. Além dos três caminhos indicados na Figura 2, podem existir outros em função da presença, em diversas bactérias, de oxigenases de lisina (HAYAISHI, 1966; TAKEDA & HAYAISHI, 1966) e de outras enzimas (STADTMAN, 1973) que levem à degradação de lisina.

Estudos sobre o catabolismo de lisina em plantas superiores têm sido raros. A transformação de lisina em alcalóides é conhecida (GUPTA & SPENSER, 1969; LEISTNER *et alii*, 1973), porém isto ocorre apenas em número bastante limitado de plantas e, além do mais, o carbono e o nitrogênio, neste caso, não são reciclados para o metabolismo intermediário. Trabalhos com *Phaseolus vulgaris*



- (1) sacaropina desidrogenase (2a) lisina 2-oxoglutarato redutase  
 (2b) sacaropina oxidoreductase (3) sacaropina desidrogenase  
 (4) sacaropina desidrogenase

FIGURA 2 - Metabolismo de lisina em fungos e mamíferos (WADE *et alii*, 1980).

*ris* (LOWY, 1953; GROBBELAAR & STEWARD, 1953) apontam um caminho catabólico para lisina no qual figura ácido piperídico como intermediário chave. É conhecido que leguminosas (MEISTER *et alii*, 1957) são capazes de formar ácido piperídico a partir de ácido  $\alpha^1$ -piperidina-2-carboxílico (ver Figura 2). Entretanto, ácido piperídico e seus derivados parecem ser mais produtos do que intermediários do metabolismo de lisina, uma vez que são acumulados em leguminosas em geral (GROBBELLAR *et alii*, 1954).

Talvez o único trabalho que fornece evidências mais claras quanto à natureza da via catabólica de lisina em plantas é o de MOLLER (1976a). Neste trabalho, feito com plântulas de cevada incubadas com diversos compostos marcados, as evidências apontam para um caminho envolvendo a sacaropina como intermediário (ver Figura 2). No mesmo trabalho foram apresentadas evidências contra o envolvimento do ácido piperídico no processo.

No caso do milho, especificamente no endosperma em desenvolvimento, há evidências de que ocorre intenso catabolismo de lisina, embora sem conhecimento do caminho envolvido. Foi observado por SODEK & WILSON (1970) diferença na marcação dos aminoácidos em endospermas de milho normal e opaco-2 com plantas onde os grãos normal e opaco-2 desenvolveram-se na mesma espiga, e constataram que o sítio de conversão de lisina estava nos grãos normais. Ainda, os embriões dos grãos normais apresentaram pouca marcação do ácido glutâmico e prolina (produtos do catabolismo de lisina), sugerindo que o endosperma é mesmo o sítio de conversão de lisina.

Os resultados encontrados por SODEK & WILSON (1970), SILVA & ARRUDA (1979), HADZI-TASKOVIC SUKALOVIC (1984), em milho e por BRANDT (1975) em cevada, indicam que o catabolismo de lisina é maior no endosperma normal do que no mutante com alta lisina. Conclui-se assim que a taxa de conversão de lisina pode ser um

mecanismo importante para o controle do nível de lisina no endosperma de milho.

Como no endosperma opaco-2 o catabolismo de lisina foi demonstrado ser menor do que no endosperma normal, e a síntese de zeína (proteína com praticamente nenhuma lisina) também é menor no opaco-2, pode-se pensar numa associação entre a baixa síntese de zeína e o baixo catabolismo de lisina, aminoácido que seria utilizado para a síntese de outras proteínas de reserva.

Recentemente, ARRUDA *et alii* (1982) caracterizaram uma enzima que converte lisina a sacaropina, a qual pode ser o primeiro passo no catabolismo de lisina em endosperma de milho. A enzima chamada lisina cetoglutatarato redutase (LKR), cataliza a seguinte reação:



É uma enzima que foi caracterizada em tecidos humanos e animais (HUTZLER & DANCIS, 1968; HUTZLER & DANCIS, 1970; FELLOWS, 1973) onde parece catalizar o primeiro passo do catabolismo de lisina (FELLOWS & LEWIS, 1973). A reação inversa é catalizada pela sacaropina desidrogenase, em presença de NAD e é considerada o passo final da biossíntese de lisina (SAUDERS & BROQUIST, 1966; GAILLARDIN *et alii*, 1979; HANKE & HILGENBERG, 1979; WADE *et alii*, 1980). Assim, em alguns organismos a sacaropina é um intermediário da biossíntese de lisina, enquanto em outros ela parece estar envolvida na degradação do referido aminoácido.

Demonstrou-se que a LKR é específica para os substratos lisina e  $\alpha$ -cetoglutatarato. Isto porque vários aminoácidos, inclusive de estruturas estreitamente relacionadas, assim como a D-lisina e L-ornitina, não substituíram L-lisina, nem oxaloacetato ou piruvato substituíram  $\alpha$ -cetoglutatarato (ARRUDA *et alii*, 1982). Demonstrou-se também que NADH não substitui NADPH como doador de elétrons, o que também foi encontrado por HUTZLER & DANCIS (1968)

para a enzima de fígado humano.

Para confirmar que a atividade medida era realmente a LKR, ARRUDA *et alii* (1982) demonstraram a formação de sacaropina no ensaio por cromatografia gás-líquida e por cromatografia em camada fina. Além disso, sugeriram que a medida da oxidação de NADPH dependente de lisina e  $\alpha$ -cetogluturato é uma estimativa razoável da atividade de LKR.

De acordo com os resultados obtidos por ARRUDA & SILVA (1983); HADZI-TASKOVIC SUKALOVIC (1984), a atividade da enzima aumenta após o início do desenvolvimento da semente, atinge um pico no estágio farináceo e decresce depois disso, com a maturidade da semente. Constatou-se que o aumento na atividade de LKR coincide com a intensificação do processo metabólico do grão para a síntese de proteínas de reserva.

Demonstrou-se que o gene opaco-2 em endosperma de milho leva a um decréscimo na atividade da LKR (SILVA & ARRUDA, 1979; HADZI-TASKOVIC SUKALOVIC (1984). Isto parece estar de acordo com o maior nível de lisina nos endospermas opaco-2, uma vez que esta enzima está envolvida no catabolismo de lisina.

### 1.7. Objetivos

No presente trabalho, o objetivo foi caracterizar a enzima lisina cetogluturato redutase, bem como determinar a curva de atividade ao longo do desenvolvimento de endospermas de milho normal e opaco-2, e relacionar os níveis de atividade com a síntese de proteínas específicas no endosperma.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo

O presente trabalho foi realizado com milho (*Zea mays* L.). Utilizaram-se duas linhagens: L.160 e L.1038, cada uma com as versões normal e opaco-2, pertencentes à coleção de germoplasma do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP. Essas linhagens são isogênicas, possuindo um mínimo de oito ciclos sucessivos de autofecundação.

Instalou-se um experimento no campo, utilizando-se as linhagens mencionadas acima, as quais foram semeadas em doze linhas de 10m de comprimento, com espaçamento de 1m entre linhas e 0,40m dentro da linha com duas plantas por cova, constituindo um ensaio em blocos ao acaso, com quatro tratamentos (linhagens) e três repetições.

A semeadura foi feita no mês de setembro de 1983 e reali-zaram-se as práticas de cultivo recomendadas para a cultura do mi-lho, ou seja: adubação à base de NPK (80kg de N, 80kg de  $P_2O_5$  e

30kg de  $K_2O$  por ha) por ocasião da semeadura; desbaste; adubação nitrogenada, em cobertura; controle de plantas daninhas e controle de pragas. As condições climáticas reinantes durante o desenvolvimento da cultura estão representadas na Tabela 3. Adotou-se também a prática da irrigação, sempre que a mesma se fez necessária.

TABELA 3 - Condições climáticas para Campinas (lat.  $22^{\circ}54'S$ , long.  $47^{\circ}5'W$ ), no verão 1983-1984 (dados fornecidos pelo IAC).

Mês	Temperatura ( $^{\circ}C$ ) (média mensal)		Umidade relativa (%)	Precipitação total mensal (mm)
	Máx.	Min.		
OUT	26,5	16,5	74,4	90
NOV	28,5	17,3	71,5	140
DEZ	27,8	18,8	80,8	277
JAN	30,8	19,3	73,9	188
FEV	32,6	20,0	69,3	36
MAR	29,9	18,7	73,5	81

Emergência: 02/10/83

Floração (início): 15/12/83

À medida que as espigas (inflorescência feminina) surgiam, foram protegidas com sacos plásticos (sempre a primeira espiga de cada planta). Assim que os estilo-estigmas estivessem viáveis (receptivos) e fossem observados nas panículas, anteras já abertas, com a presença de pólen, as mesmas foram protegidas com sacos de papel e, algumas horas depois, foi realizada a autofecundação, colocando-se sobre os estigmas da primeira espiga da mesma

planta o pólen coletado, e protegendo-a novamente. As espigas as sim obtidas foram coletadas semanalmente ao longo da maturação, compreendendo o período dos 10 aos 52 DAP (dias após a poliniza ção), e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para as análises de laboratório. Cole taram-se duas espigas de cada linha para cada estágio de matura ção.

Utilizaram-se também plântulas de milho com 3 a 9 dias de idade, obtidas através da germinação em vermiculita para evi tar o ataque de fungos sistêmicos que frequentemente ocorrem em linhagens.

Realizaram-se ainda ensaios onde as sementes de milho fo ram germinadas em placas de Petri, sobre papel de filtro umedeci do com solução de lisina, 0; 2; 4; 6; 8 e 10mM.

A título de comparação com o milho, foram realizados tam bém estudos com plântulas de soja, *Glycine max* (L.) Merrill, cv. Santa Rosa, e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). As sementes foram germinadas em placa de Petri, a  $30^{\circ}\text{C}$ , no escuro, sobre papel de filtro umedecido com água. Após cinco dias, as radículas foram se paradas dos cotilédones e ambas as partes usadas para a extração e dosagem de enzima.

## 2.2. Métodos Analíticos

### 2.2.1. Preparo dos extratos e ensaios

Os extratos foram preparados segundo a metodologia des crita por ARRUDA *et alii* (1982). O material a ser utilizado para a preparação do extrato foi macerado a frio em almofariz com 20ml de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,0 contendo EDTA, 1mM, e 2-mercapto-etanol, 1mM). O homogeneizado foi filtrado em duas camadas de gazes e centrifugado a  $12.000 \times g$ , durante 25 minutos, e o sobrenadante foi tratado com sulfato de amônio,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . O

precipitado obtido entre 30 e 70% de saturação foi coletado e ressuspendido em 2ml de tampão de extração. Após a dessalinização em uma coluna de Sephadex G-25 (1,5 x 9,0cm) a fração proteica foi coletada. Esta fração foi utilizada para a medida da atividade da lisina cetoglutaratase (LKR). O esquema da metodologia utilizada para a extração pode ser observado na Figura 3.

A enzima (LKR) foi dosada de acordo com ARRUDA *et alii* (1982). A mistura de ensaio constituiu-se de fosfato de potássio (100 $\mu$ mol, pH 7,0), L-lisina (50 $\mu$ mol),  $\alpha$ -cetoglutaratato (25 $\mu$ mol), NADPH (300 $\mu$ mol), e enzima, num volume total de 1ml. A mistura foi incubada, na própria cubeta, em banho-maria, a 30°C, e a oxidação de NADPH avaliada através da leitura em um espectrofotômetro, a 340nm, em intervalos de 10 minutos. A atividade foi calculada em nmol . h<sup>-1</sup>, baseando-se num coeficiente de extinção, para uma solução de NADPH, de 6,22.

#### 2.2.2. Presença de inibidores endógenos da LKR

Para se analisar a presença de inibidores endógenos da LKR, foram realizados ensaios misturando-se extratos de plântulas com os de endosperma ou extratos de endospermas opaco-2 com os de endosperma normal. A mistura foi feita em diferentes etapas do processo de extração da enzima, ou seja, antes do tratamento com sulfato de amônio, após a dessalinização em coluna de Sephadex G-25, e na mistura do ensaio.

#### 2.2.3. Fracionamento de proteínas

Foi realizado o fracionamento da proteína do endosperma de parte do material utilizado para a determinação da curva de atividade da LKR. Para isso os grãos foram acondicionados em frascos de vidro devidamente identificados, liofilizados, moídos em micro-moinho e depois em moinho de bola, para se obter uma fari

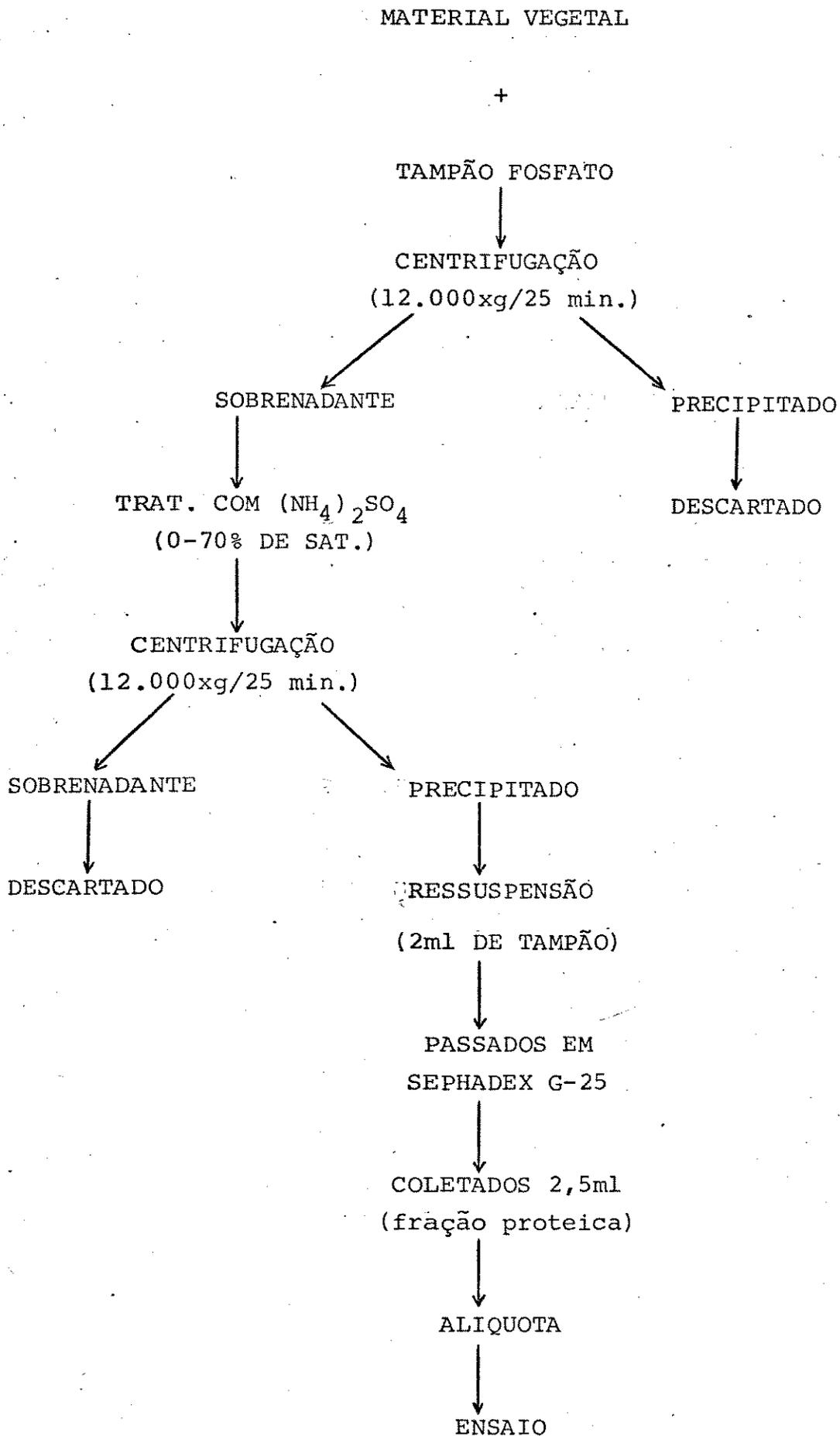


FIGURA 3 - Esquema da metodologia utilizada para a extração da fração proteica contendo a enzima lisina cetoglutarato redutase.

nha bem homogênea e fina, e uma porção desta foi utilizada para o fracionamento. O fracionamento foi feito segundo a metodologia proposta por PAULIS (1977) ou seja, uma extração sequencial das frações albumina + globulina, depois zeína e depois glutelinas.

Tomou-se uma amostra de 500mg do material liofilizado e moído, e adicionou-se 2,5ml de cloreto de sódio 0,5M, para a extração da fração albumina + globulina (Fração I). O material foi mantido a mais ou menos 4°C por 1 hora, agitando com bastão de vidro, periodicamente. Finalmente, o extrato foi centrifugado a 2.000rpm durante 5 minutos. Este procedimento se repetiu três vezes, juntando-se os sobrenadantes obtidos em cada centrifugação e anotando-se o volume. Antes da extração da fração seguinte, o resíduo foi lavado com água. Para a extração das frações zeína (Fração II) e glutelinas (Fração III), procedeu-se da mesma maneira, variando apenas os solventes de extração. A zeína (zeína 1 e zeína 2) foi extraída com isopropanol 55% + 2-Mercapto-etanol 0,6%, à temperatura ambiente, e as glutelinas foram extraídas com hidróxido de sódio 0,2N, também à temperatura ambiente. No resíduo ficaram então as proteínas não-solúveis (Fração IV).

Um esquema da metodologia utilizada para o fracionamento é apresentado na Figura 4.

#### 2.2.4. Dosagem de proteína

##### 2.2.4.1. Digestão das amostras (Micro-Kjeldahl)

Como não existe um método de leitura direta do teor de proteína em espectrofotômetro que seja igualmente sensível para todas as frações, as determinações foram feitas segundo a metodologia proposta por NKONGE & BALLANCE (1982) através da digestão das amostras e determinação do teor de nitrogênio fazendo-se depois a conversão para proteína.

Para a digestão, colocou-se alíquota de 1ml de cada fra



ção nos frascos micro-kjeldahl, aos quais juntou-se 1g da mistura catalizadora (sulfato de potássio + óxido de mercúrio, na proporção 9:1) e 3ml de ácido sulfúrico concentrado. As soluções foram aquecidas até que estivessem claras. Em seguida os digeridos foram esfriados e diluídos para 100ml com água destilada e deionizada.

As soluções padrão de nitrogênio foram preparadas utilizando-se 47,16mg de sulfato de amônio anidro (3 horas a 103°C) substituindo a amostra nas condições de digestão acima. Este, digerido, após a diluição para 100ml produziu uma solução de 100g de N/ml. As várias concentrações foram obtidas diluindo-se o digerido de sulfato de amônio com o digerido branco, que foi preparado de maneira idêntica, utilizando-se somente catalizador e ácido sulfúrico.

#### 2.2.4.2. Colorimetria

Para a dosagem do nitrogênio, foi utilizado o método colorimétrico proposto por NKONGE & BALLANCE (1982).

Inicialmente, preparou-se o tampão a partir de duas soluções estoque. Solução A, composta de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,2M), NaOH (0,2M) e tartarato de sódio e potássio (0,36M) e solução B, NaOH (2,5M). O tampão foi obtido pela mistura de A e B, na proporção de 1:1(V/V). O salicilato nitroprúico foi preparado dissolvendo-se salicilato de sódio (20g) e nitropruciato de sódio (30mg), em água destilada e deionizada até 100ml. A solução de hipoclorito de sódio foi preparada na concentração apropriada (5%) pouco antes do uso, pela diluição com água destilada e deionizada.

Tomou-se 0,5ml do digerido diluído, adicionou-se 1,5ml de tampão e 0,4ml de salicilato nitroprúico. Em seguida a solução foi misturada e colocada em banho-maria a 40°C por 3 minutos para entrar em equilíbrio com a temperatura de incubação. Depois, 0,2ml da solução de hipoclorito foi adicionada. A mistura de reação com

pleta foi incubada por 30 minutos a 40°C. As amostras foram então diluídas com 10ml de água destilada e deionizada e a absorbância a 660nm foi medida.

Após calcular o conteúdo de nitrogênio nas amostras, os valores obtidos foram transformados em proteína, usando-se o fator 6,25.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Caracterização da lisina-cetoglutarato redutase (LKR) em milho normal

A reação catalizada pela LKR envolve como substrato a lisina e  $\alpha$ -cetoglutarato, e um doador de elétrons, geralmente NADPH. Do ponto de vista prático, a dosagem desta enzima é mais fácil quando feita através da medida da oxidação do NADPH. Entretanto, neste caso é imprescindível verificar a dependência desta oxidação da presença dos outros substratos, uma vez que são muitas as enzimas que catalizam a oxidação do NADPH.

Conforme a Tabela 4, pode ser verificado que ocorre uma pequena oxidação do NADPH na ausência tanto de lisina como de  $\alpha$ -cetoglutarato, embora na presença de ambos os substratos a taxa de oxidação seja bem maior. Conclue-se desses dados que LKR está presente em endosperma imaturo de milho, e a medida da sua atividade através da oxidação de NADPH é perfeitamente viável.

TABELA 4 - Oxidação de NADPH por extrato de endosperma imaturo de milho normal na presença e na ausência de lisina e  $\alpha$ -cetogluturato.

Ensaio	Oxidação de NADPH ( $\Delta$ Abs. 340nm/30 min.)
Completo	0,135
- LYS	0,020
- $\alpha$ KG	0,021

### 3.2. Otimização do ensaio

#### a. Oxidação não específica do NADPH

Conforme os dados anteriores, Tabela 4, o ensaio apresenta um pequeno branco na ausência de lisina e  $\alpha$ -cetogluturato. Esta atividade pode ser atribuída a uma oxidação não específica do NADPH, ou pode ser atividade de LKR mesmo, devido à presença de pequenas quantidades (endógenas) de lisina e  $\alpha$ -cetogluturato no extrato.

Para esclarecer esta dúvida, realizaram-se ensaios comparando a atividade da enzima antes e depois de passar na coluna de Sephadex G-25, uma vez que o G-25 deve remover qualquer substrato endógeno do extrato. De acordo com os resultados obtidos (Tabela 5), observa-se que o valor do branco não diminuiu após a passagem pelo G-25, indicando que a mudança na leitura do branco se deve à uma oxidação não específica do NADPH. A atividade da LKR (ensaio completo menos o branco) também não se modificou em função da passagem ou não em G-25. Entretanto, para todos os ensaios posteriores foi adotado o uso de G-25 no preparo dos extratos, para se

trabalhar com o extrato mais purificado.

TABELA 5 - Taxa de oxidação de NADPH em ensaios de lisina cetoglutarato redutase com extratos de endosperma imaturo de milho normal, crus e dessalinizados em coluna de Sephadex G-25.

Extrato	Oxidação de NADPH ( $\Delta$ Abs. 340nm/30 min.)	
	Completo	Branco (-LYS)
Pré G-25	0,135	0,021
Pós G-25	0,138	0,024

#### b. Tempo de reação

Com a finalidade de estabelecer um tempo de incubação adequado para o ensaio, foi estudada a oxidação do NADPH em função do tempo, cujos resultados são apresentados na Figura 5. Observa-se que a oxidação do NADPH foi aproximadamente linear com o tempo até pelo menos 45 minutos. Para os ensaios de rotina foi adotado um tempo de 30 minutos, ou seja, dentro da faixa de linearidade.

#### c. Quantidade de enzima

Um ensaio pode ser considerado adequado para dosar uma enzima quando a atividade acusada é proporcional à quantidade de enzima no extrato. Desta forma, uma atividade que seja o dobro de outra significa a presença de duas vezes mais enzima no extrato. Tais condições são atingidas quando a reação catalizada exibe uma cinética de zero ordem, ou seja, quando a reação estiver limita

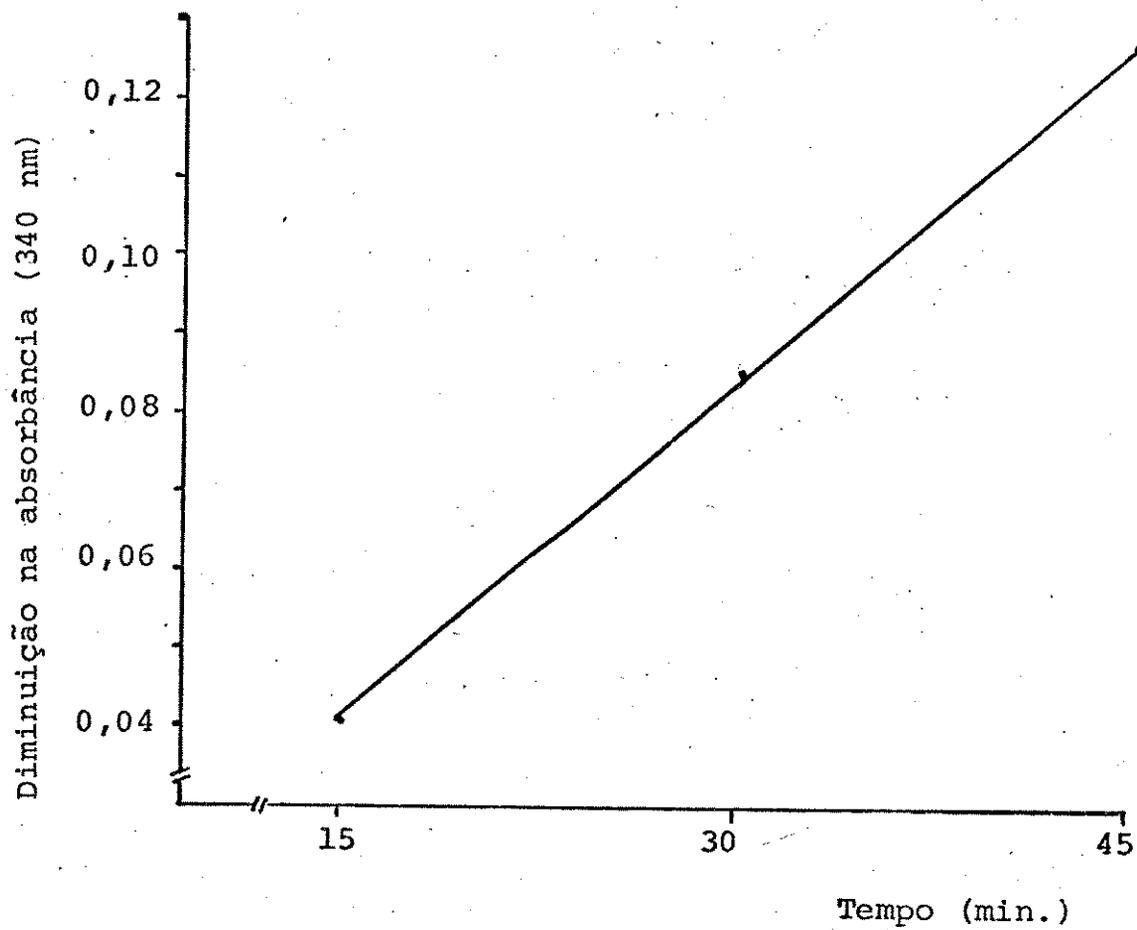


FIGURA 5 - Oxidação de NADPH ( $\Delta$  da absorb. 340nm) aos 15, 30 e 45 min. de incubação do extrato de endosperma imaturo de milho normal.

da exclusivamente pela enzima. Isto foi investigado, variando -se o volume de extrato enzimático no ensaio e, conforme pode ser observado na Figura 6, a atividade enzimática apresentada aumentou linearmente com a concentração da enzima no ensaio.

#### d. Especificidade da enzima

De acordo com as informações disponíveis sobre a LKR, verifica-se que a reação catalizada por esta enzima tem como doador de elétrons o NADPH, como por exemplo em ARRUDA *et alii* (1982).

A fim de se averiguar a especificidade da LKR do endosperma de milho com relação ao doador de elétrons, estudou-se a possibilidade de substituir o NADPH pelo NADH. Observa-se, através dos resultados apresentados na Tabela 6, que a oxidação de NADH foi praticamente igual ao branco. Por outro lado, a enzima apresentou alta atividade em presença de NADPH. Isto indica, portanto, que a LKR é altamente específica para NADPH como doador de elétrons.

TABELA 6 - Comparação de NADPH e NADH como doadores de elétrons da enzima lisina cetoglutatarato redutase, utilizando-se extrato de endosperma imaturo de milho normal.

Doador de elétrons	Oxidação de NADPH/NADH ( $\Delta$ Abs. 340nm/30 min.)	
	Completo	Branco (-LYS)
NADPH	0,138	0,024
NADH	0,022	0,017

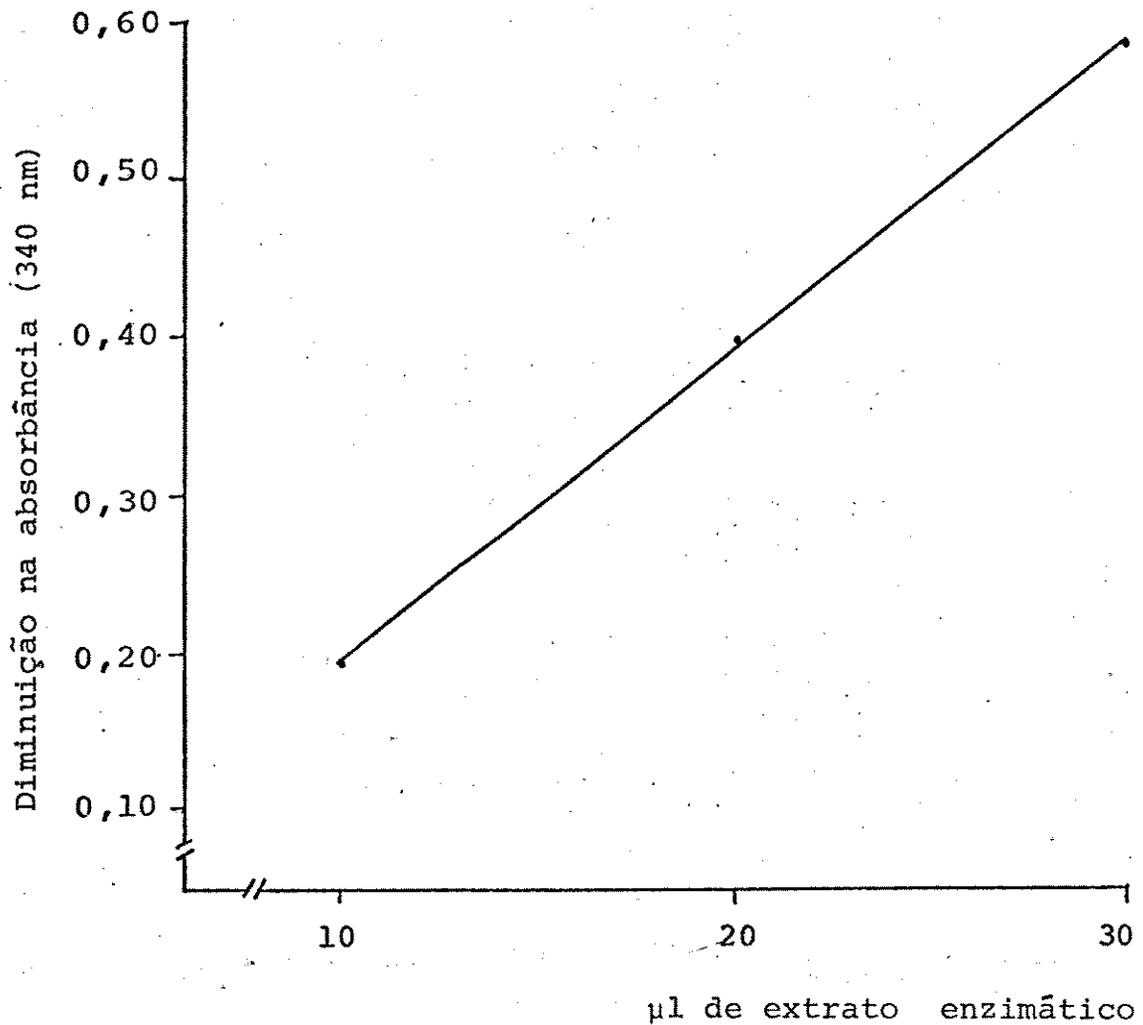


FIGURA 6 - Oxidação de NADPH ( $\Delta$  da absorb. 340nm/30 min.) em ensaios com diferentes concentrações da enzima, utilizando-se extrato de endosperma imaturo de milho normal.

### 3.3. Atividade da LKR em plântulas

#### 3.3.1. Atividade da LKR em plântulas de milho normal

Não há motivos para supor que o catabolismo de lisina se ja restrito ao endosperma de milho. Durante a mobilização das re servas de proteína de sementes, a lisina é um dos aminoácidos li berados e translocados para serem usados na síntese de proteínas do embrião. Comparando-se o nível de lisina nas proteínas de re serva, com o nível nas proteínas do embrião, a quantidade de lisi na translocada (para o eixo) pode ser insuficiente ou em excesso para atender as necessidades do eixo. Pelo menos nos casos em que a lisina se apresenta em excesso, é evidente que a mesma deve ser catabolizada. Por esses motivos, seria interessante verificar a distribuição da LKR em outros órgãos do milho e de outras espé cies.

Nestes experimentos, foi verificado o nível de LKR em plântulas de milho normal, o qual em geral tem baixo teor de lisi na nas sementes, e em plântulas de soja e feijão, que possuem se mentes com alto teor de lisina. Os resultados são apresentados na Tabela 7. Pode-se observar que no milho, independente da parte da plântula utilizada no ensaio, não se detectou atividade da LKR. Já na soja e no feijão, a enzima está presente em grande quantida de, sendo que no caso da soja a atividade da LKR na raiz chegou a ser quase cinco vezes maior que a do cotilédone, considerando-se a atividade por grama de material.

#### 3.3.2. Atividade da LKR em plântulas de milho opaco-2

Tendo em vista a ausência de LKR em plântulas de milho normal, neste experimento resolveu-se analisar a presença de LKR em plântulas de milho opaco-2, uma vez que as reservas deste mutante contém níveis mais altos de lisina e talvez,

como acontece com o feijão e a soja, espécies que possuem reservas com alto teor de lisina, se pudesse encontrar atividade da enzima.

TABELA 7 - Atividade da lisina cetogluturato redutase para diferentes tecidos vegetais, aos 4 dias.

Espécie	Parte da planta	Atividade da LKR (nmol NADPH ox.min. <sup>-1</sup> . g <sup>-1</sup> )
	Semente (germinada)	0,00
Milho	Radícula	0,00
	Coleoptilo	0,00
Soja	Cotilédone	3,76
	Radícula	17,86
Feijão	Radícula	3,65

Os resultados obtidos (Tabela 8) revelam que também em plântulas de milho opaco-2, portanto originadas de sementes mais ricas em lisina que o milho normal, não se detectou atividade de LKR.

### 3.3.3. Atividade da LKR em plântulas de milho normal germinadas em meio contendo diferentes concentrações de lisina

Em função da ausência de atividade da LKR na plântula de milho observada no experimento anterior, imaginou-se que isto poderia ser devido à baixa disponibilidade de lisina, uma vez que sementes com maior disponibilidade desse aminoácido nas reservas,

como a soja e feijão, apresentavam atividade de LKR. É possível que a LKR se torne ativa nesses tecidos apenas na presença de um excesso de lisina (por indução, por exemplo).

Nesse experimento, as sementes foram germinadas em presença de diferentes níveis de lisina no meio de germinação, e observou-se que mesmo com o fornecimento de lisina exógena durante a germinação não se detectou atividade da LKR em plântulas de milho.

TABELA 8 - Taxa de oxidação de NADPH em ensaios de LKR com extratos de plântulas de milho opaco-2, aos dias.

Parte da plântula	Oxidação de NADPH ( $\Delta$ Abs. 340nm/30 min.)	
	Completo	Branco
Coleoptilo	0,046	0,051
Radícula	0,036	0,036
Semente (germinada)	0,093	0,085

#### 3.3.4. Atividade da LKR em plântulas de milho, usando NADH como doador de elétrons

Este ensaio foi realizado para se verificar a possibilidade de que a ausência de atividade de LKR em tecidos de plântulas de milho seja devida a uma especificidade diferente para o doador de elétrons, ou seja, NADH no lugar de NADPH. Para fins de comparação, a especificidade da LKR foi verificada também para a soja e o feijão.

Conforme os resultados obtidos, apresentados na Tabela 9, constatou-se que a ausência de atividade em plântulas de milho

tanto com NADPH como com NADH como doador de elétrons. Portanto não é este o motivo da não-detecção de atividade de LKR em plântulas de milho. Também em plântulas de soja e feijão a LKR demonstrou especificidade para NADPH como doador de elétrons.

TABELA 9 - Comparação de NADPH e NADH como doadores de elétrons da enzima LKR extraída de plântulas de milho, feijão e soja, aos 5 dias.

Espécie	Oxidação de NADPH/NADH ( $\Delta$ Abs. 340nm/30 min.)			
	NADPH		NADH	
	Completo	Branco (-LYS)	Completo	Branco (-LYS)
Milho	0,102	0,007	0,020	0,016
Soja	0,567	0,183	0,012	0,039
Feijão	0,242	0,064	0,032	0,035

#### 3.4. Presença de inibidores endógenos da LKR em plântulas

Outra possibilidade para a não detecção de atividade da LKR em plântulas de milho poderia ser a presença de inibidores endógenos da enzima. Tendo em vista a alta atividade da LKR em endosperma imaturo de milho normal, supõe-se que neste tecido o inibidor não exista ou esteja presente em níveis muito baixos. Para testar esta hipótese, foram misturados extratos de endosperma com o de plântulas de milho, em três etapas diferentes do processo de extração, ou seja, antes do tratamento do extrato com sulfato de amônio, após a dessalinização em G-25, e durante o ensaio.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10. Ob

serva-se que quando se misturaram os extratos de endosperma e de plântula, independente da fase do processo de extração, a atividade da LKR observada, sempre foi menor que a esperada, ou seja, menor que a atividade calculada pela média das atividades obtidas para endosperma e plântulas de milho separadamente (considerando que na mistura de ensaio o volume de extrato utilizado constituiu-se de partes iguais de endosperma e de plântula). Isto indica a ocorrência de alguma inibição, sendo que a maior inibição ocorreu quando a mistura dos extratos foi feita antes do tratamento com sulfato de amônio para a precipitação da fração proteica do extrato. O grau de inibição foi estimado em cinco vezes, aproximadamente, considerando-se que a atividade esperada, caso não houvesse inibição, seria de 12,86nmol de NADPH oxidado por minuto por ml de extrato enzimático (média das atividades encontradas para os extratos de endosperma e de plântula separadamente), e a atividade observada foi 7,93. Subtraindo-se deste valor a atividade relativa ao extrato de plântulas na mistura, que é 5,15 (a metade de 10,3 - pois no extrato utilizado, metade da alíquota corresponde a extrato de plântula e metade a extrato de endosperma), obtêm-se o valor da atividade relativa ao endosperma, ou seja, 2,78. Este valor é aproximadamente um quinto (1/5) ou 20% da atividade esperada caso não houvesse inibição (12,86), indicando que o grau de inibição deve estar em torno de cinco vezes (80%).

Vale ressaltar ainda que o inibidor deve ser de alto peso molecular, uma vez que não foi removido pela G-25, e também que desta vez foi detectada atividade em plântulas de milho.

### 3.5. Presença de inibidores endógenos da LKR em endosperma de milho opaco-2

Tendo em vista a presença, bastante evidente, de um iní

bidor da LKR em extratos de plântulas de milho, aparentemente au sente em extratos de endosperma imaturo, surgiu a possibilidade de que a baixa atividade da enzima em endosperma imaturo de milho opaco-2 seja devida à presença de tal inibidor. Isto foi verificado misturando-se o extrato de endosperma imaturo de milho normal com o de opaco-2, também em diferentes etapas do processo de ex tração, conforme descrito no item anterior.

TABELA 10 - Efeito da mistura de extratos de endosperma imaturo e de plântulas de milho na atividade da LKR.

Ensaio	Atividade da LKR (nmolNADPH ox. min <sup>-1</sup> . ml <sup>-1</sup> de extrato)
Endosperma	25,73
Plântula	10,30
End. + Plant. (1)	3,86*
End. + Plant. (2)	7,93*
End. + Plant. (3)	6,43*

Obs.: (1) Mistura feita antes do tratamento com sulfato de amônia.

(2) Mistura feita após dessalinização em coluna de Sephadex G-25.

(3) Mistura feita no ensaio.

\* A atividade esperada para as misturas, sem inibição é 18,02 e com 100% de inibição é 5,15.

Observou-se que quando se misturaram os extratos de mi lho normal e opaco-2, a atividade da LKR observada foi aproximadamente igual à esperada (Tabela 11), calculada pela média das ati vidades obtidas para os dois tipos de endosperma separadamente, ca so não houvesse inibição, independentemente da fase do pro cesso de extração que a mistura foi feita. Assim, constatou-se que a

baixa atividade em extratos de endospermas de milho opaco-2 não é devida à presença de algum inibidor (do tipo reversível, pelo menos), uma vez que a atividade observada com a mistura de extratos é aproximadamente a que seria esperada, caso não houvesse inibição. Ressalta-se ainda o fato que a atividade obtida para os dois tipos de endosperma foi a esperada, ou seja, uma alta atividade para o endosperma normal (15,84nmol de NADPH oxidado por minuto, por endosperma) e baixa para o endosperma opaco-2 (0,32nmol de NADPH oxidado por minuto, por endosperma).

TABELA 11 - Efeito da mistura de extratos de endosperma imaturo de milho normal e opaco-2 sobre a atividade da LKR.

Extratos	Atividade da LKR (nmolNADPH ox. min <sup>-1</sup> . ml <sup>-1</sup> de extrato)
end. normal	15,84
end. opaco-2	0,32
N + O <sub>2</sub> (1)	7,88*
N + O <sub>2</sub> (2)	9,00*

Obs.: (1) Mistura feita antes do tratamento com sulfato de amônio.

(2) Mistura feita após a dessalinização em coluna de Sephadex G-25.

\* A atividade esperada para as misturas, sem inibição é 8,08.

### 3.6. Padrão de atividade da LKR em endosperma de milho durante o desenvolvimento

Com o intuito de verificar o padrão de atividade da LKR em endosperma de milho durante o desenvolvimento do grão, foi realizado um experimento com duas linhagens de milho, L. 1038 (tipo dente) e L. 160 (tipo flint) nas versões normal e opaco-2. O mate

rial para as análises foi colhido semanalmente, a partir de 10DAP (dias após a polinização) até 52DAP. Conforme pode-se observar na Figura 7, no período inicial do desenvolvimento do grão a atividade é baixa, em torno de 0,04 (L. 160) e 0,12 (L. 1038)nmol de NADPH oxidado por minuto por endosperma, para os quatro tipos de endosperma em estudo. No caso das versões normais, a atividade aumenta de forma acentuada, atingindo um pico aos 24DAP. Em seguida, a atividade cai continuamente, chegando a zero, quando os grãos atingem a maturação (52DAP). Observou-se uma diferença marcante entre as duas linhagens estudadas, sendo que a L. 1038 apresentou uma maior atividade da LKR, atingindo uma atividade igual a 7,52, enquanto a L. 160 atingiu 4,52nmol de NADPH oxidado por minuto, por endosperma, aos 24DAP. Quanto ao tipo de endosperma, no caso da L. 160 a atividade da enzima no endosperma opaco-2 foi muito baixa (0,047nmol de NADPH oxidado por minuto, por endosperma, no máximo) quando comparada com o endosperma normal(4,52). Já na L. 1038 detectou-se uma pequena atividade da enzima no endosperma opaco-2 (2,49nmol de NADPH oxidado por minuto, por endosperma), entretanto foi proporcionalmente menor que o normal (7,52), da mesma linhagem. Assim, nas duas linhagens estudadas, as versões opaco-2 apresentaram níveis de LKR muito mais baixos que o normal, embora as atividades encontradas em L. 1038 tenham sido maiores tanto para o opaco-2 quanto para o normal.

### 3.7. Fracionamento de proteína

Tendo em vista as diferenças de atividade da LKR entre as linhagens L. 1038 (dente) e L. 160 (flint), principalmente nas versões opaco-2, e considerando que a LKR desenvolve um papel no catabolismo de lisina, supostamente mais intenso nas linhagens com menor nível de lisina, seria interessante verificar o conteúdo

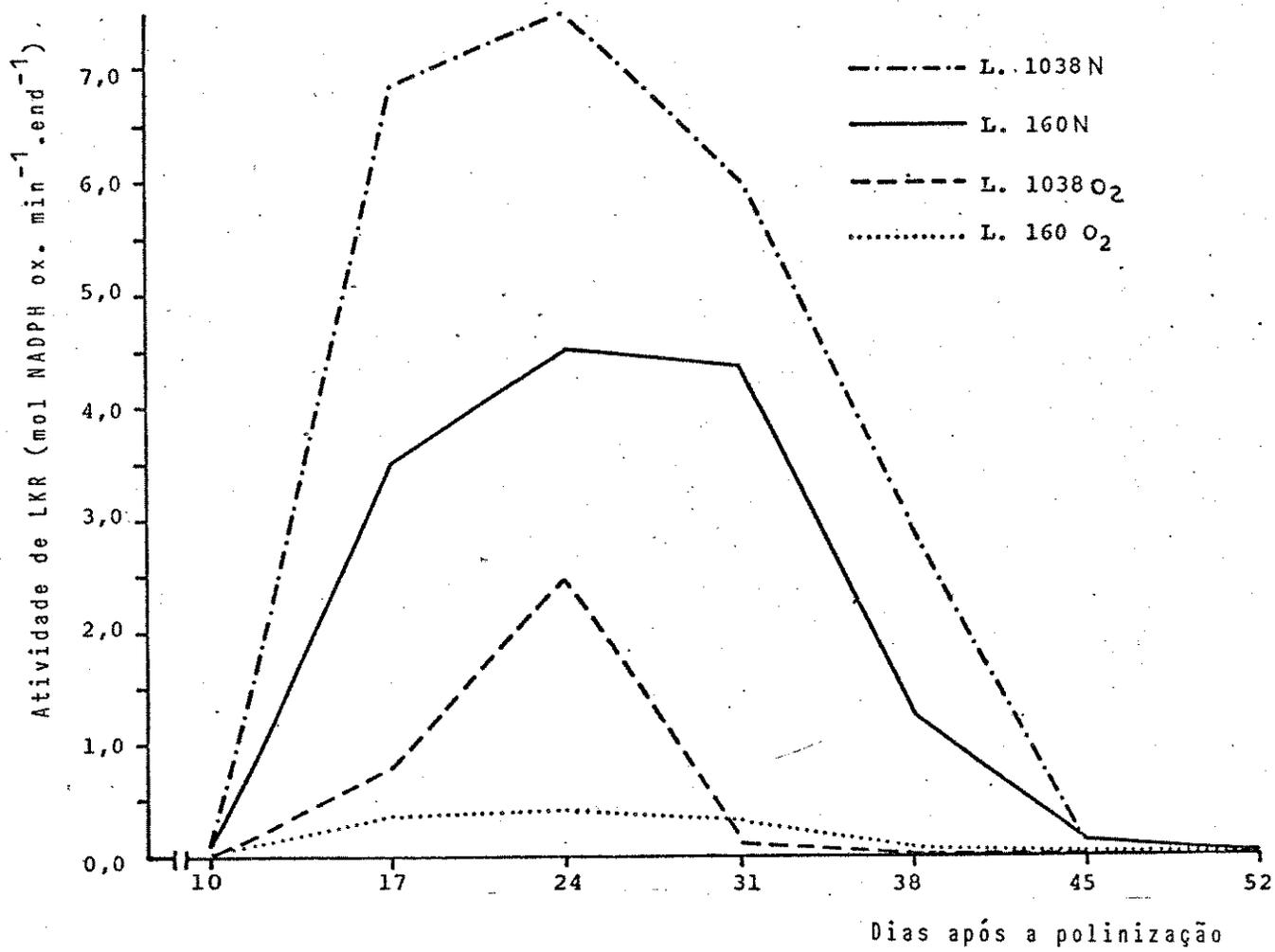


FIGURA 7 - Curva de atividade da lisina cetoglutarato redutase em endosperma de duas linhagens de milho (*Zea mays* L.) nas versões normal e opaco-2, dos 10 aos 52DAP (dias após a polinização).

do de proteínas de reserva durante o desenvolvimento do grão. Principalmente a zeína, proteína sem lisina, que poderia ser um tipo de indicador quanto à intensidade de catabolismo de lisina e, assim, talvez pudesse ser correlacionada com o nível de LKR no endosperma. Dessa forma, verificou-se a hipótese de que os diferentes níveis de LKR encontrados nos endospermas dos quatro tipos de milho estudados possam estar relacionados com o nível de síntese de zeína no endosperma. Foi realizado o fracionamento das proteínas de reserva do endosperma durante o desenvolvimento, em três grupos: Grupo I, albuminas + globulinas; Grupo II, zeína; Grupo III, glutelinas, utilizando o mesmo material colhido para a dosagem da LKR, descrito anteriormente.

Os resultados são apresentados nas Figuras 8, 9 e 10. De uma maneira geral, observa-se que não existem grandes diferenças entre as linhagens de milho utilizados. Houve um decréscimo na proporção de albumina + globulina, e um consistente aumento de zeína e glutelina, chegando a cerca de 40% (cada fração) do total. Isto seria de se esperar, pois as mesmas constituem as principais proteínas de reserva do endosperma de milho.

No caso da Fração I (alb. + glob.), cujos resultados são apresentados na Figura 8, ocorreu uma queda acentuada (50% para 5%) durante o desenvolvimento do grão, nos quatro materiais usados. No período inicial (10-24DAP) - linhagem L. 1038 - opaco-2 apresentou porcentagem um pouco maior que as demais. Observa-se ainda que, no geral, o nível dessa fração foi maior em endosperma opaco-2, mas que houve pouca diferença entre as linhagens.

Por outro lado, a Fração II (Figura 9), constituída pela zeína, apresentou um aumento acentuado entre 10 e 24DAP, não variando muito a partir de 38DAP. Observa-se que no geral o nível de zeína nos endospermas opaco-2 foi sempre menor que nos endospermas normais, principalmente entre 17 e 38DAP, entretanto houve

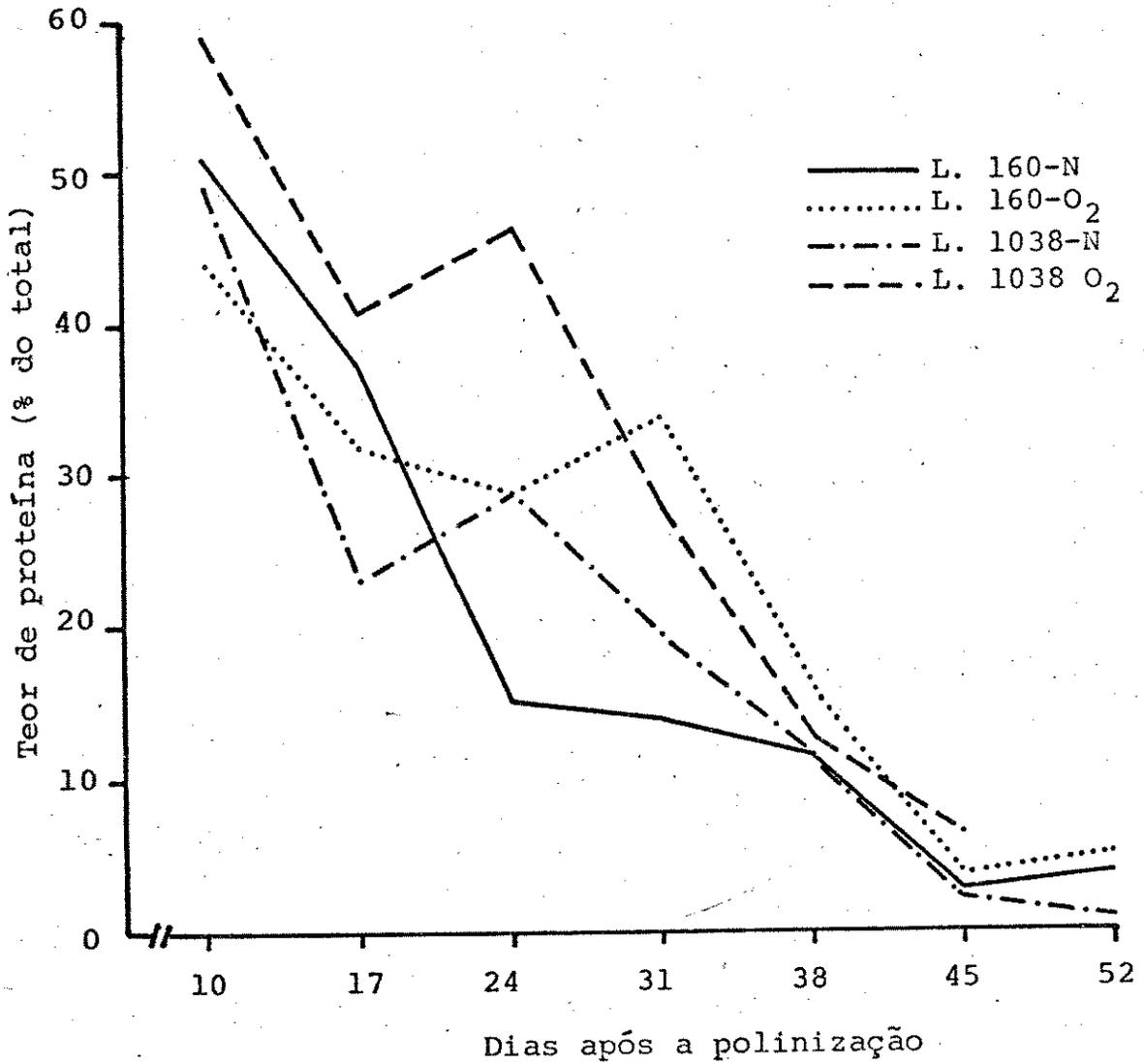


FIGURA 8 - Teor das diferentes frações proteicas em endosperma de milho, durante o desenvolvimento, para as linhagens 160 e 1038 nas versões normal e opaco-2. Fração I (albuminas + globulinas).

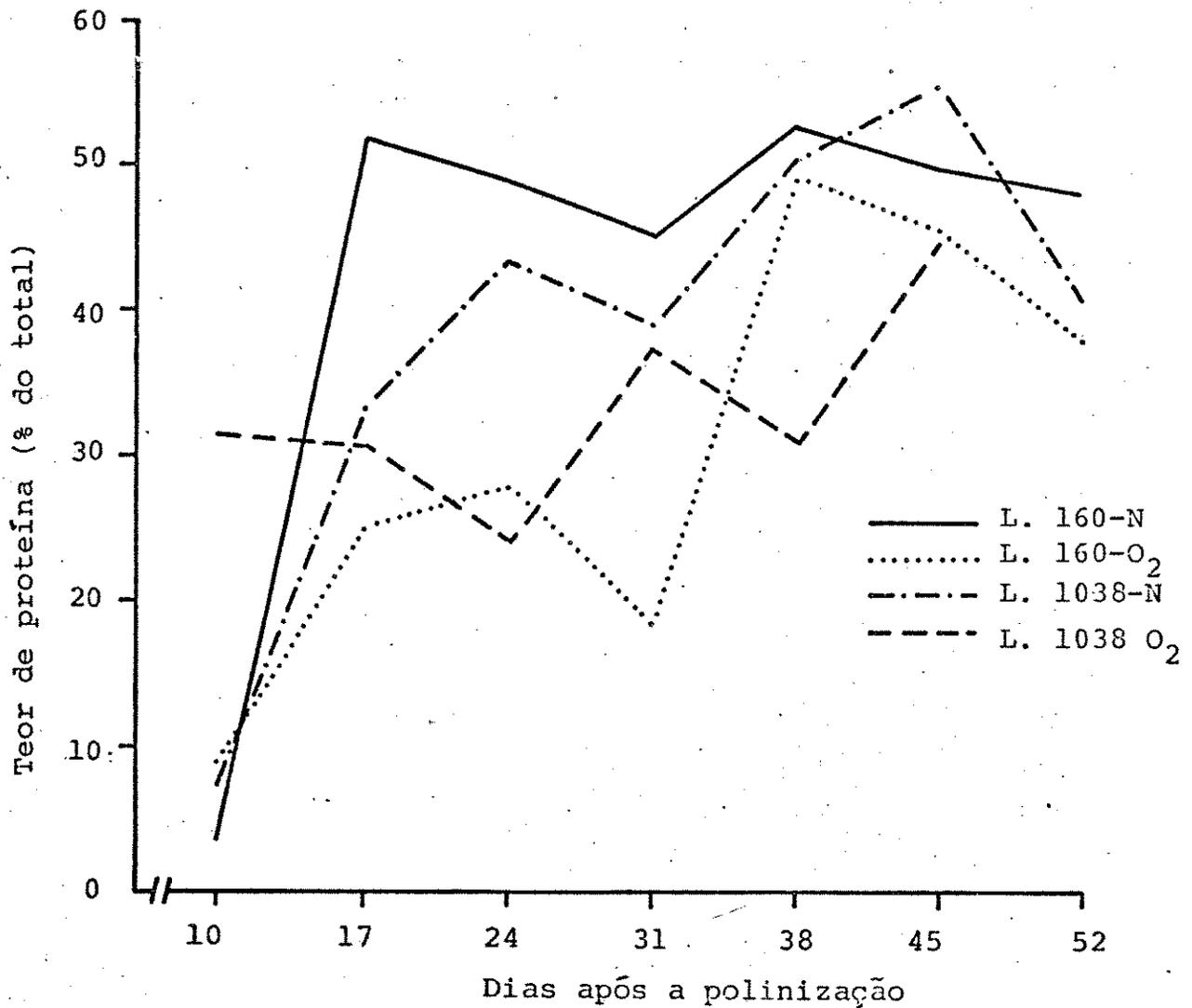


FIGURA 9 - Teor de diferentes frações proteicas em endosperma de milho, durante o desenvolvimento, para as linhagens 160 e 1038 nas versões normal e opaco-2. Fração II (zeína).

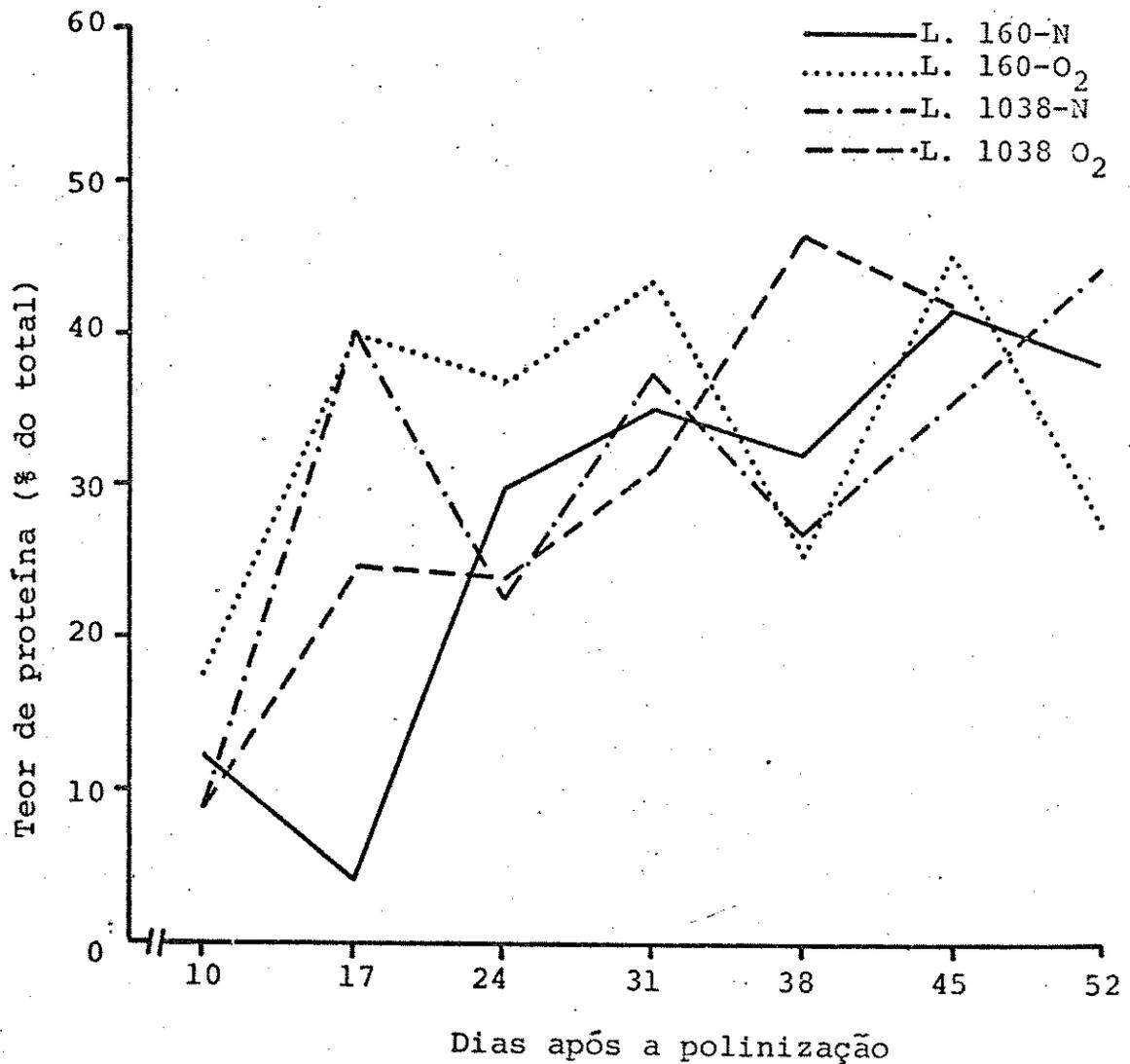


FIGURA 10 - Teor das diferentes frações proteicas em endosperma de milho, durante o desenvolvimento, para as linhas 160 e 1038 nas versões normal e opaco-2. Fração III (glutelinas).

pouca diferença entre as linhagens.

Com relação à Fração III (Figura 10) que são as glutininas, houve também um aumento acentuado entre 10 e 24DAP e depois foi muito mais lento. Há pouca diferença entre as linhagens e também entre as versões normal e opaco-2.

#### 4. DISCUSSÃO

A enzima LKR foi caracterizada pela primeira vez em plantas por ARRUDA *et alii* (1982), trabalhando com endosperma de milho. A enzima é específica para os substratos lisina e  $\alpha$ -cetoglutarato, usando NADPH como doador de elétrons. A enzima estudada no presente trabalho também apresentou as mesmas características. Uma propriedade importante demonstrada no presente trabalho é a especificidade pelo NADPH, que não pode ser substituído pelo NADH, da LKR não apenas de endosperma imaturo de milho normal, mas também para a LKR de plântulas de feijão e soja. A LKR de tecidos humanos e animais (HUTZLER & DANCIS, 1968; HUTZLER & DANCIS, 1970; FELLOWS, 1973) demonstra as mesmas características. Em tecidos animais a reação catalizada por esta enzima é tida como o primeiro passo do catabolismo de lisina (FELLOWS & LEWIS, 1973). Parece provável que a LKR possa desempenhar papel semelhante em plantas. As evidências fornecidas por MOLLER (1976) quanto à natureza da via catabólica da lisina, em plantas, apontam para um caminho en

volvendo a sacaropina como intermediário. O produto formado na reação catalizada pela LKR é a sacaropina (ARRUDA *et alii*, 1982), portanto fica reforçada a hipótese de que o catabolismo de lisina em plantas (ou cereais pelo menos) se dá pela via da sacaropina, como em animais.

O nível de atividade atingido pela enzima no endosperma de milho normal foi entre 5 e 7 nmol.min<sup>-1</sup>. endosp.<sup>-1</sup> (Figura 7). Esta atividade é semelhante à taxa de acúmulo de N no endosperma de milho que foi estimada em 5 a 10 nmol N.min.<sup>-1</sup>. endosp.<sup>-1</sup> (SO DEK & SILVA, 1977). Isto significa que a atividade da enzima é suficiente para catabolizar todo o N entrando no endosperma, mesmo que fosse todo na forma de lisina. Como a lisina representa só uma pequena parte dessa fração (ARRUDA & SILVA, 1979) a atividade está muito além do necessário para catabolizar toda a lisina excedente no endosperma, indicando que esta enzima pode estar desempenhando o papel que foi a ela atribuído.

Apesar da alta atividade de LKR encontrada no endosperma imaturo de milho normal, a atividade no endosperma do mutante opaco-2 foi muito baixa (Figura 7). Outros pesquisadores (ARRUDA *et alii*, 1982; HADZI-TASKOVIC SUKALOVIC, 1984) trabalhando com linhagens bem distintas de milho, encontraram também baixa atividade para a LKR em endospermas opaco-2. Isto confirma a forte influência do gene opaco-2 sobre a atividade da enzima. O nível de atividade para o qual o gene opaco-2 abaixou a LKR parece depender do genótipo. No presente trabalho, a atividade da enzima foi praticamente ausente na linhagem 160 com o gene opaco-2, enquanto que na linhagem 1038 opaco-2 a atividade foi bem mais alta, embora bastante reduzida em relação à versão normal (Figura 7).

Levanta-se então a questão de como o gene opaco-2 controla a atividade da LKR. Os mecanismos possíveis são o controle da síntese a nível de transcrição/tradução, ou controle da atividade

a nível da enzima (pós-tradução). Qualquer que seja o mecanismo de controle, não há nenhum motivo para se supor que envolva diretamente o gene *opaco-2*. Este gene causa mudanças acentuadas em vários pontos do metabolismo do endosperma, embora seja possível que as mudanças estejam interligadas. Por exemplo, o gene *opaco-2* causa uma redução drástica em zeína (MERTZ *et alii*, 1964; JIMENEZ, 1966; MOSSÉ, 1966; SODEK & WILSON, 1971; TSAI & DALBY, 1974; DALBY & TSAI, 1975; LEE *et alii*, 1976; BAENZIGER & GLOVER, 1977; LODHA *et alii*, 1977) um aumento em alguns aminoácidos livres (SODEK & WILSON, 1971; MISRA *et alii*, 1975; ARRUDA *et alii*, 1978); aumento na atividade da RNase (MEHTA *et alii*, 1973) e algumas enzimas do metabolismo de N (HADZITASKOVIC SUKALOVIC, 1986). Isto sugere que o gene pode afetar indiretamente vários processos. No caso da enzima LKR, é possível que o gene *opaco-2*, por estimular a utilização de lisina no endosperma através de seu efeito sobre a síntese de proteínas de reserva com diferentes conteúdos de lisina, diminua o nível de lisina acumulada no endosperma. Consequentemente, não haveria excedente de lisina em *opaco-2*, ao contrário do endosperma normal, de forma que o nível de lisina (livre) em *opaco-2* seria insuficiente para induzir a síntese de LKR. Outros aspectos dessa hipótese são discutidos adiante.

Outros tecidos da planta de milho, que não o endosperma imaturo, não possuem atividade de LKR ou a possuem em nível muito pequeno (Tabela 7). Por outro lado, tecidos de soja e feijão possuem alta atividade de enzima. Sabe-se que as reservas das sementes de soja e feijão são ricas em lisina (cerca de 6 a 7mol%) (YAZDI-SAMADI *et alii*, 1977; MORAES & ANGELUCCI, 1971), de forma que é mais provável que a mobilização das reservas proteicas gere um excesso de lisina, e portanto seria necessário o seu catabolismo. Entretanto, a lisina do endosperma de milho representa aproximadamente 1,7% do total de aminoácidos encontrados nas proteínas de

reserva, comparado com 7,4% das proteínas do embrião (SODEK & WILSON, 1973). Portanto o embrião poderia utilizar toda a lisina liberada pelas proteínas de reserva do endosperma e ainda faltaria lisina. Nesta situação, a via catabólica seria desnecessária. De fato, evidências para o metabolismo de lisina, indicam que toda a lisina proveniente das reservas de proteínas é incorporada intacta nas proteínas do embrião, e que o embrião apenas sintetiza a lisina que falta (SODEK & WILSON, 1973). Assim, de acordo com estas evidências, aparentemente, o catabolismo de lisina não ocorre na plântula, e conseqüentemente não haveria necessidade de LKR nestes tecidos. A ausência de atividade da LKR nas plântulas de milho (Tabela 7) está de acordo com esta hipótese.

Por outro lado, também não foi detectada LKR em plântulas de milho opaco-2, onde o nível de lisina no endosperma é mais elevado. No opaco-2 o nível de lisina no endosperma é cerca do dobro (4,2%) daquele encontrado em milho normal, aproximando-se da situação das leguminosas. A expectativa de encontrar LKR em plântulas de milho opaco-2, portanto, era maior, porém, não há evidências de que no milho opaco-2, ao contrário do normal, haveria catabolismo de lisina. Ressalta-se ainda que o nível mais alto de lisina no endosperma opaco-2 talvez esteja abaixo das necessidades do embrião, considerando o valor de 7,4% para o conteúdo de lisina nas proteínas do eixo. A justificativa de encontrar LKR ou não em diferentes órgãos e espécies, baseada na presença ou não de um excesso de lisina implica num mecanismo de controle de atividade da enzima, talvez por indução pelo próprio substrato. Esta possibilidade foi investigada no presente trabalho em experimentos nos quais foi aplicado um excesso de lisina aos tecidos, usando para isto o grão em desenvolvimento, bem como a plântula durante a germinação. No primeiro caso, foi utilizada a metodologia proposta por GENGENBACH (1977) para cultivo de grãos de milho "in

vitro", com o intuito de incluir lisina no meio. Infelizmente, estes experimentos foram frustrados porque não se conseguiu o desenvolvimento dos grãos. Isto, apesar de várias tentativas com modificações do meio de cultura utilizado, ou seja, meio sólido incompleto (ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico, asparagina), meio líquido completo + vermiculita. Tentou-se também utilizar no sistema de cultivo a espiga de milho inteira, segmentos de diferentes tamanhos e até grãos isolados, porém os endospermas não se desenvolveram. Assim, em nenhum dos casos foi possível dosar a atividade da enzima em endospermas de milho cultivados em meios com diferentes níveis de lisina para verificar se esse aminoácido, em excesso, induziria a atividade da LKR.

Com a aplicação de lisina na plântula durante a germinação, não se encontrou atividade da LKR em nenhuma das concentrações de lisina utilizadas no meio de germinação sugerindo a inexistência de um mecanismo de controle por indução, neste caso.

Também foi investigada a possibilidade de um controle a nível da enzima, por um inibidor por exemplo. De fato foram obtidas evidências para a existência de um inibidor nos extratos de plântulas de milho. Tais extratos quando misturados com extrato de endosperma imaturo de milho normal, de alta atividade da LKR, causariam uma considerável diminuição na atividade, a qual ficou cerca de cinco vezes menor que a esperada. Isto possivelmente explique a ausência de (ou muito baixa) atividade da enzima em plântulas de milho. Aparentemente, a enzima LKR está presente nas plântulas de milho, porém o alto grau de inibição reduz a sua atividade a um nível difícil de detectar. Resta saber se existe alguma relação entre a presença do inibidor e o nível de lisina.

A mesma hipótese foi testada também para explicar o baixo nível de LKR em endosperma imaturo de milho opaco-2. Entretanto, neste caso não há evidências com relação à presença de algum

inibidor no endosperma opaco-2, uma vez que quando se misturaram os extratos de endospermas opaco-2 e normal, a atividade da enzima encontrada foi aproximadamente igual à esperada (ou seja, igual à soma das atividades dos dois extratos separados). Assim, continua viável a possibilidade de que seja um controle a nível de síntese da enzima que explique o baixo nível da enzima no opaco-2. Porém, não foi possível investigar esta hipótese diretamente, pela aplicação de lisina nos grãos de um sistema "in vitro".

A acentuada redução na atividade de LKR no endosperma de milho opaco-2 é de grande interesse em função da possibilidade que ela esteja envolvida (embora indiretamente) no elevado nível de lisina do mutante.

Evidências com aminoácidos marcados com  $C^{14}$  sugeriram que o catabolismo de lisina em endospermas imaturos de milho poderia estar relacionado com a síntese de zeína considerando-se que os produtos (radioativos) do catabolismo de lisina marcada, o ácido glutâmico e prolina, foram preferencialmente incorporados na zeína (SODEK & WILSON, 1971b). A hipótese levantada era de que o catabolismo de lisina prosseguia mais intensamente nas regiões do endosperma mais ativas na síntese de zeína. Tal hipótese ganha mais credibilidade considerando que a primeira enzima envolvida no catabolismo de lisina, a LKR, apresenta elevada atividade em milho normal, onde a síntese de zeína é intensa, e baixa atividade em milho opaco-2, onde a síntese de zeína é reduzida. Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo (Figuras 8, 9 e 10), não apoiam tal hipótese, ou seja, linhagens com atividade mais alta da LKR não apresentaram maior teor de zeína. Por exemplo, a linhagem opaco-2 dente (L. 1038) que tem maior atividade da LKR que a flint (L. 160), apresentou pouca diferença no nível de zeína quando comparada com a flint (cerca de 30% de zeína em ambas), sendo que, pela hipótese se esperava um nível de zeína muito mais

baixo no flint. Uma análise das versões normais, onde a atividade da LKR foi diferente, também não mostrou nenhuma correlação entre teor de zeína. Porém, esta correlação entre teor de zeína e LKR, se existir, possivelmente varie em função do material utilizado.

## 5. RESUMO

O milho é considerado uma fonte pobre em proteínas para os mamíferos em crescimento, por causa do teor relativamente baixo de alguns aminoácidos essenciais no seu endosperma, como é o caso da lisina. Assim, a descoberta de que o gene mutante opaco-2 melhora a qualidade nutricional do milho, tem estimulado investigação sobre o mecanismo que direciona esta alteração, bem como, a seleção de mutantes com qualidade nutricional superior.

Assim, foi feita uma caracterização da lisina cetoglutarato redutase (LKR), enzima que converte lisina a sacaropina, o que parece ser o primeiro passo no catabolismo de lisina, em endosperma de milho. Verificou-se também a correlação entre o nível de atividade da enzima e a síntese de proteínas específicas do endosperma.

Utilizaram-se duas linhagens de milho nas versões normal e opaco-2, das quais se utilizaram plântulas e também endospermas imaturos, ao longo do desenvolvimento (10 aos 52DAP). Os extratos

e a fração proteica contendo a enzima foram obtidos de acordo com a metodologia proposta por ARRUDA *et alii* (*Plant Physiol.*, 69: 988-989. 1982).

Foi verificada também a presença de inibidores endógenos da LKR, misturando-se extratos de plântulas com o endosperma ou extrato de endosperma normal com o de opaco-2.

Observou-se que a atividade da LKR nas versões de endosperma opaco-2 (160 O<sub>2</sub> e 1038 O<sub>2</sub>) é muito mais baixa, quando comparada com aquelas de endosperma normal (160 N e 1038 N). Com relação às duas linhagens estudadas, na L. 1038 (dente) a atividade da enzima foi consideravelmente maior do que na L. 160 (flint).

Observou-se ainda que em plântulas de milho, independente da parte utilizada, não se detectou atividade da LKR, enquanto que em soja e feijão a enzima está presente em grande quantidade. Mesmo quando as sementes foram germinadas em meio com diferentes concentrações de lisina, não se detectou atividade da enzima.

Em ensaios realizados para verificar se a ausência de atividade é devida à presença de inibidores endógenos da LKR, os resultados obtidos revelaram a presença de inibidores em plântulas de milho. Por outro lado, não há evidências com relação à presença de inibidor no endosperma imaturo de milho opaco-2, portanto é possível que a acentuada redução na atividade da LKR no endosperma opaco-2 esteja relacionada ao elevado nível de lisina do mutante.

Os resultados obtidos não confirmam a hipótese de que o nível de atividade da LKR estaria correlacionado com o teor de zeína. Porém, se esta correlação existir, possivelmente varie em função do material utilizado.

## 6. SUMMARY

Maize is considered a poor source of proteins for mammals during growth, in view of its relatively low levels of some essential amino acids in the endosperm, such as lysine. Thus, the discovery that the opaque-2 mutant gene improves the nutritional value of maize has stimulated research into the mechanism underlying this alteration, together with the selection of mutants with improved nutritional qualities.

In this study, the enzyme lysine -  $\alpha$ -ketoglutarate reductase (LKR), which transform lysine in saccharopine, was characterized. Apparently, this is the first step of lysine catabolism in the maize endosperm.

Two lines of maize, with their normal and opaque-2 versions, were used in this study. Both seedlings and immature endosperms were studied, the latter in particular during development (10-52DAP). The extracts for enzyme assay were obtained according to Arruda *et alii* (*Plant Physiol.*, 69: 988-

989. 1982) .

The presence of endogenous inhibitors of LKR was also investigated using mixtures of seedling and endosperm extracts or normal and opaque-2 extracts.

It was found that the LKR activity in the endosperm of the opaque-2 versions (160 Op-2 and 1038 Op-2) is much lower than in the normal endosperms (160 N and 1038 N). With respect to the lines of maize studied, the enzyme activity was substantially greater in the dent line (L. 1038) than in flint (L. 160).

It was also found that there was little or no activity of the enzyme in any part of the maize seedling, whereas high levels of activity were found in soybean and *Phaseolus vulgaris* seedlings. Even when the maize seedlings were germinated in the presence of lysine, no appreciable activity could be detected.

In experiments designed to ascertain the presence of endogenous inhibitors of LKR, to explain the absence of activity, the results strongly suggest the presence of such inhibitors. On the other hand, the low activity observed in immature opaque-2 endosperm could not be explained in terms of inhibitors and possibly could be related to higher lysine content of the mutant.

The results obtained did not support the hypothesis that LKR activity and zein content may be correlated. Such a correlation, if it exists, may vary with the plant material used.

## 7. LITERATURA CITADA

- ARRUDA, P. & SILVA, W.J. 1979. Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. *Phytochemistry*, 18:408-410.
- ARRUDA, P. & SILVA, W.J. 1983. Lysine-ketoglutarate reductase activity in maize: its possible role in lysine metabolism of developing endosperm. *Phytochemistry*, 22:2687-2689.
- ARRUDA, P.; SILVA, W.J. & TEIXEIRA, J.P.E: 1978. Protein and free amino acids in a high lysine maize double mutant. *Phytochemistry*, 17:1217-1218.
- ARRUDA, P.; SODEK, L. & SILVA, W.J. 1982. Lysine-ketoglutarate reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.* 69:988-989.
- ASHTON, F.M. 1976. Mobilization of storage proteins of seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 95-117.
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S. & SHARKEY, P.J. 1975. Asparagine metabolism. Key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. *Plant Physiol.* 56:807-812.

- BAENZIGER, P.S. & GLOVER, D.V. 1977. Protein body size and distribution and protein matrix morphology in various endosperm mutant of *Zea mays* L.. *Crop Sci.*, 17:415-420.
- BEEVERS, L. 1976. *Nitrogen metabolism in plants*. Edward Arnold. Londres. 333p.
- BILINSKI, E. & McCONNELL, W.B. 1957. The utilization of acetate for amino acid biosynthesis. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 35: 357-364.
- BRANDT, A.B. 1975. In vivo incorporation of lysine  $^{14}\text{C}$  into the endosperm proteins of wild type and high lysine barley. *Febs Lett.*, 52:288-291.
- BRESSANI, R. 1966. Protein quality of opaque-2 maize in children. *Proc. High Lysine Corn Conf.* Corn Refiners Assoc. Inc. Washington, D.C.; p. 34.
- BRESSANI, R. & CONDE, R. 1961. Changes in the chemical composition and in the distribution of nitrogen of maize at different stages of development. *Cereal Chem.*, 38:76-84.
- BURR, F.A. & BURR, B. 1977. Localized synthesis of zein in maize endosperm. *Cereal Foods World.*, 22:469-463.
- BYRNES, F.C. 1969. A matter of life and death. Rockefeller Foundation Q-1:4.
- CHESHIRE, R.M. & MIFLIN, B.J. 1975. The control of lysine biosynthesis in maize. *Phytochemistry*, 14:695-698.
- CHRISTIANSON, D.D.; KHOO, V.; NIELSEN, H.C. & WALL, J.S. 1974. Influence of opaque-2 and floury-2 genes on formation of proteins in particulates of corn endosperm. *Plant Physiol.*, 53: 851-854.
- DALBY, A. & DAVIES, I.I. 1967. Ribonuclease activity in the developing seeds of normal and opaque-2 maize. *Science*, 155:1573 - 1575.

- DALBY, A. & TSAI, C.Y. 1974. Zein accumulation in phenotypically modified lines of opaque-2 maize. *Cereal Chem.*, 51:821-825.
- DALBY, A. & TSAI, C.Y. 1975. Comparisons of lysine and zein and nonzein protein contents in immature and mature maize endosperm mutants. *Crop Sci.*, 15:513-515.
- DI FONZO, N.; FORNASIERI, E.; SALAMINI, F. & SOAVE, C. 1977. SDS-protein subunits in normal, opaque-2 and floury-2 maize endosperms. *Maydica*, XXII:77-88.
- DIMLER, R.J. 1966. Alcohol-insoluble proteins of cereal grains. *Fed. Proc.*, 25:1670-1673.
- DUVICK, D.N. 1961. Protein granules of maize endosperm cells. *Cereal Chem.*, 38:374-3.
- FAO - Food Agricultural Organization of the United Nations. *FAO Nutr. Studies* 16.
- FELLOWS, F.C.I. 1973. Biosynthesis and degradação of saccharopine, an intermediate of lysine metabolism. *Biochem. J.*, 136:321-327.
- FELLOWS, F.C.I. & LEWIS, M.H.R. 1973. Lysine metabolism in mammals. *Biochem. J.*, 136:329-334.
- FINLAYSON, A.J. & McCONNELL, W.B. 1969. The utilization of  $^{15}\text{N}$  and phenylalanine -  $2\text{-}^{14}\text{C}$  by wheat plants. *Can. J. Biochem.* 47:415-418.
- GAILLARDIN, C.M.; POIRIER, L.; RIBET, A.M. & HESLOT, H. 1969. General and lysine specific control of saccharopine dehydrogenase levels in the yeast *Secharomycopsis lipolytica*. *Biochimie*, 61:473-482.
- GENGENBACH, B.G. 1977. Development of maize caryopses resulting from *in vitro* pollination. *Planta*, 134:91-93.
- GIANAZZA, E.; RICHETTI, P.G.; PIOLI, F.; GALANTE, E. & SOAVE, C. 1976. Size and charge heterogeneity of zein in normal and opaque-2 maize endosperms. *Maydica*, 21:1-17.

- GROBBELAAR, N. & STEWARD, F.C. 1953. Pipecolic acid in *Phaseolus vulgaris*: Evidence on its derivation from lysine. *J. Amer. Chem. Soc.*, 75:4341-4343.
- GROBBELAAR, N.; ZACHARIUS, R.M. & STEWARD, F.C. 1954. The bulk isolation of L(-) pipecolic acid from *Phaseolus vulgaris* and its quantitative determination. *J. Amer. Chem. Soc.*, 76: 2912-2915.
- GUENGERICH, F.P. & BROQUIST, H.P. 1976. Lysine catabolism in *Rhizoctonia leguminicola* and related fungi. *J. Bact.*, 126:338-347.
- GUPTA, R.N. & SPENSER, I.D. 1969. Biosynthesis of the piperidine nucleus. The mode of incorporation of lysine into pipecolic acid and into piperidine alkaloids. *J. Biol. Chem.*, 244:88-94.
- HADZI-TASKOVIC SUKALOVIC, V. 1984. Activity of nitrogen metabolism enzymes in the process of kernel development in different maize genotypes. *Febs Lett.*, 171:69-72.
- HADZI-TASKOVIC SUKALOVIC, V. 1986. Activity and distribution of nitrogen - metabolism enzymes in the developing maize kernel. *Physiol. Plant.*, 67:247-252.
- HANKE, R. & HILGENBERG, W. 1979. Charakterisierung der saccharopin-dehydrogenase aus *Phycomyces blakeslecanus*, *Z. Pflanzenphysiol.*, 92:23-31.
- HANSEL, L.Wi; TSAI, C.Y. & NELSON, D.E. 1973. The effect of the floury-2 gene on the distribution of protein fractions and methionine in maize endosperm. *Cereal Chem.*, 50:383-394.
- HAYAISHI, O. 1966. Crystalline oxygenases of pseudomonads. *Bacteriol. Rev.*, 30:720-731.
- HUTZLER, J. & DANCIS, J. 1970. Saccharopine cleavage by a dehydrogenase of human liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 206:205-214.
- HUTZLER, J. & DANCIS, J. 1968. Conversion of lysine to saccharopine by human tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, 158:62-69.

- INGVERSEN, J. 1975. Structure and composition of protein bodies from wild type and high lysine barley endosperm. *Hereditas*, 81: 69-76.
- INGVERSEN, J.; KOIE, B. & DOLL, H. 1973. Induced seed protein mutant of barley. *Experimentia*, 29:1151-1152.
- JIMENES, J.R. 1966. Protein fractionation studies of high lysine corn. In *Proc. High Lysine Corn Conference*.
- KAUL, A.K. 1973. Mutation breeding and crop protein improvement. Improving plant protein by nuclear techniques. *IAEA Symposium*. Vienna. 61p.
- KHOO, V. & WOLF, M.J. 1970. Origin and development of protein granules in maize endosperm. *Amer. J. Bot.*, 57:1042-1050.
- LANDRY, J. & MOUREAUX, T. 1970. Hétérogénéité des glutelines du grain de maïs: extracion sélective - et composition in acides aminés des trois fractions isolées. *Bull. Soc. Chem. Biol.* 52: 1021-1037.
- LAWRENCE, J.M. & GRANT, D.R. 1964. Incorporation of lysine  $^{14}\text{C}$  into the developing grain of wheat. *Arch. Biochem. Biophys.* 104:73-78.
- LEE, K.H.; JONES, R.A.; DALBY, A. & TSAI, C.Y. 1976. Genetic regulation of storage protein content in maize endosperm. *Bio Chem. Genet.*, 14:641-659.
- LEISTNER, E.; GUPTA- R.N. & SPENSER, J.D. 1973. A general method for the determination of precursor configuration in biosynthetic precursor-product relationships. Derivation of pipercolic acid from D-lysine, and of piperidine alkaloids from L-lysine. *J. Amer. Chem. Soc.*, 95:4040-4047.
- LEWIS, O.A.M. 1975. An  $^{15}\text{N}$ - $^{14}\text{C}$  study of the role of the leaf in the nitrogen nutrition of the seed of *Datura stramonium* L. *J. Exp. Bot.*, 26:361-366.

- LODHA, M.L.; MALI, P.C.; AGARWAL, A.K. & METHA, S.L. 1974. Changes in soluble protein and isoenzymes in normal and opaque-2, *Zea mays* endosperm during grain development. *Phytochemistry*, 13:539-542.
- LODHA, M.L.; RAM, P.C.; GUPTA, H.O.; MEHTA, S.L. & SINGH, J. 1977. Changes in protein, lysine and triptophan in normal and opaque-2 *Zea mays* kernels during development. *Ind. J. Exp. Biol.* 15:1080-1082.
- LOWY, P.H. 1953. The conversion of lysine to pipercolic acid by *Phaseolus vulgaris*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 47:228-229.
- MAFFIA, L.M.; CLARK, H.E. & MERTZ, E.T. 1976. Protein quality of two varieties of high lysine maize fed alone and with black beans or milk to normal and depleted weanling rats. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 29:817-824.
- MA, Y & NELSON, O.E. 1975. Amino acid composition and storage proteins in two new high lysine mutants in maize. *Cereal Chem.*, 52:412-419.
- MAZELIS, M.; WHATLEY, F.R. & WHATLEY, J. 1977. The enzymology of lysine biosynthesis in higher plants. *Febs Lett.*, 84:236-240.
- McCONNELL, W.B. 1969. Studies of wheat plants using <sup>14</sup>C labelled compounds. XXII. Incorporation into wheat proteins. *Can. J. Biochem.*, 47:19-23.
- MEHTA, S.L.; LODHA, M.L.; MALI, P.C.; JOGINDER, S. & NAIK, M.S. 1973. Characterization of polysomes and incorporation in vitro of leucine and lysine in normal and opaque-2 *Zea mays* endosperm during development. *Phytochemistry*, 12:2815-2820.
- MEISTER, A.; RADHARKRISHNAN, A.N. & BUCKLEY, S.D. 1957. Enzymatic synthesis of L-pipercolic acid and L-proline. *J. Biol. Chem.* 229:790-800.
- MERTZ, E.T.; BATES, L.S. & NELSON, O.E. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of mai

- ze endosperm. *Science*, 145:279-284.
- MERTZ, E.T.; VERON, O.A.; BATES, L.S. & NELSON, O.E. 1965. Growth of rats fed on opaque-3 maize. *Science*, 148:1741-1742
- MIFLIN, B.J. & CHESHIRE, R.M. 1974. The metabolic control of amino acid biosynthesis as a biochemical limitation on the production of nutritionally essential amino acid in plants. In: *Intern. Workshop on Genetic Improvement of Seed Proteins*, Washington, USA. March. 18-20, 23p.
- MISRA, P.S.; JANBUNATHAN, R.; MERTZ, E.T.; GLOVER, D.V.; BARBOSA, H.M. & McWHIRTER, K.S. 1972. Endosperm protein synthesis in maize mutants with increased lysine content. *Science*, 176:1425-1426.
- MISRA, P.S.; MERTZ, E.T. & GLOVER, D.V. 1975a. Studies on corn proteins. VII. Developmental changes in endosperm proteins of high-lysine mutants. *Cereal Chem.* 52:734-739.
- MISRA, P.S.; MERTZ, E.T. & GLOVER, D.V. 1975b. Studies on corn proteins. VIII. Free amino acid content of opaque-2 double mutants. *Cereal Chem.* 52:844-848.
- MOLLER, B.L. 1974. Lysine biosynthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.* 54:638-643.
- MOLLER, B.L. 1975. Lysine metabolism in plants. PhD thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen, Denmark. 69p.
- MOLLER, B.L. 1976a. Lysine catabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.*, 57:687-692.
- MOLLER, B.L. 1976b. Conversion of saccharopine to lysine in barley. *Phytochemistry*, 15:695-696.
- MORAES, R.M. & ANGELICCI, E. 1971. Chemical composition of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food. Sci.*, 36:493-494.
- MOSSÉ, J. 1966. Alcohol soluble proteins of cereal grains. *Fed. Proc.*, 25:1663-1669.

- MOSSÉ, J.; BAUDET, J.; LANDRY, J. & MOUREAUX, T. 1966. Étude sur les protéines du maïs. II. Comparaison entre les compositions en acides aminés et les proportions mutuelles des fractions protéiques de grains normaux et mutants. *An. Physiol. Vég.*, 8: 331-344.
- MOUREAUX, T. & LANDRY, J. 1968. Extraction sélective des protéines du grain de maïs et en particulier de la fraction "glutelines". *C. R. Acad. Sci., Paris*, 226:2302-23.
- MOUREAUX, T. & LANDRY, J. 1972a. La maturation du grain de maïs. Evolution qualitative et quantitative des différents formes azotés. *Physiol. Vég.*, 10:1- .
- MOUREAUX, T. & LANDRY, J. 1972b. Effets du gène opaque-2 sur la protéogenèse du grain de maïs au cours de la maturation. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 274:3309.
- MUNCK, L.; KARLSSON, K.E.; HAGBERG, A. & EGGUM, B.O. 1970. Gene for improved nutritional value in barley seed protein. *Science*, 168:985-987.
- MURPHY, J.J. & DALBY, A. 1971. Changes in the protein fractions of development normal and opaque-2 maize endosperm. *Cereal Chem.*, 48:336-349.
- NKONGE, C. & BALLANCE, G.M. 1982. A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in micro-kjeldahl digests. *J. Agric. Food. Chem.*, 30:416-420.
- OSBORNE, T.B. 1897. The amount and properties of the proteins of the maize kernel. *J. Amer. Chem. Soc.*, 19:525.
- PATE, J.S.; SHARKEY, P.J. & LEWIS, O.A.M. 1974. Phloem bleeding from legume-fruits. A technique for study of fruit nutrition. *Planta*, 120:229-243.
- PATE, J.S.; SHARKEY, P.J. & LEWIS, O.A.M. 1975. Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes, studied by a phloem bleeding technique. *Planta*, 122:11-26.

- PAULIS, J.W. & WALL, J.S. 1977. Comparison of the proteins compositions of selected corns and their wild relatives, teosinte *Tripsacum*. *J. Agric. Food. Chem.*; 25:265-270.
- PAULIS, J.W.; JAMES, C. & WALL, J.S. 1969. Comparison of glutelin in normal and *high-lysine* corn endosperm. *J. Agric. Food. Chem.*, 17:1301-1305.
- PRADILLA, A.G.; HARPSTEAD, D.D.; SARRIA, D.; LINARES, F.A. & FRANCIS, C.A. 1975. Quality protein maize in human nutrition. In: High-Quality Protein Maize Stroudsburg, Pa: Dowden, Hutchinson and Ross. p. 27.
- REDDY, V. & GUPTA, C.P. 1974. Treatment of kwashiorkor with *opaque-2* maize. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 27:122-1.
- RICHETTI, P.G.; GIANAZZA, E.; VIOTTI, A. & SOAVE, C. 1977. Heterogeneity of storage proteins in maize. *Planta*, 136:115-123.
- ROTHSTEIN, M. & MILLER, L.L. 1954. The metabolism of L-lysine-6- $C^{14}$ . *J. Biol. Chem.*, 211:851-858.
- SAUNDERS, P.P. & BROQUIST, H.P. 1966. Saccharopine, an intermediate of the amino adipic acid pathway of lysine biosynthesis. IV. Saccharopine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 241:3435-3440.
- SCHUMACHER, W. 1967. Die fernleitung der stoffe in Pflanzenkörper. In: W. RHULAND, ed., *Handbuch der Pflanzenphysiologie XIII*: 61-177.
- SCHWEET, R.S.; HOLDEN, J.T. & LOWERY, P.H. 1955. In William D. McElroy and H. Bentley Class, Johns Hopkins University. *Symposium, Amino Acid Metabolism*, p. 496. Baltimore: The Johns Hopkins Press.
- SILVA, W.J. & ARRUDA, P. 1979. Evidence for the genetic control of lysine catabolism in maize endosperm. *Phytochemistry*, 18: 1803-1805.
- SINGH, R. & AXTELL, J.D. 1973. High lysine mutant gene (tl) that improves protein quality and biological value of grain sorghum.

*Crop. Sci.*, 13:535-5.

- SOAVE, C.; PIOLLI, F.; VIOTTI, A.; SALAMINI, F. & RICHETTI, P.G. 1975. Synthesis and heterogeneity of endosperm proteins in normal and *opaque-2* maize. *Maydica*, 20:83-94.
- SODEK, L. 1973. Corn proteins. Boletim Didático BD-011. Centro de Energia Nuclear na Agricultura-CENA. USP-CNEN, 78p.
- SODEK, L. 1976. Biosynthesis of lysine and other amino acids in the developing maize endosperm. *Phytochemistry*, 15:1903-1906.
- SODEK, L. 1978. Partial purification and properties of diaminopimelate decarboxylase from maize endosperm. *Rev. Bras. Bot.* 1: 65-69.
- SODEK, L. & SILVA, W.J. 1977. Glutamate synthase. A possible role in nitrogen metabolism of the developing maize endosperm. *Plant Physiol.*, 50:602-605.
- SODEK, L. & WILSON, C.M. 1970. Incorporation of Leucine  $^{-14}\text{C}$  and lysine  $^{-14}\text{C}$  into protein in the developing endosperm of normal and *opaque-2* corn. *Arch. Biochem. Biophys.*, 140:29-38.
- SODEK, L. & WILSON, C.M. 1971a. Amino acid composition of proteins isolated from normal, *opaque-2* and *floury-2* corn endosperm by a modified Osborne procedure. *J. Agric. Food. Chem.*, 19:1144-1150.
- SODEK, L. & WILSON, C.M. 1971b. Metabolism of  $^{14}\text{C}$  - amino acids in developing endosperm of corn. *Plant Cell Physiol.*, 12:889 - 893.
- SODEK, L. & WILSON, C.M. 1973. Metabolism of lysine -  $^{14}\text{C}$  and leucine  $^{-14}\text{C}$  derived from storage protein during germination of maize. *Biöchim, Biophys. Acta*, 304:353-362.
- STADTMAN, T.C. 1973. Lysine metabolism by Clostridia. In. A. MEISTER, ed., *Advances in Enzimology*, 38:413-448.
- TAKEDA, H. & HAYAISHI, O. 1966. Crystalline L-lysine, oxygenase. *J. Biol. Chem.*, 241:3276-3282.

- TSAI, C.Y.; SALAMINI, F. & NELSON, O.E. 1970. Enzymes of carbohydrate metabolism in the developing endosperm of maize. *Plant Physiol.*, 46:299-306.
- TSAI, C.Y. & DALBY, A. 1974. Comparison of the effect of *shrunk-4*, *opaque-2*, *opaque-7* and *floury-2* genes on the zein content of maize during endosperm development. *Cereal Chem.*, 51:825-829.
- TSAI, C.Y.; HUBER, D.M. & WARREN, H.L. 1978. Relationship of the kernel sink for N to maize productivity. *Crop Sci.* 18:399-404.
- VOGEL, H.J.; THOMPSON, J.S. & SHOCKMAN, G.D. 1970. Characteristic metabolic patterns of prokaryotes and eukaryotes. *Simp. Soc. Gen. Microbiol.*, 20:107-119.
- WADE, M.; THOMSON, D.M. & MIFLIN, B.J. 1980. Saccharopine: an intermediate of L. lysine biosynthesis and degradation in *Piricularia oryzae*. *J. Gen. Microbiol.*, 120:11-20.
- WADE, M. 1977. Investigations into the design of a selective fungicide based on differential pathways of lysine biosynthesis. PhD. Thesis. London University.
- WOLF, M.J.; KHOO, V. & SECKINGER, H.L. 1969. Distribution and subcellular structure of endosperm protein in varieties of ordinary and *high-lysine* maize. *Cereal Chem.*, 46:253-263.
- YAZDI-SAMADI, B.; RINNE, R.W. & SEIF, R.D. 1977. Components of developing soybean seeds; oil, protein, sugars, organic acids, and amino acids. *Agron. J.*, 69:481-486.