

## Discriminação de linhagens de milhos normais e QPMs por meio da fração zeínas

Fabiana C. L. Barbosa<sup>1</sup>, Isabel R. P. Souza<sup>2</sup>, Cleso A. P. Pacheco<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estudante de Graduação em Ciências Biológicas pela PUC, Belo Horizonte, MG <sup>2</sup> Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, e-mail: [isabel@cnpms.embrapa.br](mailto:isabel@cnpms.embrapa.br)

**Palavras-chave:** *Zea mays* L., SDS-PAGE, focalização isoelétrica, linhagem, ponto isoelétrico (pI).

### INTRODUÇÃO

O milho é uma planta da família Gramineae e da espécie *Zea mays* L., sendo utilizado na alimentação humana e, principalmente, na alimentação animal. É consumido pela população como fonte de energia, apesar de possuir deficiência nutricional em alguns aminoácidos essenciais (Nelson, 1969). O grão de milho possui de 8% a 9% de proteínas distribuídas no endosperma e embrião. A forma de proteína predominante no embrião é a de não-zeínas que são proteínas de alto valor biológico e, no endosperma, predominam as zeínas, proteínas de reserva de baixo valor biológico devido ao desequilíbrio de aminoácidos essenciais provocado pelo alto teor de leucina e pela deficiência de lisina e triptofano (Pacheco *et al.*, 1999). As zeínas podem ser separadas com base no seu padrão eletroforético realizado em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Larkins *et al.*, 1989). Através desse método são encontrados quatro grupos distintos: alfa-zeínas (19 e 22 KDa); gama-zeínas (16 e 27 KDa); beta-zeínas (14 KDa); e delta-zeínas (10 KDa). A caracterização do milho opaco-2 por Mertz *et al.* (1976) despertou grande interesse por parte dos melhoristas de milho, já que esse mutante apresentava níveis dos aminoácidos essenciais lisina e triptofano duplicados em relação aos genótipos normais. Apesar dessas características, o endosperma dos milhos opacos-2 é farináceo e inadequado para armazenagem e uso industrial. Através de um longo processo de retrocruzamentos e seleção recorrente, melhoristas do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) no México combinaram a mutação do gene opaco-2 com modificações do endosperma (Vasal *et al.*, 1980). Os genótipos modificados derivados desse trabalho possuem excelente valor nutricional com características físicas de endosperma similares àquelas de grãos normais, e assim, foram denominados *Quality Protein Maize* (QPM). O objetivo deste trabalho foi caracterizar alterações na fração zeínas de grãos de milho normal e suas respectivas versões QPM.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desse experimento foram selecionadas amostras de linhagens de milho de grãos normais e suas respectivas versões QPM, oriundas do programa de melhoramento da EMBRAPA Milho e Sorgo, Tabela 1.

**Tabela 1.** Linhagens selecionadas e seus respectivos tipos de grão

<b>LINHAGEM</b>	<b>NORMAL</b>	<b>QPM</b>
L161	X	
L161 RC2		X
L161 MRC3		X
L 16	X	
L 16 RC2		X
L 16 MRC3		X
L 2841	X	
L 2841 RC2		X
L 2841 MRC3		X
L 20	X	
L 20 MRC3		X
L 1154	X	
L 1154 MRC3		X
L 37		X
L 45532		X
L 876518		X

#### Extração da fração zeínas e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Quarenta grãos inteiros de cada linhagem foram macerados em pilão até a obtenção de um fubá fino. Para a extração da fração zeínas foram pesados 50 mg dos grãos macerados de cada amostra e a estes adicionado 1 ml de solução tampão borato ( 12,5 mM Borato pH 10, 1% SDS e 2%  $\beta$ -Mercaptoetanol). As amostras foram submetidas à agitação vigorosa por uma noite e, após a centrifugação a 16.000 g por 15 min, foi retirada uma alíquota de 200  $\mu$ L do sobrenadante. Adicionou-se então 800  $\mu$ L de etanol absoluto, incubando a 37 °C por uma hora. As amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 15 min, removendo-se 200  $\mu$ L do sobrenadante e adicionados a este 800  $\mu$ L de acetona a -20 °C. As amostras foram incubadas no gelo por 30 min e centrifugadas a 16.000 g por 15 min. Para eletroforese da fração zeínas, o pellet obtido na última etapa foi ressuspensão em 50  $\mu$ L de tampão de amostra. e fervido por 5 min para solubilização das proteínas. Em gel de poliacrilamida 12,5% foi aplicado o equivalente a 3 mg do fubá (33  $\mu$ l da amostra). Os géis de SDS-PAGE foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada a voltagem constante de 100 V por 2 h e os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)

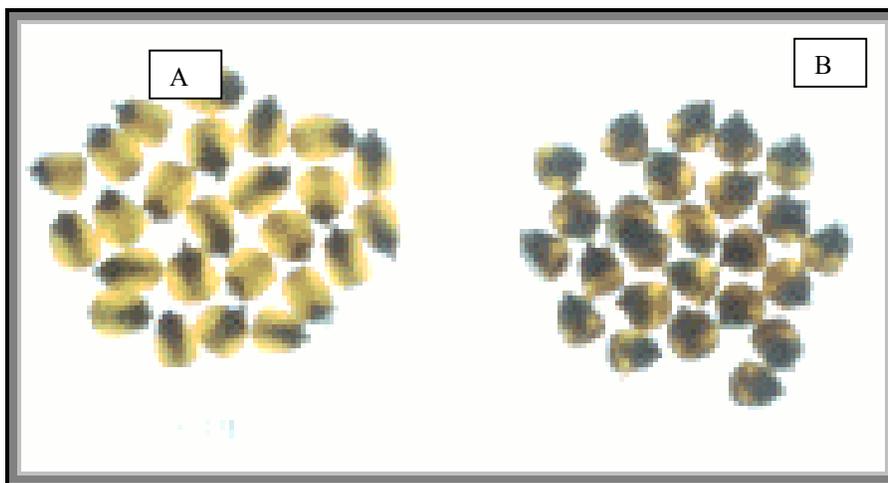
#### Focalização isoeétrica da fração zeínas

A extração de zeínas para focalização isoeétrica foi realizada conforme descrito por Wilson (1984). Foram utilizados 100 mg de fubá fino aos quais foram adicionados 500  $\mu$ l de isopropanol 55% ( v/v ) contendo 1% de  $\beta$  Mercaptoetanol. As amostras foram vortexadas para ressuspensão e deixadas sob agitação toda à noite à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram

centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi vertido para outro micro-tubo, devidamente identificado. Para a focalização isoelétrica em gel de agarose foram aplicados 5  $\mu$ l do sobrenadante de cada amostra.

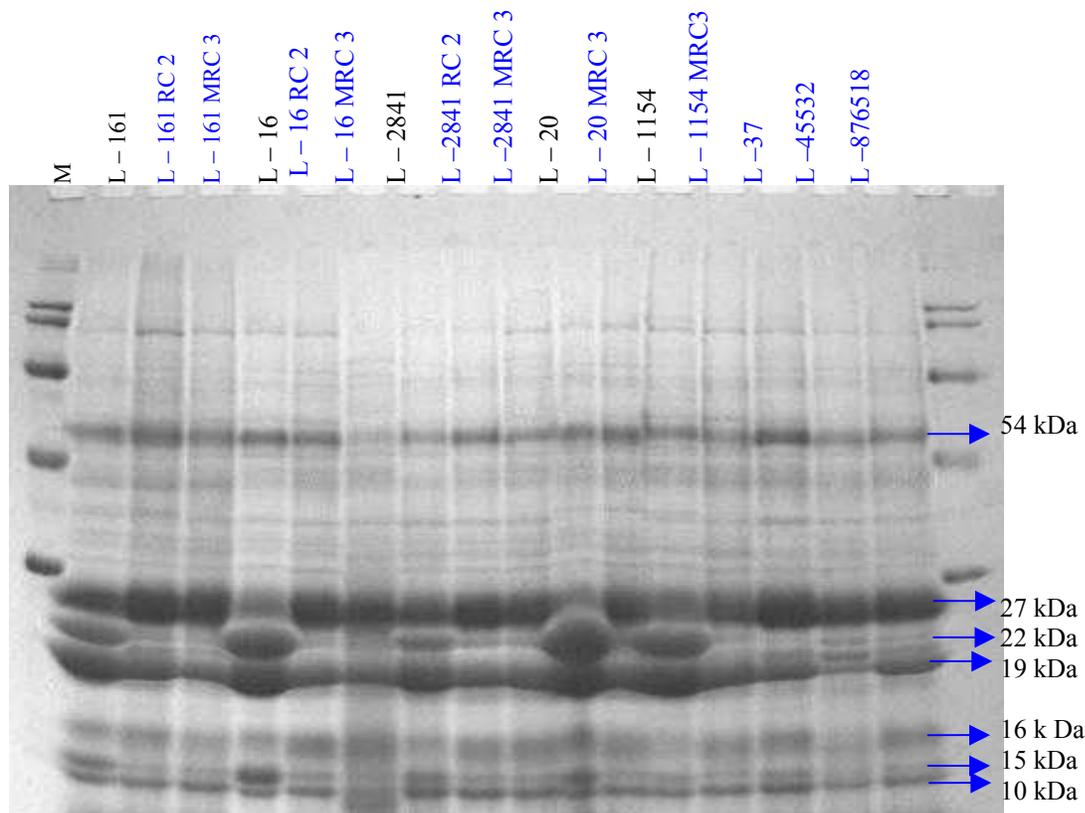
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à natureza fenotípica dos materiais Normais e QPM também pode-se observar diferenças de opacidade em partes do endosperma dos grãos, sobre transluminador. Linhagens Normais apresentaram grãos totalmente vítreos e linhagens QPM apresentam grãos semi-opacos, o que pode ser observado na Figura 1.



**Figura 1.** Grãos Normais com endosperma vítreo (A) e grãos QPM com endosperma semi-opaco (B) visualizados sobre um transluminador. Fonte: Duarte, 2003

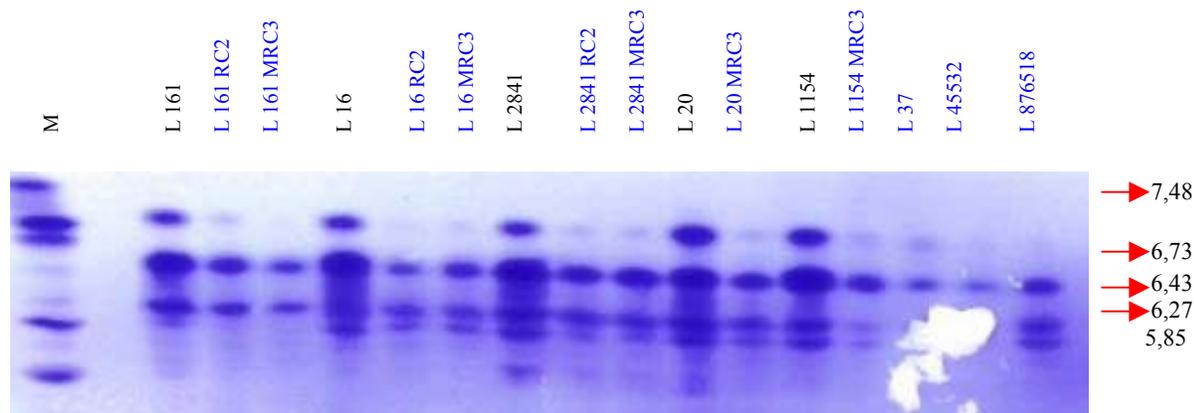
Verifica-se na Figura 2, que as linhagens de milho QPM apresentaram diferenças no perfil eletroforético da fração zeínas, quando comparado às linhagens de milho normal. As linhagens QPM apresentaram decréscimo acentuado na expressão da alfa-zeína de peso molecular de 19 kDa, moderado decréscimo na alfa-zeína de 22 kDa e moderado aumento na expressão da gama-zeína de 27 kDa. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos realizados por Paiva *et al.* (1992), onde teores mais elevados de lisina e triptofano do milho QPM estavam ligados à presença de maior expressão do polipeptídeo de 27 kDa e reduzida expressão dos polipeptídeos de 19 kDa e 22 kDa.



M = Marcador de peso molecular

**FIGURA 2.** Gel de SDS-PAGE da fração zeínas de linhagens de milhos normais e suas respectivas versões QPMs (em azul)

A focalização isoeétrica (**Figura 3**), através da separação das zeínas por ponto isoeétrico (pI), permitiu discriminar as linhagens de milhos normais das linhagens de milho QPMs (em azul). Verificou-se decréscimo acentuado na intensidade das zeínas de pIs 7,48 e 6,73 nas linhagens QPM em relação às normais. Estudos realizados por Lana *et al.* (2002) empregando a focalização isoeétrica em populações de milho normal, QPM e indígena, também verificaram redução na expressão destas mesmas zeínas, quando compararam o milho normal com o QPM. Ao utilizar a eletroforese bidimensional, técnica que alia o SDS-PAGE e a focalização isoeétrica, estes mesmos autores, determinaram que a zeína de pI 7,48 correspondia à zeína de 22 kDa. Neste trabalho, a comparação das **Figuras 2 e 3**, onde as reduções mais drásticas foram apresentadas pela zeína de 22 kDa (**Figura 2**) e a zeína de pI 7,48 (**Figura 3**), permite inferir que, provavelmente, trata-se da mesma zeína. As linhagens normais L 2841 e L20, apresentaram também maior expressão da zeína de pI 5,85 em relação às suas versões QPM, respectivamente, L 2841 RC2 e L 2841MRC3 e L 20 MRC3. (**Figura 3**). Tanto a técnica de SDS-PAGE quanto a de focalização isoeétrica permitiram a discriminação das linhagens de milhos normais e QPMs, baseado no padrão da fração zeínas, respectivamente, na separação por peso molecular (kDa) e por ponto isoeétrico (pI).



M = Marcador de ponto isoeletrico (pI)

**FIGURA 3.** Gel de focalização isoeletrica da fração zeínas das linhagens de milhos normais e suas respectivas versões QPMs (em azul).

## LITERATURA CITADA

DUARTE, J. M. Conversão de linhagens elites em milho de alta qualidade protéica (QPM). UFLA, Tese de mestrado, Lavras-MG, 2003.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

LANA G.P. U.; SOUZA R.P. I.; CARNEIRO P. N.; GUIMARÃES T. C.; PAIVA E. Eletroforese Bidimensional na Análise de Zeínas em Milhos Indígenas. XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Florianópolis, SC, setembro 2002. CD Rom.

LARKINS, B.A.; WALLACE, J.C.; GALILI, G.; LENDING, C.R.; KAWATA, E.E. Structural analyses and modification of maize storage proteins. *Developments in industrial microbiology*, New York, v.30, n.4, p.203-209, 1989.

MERTZ, E.T. Case histories of existing models. In: MERTZ, E.T. Genetic improvement of seed proteins. Washington: National Academy of Sciences, p.57-70, 1976.

NELSON, O.E. Genetic modification of protein quality in plants. *Advances in Agronomy*, New York, v.21, p. 171-194, 1969.

PACHECO, C.A.P.; GUIMARAES, P.E. de O.; PARENTONI, S.N.; LOPES, M.A.; SANTOS, M.X.dos; GAMA, E.E.G.e; VASCONCELOS, M.J.V.V.; CORREA, L.A.; MEIRELLES, W.F. O desenvolvimento de milho de alta qualidade nutricional no Brasil. In: REUNION

LATIONOAMERICANA DEL MAIZ,18., 1999. Sete Lagoas, MG. Memorias... Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS/Mexico:CIMMYT, 1999. p.13-25.

PAIVA, E.; VASCONCELOS, M. J. V.; PARENTONI, S. N.;G. e GAMA, E. E.; MAGNAVACA, R. Seleção de progênies de milho doce de alto valor nutritivo com auxílio de técnicas eletroforéticas. *Pesq. agropec. bras. (Sete Lagoas, Bras.)*, ago. 1992, vol.27, nº.8, p.1213-1218.

VASAL, S.K.; VILLEGAS, E.; BJARNASON, M.; GELAW, B.; GOERTZ, P. Genetic modifiers and breeding strategies in developing hard endosperm opaque-2 materials. In: POLLMER, G.; PHILLIPS, R.H. (eds). Improvement of quality traits of maize for grain and silage use. London: Martinus Nijhoff, 1980. p.37-73.

WILSON, C. M. Isoelectric Focusing of zein in Agarose. *Cereal Chemistry*, Goodwin, v.61, p.198-200, 1984.