

# Eletroforese Bidimensional na Análise de Zeínas em Milho Indígenas.

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

UBIRACI G.P. LANA <sup>1</sup>, ISABEL R.P. SOUZA <sup>1</sup>, NEWTON P. CARNEIRO <sup>1</sup>, CLAUDIA T. GUIMARÃES <sup>1</sup> e EDILSON PAIVA <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG ubiraci@cnpms.embrapa.br

Palavras chaves: *Zea mays* L., endosperma, focalização isoeletrica, SDS-PAGE.

## Introdução

No Brasil, o milho é uma das culturas mais importantes, com uma área de 15 milhões de hectares e uma produção total de 35 mil toneladas/ano. Apesar dos programas de melhoramento estarem mais direcionados ao aumento da produtividade de grãos, existe atualmente um interesse muito grande em melhorias nas qualidades físicas e nutricionais, refletindo no desenvolvimento de grãos mais duros/vítreos e de melhor qualidade protéica (Guimarães et al., 1995). Mutantes que apresentam endosperma opaco e farináceo têm sido caracterizados, estando frequentemente associados com elevada qualidade nutricional e baixos níveis de zeínas. No entanto, milhos indígenas, provenientes de diversas regiões do Brasil e da América do Sul, foram caracterizados e demonstraram que, apesar de possuírem endosperma opaco, apresentavam uma qualidade nutricional reduzida e níveis de zeínas semelhantes aos milhos normais (Guimarães et al., 1995).

A eletroforese bidimensional é uma ferramenta poderosa no estudo e caracterização de proteínas, pois numa primeira dimensão as proteínas são separadas em função do ponto isoeletrico e em seguida da massa molecular. O proteoma resultante mostra-se extremamente eficiente na elucidação de proteínas ligadas a estudos de estresse e resistência a doenças. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi a utilização de eletroforese bidimensional na determinação de diferenças nas zeínas em genótipos de milhos contrastantes quanto as características físicas do endosperma.

## Material e Métodos

Foram utilizadas dez populações de milhos indígenas provenientes de diversas regiões do Brasil e da América do Sul, obtidas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Milho e Sorgo, identificados como Bol-I, Bol-II, MT-I, MT-II, MT-III, MT-10, Nodzob Udza, PR-I, Poza Rica e Preto Chileno. Como controles, foram utilizados os genótipos BRS 3150 (normal) e BR 473 (QPM).

Para resolução em SDS-PAGE, as zeínas foram extraídas pela adição de 500 µL de tampão de extração [borato de sódio 12,5 mM pH 10, 1% (p/v) de SDS e 2% (v/v) de β-mercaptoetanol] à 25 mg de endosperma moído. 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 µL do sobrenadante. Adicionou-se então 800 µL 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. O precipitado foi ressuspendido em 50  $\mu$ L de tampão de amostra. Os géis de SDS-PAGE foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), utilizando-se géis de poliacrilamida 12,5 %, com aplicação de 5  $\mu$ L da amostra. Como marcador de massa molecular foi utilizado SDS-6 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). 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).

A extração de zeínas para a análise por focalização isoeletrica foi realizada pela adição de 500  $\mu$ L de isopropanol 55% (v/v) contendo 1% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol à 100 mg de grãos finamente moídos, agitando-se vigorosamente por uma noite. A mistura foi centrifugada a 8.000 g por 15 min e o sobrenadante removido para novo microtubo. Para utilização no gel de focalização isoeletrica, foram aplicados diretamente 3  $\mu$ L da amostra, correspondendo a aproximadamente 30  $\mu$ g de zeínas. A focalização isoeletrica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Wilson (1984), empregando-se isogel de agarose 1%, 5 M de uréia, 2 mM de DTT, 1,6 % e 0,4 % de anfólitos, respectivamente, de pH 5-8 e 3,5-9,5. O gel foi submetido a pré-focalização por 20 min sob uma voltagem constante de 200 V. A focalização isoeletrica foi realizada a uma potência constante de 2 W durante aproximadamente 90 min, até a estabilização da corrente elétrica. O gel foi fixado e corado de acordo como descrito por Wilson (1984). O gel oriundo da focalização isoeletrica dos genótipos Bol-II, Poza Rica, BRS 3150 (normal) e BR 473 (QPM) foi submetido à eletroforese em SDS-PAGE a 12,5 % (Laemmli, 1970), sob voltagem constante de 100 V por 2h. O gel bidimensional foi corado utilizando-se o "kit Bio-Rad Silver Stain" (BioRad, Hercules, EUA).

## Resultados e Discussão

O padrão de zeínas foi inicialmente avaliado em SDS-PAGE (Figura 1), onde o milho QPM apresentou a alfa-zeína de 22 KDa drasticamente reduzida, enquanto que a gama-zeína de 27 KDa foi aumentada. O gene *opaco-2* é um ativador transcricional que controla principalmente a expressão dos genes codificadores da alfa-zeína de 22 KDa, como no genótipo QPM este gene é mutado e inativo, as alfa-zeínas de 22 KDa são drasticamente reduzidas, o que seria o padrão esperado. Nos genótipos indígenas de endosperma farináceo, o padrão protéico assemelhou-se muito ao milho normal, entretanto, apresentaram variações no teor da gama-zeína de 27 KDa. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Guimarães et al. (1995). Ao contrário dos mutantes de endosperma opaco, até então caracterizados, os genótipos indígenas de endosperma farináceo apresentam níveis normais de zeínas e baixa qualidade nutricional (Tabela 1). Dessa forma, tais genótipos de milho podem ser considerados como uma nova classe de mutantes, que serão caracterizados, no presente trabalho, em termos de perfil protéico das zeínas em gel bidimensional.

No gel de focalização isoeletrica foi possível distinguir aproximadamente 16 isoformas de zeínas, sendo identificada uma isoforma de zeína mais catiônica, de ponto isoeletrico (pI) aproximadamente 8, presente em nove dos dez genótipos indígenas e ausente no genótipo normal (Figura 2). Em função da grande variedade de nomenclatura das zeínas descrita na literatura em relação ao ponto isoeletrico, houve dificuldade na identificação da isoforma catiônica, sendo necessária a utilização adicional do SDS-PAGE, cuja nomenclatura é melhor definida.

Para tal, foram associadas as técnicas de focalização isoeletrica e de SDS-PAGE em géis bidimensionais para a melhor caracterização dos polipeptídeos utilizando-se os genótipos

normal (BRS 3150), QPM (BR 473) e dois mutantes indígenas, um deles apresentando a isoforma de alto pI (Bol-II) e o único genótipo indígena (Poza Rica) cuja isoforma não foi encontrada. Na análise dos géis bidimensionais dos quatro materiais (Figura 3), torna-se bastante evidente a redução do nível da alfa-zeína de 22 KDa e o aumento da gama-zeína de 27 KDa no milho QPM em relação aos demais genótipos. Foram observadas zeínas de mesmo ponto isoelétrico que apresentavam diferentes massas moleculares, assim como, zeínas de diferentes pIs apresentando a mesma massa molecular.

A isoforma catiônica, presente apenas no genótipo indígena Bol-II, não foi identificada como uma proteína diferente dos demais genótipos, uma vez que ao ser separada em gel de SDS-PAGE, apresentou polipeptídeo(s) com a mesma massa molecular das demais zeínas, diferindo no entanto quanto ao balanço de cargas. Tal diferença pode estar associada à constituição aminoacídica ou a modificações pós-traducionais da(s) proteína(s). Por outro lado, o genótipo Bol-II apresentou um polipeptídeo de 14 KDa, identificado como beta-zeína, de ponto isoelétrico diferente daquele encontrado nos outros genótipos. Observa-se ainda que uma gama-zeína de 27 KDa presente nos milhos indígenas, teve sua expressão reduzida no genótipo QPM, estando ausente no milho normal. O ponto isoelétrico desse polipeptídeo encontrou-se em uma faixa diferente daqueles correspondentes a maior fração da gama-zeína.

## Literatura Citada

GUIMARÃES, C.T.; BARROS, E.G.; VASCONCELOS, M.J.V.; PAIVA, E.

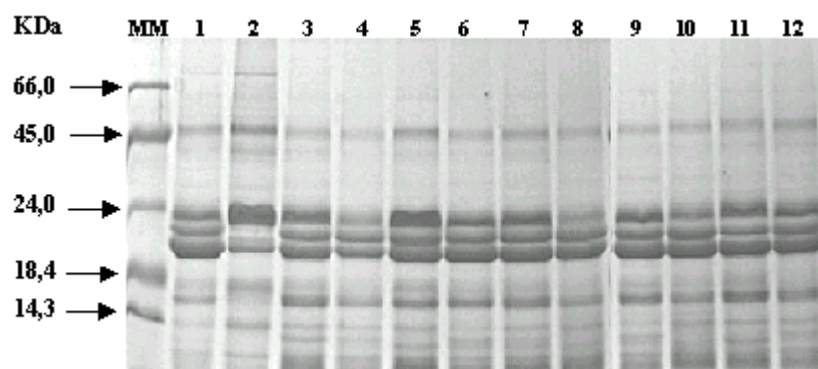
Characterization of South American exotic maize (*Zea mays* L.) populations with opaque phenotype. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.18, p.259-264, 1995.

SILVA, R. P. Caracterização dos Padrões Protéicos do Endosperma do Milho e sua Relação com a Estrutura Física do Grão. Lavras-MG. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Lavras. 1998.

WILSON, C.M. Serial Analysis of Zein by Isoelectric Focusing and Sodium Dodecyl Sulfate Gel Electrophoresis. **Plant Physiology**, Illinois, v.82, p.196-202, 1986.

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

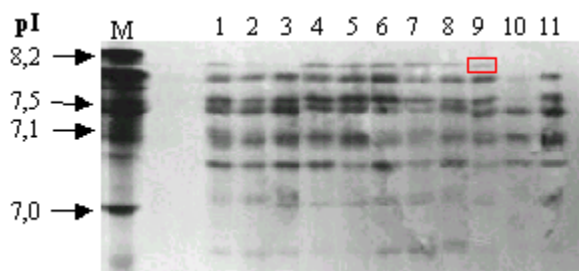
LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5258, p. 680-684, 1970.



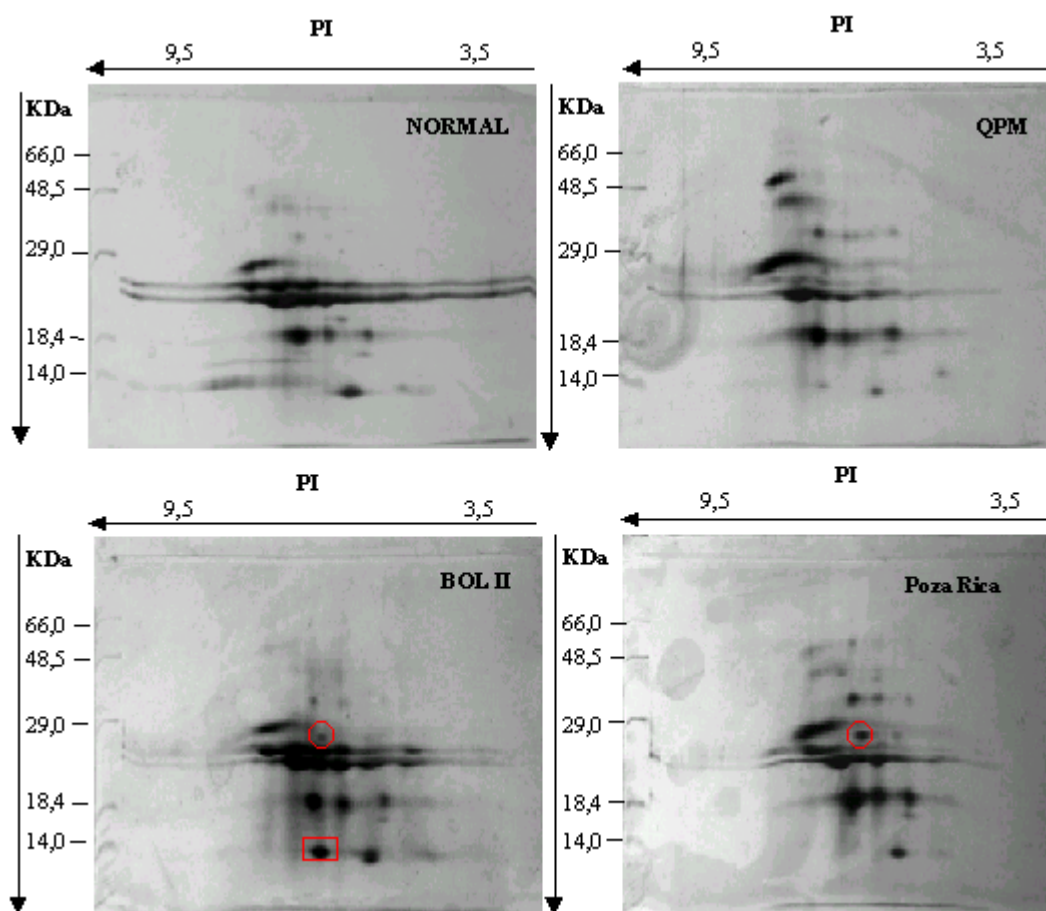
**Figura 1.** Análise de zeínas por eletroforese em SDS-PAGE a 12,5% dos genótipos: 1) BRS 3150, 2) BR 473, 3) Bol-I, 4) Bol-II, 5) MT-I, 6) MT-II, 7) MT-III, 8) MT-10, 9) Nodzob Udza, 10) PR-I, 11) Preto Chileno e 12) Poza Rica, sendo MM o marcador molecular.

**Tabela 1.** Nível de zeínas, qualidade nutricional e fenótipo do endosperma em genótipos de milho.

Genótipo	Nível de zeínas	Qualidade Nutricional	Fenótipo do endosperma
Normal	Alto	Baixa	Vítreo
Opaco-2	Baixo	Alta	Opaco
QPM	Baixo	Alta	Vítreo
Mutante Indígena	Alto	Baixa	Opaco



**Figura 2.** Gel de focalização isoeletrica de zeínas dos genótipos: 1) Bol-I, 2) Bol-II, 3) MT-I, 4) MT-II, 5) MT-III, 6) MT-10, 7) Nodzob Udza, 8) PR-I, 9) Preto Chileno, 10) Poza Rica e 11) BRS 1345 (normal), sendo M o marcador de pI. O retângulo em destaque mostra a isoforma catiônica de pI aproximadamente 8,0.



**Figura 3.** Eletroforese bidimensional de zeínas dos genótipos de milho normal (BRS 3150), QPM (BR 473) e indígenas (Bol-II e Poza Rica). O círculo em destaque mostra a gama-zeína de 27 KDa e o retângulo a beta-zeína de 14 KDa.

---

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

---