



NEWTON P. CARNEIRO, CLAUDIA T. GUIMARÃES, UBIRACI G.P. LANA,
JACIARA G.P. LANA e EDILSON PAIVA

Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151 Sete Lagoas, MG – CEP 35701-970
E-mail: newtonc@cnpms.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O grão do milho é um importante fonte de proteínas e energia para nutrição humana e animal monogástricos, contudo apresenta baixo valor nutricional devido as proteínas de reserva (zeínas) conterem baixo níveis de alguns aminoácidos essenciais. As zeínas compõem aproximadamente 70% da proteína total do endosperma que por sua vez tem 80% do peso seco do grão. As zeínas não tem função enzimática ou estrutural conhecida. As zeínas podem ser resolvidas por SDS-PAGE em quatro grandes classes: 19- e 22-kDa alfa (α -), 14-kDa beta (β -), 16- e 27-kDa gama (γ -) e 10-kDa delta (δ -) zeínas (Larkins *et al.*, 1989). As α -zeínas representam a maior classe de proteínas de reserva (60%), seguidas por γ -zeínas (25%), β -zeínas (5 a 10%) e as δ -zeínas (5%). A mutação *opaco2* (*o2*), correspondente a um fator de transcrição defeituoso do tipo zíper de leucina que regula a expressão de zeínas de 22-kDa (Hartings *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1990), reduz sensivelmente o conteúdo de zeína no endosperma. Um outro mutante descrito é o *floury2* (*fl2*), que é uma mutação semidominante causada por uma α -zeína cujo peptídeo sinal não pode ser removido (Lopes *et al.*, 1994; Coleman *et al.*, 1995). Os mutantes *o2* e *fl2* apresentam grãos macios com maior nível de amido que impede a transmissão da luz e um aumento significativo de lisina em relação ao endosperma normal (Nelson *et al.*, 1965). No entanto, os efeitos pleiotrópicos da mutação resultam em grãos mais fracos, quebradiços, com elevada susceptibilidade a pragas, que culminam em uma baixa qualidade de processamento e de produtividade (Glover e Mertz, 1987). A identificação de genes modificadores permitiu que os efeitos negativos do *opaco-2* fossem superados, culminando na obtenção de genótipos *o2* modificados, também designados *Quality Protein Maize* ou QPM, que apresentavam endosperma vítreo e duro como os normais, mantendo os altos níveis de lisina (Villegas *et al.*, 1992; Gevers e Lake, 1992). No entanto, a transferência dos genes modificadores para genótipos elites não tem sido uma tarefa fácil. O desenvolvimento de QPM tem sido dificultado pela complexidade em se manipular simultaneamente pelo menos três sistemas genéticos: a mutação *o2*, os genes modificadores do endosperma e os genes que controlam os níveis de lisina. Milhos indígenas com endosperma macio, baixo valor nutricional e níveis de zeínas idênticos ao endosperma normal foram identificados em nossos laboratórios (Guimarães *et al.*, 1995).

Esses mutantes são fontes valiosas para a investigação de mecanismos genéticos e bioquímicos que afetam a dureza do grão, uma característica de extrema importância comercial. O seqüenciamento em larga escala de bibliotecas de cDNA associado com uma caracterização sistemática dos clones tem sido usado com grande eficiência para determinar o perfil qualitativo e quantitativo das proteínas de órgãos e tecidos (Woo et al., 2001). O principal objetivo desse trabalho foi testar se um desses mutante (Bol II) apresenta genes com seqüência e freqüência alteradas em relação ao milho normal. A estratégia usada foi a construção de uma biblioteca de cDNA de endosperma de milho indígena BolIII com 20 DAP (Dias Após Polinização), seguida do seqüenciamento e análise de 500 genes. Resultados iniciais mostraram que a alfa-zeína de 19 kDa está em uma freqüência maior do que a genótipo normal, sugerindo uma possível correlação com essa mutação.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a construção da biblioteca de cDNA, RNAs foram isolados de endosperma do milho indígena Bol II com 20 DAP utilizando-se o método do Trizol e o RNA mensageiro (mRNA) purificado em coluna de oligo-dT. As bibliotecas de cDNAs foram preparadas a partir do kit "SuperCript™ Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning" e as células competentes "UltraMAX Efficiency DH5á-FT conforme especificações do fabricante (Invitrogen). Os clones da biblioteca de cDNAs foram estocados em glicerol 10%, a -80°C e o DNA plasmidial foi extraído em placas de 96 poços pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) e quantificado em gel de agarose 0,8%. Para o seqüenciamento das extremidades 3' dos insertos, utilizou-se o kit "ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing" (Applied Biosystems) no seqüenciador capilar DNA ABI 3100 (Applied Biosystems). As seqüências de DNA obtidas foram processadas e alinhadas pelo programa CAP3 (<http://bio.ifom-firc.it/ASSEMBLY/capdoc.html>), sendo posteriormente comparadas com as seqüências depositadas no "GenBank Nucleotide Database" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) pelo programa BlastN (Altschul et al., 1997).

A estratégia desse projeto foi baseada na caracterização do perfil protéico do endosperma do milho indígena Bol II utilizando o seqüenciamento em larga escala de genes expressos nesse tecido. O milho indígena Bol II apresenta um endosperma opaco, níveis de zeína normais e baixo teor protéico. Considerando que a maioria dos mutantes de endosperma descritos estão relacionados com as proteínas de reserva, fez-se uma biblioteca de cDNA do no endosperma de 20 DAP. As etapas da biblioteca utilizando o kit "SuperCript Plasmid System with Gateway Technology" estão mostrados na figura 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estratégia desse projeto foi baseada na caracterização do perfil protéico do endosperma do milho indígena Bol II utilizando o seqüenciamento em larga escala de genes expressos nesse tecido. O milho indígena Bol II apresenta um endosperma opaco, níveis de zeína normais e baixo teor protéico. Considerando que a maioria dos mutantes de endosperma descritos estão relacionados com as proteínas de reserva, fez-se uma biblioteca de cDNA do no endosperma de 20 DAP. As etapas da biblioteca utilizando o kit "SuperCript Plasmid System with Gateway Technology" estão mostrados na figura 1.

Tabela 1 – Descrição do material vegetal com a respectiva classificação de Resistência (R) e Suscetibilidade (S)

Tratamento	Material	Classificaçã	Tratamento	Material	Classificaçã
01	LR1	R	14	LS3	S
02	LR2	R	15	LS4	S
03	LR3	R	16	LS5	S
04	LR4	R	17	LS6	S
05	LR5	R	18	LS7	S
06	LR6	R	19	LS8	S
07	LR7	R	20	LS9	S
08	LR8	R	21	LS10	S
09	LR9	R	22	Z Cháco	R
10	LR10	R	23	BR 3123	S
11	LR11	R	24	BR 201	S
12	LS1	S	25	LMP 205	R
13	LS2	S			

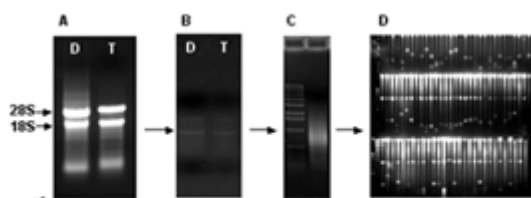


Figura 1 – Etapas da montagem da biblioteca subtrativa: A = RNA driver (D) e tester (T); B = mRNA driver (D) e tester (T); C = produto da segunda amplificação; D = amostragem da clonagem do produto de PCR no vetor TOPO-TA

Com base na cinética de renaturação de DNA e RNA, Viotti et al. (1979) concluíram que existem pelo menos 15 seqüências que não se hibridizaram, que correspondem a um número entre 110 e 130 genes. Tem sido demonstrado que um grande número de genes da super-família de alfa zeínas contém mutações que podem afetar sua expressão sugerindo que muitos deles sejam pseudogenes (Kridl et al., 1984). A freqüência e classificação das proteínas de reservas encontradas nessas duas bibliotecas estão especificadas na Tabela 1. Os resultados obtidos mostraram que apesar da biblioteca ter tido um título relativamente baixo (aproximadamente 2×10^5 colônias) foi o suficiente para fazer as análises. Outras informações relevantes da viabilidade da biblioteca incluem 2,7% de vetor (Tabela 1) e as seqüências geradas a partir do final 3' tiveram em média 600 pb (resultados não apresentados). As seqüências não foram analisadas quanto suas qualidades, mas conforme a visualização dos cromatogramas e resultados do BLAST com "*e value*" muito baixo ($e < -20$) tudo indica que foram boas. Conforme a distribuição dos clones de zeínas nesse trabalho, ficou estabelecido que aos 20 DAP, os clones mais freqüentes são as alfas zeínas (19 e 22 kDa) seguidas pelas gama zeínas.

Tabela 1 – Descrição do genes encontrados na biblioteca subtrativa.

Descrição no Banco de Dados (GenBank)	Espécie	e-value	Número de clones
Aspartate Aminotransferase	<i>Panicum milisocum</i>	2e-135	02
Ceb-m7 gene para captação de luz	<i>Zea mays</i>	e-48	01
Celulose sintase-7 (CesA-7)	<i>Zea mays</i>	e-61	01
Cinamoi CoA redutase	<i>Zea mays</i>	9e-51	01
Cloroplasto rRNA-operon	<i>Zea mays</i>	8e-64	01
Dianilfio isomerase (pdi)	<i>Zea mays</i>	e-59	01
Fator de elongação 1 alfa	<i>Zea mays</i>	0.0	10
Fator de transcrição / domínio MADS	<i>Gnatum gnemon</i>	1e-75	01
Ferredoxina	<i>Zea mays</i>	e-154	06
Fosfoenolpiruvato carboxilase	<i>Zea mays</i>	e-155	03
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	<i>Zea mays</i>	1e-37	01
Gliceraldeído-3-fosfato	<i>Zea mays</i>	e-178	01
Metaltioneína	<i>Zea mays</i>	2e-54	01
Piruvato ortofosfato diquinase	<i>Zea mays</i>	7e-46	01
Plastocianina	<i>Oryza sativa</i>	e-49	04
Proteína componente do fotosistema II	<i>Zea mays</i>	e-54	03
Proteína de choque térmico (HSP 70)	<i>Zea mays</i>	e-128	01
Proteína ligante a ácido nucleico (HBP)	<i>Zea mays</i>	0.0	02
S-adenosil-L-metionina sintetase	<i>Oryza sativa</i>	1e-30	01
Sequências codificadas encontradas em projetos de mapeamento	<i>Zea mays</i>		83
Tiorredoxina	<i>Zea mays</i>	3e-48	01
Transportador de fosfato	<i>Zea mays</i>	e-134	01
Ubiquitina	<i>Zea mays</i>	e-146	01

LITERATURA CITADA

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, EMBRAPA/CNPMS, 1995 (EMBRAPA/CNPMS, Circular Técnica, 21).

CONCLUSÃO

Uma biblioteca de cDNAs de endosperma em desenvolvimento de milho indígena Bol II foi analisada com o objetivo de caracterizar a expressão das suas proteínas de reserva. Nesse estudo ficou demonstrado que a 20 DAP as zeínas compõem aproximadamente 50% das proteínas. A partir da análise da extremidade 3' dos cDNAs das zeínas de 22 kDa, não foi possível identificar modificações nas seqüências de nucleotídeos. Contudo, verificou-se que a alfa-zeína de 19 kDa apresenta-se bem mais freqüente que a classe de 22 kDa, indicando uma possível explicação para a estrutura opaca do endosperma desse mutante.

LITERATURA CTADA

- BOYER, C.D. E HANNAH, L.C. (1994). Kernel mutants of corn. In Specialty corns. Hallauer, A.R. CRC Press, Ames, Iowa. pp.2-18
- COLEMAN, C.E., LOPES, M.A., GILLIKIN, J.W., BOSTON, R.S. E LARKINS, B.A. (1995). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:6828-6831.
- GEVERS, H.O. E LAKE J.K. (1992). Development of modified opaque2 maize in South Africa. In E. T. Mertz (ed). Quality Protein Maize. (The American Society of Cereal Chemists, St. Paul MN), pp. 49-78.
- GLOVER, D.V. E MERTZ, E.T. (1987). Corn. In R.A Olson, and K.J. Frey (eds). Nutritional Quality of Cereal Grains, Genetic and Agronomic Improvement (ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.), pp. 184-336.
- GUIMARÃES, C.T.; BARROS, E. G.; VASCONCELOS, M.J.V E PAIVA, E. (1995). Rev. Brasil. Genet. 18, 2, 259-264.
- HARTINGS, H., MADDALONI, M., LAZZARONI, N., DI FONZO, N., MOTTO, M., SALAMINI, F. E THOMPSON, R. (1989). EMBO J. 8:2795-2801.
- KRIDL, J.C., VIEIRA, J., RUBESTEIN, I. E MESSING, J. (1984). Gene 28, 113-118.
- LARKINS, B.A., LENDING, C.R., WALLACE, J.C., GALILI, G., KAWATA, E.E., GEETHA, K.B., KRIZ, A.L., MARTIN, D.N. E BRACKER, C.E. (1989). Zein gene expression during maize endosperm development. In R.B. Goldberg (ed). The molecular basis of plant development, (Alan R. Liss, Inc. New York, NY), pp. 109-120.
- LOPES, M.A. E LARKINS, B.A. (1995). Theor. Appl. Genet. 19, 271-281.

- LOPES, M.A., COLEMAN, C.E., KODRZYCKI, R., LENDING, C.R. E LARKINS, B.A. (1994). Mol. Gen. Genet. 245, 537-547.
- NELSON, O.E., MERTZ, E.T. E BATES, L.S. (1965). Science 150, 1469-1470.
- OSBORNE, T.B. E MENDEL, L.B. (1914). J. Biol. Chem. 18:1-6.
- SCHMIDT, R.J., BURR, F.A., AUKERMAN, M.J. E BURR, B. (1990). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:46-50.
- VILLEGAS, E., VASAL, S.K. E BJARNARSON, M., (1992). Quality Protein Maize - What is it and how was it developed. In E. T. Mertz (ed). Quality Protein Maize (The American Society of Cereal Chemists, St. Paul MN), pp. 27-48.
- VIOTTI, A., SALA, E., MAROTTA, R., ALBERI, P., BALDUCCI, C. E SOAVE, C. (1979). Eur. J. Bioche. 102, 211-222.
- WOO, Y; HU, D. W. LARKINS, B E JUNG, R. (2001). Pant Cell 13:2297-2317.



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C
