

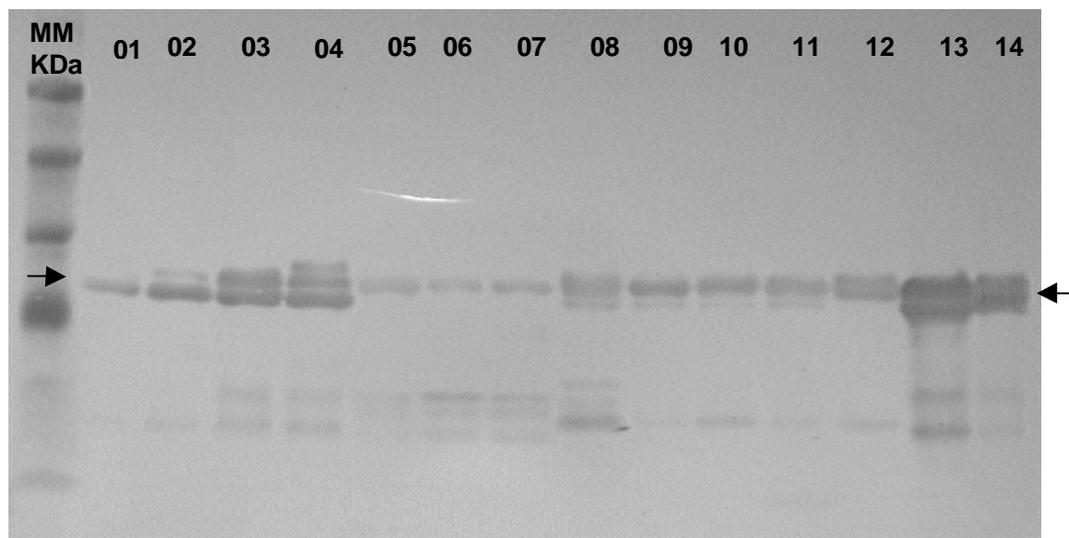
**ANÁLISE COMPARATIVA DAS PROTEÍNAS DO GRÃO DO MILHO, SORGO, MILHETO, TEOSINTE E TRIPSACUM.** Rodrigo Salles e Portugal<sup>(1)</sup>, José Edson Fontes Figueiredo<sup>(2)</sup>, Maria José Vasconcelos<sup>(2)</sup>, Edilson Paiva<sup>(2)</sup>, Tuneo Sedyama<sup>(1)</sup> & Maurício Antônio Lopes<sup>(2)</sup>. <sup>(1)</sup> - Universidade Federal de Viçosa, Deptº de Fitotecnia, Viçosa-MG, <sup>(2)</sup> - EMBRAPA – Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG.

Palavras-chave: milho (*Zea mays*), milheto (*Pennisetum glaucum*), Teosinte (*Zea maxicana*), Tripsacum (*Tripsacum dactyloides*), sorgo (*Sorghum bicolor*), proteínas de reserva.

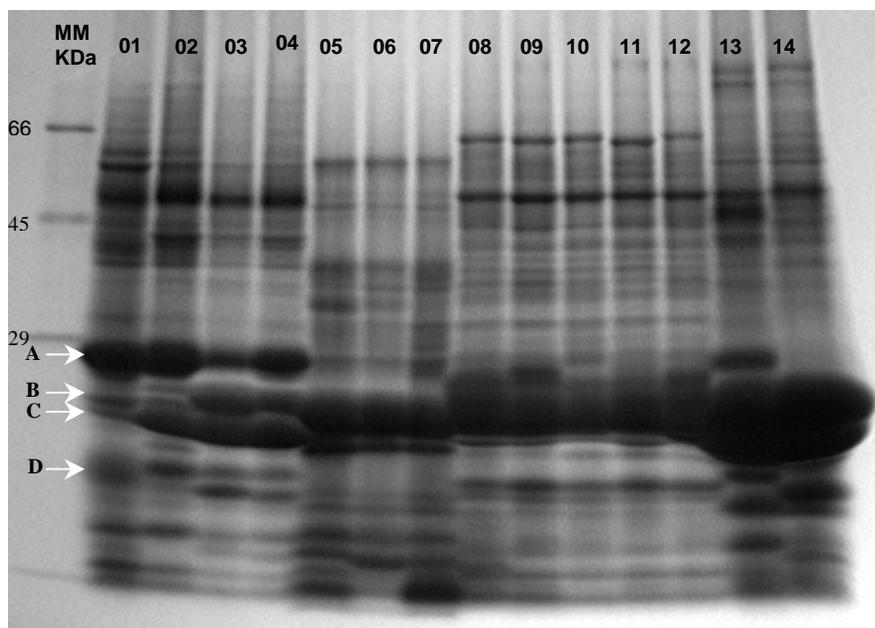
O grande avanço alcançado pela Biologia Molecular e Celular nos últimos anos tem permitido o desenvolvimento de novas alternativas que, se integradas ao melhoramento tradicional, podem gerar novos instrumentos auxiliares ao melhoramento genético e aumentar o conhecimento de mecanismos genéticos básicos, ainda pouco compreendidos. Em especial, o aprimoramento das tecnologias de DNA recombinante tem levado a um crescente interesse na aplicação desses conhecimentos, para geração de nova variabilidade genética, útil em programas de melhoramento de plantas. O desenvolvimento de cultivares cada vez mais produtivas e adaptadas às mais diversas condições de cultivo e capazes de produzir alimentos de qualidade cada vez melhor pode ser drasticamente acelerado com a utilização de técnicas de manipulação gênica e transformação. O milho, por ser uma cultura de grande expressão e um dos modelos preferidos para estudos genético-moleculares em plantas, desperta grande interesse nas mais diferentes áreas (Lopes & Larkins, 1993). Devido à importância dos componentes do endosperma desse cereal, muitos dos genes e promotores responsáveis pela síntese de compostos de reserva, em especial proteínas, já foram clonados e seqüenciados. Acesso a muitos genes, promotores e outras seqüências regulatórias úteis para manipulação da qualidade nutricional do grão tem se tornado difícil em função do acelerado processo de proteção legal via patentes, o que impossibilita a livre utilização com o objetivo de manipulação gênica e transformação de plantas. Diversas espécies relacionadas ao milho constituem importantes reservas de genes potencialmente úteis para manipulação gênica e transformação deste e outros cereais de importância econômica. Devido ao fato de possuírem pouca ou nenhuma importância econômica, essas espécies não foram ainda exploradas do ponto de vista molecular. Isso possibilita a realização de estudos nessas espécies, com o objetivo de obter produtos gênicos novos e/ou similares àqueles encontrados em milho e que possam ser utilizados como ferramentas para fins de manipulação gênica e transformação através de introdução de seqüências codificadoras heterólogas, ou pela alteração da expressão de genes endógenos colocados sob controle de promotores heterólogos. Os mecanismos de controle da expressão dos genes que codificam proteínas do grão de cereais têm sido um dos sistemas preferidos para estudos de expressão gênica em plantas (Lopes & Larkins, 1993). Os genes que codificam estas proteínas são expressos de maneira tecido-específica e em altos níveis no endosperma e, por esta razão, constituem sistemas ideais para estudos de regulação temporal e espacial de expressão gênica. O grande volume de informações disponíveis sobre síntese e deposição de proteínas, suas estruturas e associações, bem como organização e regulação dos genes que as codificam fazem deste sistema um dos mais promissores para utilização prática (Lopes & Larkins, 1996), como no melhoramento da qualidade nutricional do grão. Apesar do amplo conhecimento disponível acerca do sistema de produção e acúmulo de reserva em cereais, como milho, sorgo e trigo, espécies como o milheto, teosinto e tripsacum ainda não foram detalhadamente caracterizadas quanto à composição de reservas do grão e complexidade das famílias gênicas que as codificam.

O melhor conhecimento do sistema de produção de proteínas de reserva destas espécies poderá levar à identificação de genes e sequências regulatórias intercambiáveis que permitam o desenvolvimento de estratégias de melhoramento da qualidade nutricional do milho e outros cereais por meio de manipulação e introdução de genes heterólogos e/ou alteração da expressão de genes endógenos com utilização de promotores heterólogos via transformação gênica.

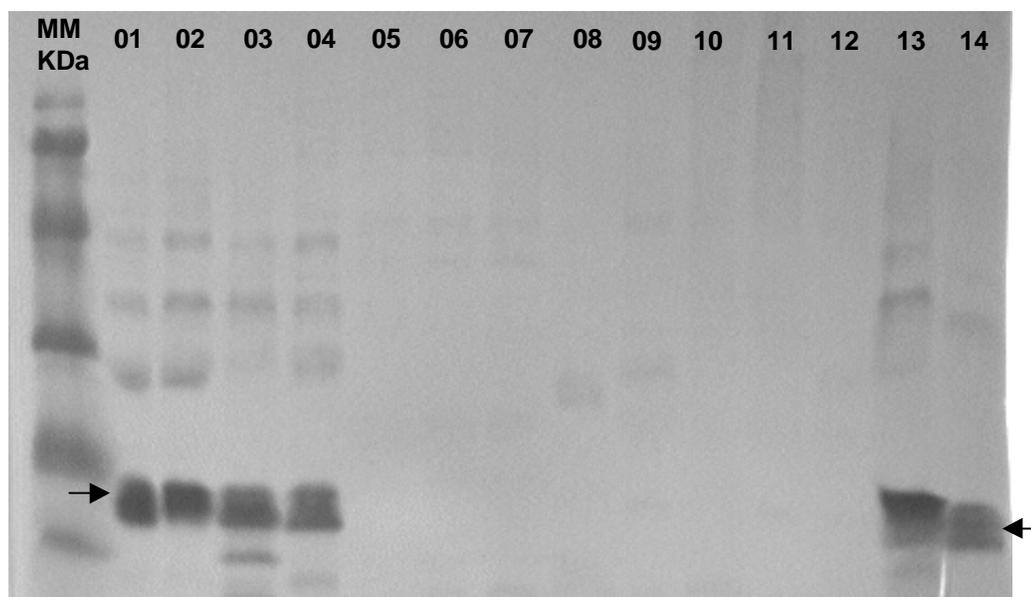
O presente trabalho relata os resultados da primeira fase do processo de prospecção de genes de expressão endosperma-específica, através da análise comparativa das proteínas do grão de milho, sorgo, milheto, teosinte e tripsacum. A extração protéica foi realizada de acordo com Wallace et al. (1990), com modificações e ajustes para extração de proteínas do milheto. Análises eletroforéticas em meio desnaturante (SDS-PAGE) foram utilizadas para as diversas frações protéicas do grão, seguidas de análises imunológicas ("western blot") com anticorpos policlonais para proteínas de reserva do milho (alfa-, beta-e gama-zeínas) para avaliação de similaridade dos polipeptídeos entre as várias espécies analisadas. Os resultados indicam conservação e dissimilaridade entre as diversas classes de polipeptídeos analisados quanto a imunoreatividade, bem como marcantes diferenças quantitativas no seu acúmulo entre as espécies analisadas, observadas em SDS-PAGE. Proteínas similares a alfa-zeínas de milho foram reconhecidas por anticorpos policlonais em todos genótipos estudados (Fig 1), variando a intensidade do sinal encontrado entre as diferentes espécies, sendo este mais acentuado em teosinte e tripsacum (Fig 2). Resultado semelhante foi observado para o anticorpo da gama-zeína, com excessão dos genótipos de milheto, onde não foi observada a presença de bandas (Fig 3). Os resultados para a fração beta-zeína indicou o reconhecimento de polipeptídeos unicamente para as proteínas de teosinte e tripsacum (Fig 4). Os resultados deste trabalho indicam similaridade de várias classes de polipeptídeos entre as várias espécies estudadas, e estudos aprofundados dos genes que codificam tais polipeptídeos serão desenvolvidos para avaliação da conservação a nível de sequências de DNA. Tais estudos orientarão a identificação e clonagem de genes e sequências regulatórias de uso potencial no melhoramento da qualidade nutricional do grão de cereais via engenharia genética.



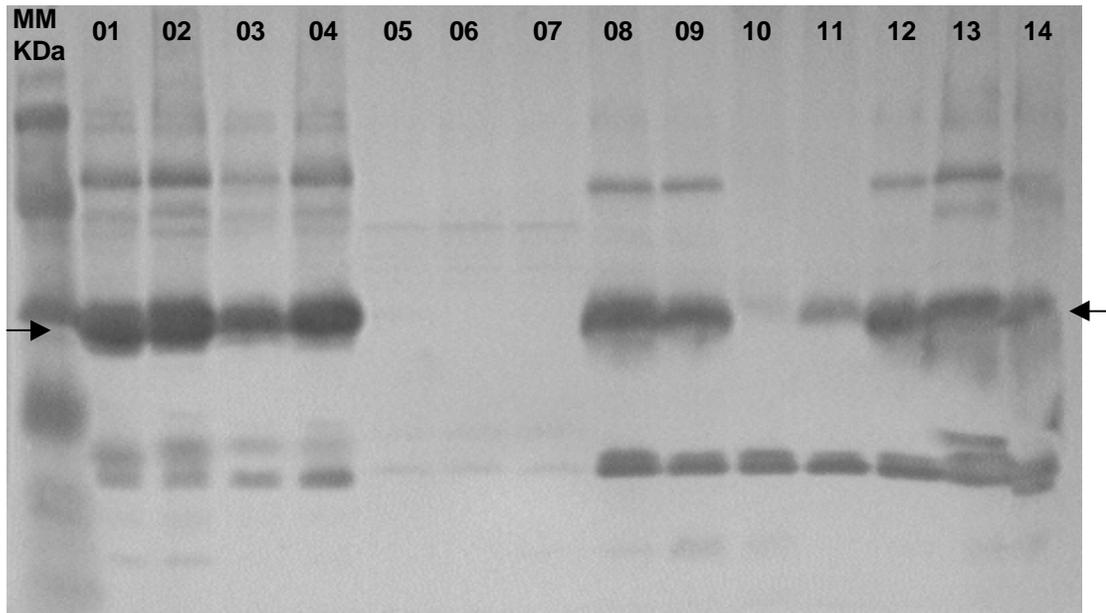
**Figura 1:** Resultado de imunoreatividade ao anticorpo para  $\alpha$ -Zeína. Onde, MM: Marcador de Peso Molecular; 1: Milho L45532; 2: Milho L45611; 3: Milho L57; 4: Milho L64; 5: Milheto 841B; 6: Milheto 842 B; 7: Milheto 843 B; 8: Sorgo BR 001B; 9: Sorgo BR 012B; 10: Sorgo CMSXS 210B; 11: Sorgo CMSXS 211B; 12: Sorgo CMSXS 225R; 13: *Zea diploperennis*; e 14: *Tripsacum dactyloides*. A seta indica, para milho, proteína  $\alpha$ -Zeína, e proteínas similares para os demais genótipos.



**Figura 2:** Resultado de SDS-PAGE para proteína total. Onde, MM: Marcador de Peso Molecular; 1: Milho L45532; 2: Milho L45611; 3: Milho L57; 4: Milho L64; 5: Milheto 841B; 6: Milheto 842 B; 7: Milheto 843 B; 8: Sorgo BR 001B; 9: Sorgo BR 012B; 10: Sorgo CMSXS 210B; 11: Sorgo CMSXS 211B; 12: Sorgo CMSXS 225R; 13: *Zea diploperennis*; 14: *Tripsacum dactyloides*; A: Proteínas 27 KDa; B: Proteínas 22 KDa; C: Proteínas 19 KDa; D: Proteínas 15 KDa; e: Proteínas 15 KDa



**Figura 3:** Resultado de imunoreatividade ao anticorpo para  $\beta$ -Zeína. Onde, MM: Marcador de Peso Molecular; 1: Milho L45532; 2: Milho L45611; 3: Milho L57; 4: Milho L64; 5: Milheto 841B; 6: Milheto 842 B; 7: Milheto 843 B; 8: Sorgo BR 001B; 9: Sorgo BR 012B; 10: Sorgo CMSXS 210B; 11: Sorgo CMSXS 211B; 12: Sorgo CMSXS 225R; 13: *Zea diploperennis*; e 14: *Tripsacum dactyloides*. A seta indica, para milho, proteína  $\beta$ -Zeína, e proteínas similares para os demais genótipos.



**Figura 4:** Resultado de imunoreatividade ao anticorpo para  $\gamma$ -Zeína. Onde, MM: Marcador de Peso Molecular; 1: Milho L45532; 2: Milho L45611; 3: Milho L57; 4: Milho L64; 5: Milheto 841B; 6: Milheto 842 B; 7: Milheto 843 B; 8: Sorgo BR 001B; 9: Sorgo BR 012B; 10: Sorgo CMSXS 210B; 11: Sorgo CMSXS 211B; 12: Sorgo CMSXS 225R; 13: *Zea diploperennis*; e 14: *Tripsacum dactyloides*. A seta indica, para milho, proteína  $\gamma$ -Zeína, e proteínas similares para os demais genótipos.

## Bibliografia

- Wallace JC, Lopes MA, Paiva E, Larkins BA (1990). New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of gamma zein in modified opaque-2 maize. *Plant Physiol* 92: 191-196.
- Lopes, M.A., and Larkins, B.A. (1993). Endosperm Origin, Development and Function. *Plant Cell* 5, 1383-1399.
- Lopes, M.A. and Larkins, B.A. (1996). Molecular Biology and Traditional Breeding Applied to the Improvement of Maize Nutritional Quality. In: B.W.S. Sobral, ed. *The Impact of Plant Molecular Genetics*. Birkhäuser Boston Inc., USA.