

EFEITO DIFERENCIAL DO GENE *OPACO-2* SOBRE OS TEORES DE PROTEÍNA E DE LISINA NAS METADES SUPERIOR E INFERIOR DO ENDOSPERMA DO MILHO*

Hélio M. Barbosa
Renato Sant'Anna**

1. INTRODUÇÃO

Após a descoberta de que o gene *opaco-2* (o_2) aumenta os teores de lisina (4) e triptófano (7) no endosperma do milho, outros estudos foram realizados para verificar se o gene o_2 influencia outros tecidos. Assim, foi observado que o_2 não influencia nem a composição de aminoácidos das proteínas do germe nem a das proteínas das folhas ou dos grãos de pólen (6). Com base nesses estudos, as diferenças entre os teores de aminoácidos no milho normal e no milho *opaco-2* têm sido consideradas como limitadas ao endosperma (6). Entretanto, trabalhos realizados por NACIF *et alii* (5) e WICHSER (10) mostraram que o_2 produz maior teor de proteína no germe, quando comparado com *normal*. NACIF *et alii* (5) encontraram, ainda, maior porcentagem de lisina na amostra e menor porcentagem de lisina na proteína (relação L/P) de germes *opaco-2*.

De acordo com BARBOSA e GLOVER (1), a maioria dos estudos em que se compara o milho *opaco-2* com o normal tem indicado que o gene o_2 tende a reduzir o teor de proteína no endosperma. Por outro lado, quando PINTO e BARBOSA (8) compararam o teor de proteína da metade superior (aspecto quase vítreo) com o da metade inferior (aspecto opaco) do endosperma *opaco-2* modificado, verificaram que o teor de proteína da metade inferior era significativamente menor. A diferença encontrada foi mais drástica que a obtida quando se compara o teor de

* Recebido para publicação em 26-12-1978.

** Professores Titulares da Universidade Federal de Viçosa.

proteína de endosperma normal com o de endosperma opaco-2. O menor teor de proteína na metade inferior do endosperma encontrado por PINTO e BARBOSA (8) poderia estar associado à diferença nas texturas das duas metades do endosperma e/ou poderia representar um fenômeno comum ao milho opaco-2 ou mesmo ao milho normal. Este estudo foi realizado para testar essas hipóteses.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas, neste estudo, sementes maduras, secas, de dez linhagens (cinco com endosperma dentado e cinco com endosperma duro) e das respectivas versões opaco-2. Endospermas de 60 sementes de cada uma das linhagens foram extraídos e separados em duas frações: metade superior e metade inferior (próxima ao pedicelo). Cada uma dessas frações e os germes obtidos da dissecação das sementes (exceto germes da linhagem 917) foram analisados quanto aos teores de proteína e de lisina. Os teores de proteína foram determinados pelo método semi-micro Kjeldahl (2), os teores de lisina no endosperma pelo método colorimétrico do TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico), descrito por ESTEVÃO *et alii* (3), e os teores de lisina no germe pelo método da cromatografia de troca iônica, conforme SPACKMAN *et alii* (9), utilizando-se um analisador automático de aminoácidos Beckman, modelo 121.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se pode ver no Quadro 1, não houve diferença significativa entre os teores de proteína nem entre os teores de lisina da metade superior e da metade inferior do endosperma do milho normal. Entretanto, o milho opaco-2 apresenta porcentagens de proteína e de lisina na amostra significativamente reduzidas na metade inferior (Quadro 2). Nota-se, ainda, nesse mesmo Quadro, que a relação L/P é maior na metade inferior. Esses dados sugerem que a metade inferior do endosperma opaco-2 tem menor concentração de zeína (fração protéica carente de lisina) e/ou maior concentração de lisina decorrente de diferenças na fração de aminoácidos livres. Portanto, o menor teor de proteína na metade inferior do endosperma é fenômeno comum associado ao gene o_2 , não se limitando, assim, ao endosperma opaco-2 modificado, como foi verificado inicialmente por PINTO e BARBOSA (8). O efeito do gene o_2 de reduzir o teor de proteína no endosperma, para o qual BARBOSA e GLOVER (1) chamaram a atenção, foi também verificado nas linhagens utilizadas neste trabalho. Como se vê nos Quadros 3 e 4, a porcentagem de proteína em endospermas opaco-2 foi significativamente inferior à encontrada no endosperma normal. Em nenhuma linhagem de endosperma normal foi encontrada menor porcentagem de proteína que na versão opaco-2. Convém salientar que as comparações feitas neste estudo são rigorosas, pois contrastam os efeitos dos alelos o_2 e *normal* em «background» genético quase isogênico. Nota-se, comparando os Quadros 3 e 4, que o efeito de o_2 de reduzir o teor de proteína no endosperma, é mais drástico na metade inferior daquele tecido.

No Quadro 5 são apresentados os teores de proteína e de lisina nos germes correspondentes às sementes normais e opaco-2 cujos endospermas foram analisados. Para todas as linhagens as versões opaco-2 apresentaram maior teor de proteína. A porcentagem média de proteína (37,5%) dos germes opaco-2 foi significativamente superior à encontrada para os germes normais (28,7%). Esses resultados confirmam os obtidos por outros autores (5, 10). A porcentagem de lisina na amos-

QUADRO 1. Porcentagem de proteína e de lisina nas metades superior e inferior de endospermas desengordurados de milho normal

Linhagem	% de proteína (P)		% de lisina (L)		L/P (%)	
	Metade superior	Metade inferior	Metade superior	Metade inferior	Metade superior	Metade inferior
2 ⁺ / +	13,6	12,1	0,137	0,151	1,02	1,24
827 ⁺ / +	9,6	8,6	0,130	0,140	1,35	1,62
835 ⁺ / +	12,6	13,9	0,133	0,141	1,06	1,02
869 ⁺ / +	9,4	10,9	0,128	0,132	1,36	1,21
886 ⁺ / +	10,6	10,3	0,122	0,133	1,17	1,28
911 ⁺ / +	9,6	9,1	0,152	0,131	1,57	1,44
917 ⁺ / +	11,4	12,6	0,126	0,129	1,11	1,02
954 ⁺ / +	9,1	8,1	0,131	0,138	1,44	1,70
960 ⁺ / +	9,8	9,5	0,129	0,135	1,31	1,42
965 ⁺ / +	11,7	11,7	0,130	0,134	1,11	1,15
Média	10,7	10,7	0,132	0,136	1,25	1,31
t (% lisina metade superior vs % lisina metade inferior) = 1,21 n.s. ^{1/}						
t (relação L/P metade superior vs relação L/P metade inferior) = 1,19 n.s.						

^{1/} n.s. = não significativo.

QUADRO 2. Porcentagem de proteína e de lisina nas metades superior e inferior de endospermas desengordurados de milho opaco-2

Linhagem.	% de proteína (P)		% de lisina (L)		L/P (%)	
	Metade superior	Metade inferior	Metade superior	Metade inferior	Metade superior	Metade inferior
2 o ² /o ²	9,6	8,1	0,215	0,198	2,23	2,45
827 o ² /o ²	9,1	6,7	0,189	0,174	2,08	2,59
835 o ² /o ²	11,8	7,6	0,205	0,189	1,74	2,49
869 o ² /o ²	8,7	6,6	0,379	0,289	4,35	4,34
886 o ² /o ²	9,6	5,7	0,165	0,153	1,71	2,67
911 o ² /o ²	9,2	6,3	0,186	0,153	2,02	2,42
917 o ² /o ²	10,5	7,4	0,261	0,201	2,48	2,72
954 o ² /o ²	8,3	5,9	0,222	0,188	2,66	3,18
960 o ² /o ²	7,8	7,4	0,277	0,247	3,53	3,32
965 o ² /o ²	8,5	7,1	0,230	0,203	2,71	2,88
Média	9,3	6,9	0,233	0,199	2,55	2,91
t (% proteína metade superior vs % proteína metade inferior)	= 6,54** ^{1/}					
t (% lisina metade superior vs % lisina metade inferior)	= 4,34**					
t (Relação L/P metade superior vs relação L/P metade inferior)	= 3,22*					

^{1/}*, ** = significativos, ao nível de 5 e 1%, respectivamente.

QUADRO 3. Porcentagem de proteína e de lisina na metade superior de endospermas desengordurados de milho normal e opaco-2

Linhagem	% de proteína (P)		% de lisina (L)		L/P (%)	
	Normal	Opaco-2	Normal	Opaco-2	Normal	Opaco-2
2	13,6	9,6	0,137	0,215	1,02	2,23
827	9,6	9,1	0,130	0,189	1,35	2,08
835	12,6	11,8	0,133	0,205	1,06	1,74
869	9,4	8,7	0,128	0,379	1,36	4,35
886	10,6	9,6	0,122	0,165	1,17	1,71
911	9,6	9,2	0,152	0,186	1,57	2,02
917	11,4	10,5	0,126	0,261	1,11	2,48
954	9,1	8,3	0,131	0,222	1,44	2,66
960	9,8	7,8	0,129	0,277	1,31	3,53
965	11,7	8,5	0,130	0,230	1,11	2,71
Média	10,7	9,3	0,132	0,233	1,25	2,55
t(% proteína endosperma normal vs % proteína endosperma opaco-2) = 3,65 ^{1/}						
t(% lisina endosperma normal vs % de lisina endosperma opaco-2) = 4,99 ^{**}						
t(Relação L/P endosperma normal vs relação L/P endosperma opaco-2) = 5,12 ^{**}						

^{1/}*, ** = significativos, ao nível de 5 e 1%, respectivamente.

QUADRO 4. Porcentagem de proteína e de lisina na metade inferior de endospermas desengordurados de milho normal e opaco-2

Linhagem	% de proteína		% de lisina		L/P (%)	
	Normal	Opaco-2	Normal	Opaco-2	Normal	Opaco-2
2	12,1	8,1	0,151	0,198	1,24	2,45
827	8,6	6,7	0,140	0,174	1,62	2,59
835	13,9	7,6	0,141	0,189	1,02	2,49
869	10,9	6,6	0,132	0,289	1,21	4,34
886	10,3	5,7	0,133	0,153	1,28	2,67
911	9,1	6,3	0,131	0,153	1,44	2,42
917	12,6	7,4	0,129	0,201	1,02	2,72
954	8,1	5,9	0,138	0,188	1,70	3,18
960	9,5	7,4	0,135	0,247	1,42	3,32
965	11,7	7,1	0,134	0,203	1,15	2,88
Média	10,7	6,9	0,136	0,199	1,31	2,91
t (% proteína endosperma normal vs % proteína endosperma opaco-2) = 8,10**1/						
t (% lisina endosperma normal vs % lisina endosperma opaco-2) = 4,68**						
t (Relação L/P endosperma normal vs relação L/P endosperma opaco-2) = 8,13**						

1/ ** = significativo, ao nível de 1%.

QUADRO 5. Porcentagem de proteína e de lisina em germes desengordurados de milho normal e opaco-2

Linhagem	% de proteína (P)		% de lisina (L)		L/P (%)	
	Normal	Opaco-2	Normal	Opaco-2	Normal	Opaco-2
2	32,3	38,8	1,33	1,86	4,12	4,79
827	25,9	33,6	1,04	1,42	4,02	4,23
835	30,2	37,8	1,15	1,70	3,81	4,50
869	26,7	35,7	1,05	1,63	3,93	4,57
886	31,3	37,4	1,29	1,61	4,12	4,30
911	26,9	36,5	1,19	1,69	4,42	4,63
954	29,3	39,3	1,30	1,82	4,44	4,63
960	27,1	38,4	1,37	1,74	5,09	4,81
965	28,4	40,1	1,11	1,73	3,91	4,31
Média	28,7	37,5	1,20	1,69	4,21	4,53
t (% proteína germe normal vs % proteína germe opaco-2)	= 13,25** ^{1/}					
t (% lisina germe normal vs % lisina germe opaco-2)	= 14,01**					
t (Relação L/P germe normal vs relação L/P germe opaco-2)	= 3,09*					

1/ *, ** = significativos, ao nível de 5 e 1%, respectivamente.

tra (Quadro 5) foi significativamente superior nos germes opaco-2, o que é consistente com os resultados de NACIF *et alii* (5). Entretanto, NACIF *et alii* (5) encontraram menor relação L/P no germe, o que está em desacordo com os resultados apresentados no Quadro 5. Por outro lado, segundo Mertz *et alii*, citados por NELSON (6), o gene o_2 não influencia a composição de aminoácidos das proteínas do germe. As discrepâncias entre os resultados relatados neste trabalho sobre a relação L/P e os de outros autores (5, 6) podem ser explicadas como sendo causadas por diferenças nos genótipos utilizados. Convém salientar, ainda, que pequenas variações nas porcentagens de proteína e/ou de lisina na amostra resultam em grandes variações nos valores calculados para a relação L/P. Os resultados relatados aqui não são conclusivos, mas indicam que o gene o_2 tende a produzir aumento na relação L/P no germe. O aumento médio observado neste estudo, embora significativo, é pequeno. É possível que, em alguns genótipos, nenhum aumento significativo ou mesmo um decréscimo na relação L/P no germe possa ocorrer.

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que o gene o_2 esteja agindo de modo diferente nas metades superior e inferior do endosperma, favorecendo a mobilização de proteínas de reserva — principalmente da metade inferior, — para o germe.

4. RESUMO

Extraíram-se endospermas de 60 sementes de cada uma de dez linhagens normais e respectivas versões opaco-2, bem como os germes de nove daqueles pares de linhagens. O objetivo foi comparar os teores de proteína e de lisina da metade superior com os da metade inferior do endosperma, bem como os teores de proteína e de lisina de germes normais e opaco-2. Os resultados obtidos permitem concluir que o gene o_2 reduz a porcentagem de proteína no endosperma e aumenta a porcentagem de proteína no germe. O efeito de o_2 , de reduzir o teor de proteína no endosperma, é mais drástico na metade inferior daquele tecido, na qual a porcentagem de proteína é significativamente menor que na metade superior. Esse efeito, portanto, não é limitado a endospermas opaco-2 modificados. O alelo *normal*, entretanto, não provoca redução na porcentagem de proteína na metade inferior do endosperma. Na metade inferior de endospermas opaco-2, o teor de lisina na amostra é menor e a relação L/P é maior que na metade superior. Germes opaco-2 apresentam maior porcentagem de lisina na amostra que germes normais, e a relação L/P em germes opaco-2 tende a ser ligeiramente superior.

É possível que o gene o_2 atue de modo diferente nas metades superior e inferior do endosperma, favorecendo a mobilização de proteínas de reserva, principalmente da metade inferior para o germe.

5. SUMMARY

The protein and lysine content of the upper and lower halves of the endosperm were determined for 10 inbred lines of normal endosperm and their respective opaco-2 versions. Protein and lysine content of the germ were also determined for nine of those inbred pairs. It is concluded that the o_2 gene causes a reduction in protein content in the endosperm and an increase in protein content in the germ. This effect of the o_2 gene in the endosperm is more severe in the lower half of that tissue, which has significantly less protein percent than the upper half. The *normal* allele does not cause such an effect. Lysine percent of sample was reduced

and lysine percent of protein was increased in the lower half of opaque-2 endosperm. Opaque-2 germs have a higher lysine percent of sample than normal germs, and the L/P ratio of opaque-2 germs also tends to be slightly higher.

It is possible that the o_2 gene acts differentially in the upper and lower halves of the endosperm, favoring the mobilization of reserve proteins, mainly from the lower half, to the germ.

6. LITERATURA CITADA

1. BARBOSA, H.M. & GLOVER, D.V. Genes and gene interactions affecting protein and lysine content in the endosperm of maize. *Rev. Brasil. Genet.* 1:29-39. 1978.
2. BREMER, J.M. Total nitrogen. In BLACK, C.A. ed. *Methods of soil analysis* Madison, American Society of Agronomy, 1965. Part 2, p. 1149-1178.
3. ESTEVÃO, M.M., SANT'ANNA, R., OLIVEIRA, L.M. & ALMEIDA F.^o, J. Estabelecimento de um método colorimétrico rápido para avaliação de lisina em milho. *Experientiae* 8:195-213. 1976.
4. MERTZ, E.T., BATES, L.S. & NELSON, O.E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145: 279-280. 1964.
5. NACIF, A.P., BARBOSA, H.M., ANDERSON, J.C. & SARAIVA, L.S. Efeito da introdução do gene opaco-2 sobre características físicas e químicas de milhos tropicais. *Experientiae* 17:45-61. 1974.
6. NELSON, O.E. The modification by mutation of protein quality in maize. In: *New approaches to breeding for improved plant protein*, Proc. IAEA-FAO Panel, Rôstanga; Sweeden, 1968, p. 41-54. International Atomic Energy Agency, Vienna, 1969.
7. NELSON, O.E., MERTZ, E.T. & BATES, L.S. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. *Science* 150:1469-1470. 1965.
8. PINTO, R.F.S. & BARBOSA, H.M. Seleção visual para endospermas de milho (*Zea mays* L.) opaco-2 de diferentes fenótipos. *Rev. Ceres* 23:281-287. 1976.
9. SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. & MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30:1190-1206. 1958.
10. WICHSER, W.R. Comparison of the dry milling properties of opaque-2 and normal dent corn. In: *Proc. High Lysine Corn Conf.*, Washington, U.S.A., Corn Refiners Association, Inc., 1966, p. 104-116.