

EFEITO DIFERENCIAL DO GENE OPACO-2 SOBRE OS NÍVEIS DE AMINOÁCIDOS PROTÉICOS E LIVRES NAS DIFERENTES PARTES DO GRÁO DE MILHO DURANTE O SEU DESENVOLVIMENTO^{1/}

Joston Simão de Assis ^{2/}
Renato Sant'Anna ^{3/}
Márcio de Moura Estevão ^{3/}
Claudio José dos Reis Carvalho ^{4/}

1. INTRODUÇÃO

MERTZ *et alii* (7) descobriram que o gene opaco-2 altera a composição aminoacídica do endosperma do milho (*Zea mays L.*), aumentando os teores de lisina e triptofano, através da redução do teor de zeínas, proteínas pobres nos referidos aminoácidos. A repressão da síntese de zeínas foi apontada por DALBY (3). MOSSÉ *et alii* (9), MURPHY e DALBY (10) e SODEK e WILSON (12) como o principal efeito do gene opaco-2, acarretando um aumento relativo das outras classes de proteínas.

Segundo LEE *et alii* (6), a zeína contém seis subunidades, predominando as frações zeína 1 e zeína 2. Essas duas subunidades têm, à exceção da metionina, composições aminoacídicas semelhantes: ambas são ricas em ácido glutâmico, prolina e leucina e pobres em lisina. Conforme MOSSÉ *et alii* (9) e SODEK e WIL-

^{1/} Parte da tese apresentada, pelo primeiro autor, à Universidade Federal de Viçosa como um dos requisitos para a obtenção do grau de «Magister Scientiae» em Fisiologia Vegetal.

Aceito para publicação em 24-7-87.

^{2/} Faculdade de Agronomia do Médio São Francisco. 48900 Juazeiro, Bahia, Brasil.

^{3/} Universidade Federal de Viçosa. 36570 Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

^{4/} EMBRAPA. 66000 Belém, Pará, Brasil.

SON (13), o gene opaco-2 causa uma drástica redução na síntese da zeína 1, afetando muito menos a zeína 2. Similarmente, CARVALHO (2) verificou uma expressiva repressão da síntese das frações zeína 1 e zeína 2, especialmente da primeira, nos endospermas opacos, com maior intensidade na sua porção inferior.

MOSSÉ *et alii* (9) e SODEK e WILSON (13) também evidenciaram um efeito secundário do gene opaco-2, qual seja, substancial elevação do teor de aminoácidos livres no endosperma do milho.

O objetivo do presente trabalho foi estudar, comparativamente, o teor e a composição aminoacídica da fração protéica e da fração nitrogenada solúvel na metade inferior e superior do endosperma e no germe, durante o desenvolvimento dos grãos de uma linhagem de milho normal e de sua versão opaca.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se no experimento as versões normal (+/+) e opaco-2 (o2/o2) da linhagem de milho n. 869 (dentada), cultivadas em 1979 por CARVALHO (2), que coletou as espigas aos 21, 28, 35, 42, 49 e 60 dias após a polinização, armazenando-as em congelador, a -20°C.

Das espigas mais uniformes de cada versão foram destacados, da região mediana, 100 (espigas de 21 dias) e 60 grãos (demais épocas). A remoção do pericarpo e do germe e a divisão do endosperma foram efetuadas nos grãos ainda congelados. O endosperma inferior continha a região próxima do pedicelos.

As amostras assim formadas sofreram Trituração em almofariz gelado (amostras de 21 a 35 dias) ou em moinho de facas, refrigerado a -5°C (amostras de 42 a 60 dias), sendo, a seguir, transferidas para placas de Petri e secas por liofilização. Procedeu-se, então, ao seu desengorduramento através de três extrações sucessivas com hexano, a 4°C (duas de duas horas e uma à noite), com agitação contínua, usando-se 10 volumes do extrator por um volume da amostra. Após a remoção dos extractos por aspiração, o hexano residual foi eliminado por jato de ar, à temperatura ambiente, e o material foi armazenado em dessecador a vácuo, até sua posterior utilização.

Para a determinação da composição aminoacídica total das diferentes partes do grão, amostras de 30 a 50 mg do material liofilizado foram hidrolisadas com 5,0 ml de HCl 6N, sob atmosfera de N₂, em ampolas de vidro seladas, a 110°C, durante 24 horas. Após evaporação a vácuo dos hidrolisados, a 45°C, dissolveram-se os resíduos em 2,0 ml de tampão de citrato de sódio 0,2N, pH = 2,2, o qual continha norleucina como padrão interno. Na análise quantitativa dos aminoácidos, aplicou-se a técnica da cromatografia de troca iônica, segundo SPACKMAN *et alii* (15), num Analisador de Aminoácidos BECKMAN, modelo 121.

A fração aminoácidos livres foi extraída de 100 mg das amostras liofilizadas, as quais sofreram agitação com 1,0 ml de NaCl 0,5N, a 4°C, durante 30 minutos, conforme o método de LANDRY e MOUREAUX (5). Seguiram-se a centrifugação da suspensão obtida a 2.000 x g, sob refrigeração, durante 15 minutos, e a remoção quantitativa do sobrenadante, cujo volume foi completado até 50 ml. As albuminas e as globulinas foram, então, removidas de alíquotas de 25 ml dos extractos, por precipitação em meio de TCA, a 5%. Após repouso de 12 horas, a 4°C, procedeu-se a uma centrifugação, a 11.000 x g, durante cinco minutos, sob refrigeração. Seguiram-se duas lavagens dos precipitados protéicos com 2,0 ml de TCA, a 5%, evaporação a vácuo dos sobrenadantes combinados e dissolução dos resíduos em 6,0 ml de água destilada.

Os extractos desproteinizados foram divididos em duas alíquotas iguais de 3,0

ml, submetendo-se uma delas à hidrólise, em meio de HCl 1N, em estufa, a 110°C, durante três horas, conforme recomendação de SODEK e WILSON (12), para converter a glutamina e a asparagina em ácido glutâmico e ácido aspártico, respectivamente. As duas alíquotas dos extratos (hidrolisada e não-hidrolisada) foram, então, processadas e analisadas como anteriormente descrito para os hidrolisados protéicos.

Os teores dos aminoácidos protéicos foram obtidos por diferença entre os teores dos aminoácidos totais e dos aminoácidos livres. Na avaliação da quantidade de proteínas de cada amostra, expressa com base no N protéico, somaram-se os conteúdos de nitrogênio dos resíduos dos aminoácidos protéicos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *Conteúdo protéico e composição aminoacídica das proteínas das partes do grão de milho*

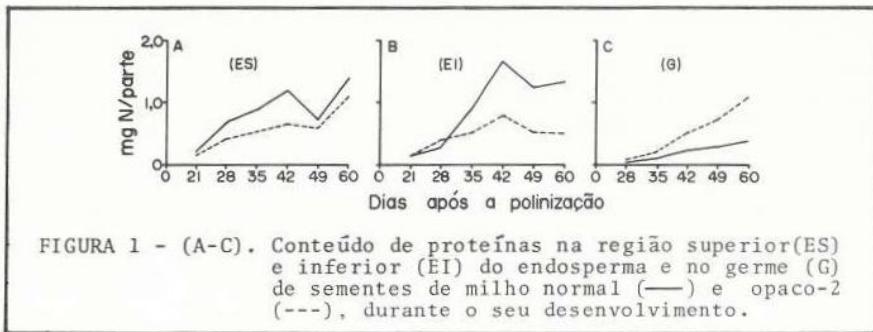
As partes inferior e superior do endosperma normal, de modo geral, sempre contiveram maiores quantidades de proteínas durante o desenvolvimento do grão, em relação ao endosperma opaco-2, ao passo que tendência inversa foi observada para os germes (Figura 1). CARVALHO (2), trabalhando com o mesmo material vegetal, mostrou que a maior causa das diferenças encontradas nas duas partes do endosperma foi a repressão da síntese das zefinas, notadamente da zefna 1, nos endospermas opacos. Já a superioridade protéica dos germes opacos sobre os normais resultou, em grande parte, de um maior acúmulo de albuminas e globulinas, como evidenciado pelo mesmo autor.

Entre os 42 e os 49 dias após a antese, ocorreu um decréscimo da quantidade de proteínas nas duas partes dos endospermas, especialmente dos normais. Daí em diante, até o final da maturação, somente os endospermas superiores continuaram a acumular proteínas. INGLE *et alii* (4), trabalhando com endospermas normais inteiros, mostraram, nessa fase, uma estabilização, seguida de incremento da síntese protéica. A Figura 1 indica, ainda, que a síntese de proteínas parece terminar mais cedo na região inferior do endosperma.

Na Figura 2, verifica-se que, praticamente em todas as fases do desenvolvimento do grão, as quantidades de lisina foram sempre maiores nos endospermas opacos, o mesmo ocorrendo com o ácido glutâmico, prolina e leucina nos endospermas normais. Essa tendência diferencial está de acordo com as observações, de NELSON *et alii* (11), BATES (1) e SODEK (14), de serem as zefinas mais abundantes nos endospermas normais, pobres em lisina e mais ricas em ácido glutâmico, prolina e leucina que as demais frações protéicas. As maiores diferenças ocorreram na região inferior do endosperma, compatíveis com a maior redução da síntese de zefinas nessa região, verificada por CARVALHO (2).

A identidade de formato das curvas de variação dos três aminoácidos abundantes nas zefinas e das proteínas (Figura 1) sugere que a queda do conteúdo protéico ocorrida entre os 42 e os 49 dias após a polinização resultou, em boa parte, de uma degradação das zefinas, embora CARVALHO (2) só tenha verificado queda significativa da quantidade de zefinas na região inferior do endosperma normal, no mesmo período.

Quanto à composição percentual dos aminoácidos nas proteínas do endosperma, a contribuição da lisina foi sempre maior nas duas regiões do endosperma opaco do que nas suas correspondentes normais, ocorrendo um diferencial mais elevado na região inferior (Figura 3). Os altos valores observados aos 21 dias após



a antese são compatíveis com a verificação de CARVALHO (2) de que, nessa época, as zeínas praticamente inexistem no endosperma, predominando as albuminas, proteínas ricas nesse aminoácido.

O ácido glutâmico apresentou comportamento atípico, somente predominando nas duas regiões do endosperma normal após os 42 dias da polinização. Considerando que os dados da literatura, consubstanciados nos trabalhos de MERTZ *et alii* (7), NELSON *et alii* (11), MISRA *et alii* (8) e SODEK (14), referem-se ao endosperma maduro, pode-se admitir que, durante os estádios iniciais de desenvolvimento do grão, determinada fração protéica possa ter variado não apenas em quantidade, mas também em composição aminoácídica.

Embora a prolina tenha, de modo geral, apresentado a tendência esperada, foi a leucina que, em termos de contribuição percentual, ao apresentar ampla supremacia nas duas regiões do endosperma normal, melhor indicou a síntese diferencial das zeínas nos dois tipos de milho.

3.2. Conteúdo e composição da fração aminoácidos livres

As diferentes partes dos grãos opaco-2 sempre contiveram maiores quantidades de aminoácidos livres, em relação aos grãos normais (Figura 4). Nas duas regiões do endosperma opaco, aos 60 dias após a antese, as quantidades encontradas superaram mais de 20 vezes as dos seus correspondentes normais, confirmando o efeito secundário do gene opaco-2, relatado por MOSSÉ *et alii* (9) e SODEK e WILSON (12). Esse acúmulo, provavelmente, resultou de uma menor demanda de aminoácidos livres, em decorrência da redução da síntese protéica, especialmente das zeínas (Figura 1).

Os germes opacos, na maturação do grão, acumularam sete vezes e meia mais aminoácidos livres do que os normais. Esse acúmulo pode ter-se originado, pelo menos em parte, da migração de aminoácidos livres da região inferior do endosperma, cuja fração aminoácídica declinou sensivelmente nos últimos estádios de desenvolvimento do grão (Figura 4).

As tendências opostas de variação das curvas dos aminoácidos livres e das proteínas (Figura 1 e 4), nas duas partes dos endospermas normais, sugerem uma substancial utilização dos aminoácidos na síntese de proteínas de reserva, quase esgotando o «pool» desses compostos ao avizinhar-se a maturação, indicando um possível corte no suprimento de aminoácidos através do pedicelo. Por outro lado, o paralelismo das mesmas curvas nas duas partes dos endospermas opacos evidenciou uma correlação positiva entre os dois parâmetros e grande excesso de aminoácidos livres, relativamente à sua demanda para uma síntese protéica mais reduzida.

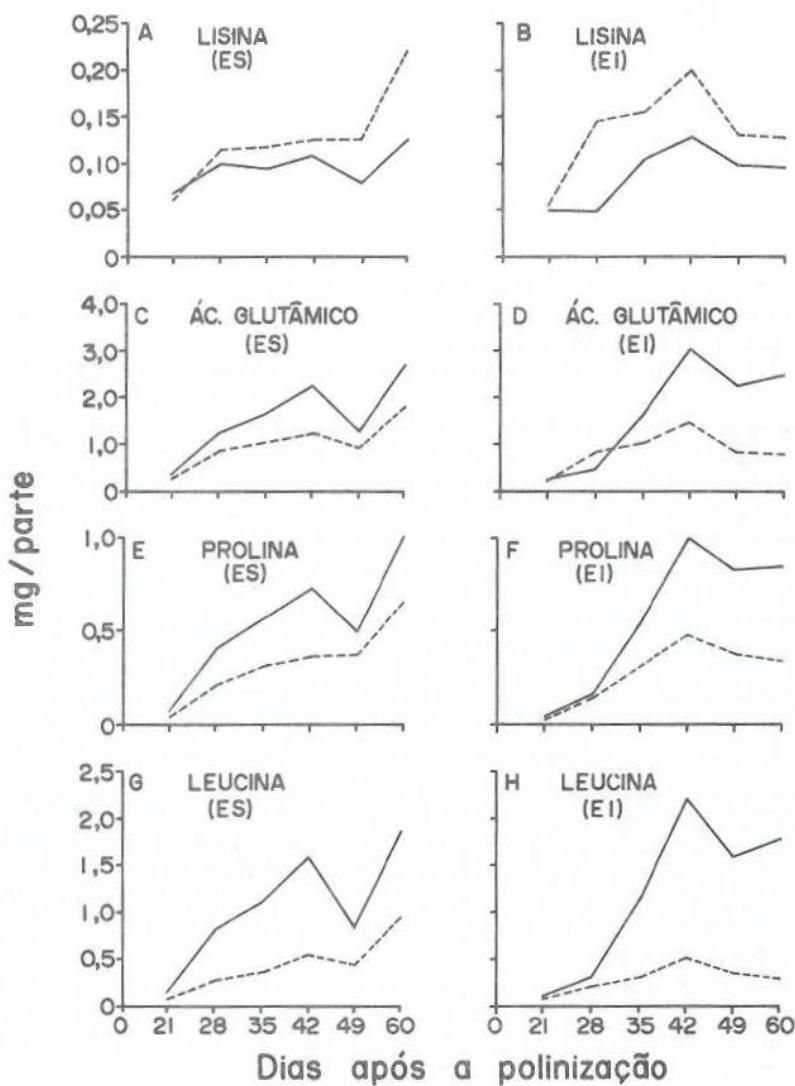


FIGURA 2 - (A-H). Quantidade de lisina, ácido glutâmico, prolína e leucina na proteína da região superior (ES) e inferior (EI) do endosperma de sementes de milho normal (—) e opaco-2 (---), durante o seu desenvolvimento.

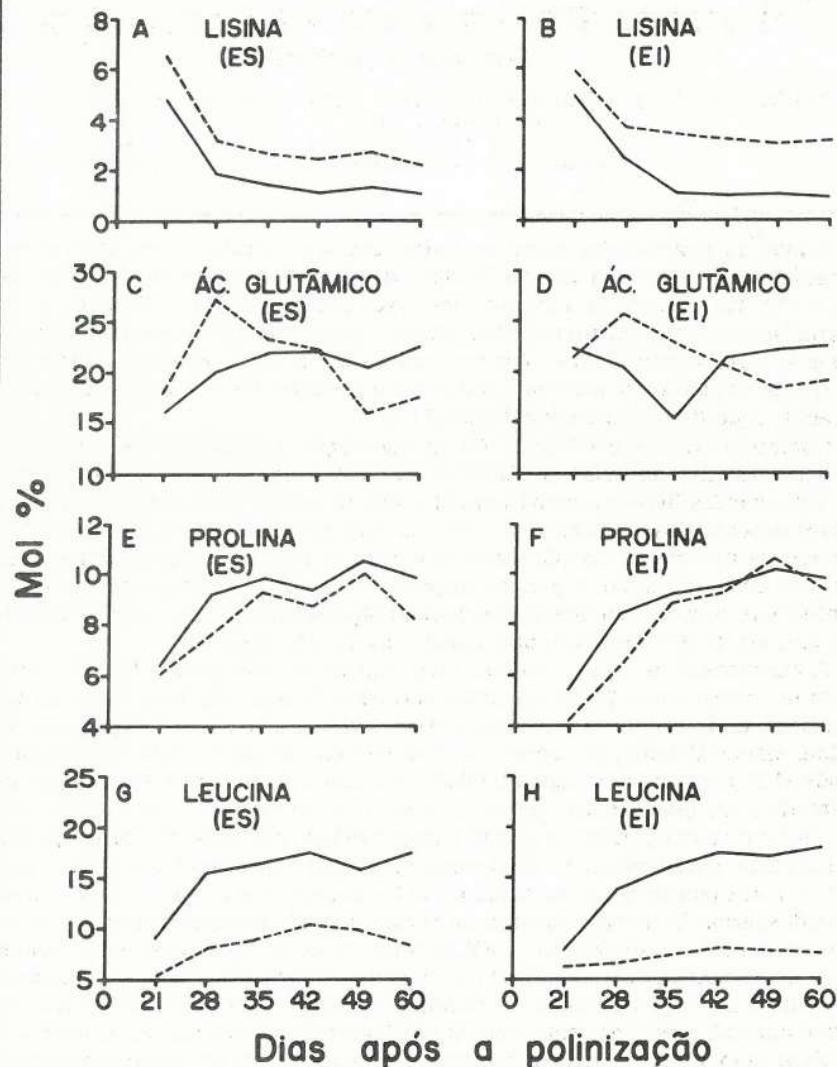


FIGURA 3 - (A-H). Composição aminoacídica das proteínas da região superior (ES) e inferior (EI) do endosperma de sementes de milho normal (—) e opa-2 (---), durante o seu desenvolvimento.

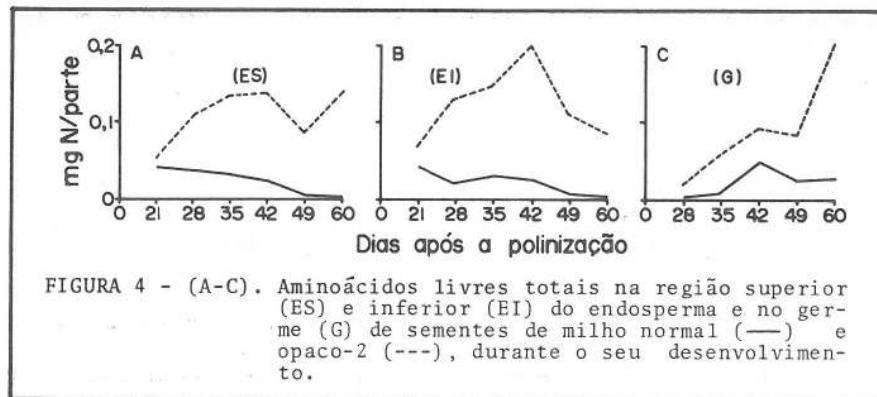


FIGURA 4 - (A-C). Aminoácidos livres totais na região superior (ES) e inferior (EI) do endosperma e no germe (G) de sementes de milho normal (—) e opaco-2 (---), durante o seu desenvolvimento.

Tanto as quantidades como os teores dos aminoácidos livres individuais variaram muito durante o desenvolvimento das diferentes partes do grão (Figuras 5, 6, 7 e 8). Tal variação já tinha sido observada por LANDRY e MOUREAUX (5), ao analisarem o grão inteiro do milho normal. De modo geral, as tendências observadas de alguns aminoácidos coincidem com as encontradas por esses autores, como queda dos teores de alanina e glutamina e elevação dos níveis de lisina, prolina, ácido aspártico e asparagina (Figura 7 e 8).

Conforme SODEK e WILSON (12), na maturação, a soma dos teores de ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico e glutamina constitui cerca de 65% da fração aminoácidos livres no milho normal e 70% no opaco. No presente estudo, os valores encontrados foram de 57% e 76% no endosperma superior e de 50% e 72% no endosperma inferior do milho normal e opaco-2, respectivamente. Nos germes dos dois tipos de milho, a prolina, seguida de asparagina, predominou amplamente sobre os demais aminoácidos no final do desenvolvimento do grão, constituindo mais de 50% da fração aminoácidos livres (Figuras 7 e 8).

A quantidade de lisina livre nas duas regiões do endosperma foi, em geral, maior na versão opaco-2. Como o milho normal sintetizou, nas duas partes do endosperma, mais proteínas que o opaco (Figura 1) e como o diferencial protéico resultou, essencialmente, da repressão da síntese das zeínas no mutante, segundo CARVALHO (2), a maior disponibilidade de lisina livre no endosperma pode ser atribuída a um maior influxo do aminoácido na semente e, ou, a uma maior taxa de síntese no endosperma. No germe, a superioridade em lisina da versão opaco-2 foi flagrante, notadamente no grão maduro, no qual a relação obtida foi de quase 20:1. A contribuição molar da lisina à fração aminoácidos livres das duas partes do endosperma foi sempre superior na versão normal. Tal fato, embora em desacordo com os dados de SODEK e WILSON (12), pode ser racionalizado em termos de menor demanda do aminoácido para a síntese das proteínas dos endospermas normais, mais ricas em zeínas e, consequentemente, mais pobres em lisina. No germe opaco-2, o teor de lisina cresceu continuamente com o tempo, ao contrário do observado no germe normal, chegando a atingir mais de 10% da fração aminoácidos livres, numa base molar, na maturação do grão.

Verificou-se maior acúmulo de prolina livre nos endospermas opacos, principalmente na sua região inferior, durante o desenvolvimento do grão (Figura 6 D-E). Isso pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo menor grau de utilização do aminoácido, em face da repressão da síntese de zeínas, nas duas regiões do endosperma, a qual, conforme CARVALHO (2), é mais intensa na parte inferior, uma vez que, segundo SODEK (14), as zeínas são mais ricas em prolina do que as albumi-

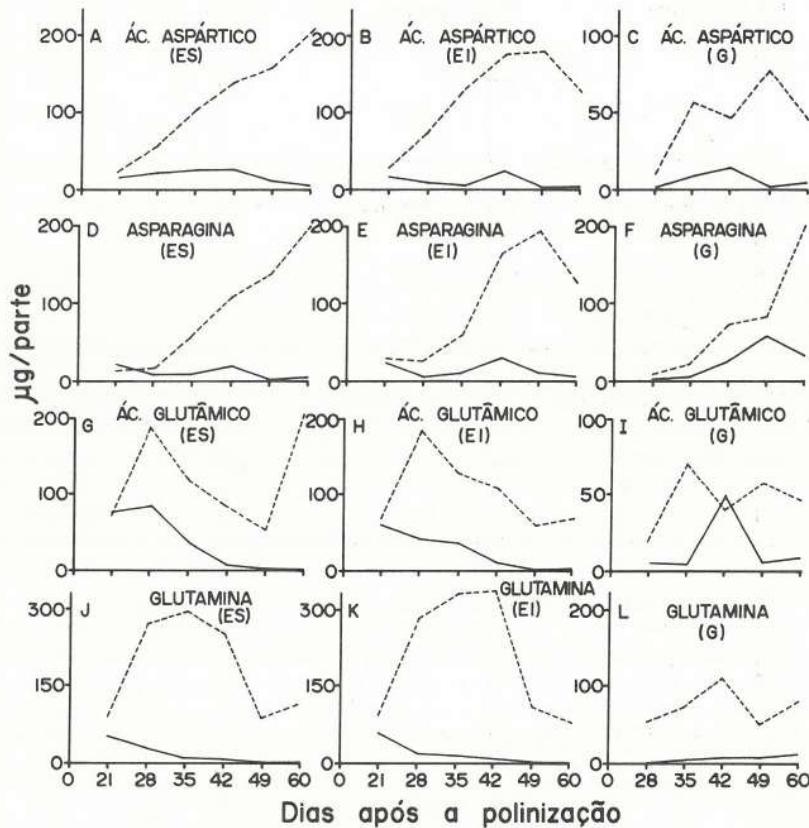


FIGURA 5 - (A-L). Quantidade de ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico e glutamina livre na região superior (ES) e inferior (EI) do endosperma e no germe (G) de sementes de milho normal (—) e opaco-2 (---), durante o seu desenvolvimento.

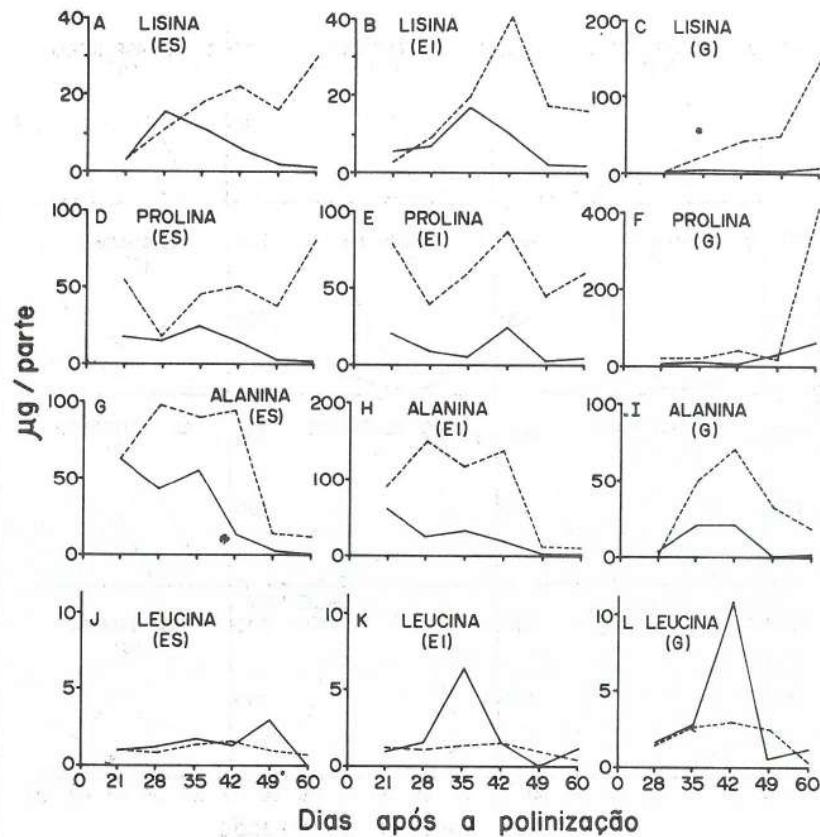


FIGURA 6 - (A-L). Quantidade de lisina, prolina, alanina e leucina livre na região superior (ES) e inferior (EI) do endosperma e no germe (G) de sementes de milho normal (—) e opaco-2 (---), durante o seu desenvolvimento.

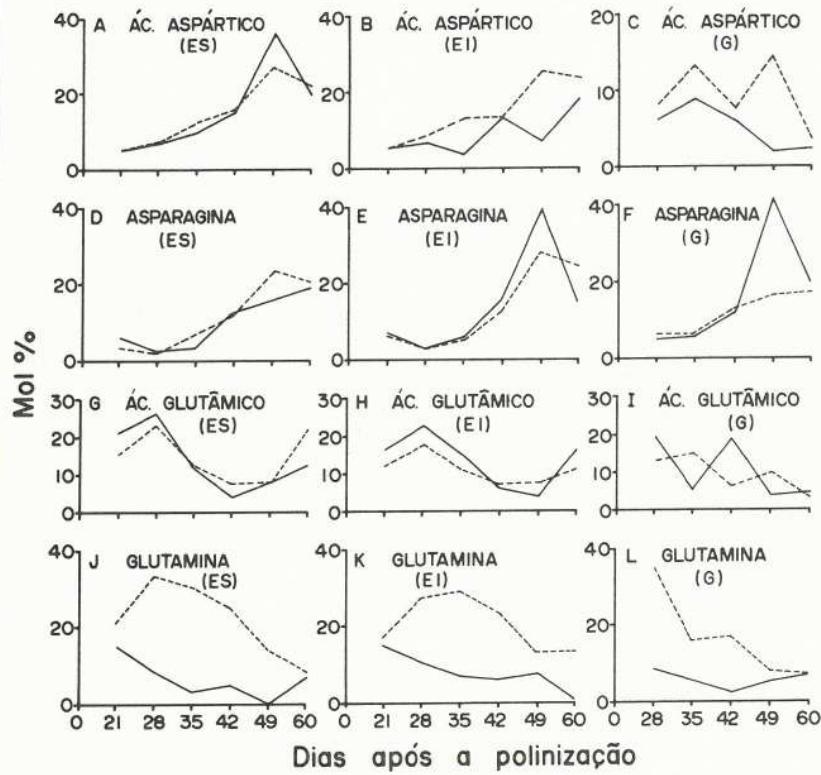


FIGURA 7 - (A-L). Composição da fração aminoácidos livres na região superior (ES) e inferior (EI) do endosperma e no germe (G) de sementes de milho normal (—) e opaco-2 (---), durante o seu desenvolvimento.

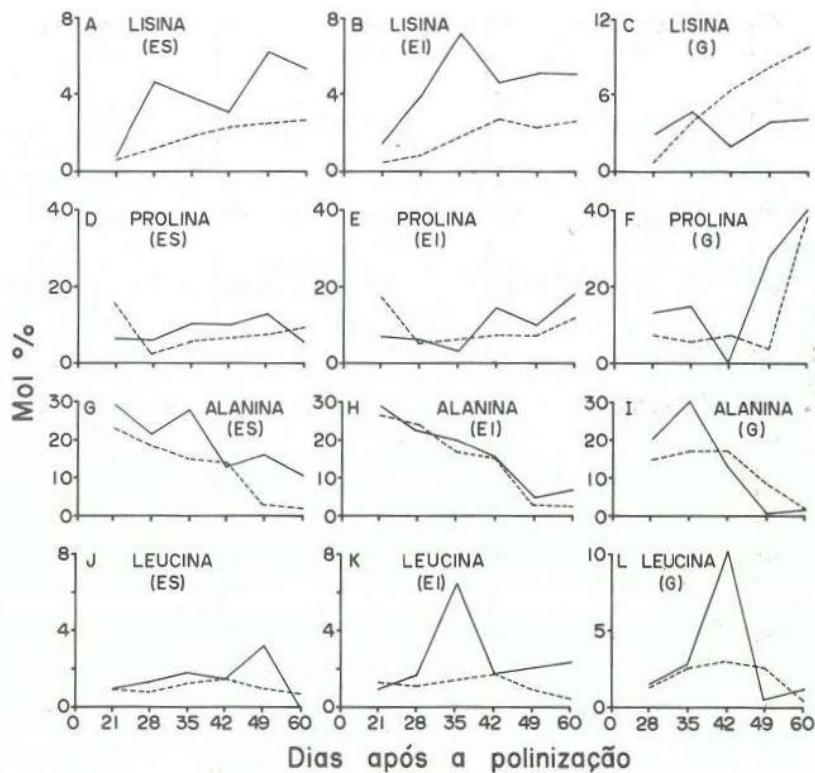


FIGURA 8 - (A-L). Composição da fração aminoácidos livres na região superior (ES) e inferior (EI) do endosperma e no germe (G) de sementes de milho normal (—) e opaco-2 (---), durante o seu desenvolvimento.

nas, globulinas e glutelinas. O germe opaco mostrou intensa acumulação de prolina livre dos 49 aos 60 dias após a polinização, coincidentemente com grande acúmulo de aminoácidos livres (Figura 4) e, de acordo com CARVALHO (2), de síntese de globulinas, proteínas pobres no aminoácido. É provável que, nessa etapa final do desenvolvimento do grão, tenha ocorrido substancial fluxo de aminoácidos livres do endosperma inferior opaco para o germe e acúmulo de prolina livre, em face de sua baixa utilização metabólica. A contribuição da prolina para a fração aminoácidos livres tendeu a ser maior nas três partes do milho normal, possivelmente como reflexo da variação dos demais aminoácidos (Figura 8 D-F).

A quantidade de ácido glutâmico e de glutamina (Figura 5 G-L), notadamente de amida, revelou-se nitidamente superior nas três partes do milho opaco-2. Em termos de contribuição percentual, a superioridade do opaco-2 ocorreu apenas no caso da glutamina (Figura 7 J-L). Tal tendência poderia ser explicada como uma consequência da repressão da síntese de zeínas no endosperma opaco, as quais são particularmente ricas em ácido glutâmico (amida incluída).

As diminutas quantidades de leucina na fração aminoácidos livres (Figura 6 J-L) comprovam a observação, de SODEK (14), da pequena contribuição de aminoácidos, cuja biossíntese requer rotas metabólicas longas.

4. RESUMO

Realizou-se um trabalho para determinar os efeitos qualitativos e quantitativos do gene opaco-2 sobre os aminoácidos protéicos e livres na metade superior e inferior do endosperma e nos germes, durante o desenvolvimento do grão de milho, utilizando-se as versões normal e opaco-2 da linhagem n. 869.

O menor acúmulo de proteína nas duas regiões do endosperma opaco, notadamente na inferior, pode ser atribuído à repressão da síntese das zeínas. O maior conteúdo protéico, contudo, ocorreu nos germes opacos.

As quantidades e os teores de lisina nas proteínas do endosperma foram, em geral, maiores na versão opaca, e os de ácido glutâmico, prolina e leucina na versão normal, em consonância com os teores desses aminoácidos nas zeínas. A leucina constituiu-se no melhor indicador da síntese diferencial das zeínas nos dois tipos de milho.

Nas três partes do grão ocorreu ampla superioridade dos aminoácidos livres no milho opaco. As tendências opostas das curvas de variação dos aminoácidos livres e das proteínas, nas duas partes do endosperma normal, sugerem uma intensa utilização dos primeiros na síntese protéica; o seu paralelismo na versão opaca evidenciou uma certa independência entre o acúmulo de aminoácidos e a sua utilização metabólica.

Tanto as quantidades como os teores dos aminoácidos livres individuais variaram acentuadamente durante o desenvolvimento dos endospermas. Nos endospermas maduros, o ácido aspártico, o ácido glutâmico e suas amidas predominaram; nos germes, a prolina, seguida da asparagina.

As maiores quantidades de lisina livre ocorreram nas duas partes dos endospermas opacos; os maiores teores, contudo, pertenceram à versão normal, possível reflexo de uma menor demanda para a síntese das proteínas do endosperma, ricas em zeínas. O maior acúmulo de prolina, ácido glutâmico e glutamina nos endospermas opacos pode ter resultado da repressão da síntese das zeínas, proteínas ricas nesses aminoácidos.

5. SUMMARY

(DIFFERENTIAL EFFECT OF OPAQUE-2 GENE ON FREE AND PROTEIN AMINOACID LEVELS IN DIFFERENT PARTS OF CORN GRAIN (*Zea mays* L.) DURING ITS DEVELOPMENT)

The effects of opaque-2 gene on the levels of free and protein amino acids in the upper and lower halves of endosperm and in the germ, during grain development, were studied by using the normal and opaque-2 versions of corn line 869.

The lower protein accumulation in the two regions of opaque-2 endosperms, especially in the lower one, can be attributed mostly to the repression of zeins synthesis. Opaque-2 germs were, however, richer in proteins than the normal ones.

In general, the higher levels of lysine in the endosperm proteins were found in the opaque version and those of glutamic acid, proline and leucine, in the normal one; this was consistent with zeins poorness in lysine and richness in the other amino acids. Leucine best showed the differential synthesis of zeins in the two types of endosperms.

The amounts of free amino acids were much higher in the three parts of opaque-2 grain. The pool size of free amino acids and the protein amounts in both regions of normal endosperms were inversely related, but in the opaque-2 version both showed the same behavior of variation. The levels of individual free amino acids changed markedly during grain development. In the mature grain, aspartic acid, glutamic acid and their amides predominated in both kinds of endosperms, and proline, followed by asparagine, in the germs.

Higher free lysine amounts were found in the opaque endosperms; the higher lysine content, however, appeared in the normal ones, a possible effect of a lower demand of the amino acid for the synthesis of endosperm proteins, richer in zeins. The greater accumulation of proline, glutamic acid and glutamine in the opaque endosperms could be due to the reduced synthesis of zeins, which are rich in these amino acids.

6. LITERATURA CITADA

1. BATES, L.S. Amino Acid Analysis. In: MERTZ, E.T. & NELSON, O.E. (ed.). *Proceedings of the High-Lysine Corn Conference*. Washington, Corn Refiners Association Inc., 1966. p. 61-66.
2. CARVALHO, C.J.R. *Efeito diferencial do gene opaco-2 sobre a síntese de proteínas, nas metades superior e inferior do endosperma e no germe, durante o desenvolvimento e maturação do grão de milho (Zea mays L.)*. Viçosa, Universidade Federal, 1980. 32 p. (Tese de M.S.).
3. DALBY, A. Protein synthesis in maize endosperm. In: MERTZ, E.T. & NELSON, O.E. (ed.). *Proceedings of the High-Lysine Corn Conference*. Washington, Corn Refiners Association Inc., 1966. p. 104-116.
4. INGLE, J.; BEITZ, D. & HAGEMAN, R.H. Changes in composition during development and maturation of maize seeds. *Plant Physiol.*, 40:835-839. 1965.
5. LANDRY, J. & MOUREAUX, T. Hétérogénéité des glutelins du grain de maïs: extraction sélective et composition en acides aminés des trois fractions isolées. *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 52:1021-1037. 1970.

6. LEE, K.H.; JONES, R.A.; DALBY, A. & TSAI, C.Y. Genetic regulation of storage protein content in maize endosperm. *Biochem. Genetics*, 14:641-650. 1976.
7. 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.
8. MISRA, P.S.; JAMBUNATHAN, R.; MERTZ, E.T.; GLOVER, D.V.; BARBO-SA, H.M. & McWHIRTE, K.S. Endosperm protein synthesis in maize mutants with increased lysine content. *Science*, 126:1425-1426. 1972.
9. MOSSÉ, J.; BAUDET, J.; LANDRY, J. & MOUREAUX, T. Étude sur les protéines du maïs. II. Comparison entre les compositions en acides aminés et les proportions mutuelles des fractions protéiques des grains normaux et mutants. *Ann. Physiol. Vég.* 8:331-344. 1966.
10. MURPHY, J.J. & DALBY, A. Changes in the protein fractions of developing normal and opaque-2 maize endosperm. *Amer. Assoc. Cereal Chem.*, 48:336-349. 1971.
11. 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.
12. SODEK, L. & WILSON, C.M. Amino acid composition of proteins isolated from normal, opaque-2 and floury-2 corn endosperms by a modified Osborne procedure. *J. Agr. Food Chem.*, 19:1144-1150. 1971.
13. SODEK, L. & WILSON, C.M. Metabolism of ¹⁴C-amino acids in developing endosperm of corn. *Plant & Cell Physiol.*, 12:899-893. 1971.
14. SODEK, L. *Corn Proteins*. Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 1973. 78 p. (Bol. Didático).
15. SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. & STANFORD, M. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, 30:1190-1206. 1958.