Bertha Dévora Agurto Berdejo
Engenheira Agrônoma

**Caracterização das proteínas de reserva em linhagem QPM e estudo bioquímico da enzima
homoserina quinase (HK) em sementes de milho (*Zea mays* L.)**

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES AZEVEDO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Berdejo, Bertha Dévora Agurto

Caracterização das proteínas de reserva em linhagem QPM e estudo bioquímico da enzima homoserina quinase (HK) em sementes de milho (*Zea mays* L.) / Bertha Dévora Agurto Berdejo. - - Piracicaba, 2010.
124 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Aminoácidos 2. Enzimas 3. Linhagens vegetais 4. Milho 5. Proteínas de plantas
6. Sementes I. Título

CDD 633.15
B486c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais Ludwig Eisntein Agurto Plata e Gladys Edith Berdejo de Agurto

pelo apoio incondicional, conselhos e esperanças...

sem eles nada seria possível.

Aos meus irmãos Ludwig Miguel Agurto Berdejo e Betty Iara Agurto Berdejo

pela presença em todos os momentos.

A minha cunhada Lucia Xutchitl Orcasberro Tarallo de Agurto

pela sua alegria de viver,

sempre “voltando” a fazer parte desta família.

Ao meu filho Gabriel Einstein Agurto de Castro

pela felicidade de ser mãe.

DEDICO

A toda minha família

que sempre me incentivou,

me encorajou,

me dando forças para poder prosseguir.

A VOCÊS

*“Te amo sin saber cómo, ni cuándo, ni de dónde,
te amo directamente sin problemas ni orgullo:
así te amo porque no sé amar de otra manera”
Pablo Neruda*

Ao meu amado marido Ricardo Nery de Castro
por todo o amor...
toda a compreensão...
por sempre estar disposto a me ouvir...
... por ter dado sentido a minha vida.
Esta conquista é tua também!!!

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus por fazer, no fim, tudo dar sempre certo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelos meses de concessão de bolsa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida (05/50735-0) e auxílio concedido ao laboratório (2004/16039-4).

À EMBRAPA Milho e Sorgo, pelo material vegetal gentilmente cedido.

À ESALQ, “Gloriosa”, por todos esses anos e ao Departamento de Genética pela oportunidade e liberdade para usufruir de toda sua infraestrutura.

Ao CCIn, obrigada por cuidar tão bem do meu nenê.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, por ter acreditado no meu trabalho, pela orientação e pelos aprendizados ao longo destes anos.

Aos professores e funcionários do Departamento.

A Salete, por ser parte constante da minha vida. Mais que uma co-orientadora, uma companheira, uma AMIGA. Sempre me ensinando, me ouvindo, me direcionando e, sempre, tudo de novo. Por ser essa pessoa incansável, estar sempre disposta. Pela amizade. Muito obrigada por tudo!

A Paula, o que dizer... Obrigada magrela!! Por tudo! Conselhos, conversas, choros, alegrias, almoços, jantas, colos, TUDO!!! Muito obrigada por ter entrado na minha vida!

A Priscila, loira, obrigada pela amizade! Pelas noites mal dormidas!

As amigas Aline, Carol, Daí, Flávia, Gicka, Mariana, Milca e Xíua, as meninas do laboratório, por tornarem meus dias mais alegres, pela ajuda na realização deste trabalho, pela companhia de todos os dias.

Ao Rogério, amigo, obrigada!

Aos amigos e colegas de outros laboratórios conquistados durante estes anos, obrigada pelos bons momentos.

Aos que passaram pelo laboratório: Renato, Leo, Pepsi, Vand, Rico, Paty obrigada pelos conselhos e pelas muitas risadas.

Aos amigos que mesmo distantes, de uma forma ou outra sempre se fizeram presentes na minha vida.

Aos Romero Reynoso, por se tornarem minha família aqui no Brasil.

A minha família, no Peru, que sempre torceram por mim, para que tudo desse certo.

Em fim, a todos aqueles que deixaram sua marca em mim ao longo destes anos.

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 A Cultura de Milho.....	25
2.2 Proteínas de Reserva e Aminoácidos	26
2.3 Via Metabólica do Asparatato	28
2.3.1 Regulação da via metabólica do aspartato.....	31
2.3.2 Biossíntese de Treonina.....	33
2.3.3 Catabolismo de Lisina	34
2.4 Opaco-2.....	36
2.5 Plantas Transgênicas.....	37
2.6 Quality Protein Maize (QPM).....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Material Vegetal	41
3.2 Proteínas de Reserva	43
3.2.1 Extração das Proteínas de Reserva	43
3.2.2 Quantificação das Proteínas.....	44
3.2.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-dodecil sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	44
3.2.4 Extração dos Aminoácidos de Cada Fração Protéica	45

3.2.5 Separação e Análise da Composição de Aminoácidos de Cada Fração em HPLC	46
3.2.6 Extração dos aminoácidos solúveis.....	46
3.2.7 Dosagem dos aminoácidos totais	47
3.3 Catabolismo do Aminoácido Lisina	47
3.3.1 Preparação dos extratos celulares	47
3.3.2 Ensaio enzimático da lisina 2-oxoglutarato redutase (LKR).....	48
3.3.3 Ensaio enzimático da sacaropina desidrogenase (SDH).....	48
3.4 Homoserina Quinase (HK)	49
3.4.1 Extração enzimática.....	49
3.4.2 Precipitação com sulfato de amônio	49
3.4.3 Ensaio da HK.....	49
3.4.4 Regulação do ensaio da HK.....	50
3.4.5 Purificação parcial da HK.....	51
3.4.5.1 Cromatografia de troca iônica do tipo <i>step-wise</i>	51
3.4.5.2 Cromatografia de troca iônica do tipo gradiente linear.....	51
3.5 Eletroforese Bidimensional	52
3.5.1 Extração de proteínas totais	52
3.5.2 Primeira dimensão: Focalização Isoelétrica	52
3.5.3 Segunda dimensão: SDS-PAGE.....	53
3.5.4 Fotodocumentação e Análise dos géis.....	53
4 RESULTADOS	55
4.1 Proteínas de Reserva	55
4.1.1 Perfil SDS-PAGE das frações protéicas	57
4.2 Análise dos aminoácidos	59

4.2.1	Análise dos aminoácidos das frações protéicas	59
4.2.2	Aminoácidos solúveis na farinha de milho	62
4.3	Catabolismo de Lisina	64
4.4	Homoserina Quinase (HK)	65
4.4.1	Isolamento da enzima envolvida na biossíntese de treonina em sementes de milho	70
4.4.2	Cromatografia de troca iônica do tipo gradiente linear.....	74
4.4.3	Regulação da enzima HK.....	76
4.5	Eletroforese Bidimensional.....	78
4.5.1	Perfil bidimensional das proteínas	82
5	DISCUSSÃO	91
5.1	Proteínas e aminoácidos.....	91
5.2	Enzima HK	98
5.3	Eletroforese bidimensional	104
6	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS	108

RESUMO

Caracterização das proteínas de reserva em linhagem QPM e estudo bioquímico da enzima homoserina quinase (HK) em sementes de milho (*Zea mays* L.)

A semente de milho, base da alimentação em muitos países na África, Ásia e América Latina, possui ~10% de proteína na semente. Por ser um cereal a proteína da semente de milho apresenta uma baixa concentração de aminoácidos essenciais como: lisina e triptofano. Com a descoberta do milho opaco-2, o qual apresenta um maior teor de lisina e triptofano em suas sementes, surgiu a oportunidade de se desenvolver milhos com qualidade protéica, aumentando o conteúdo de aminoácidos e a qualidade nutricional dos grãos. Assim, surgiu o milho QPM (*quality protein maize*), milho de alta qualidade protéica, melhorado pelo CIMMYT (México). O QPM possui duas vezes mais lisina que o milho normal mantendo a sua produtividade equivalente. A EMBRAPA, Milho e Sorgo, desenvolveu duas variedades QPM comercializadas: BR451 e BR473. A linhagem QPM 161 (EMBRAPA Milho e Sorgo) teve suas proteínas de reserva analisadas bioquimicamente neste trabalho, concluindo que o QPM 161, possui uma concentração maior de lisina em suas sementes, chegando a superar o BR 451 e a manter a mesma concentração de lisina que o BR 473. Em outra parte do trabalho, sementes imaturas (14, 20 e 14 DAP) das linhagens 161, assim como as do selvagem W22+ e de seus mutantes W22o10, W22o11 e W22o13, foram utilizadas para caracterizar a enzima homoserina quinase (HK). A HK faz parte da via de biossíntese do aminoácido essencial treonina. Constatou-se que uma alta atividade desta enzima está relacionada ao aumento de treonina na semente, porém, a alta atividade de HK foi observada nos menores estágios de maturação. Assim os resultados mostram que mais estudos sobre a regulação desta enzima devem ser realizados para que se possam desenvolver sementes ricas em lisina e também em treonina.

Palavras-chave: Milho, Opaco-2, QPM, Lisina, Homoserina quinase, Treonina

ABSTRACT

Characterization of storage protein in QPM lines and biochemical study of homoserine kinase enzyme, in maize seeds (*Zea mays* L.)

Maize which is the staple food in many countries in Africa, Asia and Latin America, has ~10% of protein in the seeds. Maize seeds protein presents low contents of essential amino acids, such as lysine and tryptophan. Since the discovery of the opaque-2 maize, a recessive mutation that results in high concentrations of lysine and tryptophan, the major challenge has been to develop better quality protein maize to increase the rate of amino acids consumed by population. The QPM (quality protein maize), originally produced and bred at CIMMYT in Mexico, came to solve the issue. The QPM protein has twice as much lysine and tryptophan, with the same yield of normal maize. The EMBRAPA, Maize and Sorghum, has bred two QPM varieties that are already commercialized (BR 451 and BR 473), but to increase the quality of the Brazilian QPM, EMBRAPA developed a new QPM line, the 161, whose storage proteins were biochemically analyzed in this study. Line 161 exhibited a higher lysine concentration than BR 451, but about the same concentration of that exhibited by BR 473. Further analyses conducted in this research involved the study of immature seeds (14, 20 and 24 DAP) of line 161, and the wild-type W22+ and its counterpart mutants W22o10, W22o11 and W22o13, and the characterization of the enzyme homoserine kinase (HK). HK is a key enzyme of the threonine biosynthetic pathway. The high HK activity was shown to be related to the increased threonine concentration in the maize seeds. HK activity was shown to reach the highest level in the first developmental stage, whereas in the last developmental stage the activity is lower and so is the rate of threonine. Therefore, it is necessary more studies on HK regulation to improve the mature maize seeds with the best rate of lysine and threonine.

Keywords: Maize, Opaque-2, QPM, Lysine, Homoserine kinase, Threonine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via metabólica do aspartato.....	29
Figura 2 - Via de degradação da lisina, e seus metabólitos.....	35
Figura 3 - Foto das sementes das linhagens 161 de milho cedidas pela EMBRAPA Milho e Sorgo.....	41
Figura 4 - Foto do material vegetal no primeiro estágio fenológico.	42
Figura 5 - Foto do material vegetal durante a polinização.	43
Figura 6 - Gráfico apresenta a quantificação de proteínas de reserva nas sementes maduras das linhagens 161.....	56
Figura 7 - Perfil de proteína em gel de SDS-PAGE das frações globulina, glutelina e albumina das linhagens 161 estudadas.	57
Figura 8 - Perfil de proteína em gel de SDS-PAGE. Padrão (P) BSA; 1, 2 e 3 representam a fração zeína nas respectivas linhagens: 161n, 161o e 161q.....	58
Figura 9 - Gráfico representando a concentração de aminoácidos solúveis, obtidos a partir de farinha de sementes maduras das linhagens 161 estudadas.....	63
Figura 10 - Atividade específica das enzimas do catabolismo de lisina: lisina 2-oxoglutarato redutase (LKR) ($\text{nmol NADPH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) e sacaropina desidrogenase (SDH) ($\text{nmol NAD} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) em cada linhagem de milho estudada, em três datas de desenvolvimento diferentes (14, 20 e 24 DAP)....	64
Figura 11 - Gráfico representando a relação entre a atividade relativa da enzima homoserina quinase em sementes imaturas (20 DAP) de linhagem normal de milho, utilizando três diferentes faixas de concentração de sulfato de amônio (0-20, 20-40 e 40-60%) para a precipitação da HK.....	66
Figura 12 - Gráfico representando a relação entre a atividade relativa da enzima homoserina quinase em sementes imaturas (20 DAP) de linhagem normal de milho, utilizando três diferentes faixas de concentração de sulfato de amônio (0-30, 30-50 e 50-70%) para a precipitação da HK.	67
Figura 13 - Gráfico representando a relação entre a atividade relativa da enzima homoserina quinase em sementes imaturas (20 DAP) de linhagem normal de milho, utilizando duas diferentes faixas de concentração de sulfato de amônio (0-40 e 30-60%) para a precipitação da HK.	67

- Figura 14 - Gráfico representando o efeito do tempo (minutos) de reação na atividade relativa da enzima homoserina quinase em sementes imaturas (20 DAP) de linhagem normal de milho... 68
- Figura 15 - Gráfico representando o efeito de três diferentes volumes (μL) de extrato de milho utilizados na reação, sobre a atividade relativa da enzima homoserina quinase, em sementes imaturas (20 DAP) de linhagem normal de milho..... 69
- Figura 16 - Gráfico representando a variação da atividade específica da enzima homoserina quinase conforme varia a concentração (mM) do substrato homoserina. Para este ensaio foi utilizado o mesmo extrato de sementes imaturas (20 DAP) de linhagem normal de milho, em cinco reações com diferentes concentrações de homoserina: 1, 3, 5, 7 e 10 mM 70
- Figura 17 - Gráfico representando a atividade específica da enzima homoserina quinase isolada de sementes imaturas de milho selvagem W22+ e seus mutantes de endosperma W22o10, W22o11 e W22o13, em três diferentes estágios de desenvolvimento: 14, 20 e 24 DAP..... 71
- Figura 18 - Gráfico representando a atividade específica da enzima homoserina quinase isolada de sementes imaturas das três linhagens de milho: 161n, 161o e 161q, em três diferentes estágios de desenvolvimento: 14, 20 e 24 DAP 72
- Figura 19 - Gráfico representando a atividade relativa da enzima homoserina quinase, nas frações obtidas a partir da purificação parcial da enzima através do *step-wise*. Ensaio realizado com sementes imaturas (20 DAP) de milho em cinco concentrações (mM) diferentes de KCl..... 74
- Figura 20 - Gráfico representando a atividade relativa da enzima homoserina quinase, nas frações obtidas a partir da purificação parcial da enzima. Gradiente linear (0 – 500 mM KCl) em coluna de troca aniônica DEAE Sephacel. Ensaio realizado com sementes imaturas (20 DAP) de milho..... 75
- Figura 21 - Proteína em gel de SDS-PAGE. Padrão (P) BSA; 1-7 frações eluídas da coluna DEAE-Sephacel: 1- fração 20, 2- fração 35, 3- fração 38, 4- fração 42, 5- fração 44, 6- fração 51, 7- fração 55; 8 – extrato bruto 76
- Figura 22 - Gráfico representando o efeito da adição de diferentes aminoácidos: L- lisina, M- metionina, T- treonina e I- isoleucina e o co-fator: S- s-adenosilmetionina (SAM) em quatro diferentes concentrações: 0,1- 0,5 -1,0 e 5,0 mM sobre a atividade relativa da enzima homoserina quinase isolada de sementes imaturas (14 DAP) de milho 77
- Figura 23 - Perfil 2D-PAGE da fração zeína de endosperma de milho das três linhagens, corado com CB-G. IF conduzido entre pH 3-10 NL..... 79

- Figura 24 - Perfil 2D-PAGE da proteína total de sementes maduras de milho nas três linhagens. Corado com CB-G. IF conduzido entre pH 3-10 NL.....81
- Figura 25 - Perfil 2D-PAGE da proteína total de sementes maduras de milho apresentando os *spots* diferenciados entre as linhagens 161n e 161o. Corado com CB-G. IF conduzido entre pH 3-10 NL83
- Figura 26 - Perfil 2D-PAGE da proteína total de sementes maduras de milho apresentando os *spots* diferenciados entre as linhagens 161n e 161q. Corado com CB-G. IF conduzido entre pH 3-10 NL 86
- Figura 27 - Perfil 2D-PAGE da proteína total de sementes maduras de milho apresentando os *spots* diferenciados entre as linhagens 161o e 161q. Corado com CB-G. IF conduzido entre pH 3-10 NL 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da proteína zeína em quatro classes distintas.	27
Tabela 2 - Composição de aminoácidos (mol% $\pm$ desvio padrão) do hidrolisado protéico, obtido a partir de cada fração protéica: globulina, albumina e glutelina.	60
Tabela 3 - Composição de aminoácidos (mol% $\pm$ desvio padrão) do hidrolisado protéico, obtido a partir de cada fração protéica: zeína I e zeína II.	61
Tabela 4 - Determinação da concentração de nitrogênio (N) total (g.Kg ⁻¹ $\pm$ desvio padrão), de proteína total (% $\pm$ desvio padrão) e do aminoácido lisina (% $\pm$ desvio padrão) em farinha de sementes maduras das linhagens de milho estudadas.	63
Tabela 5 - Composição de aminoácidos (mol% $\pm$ desvio padrão) do hidrolisado protéico e o total de aminoácidos (μ mol aminoácidos.mg ⁻¹ proteína $\pm$ desvio padrão), obtidos a partir do extrato utilizado no ensaio da enzima homoserina quinase, realizado em sementes imaturas das três linhagens de milho: 161n, 161o e 161q, em três diferentes estágios de desenvolvimento: 14, 20 e 24 DAP.	73
Tabela 6 - Comparação de <i>spots</i> da linhagem de milho 161n com a linhagem 161o.	85
Tabela 7 - Comparação de <i>spots</i> da linhagem de milho 161n com a linhagem 161q.	87
Tabela 8 - Comparação de <i>spots</i> da linhagem de milho 161o com a linhagem 161q.	89

INTRODUÇÃO

As proteínas de origem vegetal fornecem 65% do total de proteínas ingeridas no mundo todo, e até 50% deste valor é representado pelas sementes dos cereais, principalmente nos países em desenvolvimento, onde os cereais são a principal fonte protéica na dieta da maioria da população (MILLWARD, 1999).

Os cereais representam a cultura de maior importância no mundo, com uma produção estimada de 2,24 bilhões de toneladas no ano de 2008 (FAO, 2008). Suas sementes são caracterizadas por serem excelentes fontes de energia metabolizável na forma de amido, porém tem um valor considerado relativamente baixo de proteínas, entre 8 e 14% nas diferentes espécies, quando comparados com sementes de leguminosas (20-40%). Entretanto, a principal limitação das sementes dos cereais se deve ao reduzido valor nutricional de suas proteínas.

O valor nutritivo de uma proteína está relacionado à proporção de aminoácidos que a compõe (MOLINA et al., 2001), sendo este valor limitante tanto pela deficiência quanto pelo excesso de determinado aminoácido. Estas limitações representam, por um lado, problemas na nutrição humana e animal, as quais acarretam na necessidade de complementação da dieta com outras fontes protéicas, por outro lado, a contaminação ambiental devido ao excesso de nitrogênio excretado é uma das consequências do excesso de determinados aminoácidos (OENEMA, 2004).

A composição desbalanceada de aminoácidos em cereais é resultado da presença da proteína de reserva prolamina em aproximadamente 50% do conteúdo total de proteínas da semente, a qual apresenta alto conteúdo dos aminoácidos prolina e glutamina, e baixo teor de aminoácidos essenciais. As demais frações das proteínas de reserva, as albuminas, globulinas e glutelinas contêm do ponto de vista nutricional, uma qualidade superior (SHEWRY et al., 1978; KENT, 1987; LINKO et al., 1989; SHEWRY; TATHAM, 1990).

O milho (*Zea mays* L.) é o principal cereal cultivado nas regiões tropicais, e na maioria dos países em desenvolvimento representa parte importante da dieta humana, de forma que não pode ser considerado apenas como uma fonte de energia, pois também contribui com uma porção importante das proteínas (MITTELMANN, 2001). Porém, o valor nutricional da semente é inadequado para alimentação humana e animais monogástricos, devido à deficiência dos aminoácidos essenciais, principalmente lisina e triptofano (AZEVEDO et al., 1997; AZEVEDO; LEA, 2001; AZEVEDO, 2002).

Neste sentido, o melhoramento de plantas visa incrementar o valor nutricional dos cereais, para atender adequadamente os requerimentos nutricionais dos indivíduos a que serão ministrados. As estratégias utilizadas para tal finalidade podem ser divididas em dois tipos, aquelas que utilizam o melhoramento convencional e as que utilizam técnicas de engenharia genética, sendo que ambas podem envolver a alteração das proteínas de reserva, bem como as rotas metabólicas de aminoácidos essenciais e seu acúmulo.

Uma das soluções para aumentar a qualidade protéica no milho pelo melhoramento genético, é a introdução da mutação *opaco-2* (*o2*) que reduz a concentração de proteínas zeínas e aumenta a concentração de outras proteínas ricas em lisina. A associação do gene *opaco-2* com os chamados genes modificadores do *opaco-2* (*mo2*) tem permitido a obtenção de milhos com alta concentração de lisina e textura normal (vítrea), sem os problemas agronômicos do *o2*.

As cultivares com a mutação *o2* e seus modificadores foram denominadas de QPM (*quality protein maize*), e já apresentam enormes efeitos benéficos para a nutrição humana em regiões pobres do planeta, uma vez que estes materiais contêm geralmente de 30 a 40 % mais lisina e triptofano em comparação com o milho comum (VASAL, 1999; PRASANNA et al., 2001).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Cultura de Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie diplóide e alógama, pertencente à família Poacea (Gramineae), originado aproximadamente de sete a dez mil anos atrás no México e na América Central. É considerado uma das plantas cultivadas mais antigas e um dos vegetais superiores mais estudados (GUIMARÃES, 2007).

Sua origem tem sido vastamente estudada e várias hipóteses foram propostas. As mais consistentes são aquelas que demonstram que o milho descende do teosinte, que é uma gramínea com várias espigas sem sabugo, que pode cruzar naturalmente com o milho e produzir descendentes férteis (GALINAT, 1995; FREITAS, 2001).

De acordo com Borém e Giúdice (2004), devido às características do milho como a separação das inflorescências masculina e feminina (monoícia), ao número de sementes produzidas, à facilidade de manipulação, à natureza dos cromossomos e ao baixo número de cromossomos ($n = 10$), esta espécie presta-se muito bem a estudos genéticos.

Além disso, o milho é uma das espécies cultivadas mais adaptadas a diferentes ambientes e sistemas de cultivo (FRIZZI et al., 2008), sendo produzido em vários países. O Brasil se encontra entre os três principais produtores de milho, atrás dos Estados Unidos da América e da China (KLEIN, 2009).

Em algumas regiões, como em países da Ásia, África e América Latina o milho é a principal fonte de alimento para mais de 1,2 bilhões de pessoas (HULSHOF et al., 2007), e suas sementes podem representar até 56% do total de calorias diárias dessas populações (PRASANNA et al., 2001).

A composição da semente de milho fornece valores adequados de nutrientes, pois apresenta de 70-75% de carboidratos, 3-5% de lipídeos, 9% de fibras e ao redor de 8-11% de proteínas (LANDRY et al., 2005).

A proteína da semente de milho não é considerada adequada para a nutrição de animais monogástricos incluindo o homem. Isso se deve ao fato do endosperma, onde se concentra 70% da proteína da semente, possuir uma baixa porcentagem de proteínas ricas em aminoácidos essenciais (lisina, triptofano e treonina) aumentando a concentração das proteínas pobres nestes

aminoácidos, necessários à manutenção de uma dieta balanceada (VASAL, 1999; LANDRY et al., 2004).

2.2 Proteínas de Reserva e Aminoácidos

As sementes representam um órgão especial com relação ao metabolismo de aminoácidos, já que estes são armazenados em grandes quantidades nas chamadas proteínas de reserva para serem utilizados como fonte de nitrogênio e energia durante o processo de germinação. Para que as proteínas de reserva executem a sua função na germinação, elas devem possuir três características principais (GALILI; HOFGEN, 2002):

- deposição em compartimentos intracelulares para evitar a degradação prematura por proteases;
- formação de uma estrutura especial, o corpo protéico, capaz de sofrer desidratação e de ser reidratado durante o processo de germinação;
- controle rigoroso do balanço entre aminoácidos livres e incorporados na proteína, que por sua vez depende do transporte de metabólitos de carbono, nitrogênio e enxofre produzidos nas partes vegetativas da planta.

As proteínas de reserva em cereais são classificadas de acordo com sua solubilidade em água, solução salina, álcool e solução alcalina em: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas, respectivamente (OSBORNE, 1907; LANDRY; MOUREAUX, 1970; LANDRY et al., 2000).

As albuminas e globulinas são denominadas proteínas citoplasmáticas formadas por uma série de proteínas com alto teor de lisina, têm funções metabólicas e estruturais e se localizam, principalmente, no embrião e na periferia da semente. Estas proteínas representam de 3 a 5% e 10 a 20% respectivamente, do conteúdo de proteína total. As glutelinas contêm cerca de 5% de lisina, e representam uma fração importante com 35 a 45% do conteúdo total de proteína (SHEWRY et al., 1978; KENT, 1987; LINKO et al., 1989; SHEWRY; TATHAM, 1990).

O conteúdo de proteína no milho varia de 8-11% e as proteínas de reserva geralmente compreendem 70-90% do total de proteína na semente. No milho a fração prolamina é denominada de zeína e é encontrada em mais da metade das proteínas das sementes maduras. As zeínas contêm altas concentrações de prolina e glutamina e baixas concentrações de lisina e triptofano, o que explica a concentração limitante de lisina nas sementes de milho (VASAL, 1999).

Estudos mostram que uma das explicações para a deficiência de alguns aminoácidos essenciais no milho poderia ser devido ao próprio processo de seleção e melhoramento ao longo das décadas para determinadas características agronômicas, acarretando na perda de genes ao longo do processo (SWARUP et al., 1995).

Baseado inicialmente na solubilidade diferencial em etanol 70% e nas suas relações estruturais e, posteriormente, na similaridade dos genes e na sequência de aminoácidos, as diferentes zeínas foram classificadas em quatro classes distintas (SHEWRY; HALFORD, 2002).

Tabela 1 - Classificação da proteína zeína em quatro classes distintas

Classe	Massa Molecular (kDa)	Controle da classe
α -zeína	19	Multigene
	22	
β -zeína	15	Um gene
γ -zeína	16	Três genes
	27	
	50	
δ -zeína	10	Dois genes
	18	

Em milho as α -zeínas compreendem cerca de 60-70% do total desta fração, as β -zeínas 10-15%, as γ -zeínas 10-15% e as δ -zeínas cerca de 5% (ADAMS et al., 2005).

Uma importante característica das proteínas de reserva é a formação do corpo protéico no endosperma, uma estrutura que se forma através da interação entre as diferentes zeínas. Estudos usando o “two-hybrid system” (KIM et al., 2002) mostram que a γ -zeína 16 kDa e a β -zeína 15 kDa iniciam o processo nas células mais novas na região da sub-aleurona e determinam a região do retículo em que o corpo protéico será formado. Passando para o endosperma o corpo protéico aumenta de tamanho, com a formação de esferas centrais contendo α -zeínas, finalmente essas esferas se fundem para formar uma região central contínua constituída pelas α -zeínas, com as β - e γ -zeínas na região periférica do corpo protéico maduro (GIBBON; LARKINS, 2005). Em sorgo, milho e arroz as α -prolaminas estão localizadas no interior dos corpos protéicos e as β e γ -

prolaminas na superfície destes (SCHAEFFER; SHARPE, 1997; CHANDRASHEKAR; MAZHART, 1999; SCHIMIDT, 1987). Ainda em milho, γ -prolaminas são compostas de polipeptídeos de 28 kDa e 16 kDa. A zeína de 16 kDa apresenta solubilidade similar as β -prolaminas. A γ -zeína de 28 kDa é codificada por um ou dois genes, enquanto que a γ -zeína de 16 kDa por um único gene.

A alteração das proteínas de reserva é uma das estratégias que podem ser utilizadas para o melhoramento de plantas, para incrementar o valor nutricional dos cereais. O uso da transformação de plantas para manipular estas proteínas, responsáveis pela incorporação da maioria dos aminoácidos em tecidos como sementes e tubérculos, tem se mostrado uma alternativa promissora.

A manipulação genética de cereais pode ser realizada de duas formas: 1- com genes codificando proteínas estáveis ricas no aminoácido de interesse e o seu acúmulo em altos níveis nas sementes, 2- com a supressão das frações com baixo teor de aminoácidos essenciais, alterando o balanço final das frações protéicas, possibilitando um incremento daquelas consideradas ricas em aminoácidos essenciais.

Dos 20 aminoácidos normalmente incorporados às proteínas, nove não são sintetizados por animais monogástricos, e são ditos essenciais e devem ser fornecidos na dieta, são eles: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, histidina e valina (FERREIRA et al., 2005). A via do aspartato, que em plantas tem o aspartato como precursor comum, sintetiza quatro dos nove aminoácidos essenciais, lisina, treonina, metionina e isoleucina (AZEVEDO, 2002; AZEVEDO et al., 2006; LESS; GALILI, 2009).

2.3 Via Metabólica do Aspartato

Os aminoácidos essenciais lisina, metionina, treonina e isoleucina são sintetizados em plantas e na maioria dos microorganismos pela via metabólica do aspartato (CURIEN et al., 2008). A via metabólica do aspartato (Figura 1), é o regulador central do crescimento da planta, não apenas pelo fato de estes aminoácidos serem essenciais para a síntese de proteínas (LESS; GALILI, 2009). A metionina como precursor do *S*-adenosilmetionina (SAM) é um regulador indireto de uma gama de processos celulares fundamentais (AMIR et al., 2002), enquanto a treonina, através de sua conversão em isoleucina, participa de interações planta-patógeno (KANG

et al., 2006). A treonina pode também ser catabolisada por duas treoninas aldolases em glicina, podendo assim participar dos processos de fotorespiração (JOSHI et al., 2006).

Figura 1 - Via metabólica do aspartato. AK, aspartato quinase; AK-HSDH, aspartato quinase-homoserina desidrogenase; HSDH-R, homoserina desidrogenase resistente à treonina; HK, homoserina quinase; TS, treonina sintase; TD, treonina deaminase; CS, cistationina γ -sintase; DHDPS, dihidrodipicolinato sintase; (-) inibição e (+) indução

Devido à baixa concentração de lisina observada nos cereais, a via metabólica do aspartato tem sido estudada utilizando-se abordagens moleculares e bioquímicas. Os estudos realizados têm demonstrado a importância das enzimas aspartato quinase (AK, EC 2.7.2.4), homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) e dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52) como enzimas chave envolvidas na biossíntese de lisina (AZEVEDO et al., 2003; 2004; 2006). As enzimas lisina cetoglutarato redutase (LKR, EC 1.5.1.8) e sacaropina desidrogenase (SDH, EC 1.5.1.9) são também consideradas enzimas chave no acúmulo de lisina, e estão envolvidas na via de degradação do aminoácido (ARRUDA et al., 2000; STEPANSKY et al., 2006).

O aspartato é o composto inicial da via metabólica do aspartato é formado pelo processo de transaminação do ácido oxaloacético, sendo originado no ciclo de Krebs nas mitocôndrias ou através da ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase no citoplasma (FERREIRA et al., 2005; AZEVEDO et al., 2006). O aspartato atua como precursor comum em duas vias metabólicas. A

primeira conduz à biossíntese do aminoácido asparagina, que atua como transportador de nitrogênio, sendo produzido pela ação da enzima asparagina sintetase (ANDREWS et al., 2004). A segunda conduz à biossíntese de lisina, treonina, metionina e isoleucina (AZEVEDO et al., 1997; AZEVEDO, 2002).

Na via metabólica do aspartato, a primeira reação enzimática ocorre pela ação da enzima AK que catalisa a fosforilação do aspartato formando β -aspartil fosfato. O β -aspartil fosfato é, então, convertido a β -aspartato semialdeído pela ação da enzima aspartato semialdeído desidrogenase (ASADH, EC 1.2.1.11) (AZEVEDO et al., 2006).

A identificação, purificação e caracterização da AK foram primeiramente realizadas em microorganismos, particularmente com *Escherichia coli* (AZEVEDO et al., 1997). Em plantas, a AK foi estudada por 35 anos e foi identificada, isolada, parcialmente purificada e caracterizada bioquimicamente em uma grande variedade de culturas como milho (BRYAN et al., 1970; WANG et al., 2007), ervilha (LEA et al., 1979), soja (MATTHEWS; WIDHOLM, 1979), cenoura (RELTON et al., 1988), cevada (LEA et al., 1992), sorgo (FERREIRA et al., 2006) e quinoa (VARISI et al., 2008).

Até este ponto a via é comum para os quatro aminoácidos por ela sintetizados, sendo este o primeiro ponto de bifurcação da via. A partir daqui a via metabólica se divide em dois ramos, um que conduz à biossíntese de lisina e o outro que conduz à biossíntese de treonina, isoleucina e metionina.

O aminoácido lisina é sintetizado a partir de β -aspartato semialdeído em sete reações enzimáticas iniciadas pela ação da enzima DHDPs que catalisa a condensação de piruvato e β -aspartato semialdeído formando o 4-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidrodipicolinato. Após a formação do tetrahidrodipicolinato seguem-se seis reações enzimáticas catalisadas pelas enzimas dihidrodipicolinato redutase (DHDPR, EC 1.3.1.26), tetrahidrodipicolinato acilase (THPA, EC 2.3.1.117), N-acil-L,L-diaminopimelato aminotransferase (ADPAT, EC 2.6.1.17), N- α -acil-L,L-diaminopimelato deacilase (ADPD, EC 3.5.1.18), diaminopimelato epimerase (DAPE, EC 5.1.1.17) e diaminopimelato descarboxilase (DAPD, EC 4.1.1.20) (HUDSON et al., 2006).

No outro ramo, o β -aspartato semialdeído é reduzido a homoserina em uma reação catalisada pela enzima HSDH na presença da coenzima NADH ou NADPH, sendo que esta enzima está localizada nos cloroplastos. A seguir, a homoserina é fosforilada a O-fosfomoserina (OPH) pela ação da enzima homoserina quinase (HK, EC 2.7.1.39) na presença

de ATP. Esta reação é comum para a biossíntese de treonina, isoleucina e metionina. A partir deste ponto, ocorre o segundo ponto de bifurcação da via do aspartato, separando assim, a biossíntese de metionina, da biossíntese de treonina, que vem a ser convertida em isoleucina.

O substrato OPH é convertido em treonina pela enzima treonina sintase (TS, EC 4.2.99.2). O aminoácido isoleucina é sintetizado a partir de treonina em uma série de cinco reações enzimáticas catalisadas pelas enzimas treonina desaminase (TD, EC 4.2.1.16), ácido acetohidroxi sintase (AHAS, EC 4.1.3.18), ácido acetohidroxi isomeroreductase (AHRI, EC 1.1.1.86), ácido dihidroxi desidratase (DHAD, EC 4.2.1.9) e aminoácidos de cadeia ramificada aminotransferase (BCAT, EC 2.6.1.42) (AZEVEDO et al., 2006).

A metionina é sintetizada em outro ramo a partir de OPH em três reações enzimáticas envolvendo as enzimas cistationina γ -sintase (CGS, EC 4.9.99.9), cistationina β -liase (CBL, EC 4.4.1.8) e metionina sintase (MS, EC 2.1.1.13) (AZEVEDO et al., 2006).

2.3.1 Regulação da via metabólica do aspartato

A regulação da via metabólica do aspartato se faz em determinados pontos chaves, através da regulação das enzimas que catalisam estes pontos. A regulação das enzimas é realizada por ativação/inibição dos produtos finais, diretos ou indiretos, da atividade da enzima, processo denominado de retroalimentação positiva/retroalimentação negativa (TORO, 2006).

A regulação da atividade da enzima AK se dá por retroinibição de lisina e treonina. Ao menos duas isoenzimas de AK podem ser encontradas em plantas, uma monofuncional sensível à lisina, a qual está envolvida na regulação da via como um todo e pode ser sinergisticamente inibida pelo SAM (AZEVEDO et al., 1997). A outra isoenzima de AK é bifuncional (AK e HSDH), ambas atividades inibidas por treonina (AZEVEDO et al., 1997).

A enzima HSDH, a primeira enzima da biossíntese de metionina e treonina, apresenta duas isoformas em plantas, uma citoplasmática resistente à treonina e a bifuncional sensível a treonina (AZEVEDO et al., 2006).

Na via de biossíntese de lisina o principal controle é exercido pelas enzimas AK e DHDPS. Embora as duas enzimas sejam inibidas por retro-inibição pelo aminoácido lisina, a DHDPS é a principal enzima limitante da biossíntese de lisina. Diversos estudos têm demonstrado que a enzima DHDPS (K_i 5-50 μ M) apresenta uma sensibilidade maior à lisina do que a isoenzima da AK sensível à inibição por este aminoácido (K_i 200-600 μ M). Alguns

trabalhos com plantas expressando formas das enzimas AK e DHDPS menos sensíveis à inibição por lisina corroboram a hipótese de uma função regulatória mais importante no ponto da via catalisado pela enzima DHDPS (AZEVEDO et al., 1997; AZEVEDO; LEA, 2001; AZEVEDO, 2002; AZEVEDO et al., 2006). Além disso, a observação de que plantas expressando a DHDPS insensível à inibição por lisina apresentaram reduzido conteúdo do aminoácido treonina sugere que as enzimas DHDPS e HSDH competem pelo substrato comum, β -aspartato semialdeído, e o aumento na concentração celular levando ao acúmulo de lisina ou treonina podem alterar o fluxo de carbono através da via metabólica (AZEVEDO et al., 2006).

O mecanismo envolvido na regulação por retro-inibição das enzimas AK e DHDPS em vegetais ainda não é completamente conhecido. Em bactérias e fungos, a sensibilidade destas enzimas à lisina ou treonina está associada a domínios específicos aos quais estes aminoácidos se ligam. Estes domínios estão localizados na parte C-terminal da isoenzima monofuncional ou no domínio intermediário entre os domínios de AK e HSDH na isoenzima bifuncional (VIOLA, 2001). Alguns trabalhos, também sugerem a participação de algumas chaperonas como a FKP12 em fungos (ALARCON; HEITMAN, 1997) ou GroE em *E. coli* (McLENNAN; MASTERS, 1998) na regulação destas enzimas por retro-inibição.

Além da via de síntese, a via metabólica do aspartato também é altamente regulada durante o processo de degradação, principalmente pelas enzimas LKR e SDH. O acúmulo de lisina em plantas transgênicas expressando a enzima DHDPS insensível à inibição por lisina provocou estímulos na atividade da enzima LKR via cascata de sinalização que requer a participação de cálcio e fosforilação-desfosforilação da proteína (GALILI et al., 2001). Alguns estudos sugerem que o estímulo causado na atividade da LKR pela fosforilação da LKR-SDH possa ser intermediado pela participação da caseína quinase II (ARRUDA et al., 2000). Além disso, é possível que a caseína quinase II também regule a transcrição do gene da LKR-SDH (GALILI et al., 2001). De modo geral, a regulação pós-traducional da enzima LKR está fortemente associada com a regulação dos níveis celulares de lisina (ARRUDA et al., 2000).

As propriedades regulatórias observadas para HK em plantas têm apresentado consideráveis diferenças. Estudos realizados por Lee e Leustek (1999) com HK de *E. coli*, demonstraram que esta enzima não está sujeita a nenhuma regulação pelos aminoácidos produtos finais, porém quando Lee et al. (2005) superexpressaram a HK em *Arabidopsis thaliana*, não foi observado nenhum efeito na concentração de OPH, metionina e treonina, entretanto, a adição de

homoserina estimulou o acúmulo dos três aminoácidos, indicando que é a concentração de homoserina e não OPH o fator limitante.

Provavelmente a principal característica da TS em plantas seja a sua regulação pelo SAM de forma reversível e cooperativa, o qual pode estimular dramaticamente a atividade de TS (HESS et al., 2004), a TS pode também ser inibida pelo AMP (CURIEN et al., 2003). A regulação da TS pelo SAM pode ter um papel importante na regulação da biossíntese de metionina (GOTO et al., 2005). A viabilidade de SAM pode determinar a relativa proporção de OPH que é convertido em cistationina, e metionina ou treonina (AZEVEDO et al., 1997; AZEVEDO et al., 2006).

2.3.2 Biossíntese de Treonina

As pesquisas têm procurado compreender o controle genético e bioquímico de cada ramificação da via metabólica do aspartato. Devido às características já apontadas de deficiência de alguns aminoácidos entre os grupos vegetais, existe um grande interesse em estudar a fundo a via com suas reações de transformação do aspartato para lisina, treonina e metionina. Mais recentemente a conversão de treonina em isoleucina tem sido o objeto de um grande número de detalhadas pesquisas, pois foi observada que esta reação era essencial para a síntese de novos e eficazes herbicidas (SCHLOSS; AULABAUGH, 1989).

A HK catalisa a formação de OPH, o qual serve então como substrato para a CGS e TS. As enzimas CGS e TS são reguladas pelo SAM no transcrito (CGS em *Arabidopsis*) (CHIBA et al., 1999) ou a nível de proteína (TS em *Arabidopsis* e batata) (CURIEN et al., 1996; ZEH et al., 2001) dependendo da espécie vegetal. (HESSE; HOEFGEN et al., 2003).

A HK, assim como a AK, HSDH e a TS, está localizada no cloroplasto (WALLSGROVE; MAZELIS, 1981). Em plantas a HK foi isolada e parcialmente purificada de preparações brutas de folhas e plântulas de ervilha, de folhas de rabanete e folhas de cevada (AZEVEDO et al., 1997). A primeira HK foi purificada e caracterizada em semente de trigo (RIESMEIER et al., 1993). Em *Arabidopsis* a enzima HK aparece codificada por um único gene (LEE; LEUSTEK, 1999). A HK de plantas tem um papel na regulação da biossíntese de metionina e treonina (DATKO et al., 1974). Em plantas a enzima HK se apresenta na forma de um dímero de 75 kDa e requer íons de potássio (K^+) para sua atividade (RIESMEIER et al., 1993).

A treonina é sintetizada através da via metabólica do aspartato em cinco passos que envolvem quatro intermediários: aspartil fosfatase, aspartato semialdeído (ASA), homoserina e OPH. Os dois primeiros passos são catalisados pela AK e pelo aspartato semialdeído desidrogenase (ASADH, EC 1.2.1.11), passos que são comuns na biossíntese de lisina, treonina, isoleucina e metionina. A etapa de redução de ASA para homoserina e homoserina fosforilada faz parte também da biossíntese da metionina em plantas, sendo que a ramificação ocorre a partir da OPH. A reação final se dá pela TS e é necessária para a biossíntese da isoleucina sendo que o último passo envolve a irreversível conversão de OPH em treonina e é catalisado pela enzima TS.

Um dos primeiros trabalhos descrevendo a atividade da TS foi realizado com preparações de células de plantas, usando extratos de ervilhas e *Lemna minor*, incubados por um longo período (25h) com OPH e fosfato pirodoxal (SCHNYDER et al., 1975). Em plantas, a TS foi parcialmente purificada de folhas de beterraba açucareira (MADISON et al., 1976), plântulas de ervilha (MADISON; THOMPSON, 1976), folhas de rabanete (THOEN et al., 1978), *Lemna paucicostata* (GIOVANELLI et al., 1984) e de cevada (ROGNES et al., 1986). Os resultados obtidos nessas espécies para TS são muito similares e demonstram que a enzima aparece relativamente estável durante o procedimento de purificação.

A TS está localizada nos cloroplastos (ROGNES, 1990), e em todas as plantas examinadas foi praticamente uma exigência o uso do SAM como um ativador alostérico para esta enzima (ROGNES, 1990). O coeficiente de Hill da TS é de 2,0-2,5, metade da atividade máxima da enzima é obtida com 40-200 μM de SAM. Aumentos de SAM a uma V_m de 5 a 25-fold parecem diminuir o K_m de OPH (GIOVANELLI et al., 1984). A TS tem um pH ótimo de 8,0 e o K_m para HSP em *Lemna* é muito baixo (3-7 μM) se comparado com a cevada (50 μM), ervilha (0,67 mM) e beterraba (2,2 mM). O fosfato pirodoxal é requerido pela atividade da enzima purificada parcialmente, mas não quando se utiliza o extrato bruto. Por apresentar uma função em potencial na regulação da biossíntese de treonina, a TS vem sendo estudada em plantas (WALLSGROVE; MAZELIS, 1981; ZEH et al., 2001; FERREIRA et al., 2006).

2.3.3 Catabolismo de lisina

A presença do catabolismo de lisina foi confirmada em vegetais pela observação de que ^{14}C -lisina injetada em sementes de cevada era convertida em glutamato e α -aminoadípico semialdeído (SODEK; WILSON, 1970). Ao estudarem as enzimas LKR e SDH em milho,

Arruda et al., (2000) sugeriram que a via de degradação da lisina era um dos mecanismos que controlavam a concentração deste aminoácido no endosperma.

Duas enzimas estão envolvidas no catabolismo de lisina em animais, microrganismos e plantas. A enzima LKR é a primeira enzima da via (Figura 2) e é responsável pela condensação da lisina e do cetoglutarato formando sacaropina que é hidrolisada em ácido aminoadípico e ácido glutâmico em uma reação catalisada pela segunda enzima SDH (ARRUDA et al., 2000; STEPANSKY et al., 2006).

Figura 2 - Via de degradação da lisina, e seus metabólitos. LKR, lisina 2-oxoglutarato; SDH, sacaropina desidrogenase; ASD, aminoadípico semialdeído desidrogenase

Embora as enzimas LKR e SDH possam estar presentes em vegetais como enzimas monofuncionais, a maior parte dos trabalhos tem demonstrado que a maior parte da atividade da LKR e SDH está presente em um polipeptídeo bifuncional (GONÇALVES-BUTRUILLE et al., 1996; GAZIOLA et al., 1997). Em cereais, as enzimas LKR e SDH são específicas do endosperma, apresentando massas moleculares entre 200 e 260 kDa (GONÇALVES-BUTRUILLE et al., 1996; GAZIOLA et al., 1997).

Em milho, a sacaropina é um inibidor competitivo de lisina e não-competitivo de cetoglutarato, sugerindo um mecanismo em que a lisina inicialmente interage com a enzima e depois com cetoglutarato e NADPH, sendo o oposto observado em arroz (FORNAZIER et al., 2005). A atividade de LKR-SDH pode ser diferentemente afetada por Ca^{2+} , força iônica e fosforilação (KEMPER et al., 1999; GAZIOLA et al., 2000). Alguns estudos têm demonstrado em diferentes espécies que o aminoácido lisina pode regular seu próprio catabolismo com as enzimas sendo moduladas diferencialmente em uma cascata de sinais intracelular envolvendo principalmente cálcio e um processo de fosforilação-desfosforilação da proteína (AZEVEDO, 2002).

O gene que codifica para a enzima bifuncional LKR-SDH foi clonado pela primeira vez de *A. thaliana* (TANG et al., 1997), sendo posteriormente clonado de outras espécies como milho opaco-2 (KEMPER et al., 1999). Em *A. thaliana*, o locus *lkr-sdh*, além de codificar para o polipeptídeo bifuncional da LKR-SDH, ainda codifica para a enzima monofuncional da SDH, presente em um gene autônomo que está localizado no interior da região codante e 3'UTR (3' não traduzida) do gene da LKR-SDH (TANG et al., 1997; ZHU et al., 2001; TANG et al., 2002).

2.4 Opaco-2

Em 1963 com o descobrimento do mutante *opaco-2* (*o2*) de milho (MERTZ et al., 1964), uma euforia tomou conta dos pesquisadores de milho da época, muitos vendo este mutante como a solução do problema da baixa qualidade nutritiva do milho. Contudo, seguida da euforia inicial veio a decepção, visto que apesar do alto valor nutritivo deste material, a ele se associavam características agronômicas indesejáveis, tais como a queda de produção acentuada, a alta susceptibilidade a patógenos e os aspectos farináceos.

Após este mutante, outros foram isolados em geral apresentando características bastante similares ao *opaco-2*. Tal fato caracterizou um aspecto que perdura até hoje, ou seja, mutantes de alta qualidade nutritiva com características agronômicas desfavoráveis.

Verificou-se que a síntese de grande parte das α -zeínas (22 kDa) encontrava-se altamente reduzida nas sementes *opaco-2*, em grande parte devido a um decréscimo de seus mRNAs.

O gene homozigoto recessivo para *opaco-2* limita a síntese de proteínas zeína que contém pouca lisina e triptofano e leva a um incremento das proteínas não-zeínas que contêm níveis elevados de lisina e triptofano no endosperma (HABBEN et al., 1993).

A clonagem e caracterização do locus *opaco-2* mostrou que o gene codifica um fator de transcrição, pertencente à classe “basic domain/leucine zipper” (bZIP) (SCHMIDT et al., 1990) e denominada proteína *opaco-2* (O2), que controla positivamente a transcrição de genes de prolaminas (MOTTO et al., 1988). Portanto, mutantes homozigotos *opaco-2* têm diminuição no conteúdo de prolaminas em decorrência da ausência da proteína O2. Por esses fatores, torna-se de grande interesse a análise da variabilidade genética de materiais visando proteínas de reserva das sementes, essencialmente a concentração das glutelinas ricas em lisina.

A mutação *opaco-2* no milho também está relacionada com o aumento dos níveis de aminoácidos livres (FAA) no endosperma maduro da semente. A alta concentração de FAAs no endosperma do *o2* é consequência de altos níveis de síntese e acúmulo durante o desenvolvimento e da aparente inabilidade para incorporar estes aminoácidos ou descartá-los depois da dissecação do endosperma (WANG; LARKINS, 2001)

Nos últimos anos um novo alento foi dado com a obtenção do “*quality protein maize*” (QPM). Neste material, o fenótipo *opaco-2*, assim como a característica farinácea do mutante *opaco-2* foi alterada pela introdução de genes modificadores de endosperma, mantendo as características químicas e nutricionais do mutante *o2*.

O milho QPM apresenta concentrações de lisina e triptofano duplicados, além de serem 73,5% mais digeríveis que os milhos comuns. Esta porcentagem faz com que sua proteína tenha uma qualidade 90% similar à do leite (VASAL, 1999).

As primeiras variedades de milho com alta qualidade protéica (QPM) foram desenvolvidas, na década de 70, pelo Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT) localizado no México (VASAL, 1999).

Em 1983, a EMBRAPA Milho e Sorgo, introduziu duas variedades QPM do CIMMYT, iniciando assim, um programa para melhorar a qualidade protéica do milho. Um dos produtos desse programa foi a variedade BR 473 (PACHECO et al., 1999). Após o lançamento desta variedade, a EMBRAPA continua o programa, realizando seleções entre e dentro da progênie de meios irmãos a fim de melhorar as qualidades do BR 473.

2.5 Plantas Transgênicas

O estudo dos mutantes apresentando alterações na sensibilidade das enzimas AK e DHDPS aos aminoácidos lisina, treonina e ao AEC, contribuíram para a compreensão dos

mecanismos regulatórios envolvidos na via metabólica do aspartato, principalmente aos relacionados à regulação das enzimas chave da biossíntese de lisina AK e DHDPS. Além dos mutantes bioquímicos, foi revelado que o uso de plantas transgênicas é uma importante metodologia para o estudo desta via metabólica.

Em um estudo que utilizou a estratégia de alteração na regulação de enzimas como a AK e a DHDPS, foram obtidas plantas transgênicas expressando genes bacterianos menos sensíveis à inibição por lisina ou genes contendo alterações na composição de aminoácidos que tornaram as enzimas menos sensíveis à inibição por este aminoácido (GALILI, 1995). Contudo, as plantas que apresentaram incrementos na concentração de lisina também apresentaram alterações fenotípicas como esterilidade parcial e retardo no florescimento (FALCO et al., 1995).

Para elucidar a importância da via de degradação no acúmulo de lisina, Zhu et al. (2001) produziram plantas transgênicas de *A. thaliana* com *knockout* do gene da LKR-SDH. A análise revelou alta concentração do aminoácido lisina nas sementes. Posteriormente, o gene da DHDPS de bactéria foi expresso em plantas selvagens e transgênicas de *A. thaliana* para *knockout* da LKR-SDH (ZHU; GALILI, 2003). Enquanto as plantas transgênicas expressando o gene da DHDPS apresentaram aumentos de 5 a 12 vezes em relação ao tipo selvagem, as plantas que apresentavam a combinação dos dois caracteres demonstraram um efeito sinérgico que provocou um aumento de 80% na concentração de lisina solúvel (ZHU; GALILI, 2003). Contudo, esta característica mostrou estar correlacionada a severas reduções na germinação das sementes (ZHU; GALILI, 2003).

Para esclarecer se os efeitos observados durante a germinação estavam associados aos efeitos negativos do excesso de lisina, ou aos efeitos de pós-germinação devido à redução no catabolismo de lisina, foram produzidas plantas co-expressando o gene da *DHDPS* de bactéria com o gene da *LKR-SDH* silenciado, sobre o controle de um promotor específico para o desenvolvimento do endosperma (ZHU; GALILI, 2004). A análise destas plantas revelou que as reduções na germinação das sementes observadas anteriormente, ocorreram devido ao bloqueio na via de degradação de lisina e não devido ao acúmulo excessivo de lisina em concentrações tóxicas para a planta (ZHU; GALILI, 2004).

Alguns trabalhos apresentaram a engenharia genética como ferramenta para manipular a composição das proteínas do endosperma, diminuindo a fração zeína das sementes, levando assim, ao aumento da concentração de lisina solúvel nas sementes de milho (SEGAL et al., 2003;

HUANG et al., 2005; FRIZZI et al., 2008). A obtenção de um fenótipo opaco nas sementes modificadas indica uma associação direta entre a redução das proteínas zeínas e o fenótipo da semente (SEGAL et al., 2003).

Atualmente, a empresa de biotecnologia Renessen, obteve a liberação do milho transgênico LY038 (MaveraTM High Value Corn with Lysine) nos Estados Unidos. Por muitos anos, a Renessen utilizou técnicas convencionais de reprodução para produzir o MaverTM. Este milho apresenta concentrações maiores de óleo e proteína quando comparado ao milho comum. Porém apenas com a utilização da engenharia genética a Renessen logrou aumentar a concentração de lisina nas sementes do milho MaverTM. Esse produto representa a primeira oferta biotecnológica da Renessen. (Monsanto, 2008.)

2.6 Quality Protein Maize (QPM)

Uma abordagem de melhoramento genético para melhorar a qualidade nutricional da proteína do milho produziu o milho de alta qualidade protéica (QPM), o qual combina a alta qualidade nutricional do gene *opaco-2* (alta lisina e triptofano) com as características agronômicas do milho comercial (WILLIAMS et al., 2009)

A descoberta do mutante de milho *opaco-2* em 1963, contendo maior teor de aminoácidos essenciais, foi fundamental para a geração de variedades de milho com perfil de alta qualidade protéica (MERTZ et al. 1964), foi o marco para o desenvolvimento dos QPM.

Somente na década de oitenta, com o entendimento dos genes modificadores da textura do endosperma, através de melhoramento clássico, é que foi possível desenvolver genótipos de milho com conteúdo 50% mais elevado de lisina e de triptofano em suas proteínas, com características agronômicas desejáveis (NURIT et al., 2009).

Os genes dos modificadores de endosperma (*mo2*) suprimem eficientemente o fenótipo farináceo, com uma pequena perda da qualidade da proteína (GIBBON; LARKINS, 2005). A hereditariedade destes *mo2* é complexa e está relacionada a muitos *loci* (PRASANNA et al., 2001), os quais complicam a análise genética dos QPMs.

A estratégia para desenvolvimento dos QPMs inclui retrocruzamentos para desenvolver variedades e híbridos de milho *opaco-2* a partir de genótipos normais de milho, depois são realizadas seleções recorrentes para obter backgrounds genéticos específicos que restauram a porção vítrea do endosperma. Assim pools genéticos, populações e linhas híbridas de QPMs são

resultados de diversos esforços do melhoramento (VILLEGAS et al. 1992; VASAL, 2001; GUTIERREZ-ROJAS et al., 2008)

No Brasil, o Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Milho e Sorgo), tem desenvolvido cultivares de milho QPM com o objetivo de gerar cultivares comerciais destinados à alimentação humana, com características de produção desejáveis e elevado valor nutricional.

Contudo, a liberação de materiais QPM tem sido lenta principalmente pela complexidade na obtenção dos mesmos, que exige a introdução de múltiplos genes modificadores, manutenção da homozigose recessiva para o *o2* e também o monitoramento dos níveis de lisina (CICERI et al., 1997; HUANG et al., 2004; GIBBON; LARKINS, 2005). O melhor entendimento dos mecanismos bioquímicos que regem tanto o elevado teor de lisina quanto a formação de endosperma vítreo em materiais contendo o *opaco-2*, poderá colaborar para o melhor e mais acelerado desenvolvimento de materiais QPM.

As altas concentrações de lisina e triptofano dos genótipos QPMs estão associadas à redução de α -zeínas de 22 kDa e β -zeínas, e uma aumento na concentração de γ -zeína de 27 kDa (UFAZ; GALILI, 2008). Diversos trabalhos tem demonstrado uma relação direta entre a concentração da γ -zeína de 27 kDa e a quantidade de *mo2* (GEETHA et al., 1991).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Para realização deste trabalho foram utilizadas as sementes de milho das linhagens 161: 161 Normal (161n), 161 opaco (161o) e 161 QPM (161q), gentilmente cedidas pela EMBRAPA Milho e Sorgo, em Sete Lagoas. Estas linhagens são MRC 6 (Sexta geração de Retrocruzamento Modificado) com 96,875% de recuperação da linhagem normal.

As sementes recebidas apresentaram diferenças fenótípicas, com a linhagem L161o quase não apresentando partes vítreas e a linhagem L161q apresentando apenas o topo vítreo e a base opaca (Figura 3).

Figura 3 – Foto apresentando as diferenças fenótípicas entre as sementes das linhagens estudadas. 1- L161n; 2- L161o e 3- L161q

O genótipo selvagem de milho W22+ e seus mutantes de endosperma W22o10, W22o11, W22o13, foram também cultivados para quantificação da atividade da enzima HK.

O material vegetal utilizado foi cultivado e multiplicado na casa de vegetação e no campo experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP – Piracicaba (Figura 4).

Figura 4 - Foto do material vegetal no primeiro estágio fenológico. Plantio realizado no campo experimental do Departamento de Genética, ESALQ. 1- L161n, 2- L161q e 3- L161o

Foram realizadas coletas de material imaturo e de sementes maduras, as plantas utilizadas para a coleta das espigas maduras tiveram aproximadamente um ciclo de 120 dias, as espigas então foram colhidas e armazenadas na câmara fria do Departamento de Genética da ESALQ/USP, até utilização no experimento. A coleta de espigas imaturas foi realizada em três datas diferentes, a contar da polinização da planta: 14, 20 e 24 dias após a polinização (DAP), esta coleta foi realizada em nitrogênio líquido para manutenção das características bioquímicas das sementes, após serem colidas as espigas foram armazenadas em freezer -70°C até utilização.

As plantas cultivadas tiveram sua polinização controlada, as bonecas de cada planta foram cobertas com pequenos sacos plásticos, assim que surgiram. Os pendões foram cobertos com sacos e papel um dia antes da polinização (Figura 5).

Figura 5 - Foto do material vegetal durante a polinização. Plantio feito no campo experimental do Departamento de Genética, ESALQ. 1- L161n, 2- L161o e 3- L161q

3.2 Proteínas de Reserva

3.2.1 Extração das Proteínas de Reserva

Para extração das proteínas de reserva das três linhagens 161, foi utilizado o método de Landry e Damerval (LANDRY et al., 2000).

Primeiramente as sementes foram moídas até se obter uma farinha homogênea.

Para a extração foram utilizados 100 mg da farinha, em três repetições.

Antes de se realizar as extrações, a farinha foi tratada com 1 mL de hexano, à temperatura ambiente durante 15 minutos, com leves agitações, sendo a amostra, deixada para secar overnight. Foi utilizado o hexano para solubilizar os lipídeos presentes na farinha a fim de que estes não interferissem na extração protéica.

O processo de extração é sequencial, assim utilizou-se o precipitado da extração anterior como pellet da extração seguinte. Durante toda a extração sequencial a amostra foi frequentemente agitada em vortex, para auxiliar a solubilização das proteínas pelo reagente que estava sendo utilizado. Após o tempo de reação de cada fração protéica, a amostra foi centrifugada a 9.000 g durante 5 minutos.

Para a extração das globulinas, 1 mL de uma solução 0,5 M de NaCl por 30 minutos a 4°C, foi adicionado a farinha seca. Este procedimento foi repetido duas vezes. Os sobrenadantes obtidos após centrifugação foram misturados e armazenados para posterior análise. Em seguida, a fração albumina foi extraída submetendo o pellet a uma nova extração com água Milli-Q por 15

minutos a 4°C, duas vezes, o sobrenadante obtido após a primeira centrifugação foi armazenado junto com a fração anterior a -70°C para uma análise em conjunto a ser realizada posteriormente. O sobrenadante da segunda centrifugação foi descartado.

As prolaminas foram obtidas em duas frações, zeínas I e II. As zeínas I foram extraídas misturando-se ao pellet anterior (que se formou da extração da albumina) 1 mL de solução 55% (v/v) 2-propanol e 0,6% (v/v) 2-mercaptoetanol por 30 minutos a temperatura ambiente, este processo foi repetido duas vezes, os sobrenadantes obtidos após centrifugação foram misturados e armazenados a -70°C. As zeínas II foram obtidas pela extração do pellet obtido com 1 mL de solução 0,5M NaCl, pH 10 contendo 0,6% (v/v) 2-mercaptoetanol à temperatura ambiente por 30 minutos, repetindo mais uma vez. Após este período, o extrato foi centrifugado e os sobrenadantes obtidos foram armazenados a -70°C para análise posterior.

A última fração protéica, a glutelina, foi obtida pela extração do pellet anterior com 1 mL de solução 0,5% (p/v) SDS, pH 10, contendo 0,6% 2-mercaptoetanol por 30 minutos à temperatura ambiente, repetido duas vezes. Os sobrenadantes obtidos após a centrifugação foram armazenados a -70°C para análise posterior.

3.2.2 Quantificação das Proteínas

A concentração média de proteína por pool de sementes utilizado foi quantificada utilizando-se o Kit da Bio-Rad, segundo o método de Bradford (1976), usando soro albumina bovino (BSA) como padrão. Os valores foram determinados em relação a curva padrão de concentrações conhecidas por regressão linear. A curva padrão foi preparada com concentrações crescentes de BSA.

As soluções contendo a amostra e o reagente Bradford tiveram sua leitura feita em espectrofotômetro a 595 nm.

3.2.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-dodecil sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

O procedimento de preparação e corrida dos géis foi realizado como descrito por Laemmli (1970). Após a extração das proteínas, amostras com 30 µg foram aplicadas aos géis de SDS corados com Coomassie-Blue R (CB-R), para os géis corados com solução de prata, foram utilizados 6 µg de proteína.

A eletroforese das proteínas foi realizada em cuba vertical, em sistema de tampão desnaturante, utilizando-se o sistema mini-gel no tamanho de 8,3 x 10,2 cm (Bio-Rad) na concentração ideal de 10% de bis-acrilamida para as diversas proteínas a serem estudadas, seguindo o protocolo:

Gel inferior (de resolução): 5 mL acrilamida, 5 mL de 2,9 M tampão tris-HCl, pH 8,9, 200 µL de SDS (10%), 10,0 mL de água destilada, 38 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônia (1%).

Gel superior (de empacotamento): 1 mL acrilamida, 2,5 mL de 0,5 M tampão tris-HCl, pH 6,8, 100 µL de SDS (10%), 5,5 mL de água destilada, 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônia (1%).

Para realização da eletroforese, as amostras são aplicadas juntamente com o tampão de amostra [3,0 mL de água destilada, 1,0 mL de tampão de empacotamento, 1,6 mL de glicerol, 1,6 mL de SDS (10%), 0,4 mL de azul de bromofenol (0,5%) e 0,4 mL de mercaptoetanol] na proporção de 1:1.

Uma corrente constante de 15 mA foi aplicada a cada gel, com tampão de eletrólitos composto de 250 mM tris-HCl, pH 8,3 contendo 1,92 M glicina e 1% SDS (10%).

Marcadores de peso molecular foram aplicados em cada gel para a determinação da massa molecular das proteínas.

3.2.4 Extração dos Aminoácidos de cada Fração Protéica

Com as frações protéicas quantificadas, foi feita a hidrólise das proteínas pelo método de hidrólise ácida, utilizando HCl 6,0 mol/L, como reagente (TURNER; REDGWELL, 1966).

Para realizar a hidrólise foi utilizado 0,5 mg de proteína de cada genótipo. O volume de HCl utilizado foi calculado em base na razão de 4 mL de HCl para cada 10 mg de proteína. A mistura (HCl + proteína na ausência de oxigênio) foi colocada em estufa a 100°C durante 22 horas.

A proteína hidrolisada foi centrifugada por 20 minutos em seguida o sobrenadante foi liofilizado. Após a liofilização a amostra foi ressuspensa em 100 µL de água destilada e filtrada em filtro Millipore em PVDF, de 0,22 µm. A amostra foi utilizada para a quantificação dos aminoácidos presentes no hidrolisado protéico a partir da cromatografia líquida.

3.2.5 Separação e Análise da Composição de Aminoácidos de cada Fração em HPLC

Para a separação e determinação quantitativa de cada aminoácido presente no hidrolisado protéico de cada linhagem estudada, foi utilizada a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em fase reversa.

Antecedendo a separação dos aminoácidos pela coluna Spherisorb ODS-2 (C18), os aminoácidos foram derivatizados com o reagente o-ftalaldeído (OPA) (MARUR et al., 1994). As amostras derivatizadas com OPA foram detectadas por fluorescência.

A partir da solução centrifugada de aminoácidos, foram utilizados para a derivatização 10 µL da solução, adicionando-se 30 µL do reagente OPA. Após exatamente 2 minutos [os derivados glicina (GLY) e lisina (LYS) são instáveis], injetou-se 10 µL da solução (aminoácidos + OPA) no aparelho de HPLC.

O reagente OPA foi preparado dissolvendo-se 50 mg de OPA em 1 mL de metanol e misturando-se a 6,5 mL de tampão borato-NaOH. Na hora do uso, adicionou-se 5 µL de 2-mercaptoetanol a 625 µL de OPA.

A eluição dos aminoácidos da coluna, no HPLC, se deu em um gradiente de 20-100% do tampão “A” (Tampão Fosfato 50 mM Na₂HPO₄·7H₂O, pH 7,5, 50 mM CH₃COONa, 1,5 mL de CH₃COOH, 20 mL de tetrahidrofurano, 20 mL de metanol num volume final de 1L) e tampão “B” (metanol 65%) num fluxo de 0,8 mL/min. O gradiente foi programado para aumentar linearmente a proporção de “B” em relação a “A”.

A detecção dos derivados aminoácidos-OPA pelo monitor de fluorescência (Shimadzu – RF350) foi feita ajustando-se o aparelho para λ de excitação de 265 nm e para λ de emissão de 480 nm. A concentração do aminoácido nas amostras foi determinada pela área dos picos integrados.

O padrão de aminoácidos no HPLC foi calibrado para a concentração de 125 nmol.mL⁻¹, para cada aminoácido detectado: aspartato, glutamato, serina, histidina, glicina, threonina, arginina, alanina, tirosina, metionina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina e lisina.

3.2.6 Extração dos aminoácidos solúveis totais

Para extração dos aminoácidos solúveis da farinha de milho, a 1 g desta farinha foi adicionado 10 mL de MCW (metanol: clorofórmio: água, na proporção 12:5:3). A mistura foi deixada overnight a 4°C e centrifugada a 9.000 g durante 20 minutos. Ao sobrenadante foi

adicionado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água para cada 4 mL de MCW utilizado. Posteriormente, este material foi centrifugado novamente retirando-se cuidadosamente a fase aquosa formada. A solução foi colocada por 1 h a 38°C e em seguida liofilizada. O pellet foi ressuspenso em 300 µL de água e a solução de aminoácidos solúveis foi filtrada em filtro Millipore em PVDF, de 0,22 µm.

3.2.7 Dosagem dos aminoácidos solúveis totais

Após a extração dos aminoácidos como descrito anteriormente, uma alíquota foi analisada para determinação de aminoácidos solúveis totais.

Uma curva padrão foi feita utilizando-se leucina nas concentrações de 40, 80, 120, 160 e 200 nmol/mL.

Para a análise das amostras, foi utilizado 1 mL da amostra de aminoácidos previamente diluída em água destilada. Tanto para a análise das amostras desconhecidas quanto para a curva padrão acrescentou-se ao tubo de ensaio 0,5 mL de 0,2 M tampão citrato de sódio pH 5,0, 0,2 mL de reativo de ninhidrina 5% em metilglicol e 1 mL de 0,0002 M KCN.

Os tubos de ensaio foram então aquecidos em banho-maria (100°C) por 20 min. Após o aquecimento, foram resfriados e adicionou-se 1,3 mL de etanol 60%.

A leitura dos aminoácidos foi realizada pela absorbância da solução em espectrofotômetro a 570 nm, sendo o teor de aminoácidos calculado em base a curva padrão.

3.3 Catabolismo do Aminoácido Lisina

Para realização do estudo das enzimas do catabolismo de lisina, foram utilizadas sementes imaturas das linhagens fornecidas pela EMBRAPA (L161, L161o e L161q), em três diferentes estágios de desenvolvimento: 14, 20 e 24 DAP.

A metodologia utilizada nos ensaios enzimáticos de LKR e SDH foi realizada conforme Gaziola (1999).

3.3.1 Preparação dos extratos celulares

As sementes imaturas armazenadas a -70°C foram maceradas e homogeneizadas na proporção de 1 g matéria fresca para 2 mL de tampão de extração. O tampão de extração foi preparado contendo: 100 mM fosfato de potássio, pH 7,0, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT

e 10% de glicerol e 0,1 mM PMSF. Os homogeneizados foram filtrados em duas camadas de gaze e centrifugados por 30 minutos a 9.000 g em rotor JA-14 da centrífuga Beckman.

3.3.2 Ensaio enzimático da enzima lisina 2-cetoglutarato redutase (LKR)

Os ensaios para atividade de LKR foram realizados mediante incubação, por 15 minutos a 30°C, de uma mistura contendo 100 mM tampão tris-HCl pH 7.4, 10 mM ácido α -cetoglutarico neutralizado com KOH, 20 mM lisina, 0,14 mM NADPH e o extrato contendo a enzima, em um volume final de 0,9 mL. Nos controles foi medida a atividade residual ocorrida pela oxidação inespecífica da NADPH sem adição do substrato lisina (branco).

A atividade da LKR foi verificada pela queda da absorbância a 340 nm por um período de 15 minutos. Para obter a atividade da enzima foi calculada a diferença entre a absorbância no tempo zero, e absorbância em 15 minutos, descontando-se os brancos. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima necessária para a oxidação de 1 nmol de NADPH.min⁻¹ a 30°C. A atividade específica da enzima foi descrita em nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

3.3.3 Ensaio enzimático da sacaropina desidrogenase (SDH)

Os ensaios para atividade de SDH foram realizados mediante incubação, por 15 minutos a 30°C de uma solução contendo 100 mM tampão tris-HCl pH 8,4, 2 mM NAD, 2 mM sacaropina e o extrato contendo a enzima, em um volume final de 0,9 mL. No ensaio controle foi medida a atividade residual ocorrida pela redução inespecífica do NAD sem adição do substrato sacaropina (branco).

A atividade da SDH foi verificada pelo aumento da absorbância a 340 nm. Para o cálculo da atividade foi utilizada a diferença entre a absorbância no tempo zero, e em 15 minutos, descontando-se os brancos. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima necessária para a redução de 1 nmol de NAD.min⁻¹ a 30°C. A atividade específica da enzima foi descritas em nmoles de NAD oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

3.4 Homoserina Quinase (HK)

3.4.1 Extração enzimática

Os extratos celulares foram preparados a partir de sementes imaturas de milho previamente congeladas em freezer a -70°C . As sementes foram homogeneizadas em tampão de extração específico para HK, na proporção de 1:2 (m/v). Os homogeneizados foram filtrados em duas camadas de gaze e centrifugados por 30 minutos a 9.000 g em rotor JA-14 da centrífuga Beckman, modelo J2-MC. Após a centrifugação os resíduos precipitados foram desprezados, e a fase líquida dos extratos, submetidas a precipitação com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sendo os precipitados obtidos congelados a -70°C para posteriores análises enzimáticas.

O tampão de extração da HK foi feito de acordo com Brennecke et al. (1996), em uma solução tampão 100 mM tris-HCl (pH: 7,5), contendo 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, 10% glicerol (ROGNES, 1990).

3.4.2 Precipitação com sulfato de amônio

Para a realização destes testes foram utilizadas espigas imaturas de milho (20 DAP).

Para a determinação de qual faixa de saturação com o sal poderia ser encontrada a maior atividade da enzima, foram feitas extrações idênticas do material, utilizando-se 5 g por preparação. O extrato bruto de cada preparação foi então precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em quantidades crescentes até 70% de saturação, sendo um deles tratado de 0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80% e outro de 0-30%, 30-50% e 50-70%, outro de 0-40%, 30-60%, seguindo as faixas de precipitação encontradas na literatura (THOEN et al., 1978). Os precipitados obtidos de cada fracionamento foram ressuspensos em tampão 100 mM tris-HCl 8,5 e dessalinizados utilizando tubos Amicon de 10.000 MW. Cada fração foi testada para a atividade da HK e para determinação de proteína. Com os resultados obtidos determinou-se a atividade específica de HK para cada uma das frações. Cada experimento foi repetido por três vezes.

3.4.3 Ensaio da HK

Este estudo foi realizado utilizando-se espigas imaturas (14, 20 e 24 DAP) das três linhagens 161 de milho, e foi também realizado com o selvagem W22+ e seus mutantes W22o10, W22o11 e W22o13.

O ensaio utilizado para medir a atividade da enzima HK é baseado na oxidação do NADH (LEE; LEUSTEK, 1999). Neste ensaio, o NADH é oxidado a NAD. O NAD formado pode então ser medido por espectrofotometria a 340 nm por uma diminuição da absorbância, fornecendo indiretamente a atividade da enzima. Para cada amostra analisada foi feito um Branco.

O tampão de extração da HK foi feito segundo Lee e Leustek (1999), em uma solução tampão 100 mM tris-HCl (pH 8,5), contendo 0,5 mM NADH, 10 mM MgSO_4 , 1,2 mM fosfoenolpiruvato, 7 mM KCl, 3 mM ATP, 10 unidades de piruvato quinase, 15 unidades de lactato desidrogenase, 3 mM L-homoserina.

O extrato foi misturado a solução de reação, sem homoserina, e incubado a 37°C por 5 minutos, em seguida a homoserina foi adicionada ao ensaio e a absorbância da reação foi feita em 340 nm nos tempos 0 e 2 minutos.

Para o branco da reação não foi adicionado a homoserina, utilizando-se o tampão 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) completar o volume da reação. A atividade da enzima foi quantificada pelo NAD^+ formado.

Para calcular a atividade da HK foi levada em consideração a diferença entre a absorbância obtida no tempo inicial e no tempo final de incubação. Para cada amostra o ensaio foi feito em triplicata e a média das absorbâncias obtidas foi utilizada para o cálculo da atividade da enzima. Cada nmol de NAD^+ formado significa um aumento de 0,00622 na absorbância a 340 nm. O número de nmol de NAD^+ oxidado foi calculado pela diferença de absorbância obtida no ensaio de cada amostra e então dividido pelo tempo de ensaio em minutos para obter a quantidade de nmol de NAD formado por minuto. Este valor foi transformado em mL para a razão de nmol $\text{NAD} \cdot \text{minuto}^{-1} \cdot \text{mL}$. Este valor foi dividido pela concentração de proteína da amostra, obtendo-se a atividade específica da enzima em $\text{nmol NADH min}^{-1} \text{mL}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$.

3.4.4 Regulação do ensaio da HK

Para este estudo foram utilizadas espigas de milho imaturas (20 DAP). A enzima HK de sementes imaturas de milho foi estudada utilizando-se diversos compostos moduladores que são conhecidos por regular as atividades de outras enzimas da mesma via metabólica: lisina, treonina, metionina, isoleucina e SAM nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,0 e 5,0 mM.

Cada agente regulador foi adicionado ao ensaio (LEE; LEUSTEK, 1999), mantendo-se os outros componentes da reação constantes.

3.4.5 Purificação parcial da HK

O procedimento de extração e purificação foi realizado a 4°C de acordo com Riesmeier (1993) com algumas modificações. Para o ensaio enzimático foram utilizadas sementes imaturas de milho com 20 DAP. Os extratos foram filtrados em duas camadas de gaze e centrifugados a 9.000 g por 30 minutos para remover completamente compostos indesejáveis, tais como parede e membrana celulares do extrato. Sulfato de amônio sólido foi adicionado cuidadosamente na concentração de 30-60% de saturação, vagarosamente agitado por 40 minutos e o precipitado protéico recuperado por centrifugação a 9.000 g por 30 minutos. Os pellets obtidos foram dissolvidos em tampão B. A amostra foi eluída sob gravidade através da coluna Sephadex G-25, previamente equilibrada com 5 volumes de coluna de tampão B (100 mM tris-HCl, pH 8,5 contendo, 15% glicerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA e 1 mM homoserina). As amostras dessalinizadas foram utilizadas para os procedimentos de purificação posteriores.

Para este estudo foram utilizadas espigas imaturas (20 DAP) de milho.

3.4.5.1 Cromatografia de troca iônica do tipo *step-wise*

O extrato vegetal, precipitado na faixa de 30-60% de saturação com sulfato de amônio, previamente dessalinizado, foi utilizado para purificar parcialmente a enzima HK. Para a purificação parcial foi usada a coluna DEAE-Sephacel (2,5 x 8,0 cm; fluxo 1 mL.min⁻¹) equilibrada em tampão B. Após o equilíbrio da coluna, uma eluição do tipo *step-wise* foi realizada com 100, 200, 300, 400 e 500 mM KCl.

3.4.5.2 Cromatografia de troca iônica do tipo gradiente linear

A HK foi extraída a partir de 110 g de sementes imaturas de milho (24 DAP), precipitadas com sulfato de amônio para uma saturação de 30-60% e dessalinizada em coluna de Sephadex G-25 (2,5 x 20 cm).

Após a saída de toda a fração não ligante, o gradiente foi iniciado empregando-se um sistema de dois reservatórios interligados (gerador de gradiente), um contendo 108 mL de tampão de eluição sem KCl e o outro contendo 108 mL do mesmo tampão acrescido de 500 mM KCl. O fluxo de eluição foi de 1 mL.min⁻¹. As frações começaram a ser coletadas, com ajuda de coletor de frações automático (LKB-Pharmacia), num total de 72 frações de 3 mL cada, coletadas e mantidas em gelo.

As frações foram testadas para a atividade de HK, de acordo com a metodologia previamente descrita (LEE; LEUSTEK, 1999).

3.5 Eletroforese Bidimensional

3.5.1 Extração de proteínas totais

Para a extração ácida das proteínas totais de milho maduro foi utilizada a metodologia descrita por Xu et al. (2008).

A farinha obtida a partir das sementes de milho (0,5 g) foi misturada a 4 mL de tampão tris contendo 40 mM tris-base, 5 M uréia, 2 M thiouréia, 2% CHAPS e 2% mercaptoetanol. A mistura foi homogeneizada em “vortex” durante 5 minutos e foi centrifugada a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. A proteína presente no sobrenadante foi precipitada adicionando quatro vezes o volume de acetona gelada contendo 0,07% mercaptoetanol em seguida foi incubada a -20°C durante 2 horas. Após as 2 horas o material foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O processo de lavagem foi repetido duas vezes. O pellet resultante foi submetido à secagem em dessecador a -4°C por 24 horas. As proteínas do pellet foram ressuspensas em tampão de solubilização.

Os pellets obtidos a partir do tampão tris, foram solubilizados em tampão de solubilização contendo 7 M uréia, 2 M thiouréia, 4% CHAPS, 0,8% triton X-100 e 100 mM DTT. Para aumentar a solubilização das proteínas foi realizada uma sonicação do pellet durante 30 minutos.

3.5.2 Primeira dimensão: Focalização Isoelétrica

A primeira dimensão, focalização isoeletrica (IEF) foi conduzida em fitas “Immobiline DryStrip” (GE Healthcare) no aparelho Ettan IPGphor 3, no qual programa-se a voltagem desejada e o período de focalização. As fitas, de 17 cm, que apresentam gel de poliacrilamida desidratado com um gradiente de pH imobilizado, foram colocadas em sarcófagos de cerâmica e, na presença das proteínas, foram reidratadas e em seguida foram submetidas à IEF.

As proteínas de interesse foram avaliadas em fitas de pH 3-10 não-linear (NL), utilizando-se uma concentração de 500 µg de proteína em 375 µL.

As amostras foram misturadas ao tampão de solubilização (7 M uréia, 2 M tiouréia, 4% CHAPS, 0,8% triton X-100, 100 mM DTT). Foi adicionado 1,0% IPG buffer e 0,5% de azul de

bromofenol, em um volume final de 375 μ L. As fitas foram reidratadas durante 3 horas a 20°C seguidas da IEF a 20°C com 75 μ A/fita, com uma focalização programada para:

S1 = 30 V/18 h;

S2 = 150 V/1 h;

S3 = 350 V/1 h;

S4 = 500 V/1 h;

S5 = 1000 V/1 h;

S6 = 3000 V/2 h;

S7 = 5000 V/19 h.

O total de focalização após 46 horas foi de 82.000 V. Após a IEF, as fitas foram lavadas com água MilliQ e armazenadas a -70°C.

3.5.3 Segunda dimensão: SDS-PAGE

Após a IEF, as fitas foram equilibradas (BELLATO et al., 2004), em:

Solução de Equilíbrio 1: (3 mL/fita): 50 mM tris-HCl pH 8,4, 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS e 2% DTT sob temperatura ambiente durante 12 minutos, seguida de:

Solução de Equilíbrio 2: (3 mL/fita): 50 mM tris-HCl pH 8,4, 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 2,5% iodoacetamida e 400 μ L de 0,5% BPB sob temperatura ambiente durante 10 minutos.

A segunda dimensão foi realizada em gel 12,5% PAGE. A eletroforese foi conduzida a 4°C com 15 mA durante 30 minutos em seguida 30 mA durante 6 horas, em tampão de corrida contendo 0,3% tris base, 1,44% glicina e 0,1% SDS.

A coloração dos géis foi feita com coomassie blue G-250 (CB-G) (CANDIANO et al., 2004).

3.5.4 Fotodocumentação e Análise dos géis

Os géis obtidos foram escaneados utilizando o programa LabScanTM v. 5.0 (Amersham Biosciences) e posteriormente armazenados em refratários contendo solução de 50% glicerol e 15% metanol.

A análise dos *spots* diferenciados nos géis, foi feita utilizando-se o programa Image MasterTM 2D Platinum v. 5.0 (Amersham Biosciences). A expressão foi considerada diferenciada

quando o spot detectado era exclusivo (não houve expressão do respectivo no perfil da linhagem 161n), ou apresentou um volume 1,5 vezes maior que o respectivo no perfil da L161n.

A área, densidade e volume de cada spot protéico de cada linhagem foram analisados. A intensidade dos *spots* (volume), ou seja, a densidade ótica de cada spot foi normalizada como a percentagem do volume total do spot, e utilizado para quantificar os *spots* protéicos dos géis corridos e processados em paralelo para cada linhagem.

4 RESULTADOS

O material vegetal utilizado neste estudo foram as linhagens 161, cedidas pela EMBRAPA Milho e Sorgo. Estas linhagens: 161n (normal), 161o (opaco) e 161q (QPM), representam um estudo realizado pela EMBRAPA, com o intuito de se obter uma linhagem de milho QPM com melhores qualidades agronômicas a partir de uma nova metodologia de melhoramento vegetal.

Assim, todo o estudo realizado, foi com o objetivo de se obter um maior número de dados sobre estas linhagens a fim de poder caracterizar melhor milho QPM aumentando o conhecimento sobre o funcionamento da via metabólica do aspartato, e seu mecanismo que leva a L161q a ser considerado um milho de alta qualidade protéica.

4.1 Proteínas de Reserva

Sendo o endosperma o tecido de reserva de diversos nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião, entre eles as proteínas de reserva, foram caracterizadas suas frações protéicas com o objetivo de analisar as diferenças de acúmulo de proteína entre as linhagens.

A Figura 6 apresenta os valores obtidos de cada fração protéica (mg proteína.g⁻¹MS) e detalha as diferenças entre as frações protéicas de cada linhagem. Para o estudo das proteínas de reserva, as frações globulina e albumina (E1,2) foram estudadas juntas, assim como as zeínas I e II (E3,4).

Figura 6 - Gráfico apresenta a quantificação das proteínas de reserva nas sementes secas, mostrando as diferenças entre as linhagens 161 estudadas. E1,2- Frações globulina e albumina; E3,4: Frações zeína I e zeína II e E5: Fração glutelina

Levando em conta o total de proteínas de reserva, ao se analisar a Figura 6, nota-se que as linhagens 161n e 161o apresentaram uma concentração maior de proteínas quando comparadas com a L161q, chegando a um aumento de 13,5 e 25,3%, respectivamente. As frações protéicas zeínas e glutelina foram as que apresentaram as maiores concentrações.

Para a fração globulina+albumina a linhagem L161q apresentou um aumento de 19,9% com relação a L161n, a linhagem 161o apresentou uma concentração maior que a L161q com relação a esta mesma fração, com um aumento de 5,1%. Comparando-se as linhagens 161o com a L161n, observou-se um aumento na concentração da fração globulina de 26,1%.

Para a fração zeína nota-se uma grande diferença entre as três linhagens, com as linhagens 161o e 161q apresentando concentrações próximas. A L161n apresentou a maior concentração de zeína com um aumento de 185,4% quando comparada à L161o, que apresentou a menor concentração para esta fração. Com relação à concentração de zeína na linhagem 161q quando comparada com a L161o, houve um aumento de 26,4%.

A linhagem 161o apresentou os maiores valores para a fração glutelina, com aumentos de 85,4% e 31,5%, com relação as linhagens 161n e 161q, respectivamente. Comparando-se a linhagem 161q com a L161n, ocorreu um aumento de 41,0% na concentração desta fração na L161q.

A fração zeína, junto com a fração glutelina, foram as de maior contraste entre as linhagens. A fração zeína representou 47,0% do valor total das proteínas de reserva da L161n. No caso das linhagens 161o e 161q, a fração glutelina foi a de maior concentração, com 64,4 e 61,4% do total de proteínas de reserva. A fração globulina+albumina, foi a de menor concentração nas três linhagens estudadas, apresentando pouca variação, 14,7, 16,7 e 20% do total de proteínas das linhagens 161n, 161o e 161q, respectivamente.

4.1.1 Perfil SDS-PAGE das frações protéicas

Após determinar as concentrações de cada fração protéica do endosperma, as mesmas tiveram seu perfil protéico analisado através de gel SDS-PAGE, para isto foram utilizados 30 µg de proteína de cada fração.

Foram observadas diferenças no perfil das proteínas entre as três linhagens para ausência, presença e intensidade de bandas.

Os perfis protéicos das frações globulina, glutelina e albumina podem ser observados na Figura 7. As três frações protéicas aqui apresentadas possuem perfis diferenciados quando comparadas entre as linhagens, sendo que as linhagens 161o e 161q apresentaram maior número de bandas, assim como mais intensas.

Figura 7 - Perfil de proteína em gel de SDS-PAGE. Padrão (P) BSA; 1,2 e 3 representam a fração globulina nas respectivas linhagens: 161n, 161o e 161q; 4, 5 e 6 representam a fração glutelina e 7, 8 e 9 a fração albumina, para as mesmas linhagens

Na fração globulina, pode-se notar que as linhagens 161o e 161q apresentam a maioria das bandas mais intensas que a L161n, sendo que a banda de 50 kDa está ausente na linhagem 161n e mais intensa na L161q.

A linhagem 161n apresenta bandas com menor intensidade quando comparada com as linhagens 161o e 161n, na fração glutelina, porém a banda de 25 kDa está ausente nas outras duas linhagens.

A fração albumina é a fração mais constante entre as três linhagens, apresentando apenas ausência de bandas, como a banda de 100 kDa que está presente nas linhagens 161o e 161q e ausente na L161n.

A Figura 8 apresenta o gel SDS-PAGE da fração protéica zeína, das três diferentes linhagens. A fração zeína é bem descrita na literatura e não apresenta a banda de 22 kDa como resultado da mutação *opaco-2* (ARRUDA et al., 2000), o que leva a um aumento no conteúdo do aminoácido lisina em milho (WANG; LARKINS, 2001).

Figura 8 - Perfil de proteína em gel de SDS-PAGE. Padrão (P) BSA; 1,2 e 3 representam a fração zeína nas respectivas linhagens: 161n, 161o e 161q

A linhagem 161 normal apresenta todas as bandas protéicas da fração zeína, inclusive a de 22 kDa, sendo que a banda de 27 kDa é menos expressiva assim como as de 14 e 10 kDa. A linhagem 161o apresenta a banda de 22 kDa apenas em traços e tem um aumento expressivo nas bandas de 27, 14 e 10 kDa, a linhagem 161q se comporta igual à L161o. Há apenas uma diferença entre as linhagens 161o e 161q, as bandas de 19 e 16 kDa, são mais intensas na L161q quando comparadas com as da L161o.

4.2 Análise dos aminoácidos

4.2.1 Análise dos aminoácidos das frações protéicas

Após um estudo completo das proteínas de reserva das linhagens 161 fornecidas pela EMBRAPA, foram quantificados os aminoácidos solúveis de cada linhagem assim como os aminoácidos do hidrolisado protéico de cada fração.

A Tabela 2 traz a concentração de cada aminoácido (mol%) presente no hidrolisado protéico das frações globulina, albumina e glutelina de cada linhagem.

Tabela 2 - Composição de aminoácidos (mol% ± desvio padrão) do hidrolisado protéico, obtido a partir de cada fração protéica: globulina, albumina e glutelina

	Globulina			Albumina			Glutelina		
	L161n	L161o	L161q	L161n	L161o	L161q	L161n	L161o	L161q
Asp	14,58 ± 0,71	19,97 ± 0,74	24,06 ± 0,33	30,34 ± 0,62	35,31 ± 1,96	38,84 ± 1,84	10,27 ± 0,05	12,45 ± 0,08	10,57 ± 0,09
Glu	15,49 ± 0,55	19,38 ± 0,61	22,40 ± 5,15	17,78 ± 0,73	18,61 ± 0,38	21,66 ± 2,01	19,51 ± 0,65	15,28 ± 0,31	17,40 ± 1,37
Ser	7,33 ± 0,37	8,28 ± 0,07	6,39 ± 0,91	4,42 ± 0,75	6,22 ± 0,14	5,67 ± 0,15	9,36 ± 0,24	7,54 ± 0,10	9,42 ± 0,92
His	2,40 ± 0,26	2,19 ± 0,02	1,74 ± 0,07	0,37 ± 0,53	1,54 ± 0,01	0,02 ± 0,02	2,43 ± 0,21	2,76 ± 0,27	3,07 ± 0,04
Gly/Thr	19,59 ± 1,46	7,17 ± 0,66	7,08 ± 0,38	8,62 ± 0,74	5,88 ± 0,32	7,07 ± 0,24	8,07 ± 0,07	10,04 ± 0,46	9,20 ± 0,95
Arg	7,57 ± 0,32	8,32 ± 0,04	6,99 ± 0,73	4,57 ± 0,53	6,25 ± 0,25	6,32 ± 0,11	3,15 ± 0,08	4,92 ± 0,15	3,85 ± 0,50
Ala	13,96 ± 0,80	11,44 ± 0,39	12,43 ± 1,37	12,75 ± 1,07	9,42 ± 0,06	7,77 ± 0,37	18,23 ± 0,55	18,69 ± 0,47	18,16 ± 1,47
Tyr	2,20 ± 0,26	3,23 ± 0,15	3,58 ± 0,23	3,35 ± 0,15	3,94 ± 0,17	3,03 ± 1,01	3,29 ± 0,05	3,12 ± 0,10	3,90 ± 0,03
Met	0,45 ± 0,07	1,34 ± 0,04	0,81 ± 0,15	3,11 ± 0,04	0,26 ± 0,04	1,93 ± 0,37	0,51 ± 0,11	0,53 ± 0,08	0,75 ± 0,02
Val	2,98 ± 0,22	3,69 ± 0,16	2,59 ± 0,39	2,45 ± 0,87	2,37 ± 0,42	2,04 ± 0,41	3,32 ± 0,13	3,63 ± 0,09	4,67 ± 0,14
Phe	3,68 ± 0,65	3,73 ± 0,35	2,87 ± 0,10	1,57 ± 0,69	1,75 ± 0,17	0,00 ± 0,00	5,35 ± 0,54	5,01 ± 0,33	4,00 ± 0,06
Ile	1,31 ± 0,04	1,93 ± 0,08	1,92 ± 0,30	3,65 ± 0,37	0,99 ± 0,02	0,92 ± 0,15	1,61 ± 0,25	1,72 ± 0,11	2,09 ± 0,20
Leu	4,80 ± 0,00	5,09 ± 0,22	4,11 ± 0,45	3,04 ± 1,58	3,15 ± 0,50	3,22 ± 0,48	12,61 ± 0,25	9,82 ± 0,02	10,51 ± 0,52
Lys	3,66 ± 0,97	4,24 ± 0,27	3,04 ± 0,27	3,97 ± 0,17	4,32 ± 0,62	1,53 ± 0,75	2,27 ± 0,27	4,48 ± 0,85	2,42 ± 0,03

Na fração globulina observou-se uma concentração maior do aminoácido aspartato (Asp), em contrapartida, o aminoácido metionina (Met) apresentou a menor concentração. Para esta fração a linhagem 161o foi a que apresentou maior concentração de aminoácidos, sendo a L161q a de menor concentração.

Na fração albumina o aspartato foi o de maior concentração e o aminoácido fenilalanina (Phe) a menor concentração. Nesta fração as três linhagens diferem, sendo a linhagem 161n a de maior concentração e a L161q a de menor concentração no total de aminoácidos.

A linhagem 161q apresenta a maior concentração total de aminoácidos dentro da fração glutelina, enquanto, a L161n a de menor concentração. A fração glutelina tem o aminoácido glutamato (Glu) e o aminoácido metionina com a maior e a menor concentração, respectivamente.

A Tabela 3 apresenta a concentração de cada aminoácido (mol%) presente no hidrolisado protéico das frações zeína I e zeína II, de cada linhagem.

Tabela 3 - Composição de aminoácidos (mol% $\pm$ desvio padrão) do hidrolisado protéico, obtido a partir de cada fração protéica: zeína I e zeína II

	Zeína I			Zeína II		
	L161n	L161o	L161q	L161n	L161o	L161q
Asp	8,59 $\pm$ 0,18	6,87 $\pm$ 0,07	8,89 $\pm$ 0,24	12,00 $\pm$ 0,93	6,78 $\pm$ 0,10	6,18 $\pm$ 0,20
Glu	12,99 $\pm$ 0,44	10,23 $\pm$ 0,35	26,11 $\pm$ 0,09	39,12 $\pm$ 0,34	14,74 $\pm$ 0,03	15,55 $\pm$ 0,17
Ser	11,38 $\pm$ 0,22	8,11 $\pm$ 0,01	8,42 $\pm$ 1,53	6,54 $\pm$ 0,73	10,53 $\pm$ 0,21	7,55 $\pm$ 0,18
His	2,05 $\pm$ 0,48	1,45 $\pm$ 0,32	1,43 $\pm$ 0,14	3,83 $\pm$ 0,18	10,15 $\pm$ 0,51	5,92 $\pm$ 0,25
Gly/Thr	5,30 $\pm$ 0,10	10,13 $\pm$ 0,25	7,61 $\pm$ 0,38	12,47 $\pm$ 0,70	8,32 $\pm$ 0,44	9,12 $\pm$ 0,35
Arg	2,71 $\pm$ 0,77	3,83 $\pm$ 0,01	2,41 $\pm$ 0,34	2,47 $\pm$ 0,33	7,78 $\pm$ 0,71	6,91 $\pm$ 0,07
Ala	15,19 $\pm$ 0,68	27,12 $\pm$ 0,38	12,81 $\pm$ 1,83	8,46 $\pm$ 0,29	11,83 $\pm$ 0,14	11,33 $\pm$ 0,20
Tyr	6,79 $\pm$ 0,48	4,31 $\pm$ 0,37	4,36 $\pm$ 0,68	2,31 $\pm$ 0,43	4,76 $\pm$ 0,29	4,25 $\pm$ 0,16
Met	1,52 $\pm$ 0,40	3,53 $\pm$ 0,08	2,07 $\pm$ 0,41	0,77 $\pm$ 0,22	1,25 $\pm$ 0,12	2,71 $\pm$ 0,01
Val	5,60 $\pm$ 0,28	3,49 $\pm$ 0,25	2,39 $\pm$ 0,17	2,23 $\pm$ 0,18	4,47 $\pm$ 0,48	3,85 $\pm$ 0,16
Phe	9,97 $\pm$ 0,05	8,47 $\pm$ 0,06	3,28 $\pm$ 1,27	2,48 $\pm$ 0,29	4,10 $\pm$ 0,36	5,93 $\pm$ 0,28
Ile	5,22 $\pm$ 0,20	1,63 $\pm$ 0,07	3,80 $\pm$ 1,38	5,76 $\pm$ 1,08	2,54 $\pm$ 0,00	2,16 $\pm$ 0,03
Leu	12,67 $\pm$ 0,31	9,22 $\pm$ 0,16	16,36 $\pm$ 0,85	1,05 $\pm$ 0,44	10,53 $\pm$ 0,50	10,10 $\pm$ 0,42
Lys	0,00 $\pm$ 0,00	1,60 $\pm$ 0,14	0,07 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,34	2,23 $\pm$ 0,14	8,46 $\pm$ 0,16

Na fração zeína I as três linhagens diferem entre si em relação à concentração total de aminoácidos do hidrolisado protéico, sendo que a L161n apresenta a maior concentração de aminoácidos e a L161q a menor. O aminoácido alanina (Ala) é o aminoácido de maior e o aminoácido lisina (Lys) o de menor concentração. A L161n não apresentou acúmulo de lisina nesta fração protéica. As linhagens 161 apresentaram baixos teores de lisina na fração zeína I, quando comparada com as outras frações.

Na fração zeína II, a linhagem 161q apresentou maiores concentração e a L161n apresentou a menor concentração total de aminoácidos. Os teores de lisina na fração zeína II são maiores quando comparados à fração Zeína I. A maior concentração de lisina está na fração zeína II da L161q.

Comparando as cinco frações (Tabelas 2 e 3) em relação aos quatro aminoácidos essenciais sintetizados pela via do aspartato, observou-se que treonina (Thr), neste caso quantificada junto com o aminoácido glicina (Gly), está mais concentrada na fração globulina da linhagem 161n, e menos concentrada na fração zeína I da linhagem 161n. Com relação ao aminoácido metionina, a maior concentração está na fração zeína I da L161o e a menor concentração na fração albumina da L161o. Para o aminoácido isoleucina (Ile) o maior acúmulo está na fração zeína II da L161n e o menor na albumina da L161q. Por fim, o aminoácido lisina apresentou uma maior concentração na zeína II da linhagem 161q e a menor concentração na zeína I da L161n.

Com relação ao total de aminoácidos presentes nas cinco frações protéicas, sintetizados pela via metabólica do aspartato, a linhagem 161n acumulou mais treonina (54,06 mol%), a L161q acumulou mais metionina (8,26 mol%) e a L161o mais isoleucina, com 17,54 mol%. A lisina se concentrou mais na L161o, com 16,86 mol%.

4.2.2 Aminoácidos solúveis na farinha de milho

Com relação aos aminoácidos solúveis presentes na farinha de milho a Figura 9 mostra que há uma grande diferença entre as linhagens estudadas. A L161o acumulou a maior concentração destes aminoácidos, alcançando mais de 50% quando comparada à L161n que apresentou uma menor concentração de aminoácidos solúveis.

Figura 9 - Gráfico representando a concentração de aminoácidos solúveis, obtidos a partir de farinha de sementes maduras das linhagens 161 estudadas

A concentração de proteína total foi determinada pelo Laboratório de Nutrição Mineral da ESALQ/USP. Para esta análise foi enviado 100 mg de farinha de milho, obtida através da maceração das sementes. No Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, foi quantificado o teor de nitrogênio orgânico (N) em cada amostra, pelo método de Kjeldahl. O teor de proteína total de cada amostra foi obtido multiplicando-se o teor de N de cada amostra pelo fator de conversão (6,25) no caso do milho (OLIVEIRA et al., 2004). Estes dados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Determinação da concentração de nitrogênio (N) total (g.Kg⁻¹ ± desvio padrão), concentração de proteína total (% ± desvio padrão) e concentração do aminoácido lisina (% ± desvio padrão) em farinha de sementes maduras das linhagens de milho estudadas

	N	Proteína	Lys
L161n	14,98 ± 0,20	9,36 ± 0,12	0,15 ± 0,01
L161o	16,17 ± 0,89	10,11 ± 0,56	0,22 ± 0,009
L161q	18,20 ± 0,59	11,37 ± 0,37	0,24 ± 0,014

A Tabela 4 apresenta a variação de proteína total nas três linhagens. A linhagem 161q foi a que apresentou maior concentração de proteína e do aminoácido lisina. A L161n acumulou um teor menor de N, proteína total e lisina. Apesar da linhagem 161o apresentar a maior

concentração de aminoácidos solúveis totais, a concentração de lisina nesta linhagem é menor que o da L161q.

4.3 Catabolismo de Lisina

Para a compreensão da via metabólica do aspartato as enzimas chaves AK, HSDH, DHDPS, LKR e SDH têm sido estudadas e caracterizadas em diversas espécies vegetais (AZEVEDO et al., 2006).

As enzimas envolvidas com via de degradação da lisina (LKR e SDH) foram estudadas nas linhagens de milho 161. Para este estudo foram utilizadas sementes em desenvolvimento com 14, 20 e 24 dias após a polinização (DAP). A Figura 10 representa a atividade destas enzimas.

Figura 10 - Atividade específica das enzimas do catabolismo de lisina: lisina 2-oxoglutarato redutase (LKR) (nmol NADPH.min⁻¹.mL⁻¹.mg⁻¹ proteína) e sacaropina desidrogenase (SDH) (nmol NAD.min⁻¹.mL⁻¹.mg⁻¹ proteína) em cada linhagem de milho estudada, em três estágios de desenvolvimento (14, 20 e 24 DAP)

A Figura 10 mostrou que apenas a linhagem 161n, apresentou uma atividade crescente das duas enzimas conforme o desenvolvimento das sementes, com maiores atividades com 20 e 24 DAP. Em contrapartida este comportamento não pode ser observado nas outras duas linhagens. A L161o apresentou alta atividade com 14 DAP, mas atividades muito baixas e decrescentes com 20 e 24 DAP para a enzima LKR. A enzima SDH não apresenta o mesmo comportamento, diminuindo a atividade com 20 DAP, mas aumentando com 24 DAP. Na L161q as atividades da

LKR e SDH não mantiveram um padrão, mas apresentaram-se ainda menores quando comparadas a L161n e L161o.

A atividade enzimática da LKR e da SDH se apresentou muito baixa na linhagem 161q nas três datas de desenvolvimento e na L161o com 20 e 24 DAP.

A Figura 10 apresenta a enzima LKR com a maior atividade de todo o estudo na L161o com 14 DAP, a enzima SDH também apresentou uma alta atividade neste estágio para a mesma linhagem. Com 20 DAP foi verificada para a linhagem 161o uma atividade três vezes maior que com 24 DAP, com relação à enzima LKR.

As atividades das enzimas observadas com 20 DAP, para as linhagens 161o e 161q, mantêm um padrão, com a atividade de LKR quatro vezes maior que a atividade de SDH, LKR, com 24 DAP ocorre uma inversão nestas duas linhagens, com a atividade SDH superando a atividade da LKR.

4.4 Homoserina Quinase (HK)

A proposta original era o estudo da enzima TS, que está envolvida na via metabólica do aspartato, a qual catalisa o último passo de formação do aminoácido treonina, convertendo o substrato OPH em treonina e fosfato inorgânico (MAS-DROUX et al., 2006; RINDER et al., 2008; COVARRUBIAS et al., 2008). Porém para a realização do ensaio enzimático da TS era necessário o substrato OPH, o que se tornou inacessível, devido ao seu alto custo. Assim, ficou decidido o estabelecimento de um estudo completo da enzima HK, a qual antecede a enzima TS na mesma via metabólica, para que, posteriormente, pudesse ser estabelecido o ensaio enzimático sugerido por Shames et al. (1984), onde a atividade da enzima TS é obtida utilizando-se a HK purificada.

Como a enzima HK ainda é pouco estudada em plantas e no caso do milho, não há literatura sobre a mesma, foi necessário realizar uma série de ensaios sobre a cinética da enzima em milho, para isso foi utilizado o ensaio descrito por Lee e Leustek (1999) para *Arabidopsis thaliana* como ponto inicial.

Primeiramente foram realizados diferentes fracionamentos utilizando sementes imaturas de milho (20 DAP) e porcentagens variadas de sulfato de amônio para poder estabelecer qual a faixa de precipitação mais adequada para a recuperação da enzima HK. Os resultados obtidos podem ser observados nas Figuras 11, 12 e 13. A realização do fracionamento utilizando seis

diferentes faixas de saturação que se sobrepunham permitiu a definição da faixa de saturação com sulfato de amônio na qual se concentrava a atividade da enzima.

Figura 11 - Gráfico representando a relação entre a atividade relativa da enzima homoserina quinase em sementes imaturas (20 DAP) de linhagem normal de milho e as diferentes faixas de precipitação com sulfato de amônio (%) utilizadas

Figura 12 - Gráfico representando a relação entre a atividade relativa da enzima homoserina quinase em sementes imaturas (20 DAP) de linhagem normal de milho e as diferentes faixas de precipitação com sulfato de amônio (%) utilizadas

Figura 13 - Gráfico representando a relação entre a atividade relativa da enzima homoserina quinase em sementes imaturas (20 DAP) de linhagem normal de milho e as diferentes faixas de precipitação com sulfato de amônio (%) utilizadas

Como pode ser observado nas Figuras 11 e 12 a atividade da HK se concentrou principalmente entre as faixas de saturação com sulfato de amônio acima de 40%. Os ensaios feitos com as amostras obtidas do fracionamento realizado com as faixas de saturação de 0-20, 20-40 e 40-60% indicaram que a maior absorbância relativa à atividade enzimática obtida neste fracionamento pode ser detectada entre 40-60% de saturação (Figura 11) e para o fracionamento feito com as faixas de 0-30, 30-50 e 50-70%, os resultados indicaram uma maior atividade relativa de HK presente entre 50-70% de saturação (Figura 12). Deste modo, incluímos uma terceira faixa de precipitação com sulfato de amônio entre 30-60% (Figura 13) a fim de determinar precisamente a faixa de saturação onde podemos encontrar a maior atividade de HK. De acordo com os resultados obtidos, o uso de sulfato de amônio na faixa de 30-60%, permite a precipitação da enzima em questão, concentrando a atividade enzimática nesta faixa de saturação.

Diversos testes de tempo de reação foram realizados para estabelecer o tempo no qual a reação mantém a absorbância constante com uma maior atividade enzimática de HK em sementes de milho. Desta forma foram realizados testes de minuto em minuto, até o limite de 15 minutos (Figura 14). Pela Figura 14 pode-se observar que a atividade da enzima vai decaindo conforme aumenta o tempo da reação, com 2 minutos de reação a enzima apresenta uma atividade relativa

máxima, isto é justificável pelo fato de a reação utilizar o NADH como co-fator doador de elétrons, o qual é oxidado nos primeiros minutos da reação.

Figura 14 - Gráfico representando o efeito do tempo (minutos) de reação na atividade relativa da enzima homoserina quinase e sementes imaturas (20 DAP) de linhagem normal de milho

Com o objetivo de aprimorar as metodologias do ensaio enzimático de HK já estabelecidas para plantas e microorganismos, foi utilizado como um fator variável o volume de amostra a ser usado no ensaio.

Não há na literatura um volume pré-definido de extrato. Miyajima e Shiio (1972) obtiveram uma atividade linear de HK utilizando concentrações crescentes de proteína ($\mu\text{g/mL}$) até $120 \mu\text{g/mL}$, assim foram testados três diferentes volumes de extrato: 5 ($59,71 \mu\text{g/mL}$), 10 ($119,43 \mu\text{g/mL}$) e 15 μL ($179,14 \mu\text{g/mL}$), como mostrado na Figura 15.

Figura 15 - Gráfico representando o efeito de três diferentes volumes (μL) de extrato de milho utilizados na reação sobre a atividade relativa da enzima homoserina quinase, em sementes imaturas (20 DAP) linhagem normal de milho

Como pode ser observado na Figura 15, a maior atividade foi com a adição de 5 μL de amostra no ensaio enzimático, este volume também gera uma curva de atividade da enzima HK mais constante. Pode-se observar que o aumento no volume do extrato, leva a alta redução da atividade enzimática, o que pode ser explicado pela cinética da enzima, uma vez que havendo um aumento excessivo na concentração da enzima, há um aumento momentâneo na velocidade da reação da mesma, fazendo com que ocorra uma oxidação muito rápida do NADH, ao se consumir a maior parte do substrato em menor tempo. Com a rápida diminuição do substrato, ocorre a diminuição da atividade enzimática pela ausência do substrato e também do cofator. Portanto, o volume de extrato protéico ideal para o ensaio pré-determinado da enzima HK foi de 5 μL .

Para estabelecer a ação do substrato homoserina sobre o comportamento da enzima HK, foi determinada a atividade da enzima em relação a tratamentos com diferentes concentrações (1, 3, 5 e 7 mM) de homoserina, substrato utilizado pela HK (Figura 16)

Figura 16 - Gráfico representando a variação da atividade específica da enzima homoserina quinase conforme varia a concentração (mM) do substrato homoserina. Para este ensaio foi utilizado o mesmo extrato de sementes imaturas (20 DAP) de linhagem normal de milho, em cinco reações com diferentes concentrações de homoserina: H 1 (1 mM), H 3 (3 mM), H 5 (5 mM), H 7 (7 mM) e H 10 (10 mM)

A Figura 16 mostra a curva de atividade com diferentes concentrações de homoserina na reação de HK. Observou-se um crescente aumento da atividade da enzima, com um pico máximo na concentração de 3 mM de homoserina, só ocorrendo um decréscimo na atividade com 5 mM de homoserina. Adições de concentrações crescentes de homoserina, após 5 mM, fizeram com que a atividade de HK aumentasse novamente, com uma atividade máxima na concentração de 10 mM de homoserina. A atividade de HK com a adição de 10 mM de homoserina, é superior à atividade de HK adicionando-se 3 mM de homoserina.

4.4.1 Isolamento da enzima envolvida na biossíntese de treonina em sementes de milho

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de estudar as enzimas da via do aspartato, utilizando para isso sementes imaturas: LKR e SDH em milho (KEMPER et al., 1999), AK e HSDH em sorgo (FERREIRA et al., 2006) e DHDPS em milho (VARISI et al., 2007). Com o objetivo de avaliar a atividade da enzima HK em sementes imaturas de milho (14, 20 e 24 DAP), foram estudadas as três linhagens e o selvagem W22+, assim como os seus mutantes W22o10, W22o11 e W22o13.

Para este estudo foi incluído o selvagem W22+ e seus mutantes, visto que a enzima HK, faz parte da biossíntese de treonina, e estudos anteriores apresentaram estes genótipos com uma atividade alta da enzima HSDH, enzima que antecede a HK na via do aspartato, e uma concentração também alta do aminoácido treonina (VARISI et al., 2007).

Os resultados obtidos não revelaram um padrão semelhante de atividade da HK (Figuras 17 e 18) entre os diferentes estádios de desenvolvimento, mostrando grandes diferenças na atividade da enzima nos três estágios de maturação das sementes de milho, variando a atividade da enzima conforme o genótipo estudado e os dias de maturação.

Dentro do grupo do selvagem W22+ (Figura 17) observou-se que os genótipos mutantes W22o10 e W22o11 apresentaram um aumento da atividade de HK durante o desenvolvimento e maturação das sementes de milho, sendo que o genótipo selvagem W22+ apresentou atividade maior com 14 e 24 DAP, apenas o mutante W22o13 apresentou uma atividade de HK maior com 20 DAP.

Figura 17 - Gráfico representando a atividade específica da enzima homoserina quinase isolada de sementes imaturas de milho selvagem W22+ e seus mutantes de endosperma W22o10, W22o11 e W22o13, em três diferentes estágios de desenvolvimento: 14, 20 e 24 DAP

A atividade da HK nas linhagens 161 da EMBRAPA (Figura 18) manteve um padrão, com o estágio de 14 DAP apresentando uma maior atividade. Apenas a L161n apresentou com 24 DAP a atividade maior quando comparada com 20 DAP. As outras duas linhagens 161o e 161q

apresentaram uma atividade baixa e constante nos dois últimos estágios de maturação (20 e 24 DAP). A maior atividade foi apresentada pela L161o com 14 DAP, esta mesma linhagem também apresentou a menor atividade da enzima com 24 DAP.

Figura 18 - Gráfico representando a atividade específica da enzima homoserina quinase isolada de sementes imaturas das três linhagens de milho: 161n, 161o e 161q, em três diferentes estágios de desenvolvimento: 14, 20 e 24 DAP

Ao comparar as Figuras 17 e 18 observa-se que o milho selvagem W22+ apresentou o mesmo comportamento da L161n, com o estágio de 14 DAP apresentando a maior atividade e o estágio de 20 DAP apresentando a menor atividade enzimática, porém não há relação entre os mutantes e as linhagens 161o e 161q, sendo que os mutantes *W22o10* e *W22o11* possuem um comportamento inverso aos das linhagens 161o e 161q, com um aumento crescente da atividade de HK, conforme aumenta a maturação das sementes.

Na Tabela 5 está representada a concentração (mol%) dos quatro aminoácidos que fazem parte da via metabólica do aspartato (treonina, metionina, isoleucina e lisina). Para este estudo os aminoácidos foram obtidos através da hidrólise ácida do extrato utilizado para o ensaio enzimático da HK das três linhagens 161 em seus três estágios de maturação, a fim de se obter o acúmulo de cada aminoácido com em cada fase de maturação das sementes de milho.

Tabela 5 - Composição de aminoácidos (mol% $\pm$ desvio padrão) do hidrolisado protéico e o total de aminoácidos (μmol aminoácidos. mg^{-1} proteína $\pm$ desvio padrão), obtidos a partir do extrato utilizado no ensaio da enzima homoserina quinase realizado em sementes imaturas das três linhagens de milho: 161n, 161o e 161q, em três diferentes estágios de desenvolvimento: 14, 20 e 24 DAP

		L161n	L161o	L161q
Thr	14	11,07 $\pm$ 0,29	11,45 $\pm$ 0,03	16,21 $\pm$ 0,78
	20	9,77 $\pm$ 0,44	9,53 $\pm$ 0,29	9,37 $\pm$ 0,70
	24	9,92 $\pm$ 0,34	9,19 $\pm$ 0,09	11,10 $\pm$ 0,35
Met	14	1,09 $\pm$ 0,41	0,52 $\pm$ 0,08	4,78 $\pm$ 0,27
	20	0,02 $\pm$ 0,00	1,16 $\pm$ 0,21	1,48 $\pm$ 0,34
	24	0,00 $\pm$ 0,00	1,28 $\pm$ 0,04	0,77 $\pm$ 0,01
Ile	14	2,98 $\pm$ 0,28	2,69 $\pm$ 0,32	3,02 $\pm$ 0,66
	20	3,58 $\pm$ 0,10	4,22 $\pm$ 0,03	4,15 $\pm$ 0,27
	24	3,78 $\pm$ 0,26	4,53 $\pm$ 0,36	3,30 $\pm$ 0,13
Lys	14	6,20 $\pm$ 0,48	2,17 $\pm$ 0,14	6,68 $\pm$ 0,35
	20	6,15 $\pm$ 0,67	5,87 $\pm$ 0,21	7,32 $\pm$ 0,79
	24	8,30 $\pm$ 0,13	5,86 $\pm$ 0,42	6,37 $\pm$ 0,06
Total	14	262,61 $\pm$ 11,30	141,08 $\pm$ 3,32	142,17 $\pm$ 13,04
	20	240,02 $\pm$ 8,60	289,55 $\pm$ 10,70	312,36 $\pm$ 29,77
	24	184,56 $\pm$ 2,95	158,96 $\pm$ 8,22	249,13 $\pm$ 18,39

Pode-se observar na Tabela 5 que os aminoácidos treonina e metionina apresentam uma diminuição gradual de suas concentrações, conforme aumenta o amadurecimento das sementes, sendo que ambos apresentam uma maior concentração na L161q com 14 DAP. Os aminoácidos isoleucina e lisina apresentam um aumento na concentração conforme o amadurecimento das sementes, sendo que as maiores concentrações são encontradas nas linhagens 161o e 161n com 24 DAP, respectivamente.

Com relação ao total de aminoácidos (μmol aminoácidos. mg^{-1} proteína), é a L161n que apresenta a maior concentração, sendo que esta concentração diminui com o amadurecimento das sementes. As linhagens 161o e 161q têm o comportamento inverso, com a concentração de aminoácidos aumentando nos dois primeiros estágios (14 e 20 DAP) e diminuindo logo em seguida, no último estágio de maturação (24 DAP).

Ao se relacionar a Tabela 5 com a Figura 18, observa-se uma coincidência nos dados, pois a Figura 18 mostra alta atividade da enzima HK com 14 DAP para as três linhagens de milho, e a

Tabela 5 apresenta uma alta concentração do aminoácido treonina neste mesmo estágio. A mesma relação pode ser observada nos outros dois estágios com 24 DAP apresentando uma atividade maior que o segundo estágio (20 DAP) nas linhagens 161n e 161q, apenas a L161o apresenta uma concentração de treonina constante nos últimos dois estágios (20 e 24 DAP).

4.4.2 Cromatografia de troca iônica do tipo gradiente linear

Para iniciar os estudos de purificação parcial da enzima HK, foi realizado um *step-wise* a partir de 50 g de semente de milho imatura (Figura 19). O *step-wise* foi realizado numa faixa de 0-500 mM KCl, para assim poder estabelecer qual faixa de concentração de KCl é ideal para a enzima HK.

Como pode ser observado na Figura 19, a faixa de concentração de KCl ideal para a HK é de 300-500 mM.

Figura 19 - Gráfico representando a atividade relativa da enzima homoserina quinase, nas frações obtidas a partir da purificação parcial da enzima: extrato bruto, após a desalinização pela coluna Sephadex G-25, umbound e as frações obtidas pela eluição do tipo *step-wise*. Ensaio realizado com sementes imaturas (20 DAP) de milho, e cinco concentrações (mM) diferentes de KCl

A cromatografia por troca iônica foi utilizada para a purificação parcial da enzima HK em sementes imaturas de milho, utilizando-se um gradiente linear de 0-500 mM de KCl em colunas de DEAE-Sephacel (Figura 20).

Figura 20 - Gráfico representando a atividade relativa da enzima homoserina quinase, nas frações obtidas a partir da purificação parcial da enzima: extrato bruto, após a dessalinização pela coluna Sephadex G-25, unbound e as frações obtidas da eluição do tipo gradiente linear (0-500 mM KCl) em coluna de troca aniônica DEAE Sephacel. Ensaio realizado com sementes imaturas (20 DAP) de milho

A atividade de HK foi obtida para todas as frações, como se pode observar na Figura 20, pelo menos quatro picos de atividade máxima foram observados, o primeiro eluído da fração 20 com 138,6 mM KCl, o segundo da fração 35 com 242,55 mM KCl, o terceiro da fração 44 com 304,92 mM KCl e o último da fração 51 com 353,43 mM KCl. Ao analisar a atividade enzimática de cada pico selecionado, observou-se que o último pico, da fração 51, apresentou uma atividade de HK menor que os outros três anteriores, porém ainda assim uma atividade considerada alta.

Com relação à concentração de proteína recuperada de cada uma destas frações, a última fração (55) foi a de maior concentração (0,90 mg proteína/mL), e a primeira, fração 20, foi a de menor concentração (0,02 mg proteína/mL), isto indica que com o aumento da concentração de KCl no tampão de eluição, houve uma maior eluição de proteínas da coluna DEAE-Sephacel.

Entretanto, ao analisar a atividade enzimática da HK, observou-se que sua eluição ocorreu com baixa concentração de KCl, frações menores apresentaram maior atividade enzimática. As frações 20 e 42 foram as que apresentaram as maiores atividades enzimáticas seguidas da fração 51.

A Figura 21 apresenta o gel SDS-PAGE das frações com maior atividade, obtidas da purificação parcial da enzima HK, corado com solução de prata, método mais sensível a detecção de baixas concentrações de proteína.

Figura 21 - Proteína em gel de SDS-PAGE. Padrão (P) BSA; 1 – 7 frações eluídas da coluna DEAE-Sephacel: 1- fração 20, 2- fração 35, 3- fração 38, 4- fração 42, 5- fração 44, 6- fração 51, 7- fração 55; 8- extrato bruto

As primeiras frações 20 e 35 (Figura 21, colunas 1 e 2), por apresentarem uma menor concentração de proteínas apresentam menor intensidade e até quantidade de bandas. As frações 38, 42 e 51 (Figura 21, colunas 3, 4 e 5) apresentaram uma concentração de proteína e atividades enzimáticas altas. Segundo a literatura, a enzima HK de milho possui massa molecular de aproximadamente 36 kDa, com existência de possíveis isoformas (AZEVEDO et al., 2006).

4.4.3 Regulação da enzima HK

A atividade de cada enzima pode ser regulada por alguns aminoácidos, análogos de aminoácidos e co-fatores da reação. No caso pontual da via metabólica do aspartato, já é conhecido o fato de que algumas das enzimas desta via são altamente reguladas pelos seus próprios produtos finais (lisina, treonina, isoleucina e SAM) (AZEVEDO et al., 2006).

No intuito de estudar a influência de alguns destes compostos no comportamento da enzima HK, foi determinada a atividade da enzima em relação a tratamentos com a adição de diferentes aminoácidos: lisina, treonina, metionina e isoleucina, assim como com o cofator SAM em diferentes concentrações (0,1, 0,5, 1,0 e 5 mM) (Figura 22) para estudar o efeito dos mesmos na reação. Para estes ensaios foram utilizadas sementes imaturas (14 DAP) de cada linhagem, visto que a maior atividade desta enzima se encontra neste estágio, nas três linhagens estudadas.

Figura 22 - Gráfico representando o efeito da adição de diferentes aminoácidos: L- lisina, M- metionina, T- treonina e I- isoleucina e o co-fator: S- s-adenosilmetionina (SAM) em quatro diferentes concentrações: 0,1- 0,1 mM, 0,5- 0,5 mM, 1- 1,0 mM e 5- 5,0 mM sobre a atividade relativa da enzima homoserina quinase isolada de sementes imaturas (14 DAP) da linhagem 161q.

Os aminoácidos lisina, treonina, metionina e isoleucina são sintetizados pela via metabólica do aspartato, a enzima HK, que participa desta via, foi testada na presença dos quatro aminoácidos, produto final da via do aspartato e também pelo co-fator SAM (Figura 22). Os resultados obtidos na Figura 22 mostram que apenas o SAM na concentração de 1 mM induz a atividade da HK na reação, aumentando em 62% a atividade da enzima. Os outros aminoácidos testados, em diferentes concentrações, levam a uma inibição da atividade enzimática.

Com uma concentração de 5 mM, os aminoácidos metionina e treonina, assim como a isoleucina com 0,5 mM foram os que levaram a uma maior inibição da atividade de HK, com 98,7, 84,2 e 77,8% de inibição, respectivamente.

As menores inibições ocorreram com a adição dos aminoácidos treonina (0,5 mM), lisina (0,1 mM) e isoleucina (1,0 mM) com inibições de 23,6, 30,2 e 32%, respectivamente.

Na concentração de 0,1 mM, o aminoácido metionina e a SAM levaram a uma inibição de 50%, a isoleucina de 46%, a treonina de 34% e a lisina de 30%. Na concentração de 0,5 mM a isoleucina levou a uma maior inibição (84%), e a treonina à menor inibição da atividade da enzima. A SAM na concentração de 1 mM induziu a atividade da enzima, e os aminoácidos metionina e isoleucina tiveram a maior (59%) e a menor inibições (32%), respectivamente. Na concentração de 5 mM a metionina e a isoleucina inibiram a atividade de HK, a adição de isoleucina levou à menor inibição (43%).

4.5 Eletroforese Bidimensional

O fato de o estudo ser focado em três linhagens, das quais duas são de alta lisina, é de grande interesse compreender o comportamento que leva ao acúmulo de lisina nestas linhagens. Assim, foi realizada uma caracterização bidimensional da fração protéica zeína de cada linhagem, a fim de se obter mais informações sobre a mesma.

A Figura 23 apresenta os géis bidimensionais da fração zeína das três linhagens, as setas verdes apresentam os *spots* que se diferenciaram, aumentando sua expressão, nas linhagens 161 e 161q, quando comparadas com a L161n, e as vermelhas indicam os *spots* que apresentaram uma diminuição de sua expressão, em relação à L161n. Neste estudo não foram detectados *spots* exclusivos em nenhuma das três linhagens.

Figura 23 - Perfil de distribuição de proteínas da fração zeína de endosperma de milho. A – Linhaagem 161n, B – Linhaagem 161o e C – Linhaagem 161q. Corado com CBB G-250. As setas verdes indicam os *spots* com maior expressão, e as vermelhas com menor expressão, em relação à L161n. Apenas a região contendo as isoformas é apresentada na figura. IF conduzido entre pH 3-10 NL

Comparando-se a linhagem 161n com as L161o e L161q, nota-se uma grande diferença entre os perfis de proteínas expressas, tanto na quantidade de *spots* presentes, como na intensidade de alguns *spots* (Figura 23), porém a diferença mais contrastante foi observada entre as linhagens 161n e 161o, e assim como já foi observado no gel SDS-PAGE, a L161o não apresentou a fração de 22 kDa, presente na L161n.

As setas em vermelho representam os *spots* que estão em menor intensidade quando comparados com os da linhagem 161n, dois *spots* da α -zeína com 19 kDa nas linhagens 161o e 161q, e um spot da β -zeína com 14 kDa na L161o. As setas em verde apontam os *spots* com uma maior intensidade em relação à L161n, mostrando que a proteína γ -zeína apresentou um aumento tanto na de 27 kDa como na de 16 kDa, na L161o, sendo que esta linhagem também apresentou um aumento na δ -zeína de 10 kDa. A L161q apresentou aumento na γ -zeína de 16 kDa e na δ -zeína.

Na semente de milho o endosperma representa o tecido de reserva de nutrientes e é o responsável pela germinação e primeiras etapas do desenvolvimento da plântula, assim, foi analisado o perfil de distribuição de proteínas expressas nas três linhagens (Figura 24).

Figura 24 - Perfil 2D-PAGE da proteína total de sementes maduras de milho. A – Linhagem 161n, B – Linhagem 161o e C – Linhagem 161q. Corado com CBB G-250. IF conduzido entre pH 3-10 NL

Foi observado que o perfil protéico bidimensional das proteínas teve concordância na distribuição de tamanhos das proteínas, entre 15 e 120 kDa, com o perfil obtido através de SDS-PAGE.

O estudo do perfil protéico bidimensional foi realizado comparando as linhagens 161o e 161q com a L161n e também as linhagens 161o e 161q entre si, a fim de se obter um maior número de informações sobre as diferenças encontradas nas três linhagens.

Embora no perfil das proteínas totais o número de *spots* obtidos tenha sido muito alto nas diferentes linhagens, apenas poucas proteínas se diferenciaram e caracterizaram cada linhagem. Com tudo, deve-se ressaltar que as comparações de *spots*, visaram incluir nas análises aqueles *spots* que fossem nítidos e de maior concentração.

4.5.1 Perfil bidimensional das proteínas

As imagens obtidas dos géis foram analisadas através de parâmetros constantes para todos os géis, utilizando-se o programa Image Master Platinum Software v. 5.0 (Amersham - GE). Todos os géis foram analisados em triplicata.

As imagens dos géis analisados pelo programa geraram falsos *spots*, necessitando de uma intervenção de edição manual. Os volumes dos *spots* foram normalizados de acordo com a ferramenta do programa. Os *spots* que não apresentaram repetibilidade foram desconsiderados.

A comparação dos *spots* diferencialmente expressos foi realizada com base em um gel de referência adotado.

A análise de cada *spot* foi feita de acordo com a área, densidade e porcentagem de volume (%vol) de cada *spot* protéico expresso em cada perfil. As Tabelas 6, 7 e 8 apresentam o %vol e a massa molecular (MM) de cada *spot* diferenciado nos perfis de cada linhagem e retratam os *spots* que apresentaram maior intensidade em cada linhagem.

Proteínas foram consideradas expressas diferencialmente quando a média da %vol do *spot* das linhagens comparadas fosse pelo menos 1,50 vezes maior ou menor do que o respectivo *spot*. Presença e ausência de *spots* de proteínas foram observadas quando os perfis de cada linhagem foram comparados entre si.

A linhagem 161n apresentou um maior número de *spots* (832) seguida das linhagens 161q com 565 e da L161o com 427. Dos *spots* da linhagem 161n, foram identificados 17 *spots* exclusivos quando comparada com a L161o, sendo que destes apenas 3 com a L161q. Ao analisar

a linhagem 161n com a 161q, foram detectados 4 *spots* únicos na L161n. Com relação à análise feita entre as linhagens 161o e 161q, foram detectados apenas 6 *spots* exclusivos na L161q, sendo que ao comparar estes *spots* na L161n, apenas 1 apresentou diferença em volume, apresentando um volume maior na L161n.

A Figura 25 apresenta o perfil de proteínas expressas da linhagem 161n, comparando-a com a L161o. Os *spots* que apresentaram maior expressão na L161n se encontram em verde, já os que apresentaram maior expressão na L161o aparecem em roxo. Os *spots* que são exclusivos da L161n nesta análise aparecem em laranja.

Figura 25 - Perfil de proteínas expressas de sementes maduras da linhagem 161n. Os *spots* em verde estão mais expressos na L161n; *spots* em roxo estão mais expressos na L161o; *spots* em laranja são exclusivos da L161n, quando comparada a L161o. IF conduzido entre pH 3-10 NL

A Tabela 6 lista comparativamente os 39 *spots* diferenciados entre as linhagens 161n e 161o com seus respectivos %vol e massas moleculares. Estes *spots* encontram-se na faixa de 18 a 68 kDa. O perfil da L161n apresentou 35 proteínas com uma %vol maior quando comparadas com as respectivas proteínas na L161o, o inverso só foi observado em 4 *spots*. Pode-se observar que 14 dos 35 *spots* de maior %vol na L161n, estão na faixa de 18 a 28 kDa, faixa esta onde se encontram as maiores diferenças entre as bandas da fração zeína, os *spots* diferenciados na L161o, apresentaram MM em torno de 60 kDa.

Tabela 6 - Comparação de *spots* da linhagem de milho 161n com a linhagem 161o

L161n			L161o		
Spot	vol%	kDa	Spot	vol%	kDa
9084	0,04	27			
8836	0,42	17			
8832	0,35	18			
8823	0,21	18			
8777	0,22	23			
8766	0,13	24			
8765	0,20	23			
8744	0,92	25			
8713	0,66	27			
8696	0,11	28			
8694	2,46	27			
8690	1,78	27			
8689	2,95	27			
8680	0,79	30			
8671	2,13	30			
8670	0,76	28			
8628	0,22	36			
8625	0,20	35			
8620	0,29	33			
8619	0,21	33			
8592	0,25	39			
8585	0,22	40			
8555	0,41	38			
			4470	0,464	38
8523	0,25	42			
8515	0,15	42			
8501	0,28	44			
8481	0,22	50			
8464	1,19	47			
8462	1,09	48			
8458	0,86	49			
8454	0,72	50			
			4369	0,12	60
			4348	0,461	62
8331	2,17	67			
8326	2,44	67			
			4739	0,006	66
8324	1,64	67			
8319	0,43	68			

A Figura 26 apresenta o perfil de proteínas expressas da linhagem 161n, comparando-a com a L161q. Os spots que apresentaram maior expressão na L161n se encontram em verde, já os que apresentaram maior expressão na L161q aparecem em roxo. Os *spots* que são exclusivos da L161n nesta análise aparecem em laranja.

Figura 26 - Perfil de proteínas expressas de sementes maduras da linhagem 161n. Os *spots* em verde estão mais expressos na L161n; *spots* em roxo estão mais expressos na L161q; *spots* em laranja são exclusivos da L161n, quando comparada a L161q. IF conduzido entre pH 3-10 NL

A Tabela 7 lista comparativamente 40 *spots* diferenciados entre as linhagens 161n e 161q. Nesta tabela podem ser verificados *spots* coincidentes com a Tabela 6. Portanto apenas 10 *spots* ao se comparar o perfil bidimensional das três linhagens, têm uma expressão igual nas linhagens 161n e 161o, porém uma menor expressão na L161q.

Tabela 7 - Comparação de *spots* da linhagem de milho 161n com a linhagem 161q

L161n			L161q		
Spot	vol%	kDa	Spot	vol%	kDa
			7025	0,12	30
9064	0,05	32			
8744	0,92	26			
8714	0,18	27			
8713	0,66	27			
8711	0,93	27			
8695	0,85	28			
8690	1,78	29			
8689	2,95	28			
			7064	0,22	28
8628	0,22	34			
8625	0,20	34			
8600	0,15	36			
8592	0,25	38			
8585	0,22	37			
			6947	0,49	40
			6937	0,06	41
8523	0,25	44			
8516	0,21	43			
8515	0,15	44			
			6902	0,12	44
			6915	0,40	43
8481	0,22	47			
8477	0,24	47			
8464	1,19	49			
8462	1,09	49			
8458	0,86	50			
			6836	0,93	53
			6800	0,10	56
			6771	0,26	60
			6768	0,13	60
			6730	0,91	64
8326	2,44	63			
8324	1,64	63			
			6729	0,73	64
			6700	0,22	71
8210	0,21	113			
8197	0,32	111			
8193	0,30	116			

Os *spots* diferenciados, nesta análise (Tabela 7) apresentaram uma faixa maior de variação do MM entre 26 e 116 kDa. O perfil da L161n apresentou 27 proteínas com uma %vol maior que as respectivas na L161q e destas apenas 10 não apresentaram diferença de %vol entre as linhagens 161n e L161o. A L161q apresentou 13 *spots* que tinham maiores %vol ao serem comparadas com as respectivas na L161n.

A Figura 27 apresenta o perfil de proteínas expressas da linhagem 161o, comparando-a com a L161q. Os *spots* que apresentaram maior expressão na L161o se encontram em verde, já os que apresentaram maior expressão na L161q aparecem em roxo. Nesta análise foi a L161q que apresentou *spots* exclusivos, assim, não aparecem *spots* da cor laranja nesta figura.

Figura 27 - Perfil de proteínas expressas de sementes maduras da linhagem 161o. Os *spots* em verde estão mais expressos na L161o; *spots* em roxo são mais expressos na L161q. IF conduzido entre pH 3-10 NL

A Tabela 8, que apresenta o menor número de *spots* diferenciados, lista comparativamente 24 *spots* que apresentaram diferenças de %vol entre as linhagens 161n e 161q, destas proteínas, 4 são encontradas na Tabela 7, o que indica que apenas estes *spots* estão diferenciados nas três linhagens, com a L161q apresentando uma %vol maior para estas proteínas quando comparada com as outras duas linhagens, e a L161o apresentando a menor %vol para estes *spots*.

Tabela 8 - Comparação de *spots* da linhagem de milho 161o com a linhagem 161q

L161o			L161q		
Spot	vol%	kDa	Spot	vol%	kDa
4603	0,10	17			
4600	0,12	17			
			7162	0,35	19
4588	0,08	25			
4570	0,70	26			
4565	1,10	26			
4559	0,20	28			
4558	0,27	27			
			7092	0,06	28
4549	0,19	27			
			7064	0,22	29
			7062	0,24	29
			6974	0,11	36
			7004	0,15	35
			7000	0,17	35
4466	0,18	40			
			6908	0,27	43
			6915	0,40	43
			6870	0,54	48
			6869	0,42	49
			6864	0,32	50
4427	0,14	49			
			6768	0,13	60
			6800	0,10	58

Esta análise (Tabela 8) apresentou a menor faixa de variação de MM, entre 17 e 60 kDa, para os *spots* diferenciados. O perfil da L161q apresentou 14 proteínas com uma %vol maior que as respectivas na L161o, o inverso ocorreu em 10 proteínas, as quais não apresentaram diferença na comparação com a L161n.

Os *spots* que apresentaram uma expressão diferenciada, nestas análises, posteriormente, serão eluídos do gel para serem sequenciados através da espectrofotometria de massa, e assim poder identificar quais as proteínas que estão diferenciadas em cada linhagem.

5 DISCUSSÃO

5.1 Proteínas e aminoácidos

O milho (*Zea mays* L.) é de grande importância como fonte de proteínas na dieta humana e na alimentação animal em diferentes partes do mundo, entretanto, essas proteínas são de baixo valor biológico, por apresentarem baixos teores de aminoácidos essenciais, em particular, lisina e triptofano.

Uma importante limitação do endosperma de milho é o balanço de aminoácidos. A deficiência de aminoácidos, como lisina, reduz a viabilidade de outros aminoácidos presentes em abundância (BICAR et al., 2008). Para tentar superar esta limitação e se lograr uma boa qualidade protéica, algumas técnicas como o melhoramento tradicional e a engenharia genética poderiam ser utilizadas. No entanto existe uma forte correlação genética negativa entre a qualidade de proteína e a produtividade, sendo então preciso determinar primeiramente quais seriam os possíveis caracteres responsáveis pelo aumento na qualidade das proteínas (TORO, 2006).

Um dos possíveis caminhos a serem seguidos, tanto pelo melhoramento clássico como pela engenharia genética, para se obter sementes de milho de melhor qualidade protéica é suprimindo a síntese de zeínas. A alta concentração de zeínas no endosperma de milho é a principal razão para uma baixa qualidade protéica (VASAL, 1999). A diminuição da síntese de zeína no endosperma da semente de milho permitiria que o nitrogênio normalmente usado na síntese destas zeínas passasse a ser utilizado na síntese de outras proteínas ricas em lisina e triptofano (CROW; KERMICLE, 2002).

Outro caminho possível para o melhoramento da qualidade protéica do milho é a busca por variedades naturais, que apresentem essa característica, assim foi descoberto o milho o2, o qual apresenta teores elevados de lisina e triptofano em suas sementes (MERTZ et al., 1964).

Com o surgimento do mutante o2, na década de 60 (MERTZ et al., 1964), deu-se início a pesquisa por um milho que concentrasse uma quantidade alta de lisina como o o2, e que não apresentasse o fenótipo indesejável do mesmo. Assim, nos anos 90 surgiu o milho de alta qualidade protéica (QPM) (VASAL, 1999), através de programas de melhoramento realizados pelo CIMMYT. O principal programa de desenvolvimento de milho com alta lisina foi realizado

pelo CIMMYT, no qual os pesquisadores trabalharam a fim de obter um endosperma mais duro que o *o2* e que apresentasse um teor maior deste aminoácido.

O QPM foi obtido através de melhoramento clássico no qual foram introduzidos em uma linhagem de milho normal, os genes *o2* e também genes modificadores de endosperma (*mo2*), através de sucessivos retrocruzamentos. Foram selecionadas plantas que apresentaram as características desejadas pelos melhoristas (alta produtividade, sementes de endosperma vítreo e alta lisina).

As linhagens 161 cedidas pela EMBRAPA encontram-se neste contexto. A linhagem 161q é fruto de uma nova metodologia de retrocruzamento, praticada pela EMBRAPA, pela qual, partindo das linhagens 161n e 161o, após de uma série de seleções, foi possível obter a linhagem 161q.

É preciso enfatizar que esta metodologia não gera novos genótipos, apenas permite reproduzir aqueles existentes em uma população, e com isso, os genótipos de uma população podem ser fixados e multiplicados, permitindo selecionar os genótipos superiores de uma população, que serão posteriormente multiplicados e liberados como cultivares.

Em razão deste contexto foi realizada uma série de análises bioquímicas nas três linhagens cedidas pela EMBRAPA Milho e Sorgo para caracterizá-las quanto ao teor de proteínas de reserva e aminoácidos a fim de compreender melhor quais mecanismos colaboram no aumento de lisina na semente, e poder observar se ocorreu a fixação destas qualidades esperadas durante a seleção.

Inicialmente, um estudo nas proteínas de reserva das três linhagens foi realizado (Figura 6). Os resultados demonstraram que a L161o apresentou uma alteração na composição bioquímica da semente, com diminuição do acúmulo da fração zeína. Estudos realizados com diferentes genótipos mutantes de milho apresentam resultados semelhantes, ao encontrado nas linhagens 161, com o milho normal (selvagem) apresentando uma concentração maior de zeína quando comparado ao milho opaco (AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2004b).

Com relação a fração glutelina, foi observado que a linhagem 161o (Figura 6) apresentou a maior concentração desta fração. O fato de diminuir a concentração da fração zeína, durante a síntese das proteínas de reserva, talvez ocorra uma substituição da fração zeína, pela fração glutelina que apresenta um maior acúmulo de lisina em sua composição. Estes dados foram

também observados por Azevedo et al. (2003) ao estudar o genótipo selvagem OH43+ e seu mutante OH43o2, no qual a concentração de glutelina aumentou 2,5 vezes ao ser comparado com seu selvagem. Este resultado também é semelhante ao encontrado no selvagem W22+ com relação a seu mutante W22o11 (AZEVEDO et al., 2004a)

Analizando as linhagens 161, fornecidas pela EMBRAPA, nota-se que a linhagem L161q (a linhagem QPM) apresentou maior concentração de proteínas totais (Tabela 4). Esta linhagem apresentou teores de proteína superiores aos observado na linhagem 161n, apresentando também valores superiores aos descritos na literatura para os milhos QPM (OLIVEIRA et al., 2004).

Os genes presentes na linhagem 161o, assim como os genes modificadores de endosperma presentes nos milhos QPM, levam a um aumento na concentração de lisina, diminuindo o acúmulo da fração zeína nestas linhagens. Entretanto a diminuição observada na L161q é maior a observada na L161o, isto se pode ser devido ao background genético utilizado para a seleção da mesma.

A mutação *o2* leva a um aumento na concentração de lisina, pois interfere no balanço das frações protéicas, aumentando a concentração das frações consideradas não zeínas (glutelina e globulina) ricas em lisina, e diminuindo, conseqüentemente, a concentração das proteínas zeínas (SODEK; WILSON, 1971; LANDRY et al., 2000; AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004).

Para relacionar a concentração das frações protéicas com o acúmulo de lisina, foram realizados estudos de cada fração em análise de SDS-PAGE na tentativa de identificar proteínas com níveis de expressão induzido ou reduzidos, que possam diferenciar as linhagens.

No perfil protéico das frações globulina, glutelina e albumina (Figura 7) foi observada uma heterogeneidade entre o tamanho das bandas protéicas, assim como na presença e ausência das mesmas. Ao analisar comparativamente os perfis eletroforéticos de cada linhagem, pode-se constatar que existe a possibilidade dos genes da linhagem 161o promover a síntese de proteínas que não estariam presentes ou em quantidades não detectáveis na L161n. A fração zeína, rica em prolina e glutamina, é a fração protéica de maior concentração no milho (XU; MESSING, 2008), sendo esta fração subdividida em quatro diferentes classes, identificadas através do gel de proteínas SDS-PAGE: γ -zeína (27 kDa), α -zeína (22 e 19 kDa), β -zeína (16 e 14 kDa) e δ -zeína (10 kDa) (GEETHA et al., 1991).

O perfil protéico da fração zeína (Figura 8) revelou bandas distribuídas entre 10 e 27 kDa, com diferenças na intensidade e na presença e ausência de bandas nas três linhagens. As linhagens 161o e 161q, como observado na Tabela 2 apresentaram uma concentração maior de lisina, assim como de aminoácidos solúveis (Figura 9), o que está diretamente relacionado ao fato de estas linhagens apresentarem apenas traços da banda protéica de 22 kDa (Figura 8). No mutante *o2* está bem documentado a ausência da banda de 22 kDa (α -zeína), como também a redução das bandas de 10 (δ -zeína) e 15 (β -zeína) kDa (HUNTER et al., 2002; HUANG et al., 2005).

Como esperado a linhagem 161n apresentou a banda de 22 kDa e a de 27 kDa numa intensidade muito menor que as outras duas linhagens (161o e 161q) (Figura 8). A fração zeína, rica em prolina e glutamina, é a fração protéica de maior concentração no milho (XU; MESSING, 2008), sendo esta fração subdividida em quatro diferentes classes, identificadas através do gel de proteínas SDS-PAGE: γ -zeína (27 kDa), α -zeína (22 e 19 kDa), β -zeína (16 e 14 kDa) e δ -zeína (10 kDa) (GEETHA et al., 1991).

A banda protéica de 27 kDa (γ -zeína), assim como as de 19 e 16 kDa, se apresentaram mais intensas na L161q quando comparada com a L161o (Figura 8), o que pode indicar uma relação entre a diminuição do fenótipo opaco e o aumento na concentração destas proteínas durante a formação da fração zeína, levando assim a uma maior concentração do aminoácido lisina (Tabela 3) nesta linhagem. A banda protéica de 27 kDa facilita a formação de corpos protéicos, formando pontes de bissulfato ao redor dos grânulos de amido, modificando o endosperma (GIBBON; LARKINS, 2005). Os genótipos QPM apresentam níveis reduzidos da α -zeína de 22 kDa, típico de mutantes *o2* e também aproximadamente duas vezes mais γ -zeína de 27 kDa (WALLACE et al., 1990; GEETHA et al., 1991). Estudos mostram uma relação direta entre o aumento da concentração da γ -zeína de 27 kDa e a dosagem de genes *mo2* que levam a um endosperma vítreo. Estes genes são resultantes de um complexo sistema genético, e seu principal efeito parece ser a síntese da proteína γ -zeína (LOPES; LARKINS, 1993). A concentração da γ -zeína de 27 kDa pode ser um importante componente da modificação de endosperma pelo *mo2* no QPM e nossas análises confirmam exatamente este aspecto e a 161q como um material claramente QPM. Pela concentração observada para a γ -zeína de 27 kDa, bastante aumentada, pode-se sugerir que na verdade o 161q é um material QPM bem

característico com essa peculiaridade exacerbada em comparação com outros QPM, o que pode inclusive explicar algumas outras variações para aminoácidos encontrados nessa trabalho.

Outro aspecto avaliado foi a concentração de aminoácidos presentes no hidrolisado protéico de cada proteína de reserva das três linhagens (Tabelas 2 e 3). As linhagens 161q e 161o apresentaram uma maior concentração do aminoácido lisina. Os resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, nos quais esta característica é descrita para milhos QPM (GAZIOLA et al., 1999; NAVES et al., 2004; GUTIERREZ-ROJAS et al., 2008).

A análise da composição de aminoácidos das frações protéicas globulina, albumina e glutelina (Tabela 2) sugerem que na linhagem 161o ocorreu apenas o aumento de lisina, sendo que os outros aminoácidos (treonina, metionina e isoleucina) tiveram suas concentrações diminuídas. Os aminoácidos treonina, metionina, isoleucina e lisina são sintetizados pela via do aspartato (Figura 1) em três grandes ramos: um dá origem a lisina, outro a metionina e por último o que origina a treonina, a qual dá origem a isoleucina. A diminuição na concentração dos aminoácidos da via metabólica em questão, com exceção da lisina, que teve um aumento na sua concentração, também foi observada por Toro (2006) para mutantes opacos de endosperma de milho.

Com relação a análise de aminoácidos da fração zeína (Tabela 3) observou-se um padrão de aumento da concentração nas linhagens 161o e 161q, quando comparadas com a L161n, com a L161o apresentando o maior aumento para os aminoácidos metionina, treonina e lisina. O aminoácido isoleucina manteve um comportamento contrário, diminuindo sua concentração nas linhagens 161o e 161q, com uma maior diminuição na L161o, quando comparadas com a L161n. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Toro (2006) ao estudar o genótipo selvagem OH43+ e seus mutantes de endosperma (OH43o1, Oh43o2, OH43fl1 e OH43fl2), onde também foi observado o mesmo comportamento destes aminoácidos na fração zeína, quando comparados o selvagem com o mutante OH43o2.

Considerando a análise das proteínas de reserva (Figura 6) em conjunto com a Tabela 2, pode-se explicar um acúmulo maior de lisina pela linhagem 161o. Esta linhagem apresentou um aumento na concentração das frações globulina+albumina e glutelina, e nestas frações foram observadas maiores concentrações do aminoácido em questão, sendo que a fração glutelina apresentou o maior aumento, com duas vezes mais lisina que a linhagem 161n. Os resultados sugerem que a lisina está acumulada nas proteínas das frações protéicas não zeínas, as quais

tiveram suas concentrações aumentadas nas linhagens 161o e 161q. Nesta mesma análise, pode-se observar que a linhagem 161n, apresentou maior concentração da fração zeína e que esta fração apresentou uma concentração mínima de lisina (Tabela 3), acarretando num menor acúmulo deste aminoácido nesta linhagem.

Portanto com estes resultados confirma-se a principal característica da zeína, que é uma baixa concentração de lisina (Tabela 3). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Toro (2006) e podem ser explicados pelo fato de a banda de 22 kDa estar presente em baixíssima concentração nas linhagens 161o e 161q. A classe α -zeína corresponde a 50% do total de zeínas, e é rica nos aminoácidos glutamina e leucina, enquanto as outras classes, menos abundantes, são ricas em metionina (WU et al., 2009).

Os resultados sugerem que o aminoácido treonina, tenha um comportamento semelhante ao da lisina, com maior acúmulo de treonina nas frações não zeína (Tabela 2), ao contrário do aminoácido isoleucina, que apresentou um maior acúmulo na fração zeína. Com relação ainda ao aminoácido treonina foi observado que as frações que apresentaram uma alta concentração deste aminoácido apresentaram também uma baixa concentração de isoleucina. O que pode ser explicado pelo fato do aminoácido isoleucina ser produto do catabolismo de treonina, assim, se há um maior acúmulo deste aminoácido, pode estar ocorrendo uma menor atividade de seu catabolismo, diminuindo a concentração de isoleucina. No total de aminoácidos, não foi observado um maior acúmulo de treonina pelas linhagens 161o e 161q quando comparadas à L161n.

Ao analisar a Tabela 4 nota-se que o acúmulo de lisina seguiu o mesmo padrão das proteínas totais, demonstrando que as linhagens que apresentaram uma concentração alta de proteínas totais, apresentaram também uma baixa quantidade da fração zeína, aumentando assim, a concentração de proteínas não-zeínas (Figura 6) levando a um aumento na concentração de lisina.

A linhagem 161o apresentou maior concentração de aminoácidos solúveis (Figura 9) quando comparada às outras duas linhagens. Aumentos na concentração de aminoácidos solúveis nas linhagens 161o e 161q podem ser relacionados com aumentos nas quantidades de lisina incorporada nas proteínas de reserva. Esta relação foi também observada por Azevedo et al. (2004a) num estudo com o genótipo selvagem W22+ e seus mutantes, no qual foi observado um aumento na concentração de aminoácidos solúveis nos mutantes W22o10 e W22o11, com relação

ao selvagem. O aumento da concentração de lisina em mutantes *o2* está também relacionado com o aumento de aminoácidos solúveis no endosperma (WANG; LARKINS, 2001). A diminuição da síntese de proteínas de maior concentração, zeína, e uma maior disponibilidade de lisina para ser incorporada durante o desenvolvimento da semente, poderiam de fato contribuir para a síntese de proteínas com níveis elevados de lisina na sua composição.

É possível que a redução de zeína afete o acúmulo de lisina através da regulação do catabolismo de lisina. A redução de zeína nos mutantes *o2* e *o7* parece também estar associada a baixa atividade da LKR, a qual converte lisina e α -cetoglutarato em sacaropina (GAZIOLA et al., 1999; KEMPER et al., 1999; AZEVEDO et al., 2004a; AZEVEDO et al., 2006) (Figura 2). Entretanto estes autores relatam a presença da atividade de LKR apenas no endosperma, sendo que a detecção de elevados níveis de metabólitos de lisina pode indicar que o metabolismo de lisina pode ainda ter papel importante no acúmulo de lisina específica do embrião (HUANG et al., 2005). A maior atividade das enzimas LKR e SDH se apresenta na forma de um polipeptídeo bifuncional contendo os domínios de ambas as enzimas (ARRUDA et al., 2000; GAZIOLA et al., 1997; AZEVEDO, 2002), entretanto foram identificadas também formas monofuncionais destas enzimas (ZHU et al., 2000; TANG et al., 2002). Em milho também ocorreu uma caracterização das enzimas LKR e SDH monofuncionais e do polipeptídeo bifuncional (GONÇALVES-BRUTUILLE et al., 1996; KEMPER et al., 1999). Na literatura há geralmente indicações que a atividade da SDH é mais estável que a atividade da LKR (AZEVEDO, 2002).

Na análise da atividade das enzimas do catabolismo de lisina nas linhagens estudadas (Figura 10), observou-se um padrão de atividade para as enzimas LKR e SDH, com ambas apresentando uma maior atividade na linhagem 161n e uma menor atividade na linhagem 161q. Assim pode se concluir que na L161n ocorre uma maior degradação do aminoácido lisina durante o desenvolvimento das sementes. O catabolismo de lisina tem um papel importante na regulação da concentração de lisina solúvel em sementes em desenvolvimento (ARRUDA et al., 2000; ZHU; GALILI, 2004; STEPANSKY et al., 2006).

Analisando dentro de cada linhagem pode-se observar que apenas a linhagem 161o apresentou uma diminuição crescente na atividade de ambas as enzimas, conforme aumentava a maturação das sementes (Figura 10). Por outro lado, apesar de não apresentar um padrão na atividade das duas enzimas, a linhagem 161q apresentou as menores atividades das mesmas, nos três estágios de maturação. Ao relacionar este dado com a Tabela 4, pode-se entender melhor

porque a linhagem 161o apresentou uma menor concentração de lisina total, quando comparada à L161q. De acordo com Gaziola et al. (1999) os QPMs demonstraram uma redução no catabolismo da lisina ainda mais acentuada quando comparados com os materiais que apresentam apenas o *o2* e não os seus modificadores. O efeito do gene *o2* parece não estar restrito ao catabolismo de lisina, mas também na regulação de sua síntese (FERREIRA et al., 2005).

Na análise da atividade da enzima LKR foi observada uma atividade duas vezes menor na linhagem 161o (Figura 10), quando comparada com a L161n, redução esta já previamente verificada também por Azevedo et al. (2003) ao analisar a atividade desta enzima no selvagem OH43+ e no seu mutante OH43*o2*, porém no caso citado a redução da atividade da LKR foi de seis vezes no mutante, a qual pode ser devida ao background genético de cada material estudado. A maioria dos estudos com mutantes de alta lisina já realizados indicam que a redução na atividade de LKR está diretamente associada com o aumento na concentração de lisina solúvel quando comparados ao genótipo selvagem (AZEVEDO et al., 2004a). A presença do gene *o2* afeta a atividade da LKR, diminuindo a síntese de mRNA e consequentemente a síntese de proteína (KEMPER et al., 1999).

Com relação à enzima SDH, também pode ser observada uma redução de sua atividade (Figura 10), porém neste caso, ocorreu uma maior redução, chegando a diminuir doze vezes a atividade da SDH na linhagem 161o. A enzima SDH também tem sua atividade regulada pelo gene *o2* (AZEVEDO et al., 2003).

Ao analisar todos os resultados obtidos neste estudo pode-se considerar que o gene *o2*, assim como o modificador de endosperma *mo2* ao induzirem alterações na síntese do padrão de proteínas, na fração zeína, levaram as linhagens 161o e 161q a apresentar maior acúmulo de aminoácidos solúveis e uma menor atividade do catabolismo de lisina, consequentemente, a um aumento considerável na concentração de lisina.

5.2 Enzima HK

A via metabólica do aspartato leva à síntese de quatro aminoácidos essenciais: lisina, treonina, metionina e isoleucina. Esta via está intimamente relacionada com a regulação do crescimento em plantas, não apenas pelo fato destes aminoácidos serem essenciais para a síntese de proteínas, mas também pelo fato de estes aminoácidos estarem relacionados com outros processos celulares. A treonina, ao ser convertida em isoleucina, participa de interações planta –

patógeno e na produção de energia celular, também, ao ser catabolizada pode ser associada com a fotorespiração (LESS; GALILI, 2009).

A síntese dos aminoácidos metionina, treonina e isoleucina, na via do aspartato, se inicia com a enzima HK, a qual catalisa a reação que sintetiza o substrato OPH, a partir de L-homoserina e ATP (LEE et al.; 2005; GOTO et al., 2005). O substrato OPH é o ponto em comum para a síntese de três dos quatro aminoácidos da via do aspartato: treonina, isoleucina e metionina (CURIEN et al.; 2008; HACHAM et al., 2008).

Assim, foram realizados diversos estudos para primeiramente estabelecer o protocolo da HK em milho, já que na literatura não há referência igual, e depois de estabelecido este protocolo, foi realizada a análise da HK nas sementes imaturas das linhagens propostas.

Inicialmente, para o estabelecimento do protocolo de ensaio da HK, foram testadas diferentes porcentagens de sulfato de amônio para a precipitação da proteína do extrato protéico bruto (Figuras 11 e 12). Para o milho, foi observada maior atividade da enzima utilizando-se a faixa de saturação 30-60% de sulfato de amônio para a precipitação da enzima. Os resultados observados na Figura 13 concordam com os dados encontrados na literatura para precipitação de diferentes enzimas da via metabólica do aspartato em milho (GAZIOLA et al., 1999; AZEVEDO et al., 2003), diferindo dos estudos encontrados na literatura para a enzima HK em diversas espécies de plantas e microorganismos (THEZE et al., 1974; RIESMEIER et al., 1993). Em microorganismos, estudos conduzidos por Theze et al. (1974) com *Escherichia coli* K-12 demonstraram que a melhor faixa de precipitação para a enzima HK nesta bactéria é de 25-40%, para diferentes linhagens de *E. Coli* a faixa de precipitação mais adequada foi de 40-60% (BOY et al., 1973; SHAMES et al., 1984). Com relação à levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi estabelecido por Mannhaupt et al. (1990) que a melhor faixa de precipitação é de 0-80%, no caso de fungos, em estudo realizado por Fernández et al. (2004), que trabalharam com *Streptomyces* sp, a faixa de 0-45% de sulfato de amônio foi utilizada para a precipitação da enzima. Diversos estudos de purificação parcial de HK em plantas, tem demonstrado uma maior atividade de HK nas faixas de 0-55% de saturação para plântulas de ervilha (THOEN et al., 1978), em estudos com folhas de rabanete e germe de trigo utilizou-se de 0-70% de sulfato de amônio (BAUM et al., 1983; RIESMEIER et al., 1993).

Seguindo com o estabelecimento do protocolo do ensaio de HK em milho, a partir dos resultados obtidos (Figura 15), estabeleceu-se que seria utilizado 5 µL (59,71 µg/mL) de amostra

em cada ensaio. Em estudo realizado com *Brevibacterium flavum*, Miyajima e Shiiro (1972) obtiveram uma atividade linear de HK utilizando concentrações crescentes de proteína ($\mu\text{g/mL}$) até alcançar a concentração de $120 \mu\text{g/mL}$. Em folhas de rabanete (BAUM et al., 1983) foi utilizado $10 \mu\text{L}$ de extrato para realizar o ensaio enzimático de HK, este volume, manteve uma reação constante por 60 minutos. Thoen et al. (1978) também encontrou uma atividade constante de HK até 60 minutos, utilizando para isso uma faixa de concentração de proteína que variou de $0\text{-}85 \mu\text{g}$.

Foi também estabelecida para o ensaio da HK, a concentração de homoserina a ser utilizada (Figura 16). Foi observado que na concentração de 3 mM homoserina se formou um pico de atividade, e que as concentrações crescentes de homoserina levaram a uma queda da atividade de HK. Entretanto, a adição de homoserina em uma alta concentração (10 mM) elevou novamente a atividade da enzima. Portanto optou-se por utilizar 3 mM de homoserina no ensaio de HK, visto que esta concentração leva a uma alta atividade da enzima, e a concentração maior (10 mM) poderia estar ativando a HK, superestimando assim sua atividade. Lee et al. (2005) ao estudarem a relação de homoserina na biossíntese de metionina e treonina em *Arabidopsis thaliana*, concluíram que a concentração de homoserina, é limitante para a atividade de HK na síntese destes aminoácidos. Em estudo realizado com batata, Rinder et al. (2008), também observou que a homoserina é o fator limitante da atividade de HK em plantas, ao fornecer uma concentração maior de homoserina às plantas, foi observado um aumento na concentração dos aminoácidos metionina e treonina.

Com o ensaio da HK otimizado em milho, foi dada continuidade ao trabalho, analisando assim a atividade da HK no genótipo selvagem W22+ e seus mutantes de endosperma (Figura 17) e também nas linhagens 161 (Figura 18).

Ao analisar a Figura 17 foi observado que apenas o genótipo selvagem apresentou uma atividade decrescente da enzima. Os mutantes W22o10 e W22o11 apresentaram uma atividade oposta a seu selvagem, com um aumento da atividade com a maturação das sementes. Estes mesmos genótipos, 20 DAP, já foram o foco de estudo para a enzima HSDH (VARISI et al., 2007), ao se comparar o comportamento de ambas as enzimas observou-se uma semelhança entre suas atividades, com as duas enzimas apresentando maior atividade no mutante W22o10. O aumento da atividade de HK e HSDH nestes mutantes pode indicar uma maior biossíntese do aminoácido treonina. A enzima HK é a segunda enzima que participa na via de biossíntese da

treonina, sendo a enzima HSDH, a primeira. A HSDH catalisa a reação de síntese da homoserina. A HK participa na fosforilação da homoserina, formando o substrato OPH, o qual pode ser utilizado pela CGS ou pela TS, levando à biossíntese de metionina e treonina. Assim, é esperado que ambas as enzimas possuam o mesmo comportamento, uma vez que uma participa da síntese do substrato da outra. Supondo-se que ocorra um aumento da atividade de HSDH, aumenta a concentração de homoserina livre, aumentando assim a atividade da HK.

O mutante *W22o10* apresentou uma atividade duas vezes maior de HK quando comparado com o selvagem *W22+* (Figura 17), o que pode indicar um aumento na biossíntese de treonina. Este dado é importante, visto que Azevedo et al. (2004) observaram para este mesmo mutante, um aumento no pool de aminoácidos solúveis, apresentando porém uma baixa concentração de lisina. Foi constatada também uma concentração duas vezes maior de treonina solúvel quando comparado com o seu selvagem. Este aumento de treonina foi devido a uma maior atividade das enzimas AK e HSDH no mutante. Estes dados indicam uma transferência de carbono e N, direcionando-os para a biossíntese de treonina na via do aspartato, visto que apesar do mutante apresentar uma baixa atividade das enzimas do catabolismo de lisina, concentrou treonina e não lisina.

A enzima HSDH, em plantas, apresenta duas isoformas, uma resistente ao aminoácido treonina e outra sensível a inibição por treonina (AZEVEDO et al., 1997). Em estudo conduzido por Azevedo et al. (2004a) conclui-se que o gene *o11* eliminou por completo a inibição da HSDH pela treonina, levando a um ligeiro estímulo de sua atividade, assim, o mutante *W22o11* apresentou duas vezes mais treonina solúvel quando comparado ao selvagem *W22+*.

O mutante *W22o13* apresentou as menores atividades da enzima HK (Figura 17). Varisi et al. (2007) também observaram uma baixa atividade da enzima HSDH para este mutante. Ao contrário do mutante *W22o10*, Azevedo et al. (2004a), observaram uma alta concentração de lisina para este mutante, com uma baixa atividade das enzimas de seu catabolismo. Assim pode-se afirmar que há uma relação antagônica entre a concentração dos aminoácidos lisina e treonina, uma vez que as enzimas que participam da síntese de ambos são reguladas pelas suas concentrações. Em sementes imaturas de sorgo Ferreira et al. (2006) observou uma atividade de HSDH, muito menor do que a encontrada nas sementes de milho, sendo que esta baixa atividade se manteve constante nos três estágios de desenvolvimento estudados, apresentando porém uma alta concentração de lisina.

Conforme a Figura 18, as linhagens 161o e 161q apresentaram uma atividade decrescente de HK com o amadurecimento das sementes, sendo que os dois últimos estágios (20 e 24 DAP) não apresentaram muita oscilação na atividade. Em estudo realizado com milhos QPM (BR451 e BR473) para a caracterização das enzimas AK e HSDH, Gaziola et al. (1999) também observaram para estas enzimas nos genótipos estudados, uma atividade decrescente conforme o amadurecimento das sementes, estes resultados são semelhantes aos encontrados para a atividade de HK nas linhagens 161 estudadas (Figura 18). Gaziola et al. (1999) também observaram uma redução da atividade de SDH, conforme aumenta o desenvolvimento das sementes nos genótipos QPM. Pode-se ainda estabelecer uma semelhança entre o QPM BR451 e a linhagem 161q, com atividades de HSDH e HK, respectivamente, intermediárias, quando comparados aos seus opacos e selvagens.

Os resultados obtidos na L161o com 14 DAP, apresentando maior atividade de HK (Figura 18) e as maiores atividades das enzimas do catabolismo de lisina (Figura 10) são confirmados ao analisar a concentração de aminoácidos nas extrações protéicas imaturas (Tabela 5). Nesta análise, foi observado maior concentração do aminoácido treonina e menor concentração de lisina, este resultado está relacionado com a alta atividade de HK e a alta atividade das enzimas do catabolismo de lisina. Estes resultados vêm corroborar com a idéia de que há uma regulação antagônica na síntese destes aminoácidos. Esta relação também foi observada na análise da atividade de HK com 24 DAP. Porém numa relação antagônica, na qual os resultados apresentados mostram a L161o com a menor atividade de HK levando a uma baixa concentração de treonina e a um aumento na concentração de lisina, devido também a baixa atividade da enzima LKR. Entretanto, neste caso ocorreu também um aumento na concentração do aminoácido isoleucina. A isoleucina é sintetizada a partir do catabolismo da treonina. A alta atividade de HK aumenta o fluxo de carbono em direção à síntese de metionina e treonina, porém a regulação da síntese destes aminoácidos é altamente variável e está sujeita a um complexo controle bioquímico, fisiológico e ambiental (RINDER et al., 2008).

HK é uma enzima de menor abundância e, deste modo, é desafiador estudá-la com muitos detalhes (RINDER, et al., 2008), embora Riesmeier et al. (1993) foram capazes de purificar e caracterizar a HK nativa de trigo. A regulação da enzima é variável. Em trigo esta enzima não é inibida por concentrações fisiológicas de treonina, metionina, valina, isoleucina ou SAM (RIESMEIER et al., 1993). Trabalhos anteriores, porém mostraram que a atividade de HK de

ervilha e rabanete é alostericamente inibida por esses aminoácidos (THOEN et al., 1978; BAUM et al., 1983). Greenberg et al. (1988) isolou linhagens de células de soja com atividade de HK reprimida conforme a metionina se acumulava. Aarnes (1978) estudou a HK de cevada e concluiu que não ocorria nenhum tipo de inibição de sua atividade pela adição destes aminoácidos, em nenhuma molaridade até 10 mM.

No estudo da regulação da enzima HK pelo aminoácido lisina (Figura 22), foi observado que baixas concentrações deste levam a uma pequena inibição da atividade de HK, sendo que a concentração de 5 mM levou a uma alta inibição da atividade. Este aminoácido auxilia na regulação de diferentes enzimas da via do aspartato, inibindo suas atividades. Uma das enzimas mais estudadas é a AK, a qual é a primeira a atuar na via metabólica, e é altamente regulada pela lisina. Em milho a AK é altamente inibida pelo aminoácido lisina na concentração de 5 mM (AZEVEDO et al., 1992). Na via de biossíntese da lisina a enzima DHDPS é também fortemente inibida pelo aminoácido lisina na concentração de 5 mM (VARISI et al., 2007).

O efeito do aminoácido metionina na regulação da enzima HK foi também analisado (Figura 22). Observou-se que concentrações crescentes deste aminoácido levam ao aumento da inibição da atividade enzimática, sendo que com 5 mM ocorre a maior inibição da enzima HK. Este aminoácido na concentração de 1 mM levou a inibição média da atividade de HK, coincidindo com os resultados obtidos por Baum et al. (1983) em folhas de rabanete, nos quais o aminoácido metionina na concentração de 1 mM levou a uma inibição da atividade de HK de 14% na atividade de HK. Pelos dados apresentados na Figura 22 podemos sugerir que há uma relação entre a atividade da enzima HK com o aminoácido metionina, visto que este aminoácido na concentração de 5,0 mM acarreta em uma maior inibição (98%) de sua atividade.

Todos os aminoácidos estudados acarretaram na inibição da atividade de HK (Figura 22), em maior ou menor concentração, apenas o ensaio realizado com SAM na concentração de 1,0 mM levou ao aumento da atividade da enzima. Como já descrito na literatura, SAM pode ativar a atividade da enzima TS (AZEVEDO; LEA, 2001; GALILI, 2002; AZEVEDO et al., 2006), levando a maior biossíntese de treonina, regulando assim, indiretamente, a biossíntese de metionina.

A fim de purificar a enzima HK, para poder caracterizá-la por completo em milho, foi utilizada a cromatografia de troca iônica, DEAE-Sephacel, para sua purificação parcial em sementes imaturas (20 DAP) de milho. A atividade de HK das frações recuperadas apresentaram

ao menos três grandes picos de atividade (Figura 20) em diferentes concentrações (139-353 mM) de KCl. Esta análise ainda não mostra um claro perfil de eluição da HK por gradiente e se por um lado os maiores picos de atividade podem indicar a possível existência de isoenzimas da HK, somente pelas análises deste trabalho não se pode afirmar tal presença de isoenzimas. Dados obtidos por Muhitch e Wilson (1983) com ervilhas, indicam a existência de isoformas de HK, porém resultados contrastantes foram obtidos por Riesmeier et al. (1993), nos quais a HK purificada foi apresentada na forma de um dímero de 36 kDa, sem a presença de isoformas. Os resultados obtidos (Figuras 20 e 21) não são conclusivos, sendo difícil sugerir ou afirmar a presença de isoenzimas. Futuros estudos devem ser realizados para melhor caracterizar a enzima HK.

5.3 Eletroforese bidimensional

Com a constatação das diferenças entre as linhagens estudadas, foi necessário realizar um estudo mais específico de suas proteínas, para poder entender melhor o metabolismo de acúmulo dos aminoácidos em questão. Para isso foi realizado uma caracterização bidimensional das proteínas de cada linhagem. Utilizando a metodologia de eletroforese bidimensional (2DE), podemos observar o complexo padrão de alterações nas linhagens estudadas, ao compará-las entre si.

Os resultados decorrentes da análise bidimensional sugerem que há diferença na expressão de algumas proteínas entre as linhagens, com maior diferença entre as linhagens 161n e 161o (Figura 24). A linhagem 161q não apresentou muitas diferenças entre as proteínas expressas quando comparada a outras duas linhagens. Isso possivelmente se deve ao fato da L161q, ser originada a partir do cruzamento das outras duas linhagens. Pode ser possível que os *spots* diferenciados na L161q ao compará-la com a L161n se devam a genes presentes na linhagem 161o, visto que há um maior número de *spots* diferenciados entre as linhagens 161n e 161o.

O perfil protéico das proteínas expressas das linhagens 161 foi realizado seguindo o mesmo critério de análise do perfil protéico de SDS-PAGE. Os resultados obtidos na análise de 2DE das proteínas sugerem que o gene *o2*, assim como os genes *mo2* promoveram a diminuição na expressão de certas proteínas e a síntese aparente de novas proteínas.

A fração zeína apresentou distribuição semelhante nos perfis protéicos SDS-PAGE e 2DE (Figura 23), com diminuição na expressão dos *spots* com 19 kDa e aumento da expressão das

proteínas com 16 e 14 kDa, quando comparada a linhagem 161n com as L161o e L161q. O aumento de expressão nas isoformas de β -zeína 14 kDa é coerente com a literatura, que indica que o gene *o2* afeta a síntese desta proteína (AZEVEDO et al., 2003). A ausência de proteínas com 22 kDa, na linhagem 161o, também pode ser observado no perfil 2DE desta fração. Em trabalho realizado por Motto et al. (1986) foi relatado que os genes *o1*, *o2*, *fl1* e *fl2* induziram a expressão de proteínas com similar PM e pI, dentro de cada fração protéica, sugerindo que os mesmos, apesar de terem origens diferentes poderiam afetar direta (*o2*) ou indiretamente (*fl2*) a expressão de genes de proteínas de reserva, tanta na transcrição como na transdução.

O padrão de distribuição das proteínas expressas na linhagem 161n apresentou maior número de *spots*, quando comparada às outras duas linhagens (Figura 24). Ao se comparar os *spots* das três linhagens, a L161n, apresentou maior número de *spots* com maior expressão que as outras duas linhagens. Com relação à aparição de novos *spots*, novamente foi a L161n que apresentou um maior número de *spots* exclusivos.

Ao comparar apenas as linhagens 161o e 161q (Figura 24), as diferenças observadas foram menores, com poucos *spots* diferenciados, porém 6 *spots* exclusivos na linhagem 161q.

Embora tenham sido publicados diversos trabalhos de análise bi-dimensional em milho, apenas um avaliou os efeitos de *o2* na expressão de proteínas durante o desenvolvimento do endosperma (DAMERVAL; LE GUILLOUX, 1998), outros foram direcionados para obtenção de mapas proteômicos de sementes imaturas (MÉCHIN et al., 2004) ou para caracterizar isoformas da família zeína da semente de milho (CONSOLI; DAMERVAL, 2001). Entretanto, a partir dos mapas proteômicos foi possível determinar: 1) A distribuição dos *spots* protéicos entre 10 e 100 kDa; 2) numerosos *spots* com similar PM e diferentes pI podem pertencer à mesma proteína; 3) numerosas isoformas conformam a família de proteínas da fração zeína, existindo ampla variabilidade em quantidade de polipeptídeos em linhas diferentes de milho (AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2004).

Os *spots* que apresentaram expressão diferenciada, assim como aqueles que se apresentaram exclusivos em cada linhagem, serão processados com tripsina para posterior identificação da massa das proteínas por espectrofotometria. Deve-se esclarecer que os valores de MM citados neste trabalho são apenas teóricos e devem ser confirmados com os valores obtidos após o sequenciamento e identificação das proteínas.

Tendo caracterizado as proteínas de reserva de cada linhagem estudada, foi observado que o melhoramento de milho para obtenção de um QPM é de fato eficaz, obtendo milhos de características fenotípicas semelhantes ao milho normal e de alta concentração de lisina. Com um seqüenciamento dos *spots* diferenciados de cada linhagem, pode-se obter um maior entendimento sobre o metabolismo das proteínas que levam o QPM a ser rico em lisina. Com o estabelecimento do protocolo da enzima HK para milho, é necessário que se realizem mais pesquisas a fim de se obter uma maior compreensão da via de biossíntese do aminoácido treonina. Pode-se afirmar que com o melhoramento do milho para obtenção de um QPM, futuramente, se poderá também, obter um QPM rico em treonina.

6 CONCLUSÕES

- Com a análise de todos os dados em conjunto pode-se concluir que a linhagem de milho 161q fornecida pela EMBRAPA, apresentou as características desejadas de milhos QPM, com uma qualidade protéica alta. A alta concentração do aminoácido lisina pode ser devida à diminuição na concentração da fração zeína, aumentando assim as frações não zeínas, e à baixa atividade das enzimas, LKR e SDH, que participam do catabolismo deste aminoácido.
- A diferença entre a concentração de lisina encontrada entre as linhagens 161o e 161q como em outros materiais já analisados na literatura, pode ser devida ao background genético de cada linhagem.
- O fato de a linhagem QPM apresentar alta concentração de lisina a caracteriza como um potencial genitor para o melhoramento genético de milho visando alto teor de proteína. Aumentando assim, a qualidade protéica do milho.
- Com relação à enzima HK, pode ser concluído que o aumento de sua atividade acarreta num aumento da concentração do aminoácido treonina, diminuindo a concentração de lisina nas sementes.
- No estudo da atividade de HK ocorreu indução da enzima pela adição de SAM na concentração de 1,0 mM. Com a adição de metionina 5,0 mM ocorreu alta inibição da atividade da enzima. Estes resultados podem indicar uma regulação da HK por estes aminoácidos, como já é conhecido para outras enzimas da via do aspartato. É necessário que se realizem mais estudos sobre esta enzima para poder compreender melhor seu mecanismo de regulação.

REFERÊNCIAS

AARNES, H. Regulation of threonine biosynthesis in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.) **Planta**, New York, v. 140, p.185-192, 1978.

ADAMS, W.; HUANG, S.; KRIZ, A.; LUETHY, M. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of zeins in mature maize kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, p.1842-1849, 2005.

ALARCON, C.M.; HEITMAN, J. FKBP12 physically and functionally interacts with aspartokinase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 17, p. 5968-5975, 1997.

AMIR, R.; HACHAM, Y.; GALILI, G. Cystathionine γ -synthase and threonine synthase operate in concert to regulate carbon flow towards methionine in plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 7, p. 153-156, 2002.

ANDREWS, M.; LEA, P.J.; RAVEN, J.A.; LINDSEY, K. Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v.145, p. 25-40, 2004.

ARRUDA, P.; KEMPER, E.L.; PAPES, F.; LEITE, A. Regulation of lysine catabolism in higher plants. **Trends in Plant Science**, London, v.5, p.324-330, 2000.

AZEVEDO, R. A. Analysis of the aspartic acid metabolic pathway using mutant genes. **Amino Acids**, New York, v. 22, p. 217–230, 2002

AZEVEDO, R.A.; LEA, P. J. Lysine metabolism in higher plants. **Amino Acids**, New York, v.20, p.261–279, 2001.

AZEVEDO, R.A.; LANCIEN, M.; LEA, P.J. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. **Amino acids**, New York, v.30, p.143-162, 2006.

AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Aspartate kinase regulation in maize: regulation by calcium and calmodulin. **Phytochemistry**, Oxford, v.31, p.3735-3737, 1992.

AZEVEDO, R. A.; ARRUDA, P.; TURNER, W. L.; LEA, P. J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.46, p.395–419, 1997.

AZEVEDO, R. A.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; LEA, P.J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A.; GAZIOLA, S.A.; BERDEJO, B.D.A. Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by opaque and floury mutations. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.270, p.4898-4908, 2003

AZEVEDO R.A.; DAMERVAL C.; LEA P.J.; LANDRY J.; BELLATO C.M.; MEINHARDT L.W.; LE GUILLOUX M.; DELHAYE S.; TORO A.A.; GAZIOLA S.A.; VARISI V.A.; GRATÃO P.L. Genetic control of lysine metabolism in maize endosperm mutants. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v.31, p. 339-348, 2004a.

AZEVEDO, R. A.; LEA, P.J.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; VARISI V.A.; GAZIOLA, S.A.; GRATÃO P.L; TORO A.A. Regulation of lysine metabolism and endosperm protein synthesis by *Opaque-5* and *Opaque-7* maize mutations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p.4865-4871, 2004b.

BAUM, H.J.; MADISON, J.T.; THOMPSON, J.F. Feedback inhibition of Homoserine Kinase from radish leaves. **Phytochemistry**, Oxford, v. 22, p. 2409-2412, 1983.

BELLATO, C. DE M., GARCIA, A.K.M, MESTRINELLI, F., TSAI, S.M., MACHADO, M.A., MEINHARDT, L.W. The induction of differentially expressed proteins of *Xylella Fastidiosa* with Citrus extract, **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 235-242, 2004.

BICAR E.H.; WOODMAN-CLIKEMAN, W.; SANGTONG, V. PETERSON, J.M.; YANG, S.S.; LEE, M.; SCOTT, P. Transgenic maize endosperm containing a milk protein has improved amino acid balance. **Transgenic Research**, New York, v. 17, p. 59-71, 2008.

BORÉM, A.; GIÚDICE, M.P. Cultivares transgênicos. In: GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V. (Ed) **Tecnologia de produção do milho**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. v.1, p.13-53.

BOY, E.; THEZE, J.; PATTE, C. Transient regulation of enzyme synthesis in *Escherichia coli*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 121, p. 77-81, 1973.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San diego, v. 72, p. 248-259, 1976.

BRENNECKE, K.A.; SOUZA NETO, J.A.; LUGLI, J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Aspartate kinase in the maize mutants *Ask1-LT19* and *Opaque-2*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 41, p. 707-712, 1996.

BRYAN, P.A.; CAWLEY, R.D.; BRUNNER, C.E.; BRYAN, J.K. Isolation and characterization of a lysine-sensitive aspartokinase from a multicellular plant. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 41, p. 1211-1217, 1970.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCHI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETI, P.G. Blue Silver: A very sensitive Colloidal Comassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Berlin, v.25, p.1327-1333, 2004.

CHANDRASHEKAR, A.; MAZHART, H. The biochemical bases and implications of grain strenght in sorghum and maize. **Journal of Cereal Science**, Washington, v.30, p.193-207, 1999.

CHIBA, Y.; ISHIKAWA, M.; KIJIMA, F.; TYSON, R.H.; KIM, J.; YAMAMOTO, A.; MAMBARA, E.; LEUSTEK, T.; WALLSGROVE, R.M.; NAITO, S. Evidence for autoregulation of cystathionine g-synthase mRNA stability in Arabidopsis. **Science**, Washington, v. 286, p. 1371–1374, 1999.

CICERI, P.; GIANAZZA, E.; LAZZARI, B.; LIPPOLI, G.; GENGA, A.; HOSCHEK, G.; SCHMIDT, R.J.; VIOTTI, A. Phosphorylation of *opaque-2* changes diurnally and impacts its DNA binding activity. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 97-108, 1997.

CONSOLI, L.; DAMERVAL, C. Quantification of individual zein isoforms resolved by two-dimensional electrophoresis genetics variability in 45 maize imbred lines. **Electrophoresis**, Berlin, v. 22, p. 2983-2989, 2001.

COVARRUBIAS, A.S.; HOGBOM, M.; BERGFORS, T.; CARROLL, P.; MANNERSTEDT, K.; OSCARSON, S.; PARISH, T.; JONES, T.A.; MOWBRAY, S.; Structural biochemical, and *In Vivo* investigations of the threonine synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 381, p. 622-633, 2008.

CROW, J.F.; KERMICLE, J. Anecdotal, Historical and Critical Commentaries on Genetics: Oliver Nelson and Quality Protein Maize. **Genetics**, Baltimore, v. 160, p. 819-821, 2002.

CURIEN, G.; BIOU, V.; MAS-DROUX, C.; ROBERT-GENTHON, M.; FERRER, J.L.; DUMAS, R. Amino acid biosynthesis: New architectures in allosteric enzymes. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, p. 325-339, 2008.

CURIEN, G.; RAVANEL, S.; DUMAS R. A kinetic model of the branchpoint between the methionine and threonine biosynthesis pathways in *Arabidopsis thaliana*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 270, p. 4615-4627, 2003.

CURIEN, G.; DUMAS, R.; RAVANEL, S.; DOUCE, R. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding an S-Adenosylmethionine-Sensitive Threonine Synthase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 390, p. 85-90, 1996.

DAMERVAL, C.; GUILLOUX, M. Characterization of novel proteins affected by the *o2* mutation and expressed during maize endosperm development. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 257, p. 354-361, 1998.

DATKO, A.H.; GIOVANELLI, J.; MUDD, S.H. Homocysteine biosynthesis in green plants, o-phosphorylhomoserine as the physiological substrate for cystathionine c-synthase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 249, p. 1139-1155, 1974.

FALCO, S.C.; GUIDA, T.; LOCKE, M.; MAUVAIS, J.; SANDERS, C.; WARD, R.T.; WEBBER, P. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. **Bio-Technology**, New York, v. 13, p. 577-582, 1995.

FAO. **Statistical databases**. Disponível em: <http://apps.fao.org/> Acesso em: 04 Dec.2008.

FERNANDÉZ, M.; CUADRADO, Y.; APARICIO, J.F.; MARTÍN, J.F. Role of homoserine and threonine pathway intermediates as precursors for the biosynthesis of aminoethoxyvinylglycine in *Streptomyces* sp. NRRL 5331. **Microbiology**, London, v.150, p. 1467-1474, 2004.

FERREIRA, R.R.; MEINHARDT, L.W.; AZEVEDO, R.A. Lysine and threonine biosynthesis in sorghum seeds: Characterisation of aspartate kinase and homoserine dehydrogenase isoenzymes. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 149, p. 77-86, 2006.

FERREIRA, R.R.; VARISI, V.A.; MEINHARDT, L.W.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Are high-lysine cereal crops still a challenge? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, p. 985-994, 2005.

FORNAZIER, R.F.; GAZIOLA, S.A.; HELM, C.V.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Isolation and characterization of enzymes involved in lysine catabolism from sorghum seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 1791-1798, 2005.

FREITAS, F.O. **Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (*Zea mays mays* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)** 2001. 125 p. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

FRIZZI, A.; HUANG, S.; GILBERTSON, L.A.; ARMSTRONG, T.A.; LUETHY, M. Modifying lysine biosynthesis and catabolism in corn with a single bifunctional expression/silencing transgene cassette. **Plant Biotechnology Journal**, New York, v. 6, p. 13-21, 2008.

GALILI, G. New insights into the regulation and functional significance of Lysine metabolism in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Oxford, v. 53, p. 27-43, 2002.

GALILI, G. Regulation of lysine and threonine synthesis. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 899-906, 1995.

GALILI, G.; HÖFGEN, R. Metabolic engineering of amino acids and storage proteins in plants. **Metabolic Engineering**, San Diego, v.4, p.3-11, 2002.

GALILI, G.; TANG, G.L.; ZHU, X.H.; GAKIERE, B. Lysine catabolism: A stress and development super-regulated metabolic pathway. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 261-266, 2001.

GALINAT, W.C. The origin of maize: grain of humanity. **New York Botanical Garden Journal**, New York, v. 44, p. 3-12, 1995.

GAZIOLA, S.A. **Isolamento, purificação, caracterização e estudo dos mecanismos de regulação das enzimas lisina 2-oxoglutarato reductase (LKR) e sacaropina desidrogenase (SDH) em Arroz (*Oriza sativa* L.).** 1999. 96p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

GAZIOLA, S.A.; SODEK, L.; ARRUDA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Degradation of lysine in Rice seeds: effect of calcium, ionic strength, S-adenosilmethionine and S-2-aminoethyl-L-cysteine on the 2-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme. **Physiologia Plantarum**, Finlandia, v. 110, p. 164-171, 2000.

GAZIOLA, S.A.; TEIXIERA, C.M.G; LUGLI, J.; SODEK, L.; AZEVEDO, R.A. The enzymology of lysine catabolism in rice seeds. Isolation, characterization, and regulatory properties of a lysine 2-oxoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional polypeptide. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 247, p. 364-371, 1997.

GAZIOLA, S.A.; ALESSI, E.S.; GUIMARAES, P.E.O.; DAMERVAL, C.; AZEVEDO, R.A. Quality protein maize: A biochemical study of enzymes involved in lysine metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.47, p.1268-1275, 1999.

GEETHA, K.; LENDING, C.R.; LOPES, M.A.; WALLACE, J.C.; LARKINS, B.A. opaque-2 modifiers increase γ -zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, p. 1207-1219, 1991.

GIBBON, B.C.; LARKINS, B.A. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. **Trends in Genetics**, London, v.21, p.227-233, 2005.

GIOVANELLI, J.; VELUTHAMBI, K.; THOMPSON, G.A.; MUDD, S.H.; DATKO, A.H. Threonine Synthase Of *Lemna Paucicostata* Hegelm. 6746. **Plant Physiology**, Rockville, v. 76, p. 285-292, 1984.

GONÇALVES-BUTRUILLE, M.; SZAJNER, P.; TORIGOI, E.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Purification and characterization of the bifunctional enzyme lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase from maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, p. 765-771, 1996.

GOTO, D.B.; ONOUCHI, H.; NAITO, S. Dynamics of methionine biosynthesis, **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 22, p. 379–388, 2005.

GREENBERG, J.M.; THOMPSON, J.F.; MADISON, J.T. Homoserine kinase and threonine synthase in methionine-overproducing soybean tissue cultures. **Plant Cell Report**, Rockville, v. 7, p. 477–480, 1988.

GUIMARÃES, P.S. **Desempenho de híbridos simples de milho (*Zea mays* L.) e correlação entre heterose e divergência genética entre as linhagens parentais**. 2007. 111 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical Subtropical) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

GUTIERREZ-ROJAS, A.; SCOTT, M.P.; LEVYA, O.R.; MENZ, M.; BETRÁN, J. Phenotypic characterization of Quality Protein Maize endosperm modification and amino acid contents in a segregating recombinant inbred population. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. 1714-1722, 2008.

HABBEN, J.E.; KIRLEIS, A.W.; LARKINS, B.A. The origin of lysine containing proteins, in *opaque-2* maize endosperm. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 23, p. 825-838, 1993.

HACHAM, Y.; MATITYAHUL, I.; SCHUSTER, G.; AMIR, R. Overexpression of mutated forms of aspartate kinase and cystathionine c-synthase in tobacco leaves resulted in the high accumulation of methionine and threonine. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, p. 260-271, 2008.

HESS, H.; NIKIFOROVA, V.; GAKIERE, B.; HOEFGEN, R. Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1283-1292, 2004.

HESSE, H.; HOEFGEN, R. Molecular aspects of methionine biosynthesis. **Trends in Plants Science**, London, v. 8, p. 259-262, 2003.

HUANG, S.S.; KRUGER, D.E.; FRIZZI, A.; D'ORDINE, R.L.; FLORIDA, C.A.; ADAMS, W.R.; BROWN, W.E.; LUETHY, M.H. High-lysine corn produced by the combination of enhanced lysine biosynthesis and reduced zein accumulation. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 3, p. 555-569, 2005.

HUANG, S.; ADAMS, W.R.; ZHOU, Q.; MALLOY, K.P.; VOYLES, D.A.; ANTHONY, J.; KRIZ, A.L.; LUETHY, M.H. Improving nutritional quality of maize proteins by expressing sense and antisense. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 1958-1964, 2004.

HUDSON, A.O.; SINGH, B.K.; LEUSTEK, T.; GILVARG, C. An LL-diaminopimelate aminotransferase defines a novel variant of the lysine biosynthesis pathway in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 292-301, 2006.

HULSHOF, P.J.M.; KOSMEIJER-SCHUILA, T.; WESTA, C.E.; HOLLMAN, P.C.H. Quick screening of maize kernels for provitamin A content. **Journal of Food Composition and Analysis**, Wageningen, v. 20, p. 655-661, 2007.

HUNTER B.G.; BEATTY, M.K.; SINGLETARY, G.W.; HAMAKER, B.R.; DILKES, B.P.; LARKINS, B.A.; JUNG, R. Maize *opaque* endosperm mutation create extensive changes in patterns of gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 2591-2612, 2002.

JOSHI, V.; LAUBENGAYER, K.M.; SCHAUNER, N.; FERNIE, A.R.; JANDER, G. Two Arabidopsis threonine aldolases are nonredundant and compete with threonine deaminase for a common substrate pool. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 3564-3575, 2006.

KANG, J.H.; WANG, L.; GIRI, A.; BALDWIN, I.T. Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acidisoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 3303-3320, 2006.

KEMPER, E.L.; NETO, G.C.; PAPES, F.; MORAES, K.C.M.; LEITE, A.; ARRUDA, P. The role of *opaque-2* in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1981-1993, 1999.

KENT, N. L. **Tecnología de los cereales**: Introducción para Estudiantes de ciência de los alimentos y agricultura. Zaragoza: Acribia, 1987.

KIM, C.S.; WOO, Y.; CLORE, A.M.; BURNETT, R.J.; CARNEIRO, N.P.; LARKINS, B.A. Zein protein interactions, rather than the asymmetric distribution of zein mRNAs on endoplasmic reticulum membranes, influence protein body formation in maize endosperm. **Plant Cell**, Rockville, v.14: p.655-672, 2002.

KLEIN, O. **Posição mundial de milho brasileiro pode ser afetada**. Viçosa: Agrosoft Brasil, 2009.v. 4,p.1.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

LANDRY, J.; MOUREAUX, T. Heterogeneity Of Glutelins Of Corn Seeds - Selective Extraction And Composition Of Amino Acids Of 3 Isolated Fractions. **Bulletin De La Societe De Chimie Biologique**, Paris, v. 52, p. 1021, 1970.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Protein distribution pattern in floury and vitreous endosperm of maize grain. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 81, p. 153-158, 2004.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Improved method for isolating and quantitating R-amino nitrogen as nonprotein, true protein, salt-soluble proteins, zeins, and true gluteins in maize endosperm. **Cereal Chemistry**, St Paul, v.77, p.620-626, 2000.

LANDRY J., DAMERVAL C., AZEVEDO R.A., DELHAYE S. Effect of the Opaque and Floury mutations on the accumulation of dry matter and protein fractions in maize endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, p. 549-556, 2005.

LEA, P. J.; BLACKWELL, R. D.; AZEVEDO, R. A. Analysis of barley metabolism using mutant genes. In, SHEWRY, P.R. (Ed.) **Barley, genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology**. Wallingford: CAB International. 1992, p. 181–208.

LEA, P.J.; MILLS, W.R.; MIFLIN, B.J. The isolation of a lysine-sensitive aspartate kinase from pea leaves and its involvement in homoserine biosynthesis in isolated chloroplasts. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 98, p. 165-168, 1979.

LEE, M.; LEUSTEK, T. Identification of the gene encoding Homoserine Kinase from *Arabidopsis thaliana* and characterization of the recombinant enzyme derived from the gene. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 372, p. 135-142, 1999.

LEE, M.; MARTIN, M.N.; HUDSON, A.O.; LEE, J.; MUHITCH, M.J.; LEUSTEK, T. Methionine and threonine synthesis are limited by Homoserine availability and not the activity of Homoserine Kinase in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v.41, p. 685-696, 2005.

LESS, H.; GALILI, G. Coodinations between gene modules control the operation of plant amino acid metabolic network. **BMC Sistem Biology**, London, v. 3, p. 14-32, 2009.

LINKO, R.; LAPVETELÄINEN, A.; LAAKSO, P.; KALLIO, H. Protein composition of a high-protein barley flour and barley grain. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 66, p. 478-482, 1989

LOPES, M.A.; LARKINS, B. Endosperm Origin, development, and function. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1383-1399, 1993.

MADISON, J.T. & THOMPSON, J.F. Threonine synthase from higher plants: stimulation by S-adenosylmethionine and inhibition by cysteine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 71, p. 684-691, 1976.

MANNHAUPT, G.; POHLENZ, H-D.; SEEFLUTH, A.K.; PILZ, U.; FELDMANN, H. Yeast homoserine kinase. Characteristics of the corresponding gene, THR1, and the purified enzyme, and evolutionary relationships with other enzymes of threonine metabolism. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 191, p. 115-122, 1990.

MARUR, C. J., SODEK, L., E MAGALHÃES, A C. N. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 6, p. 103-108, 1994.

MAS-DROUX, C.; BIOU, V.; DUMAS, R. Allosteric threonine synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, Washington, v. 281, p. 5188-5196, 2006.

MATTHEWS, B.F.; WIDHOLM, J.M. Expression of aspartokinase, dihydrodipicolinic acid synthase and homoserine dehydrogenase during growth of carrot cell suspension cultures on lysine and threonine supplemented media. **Zeitschrift Naturforsch**, Wiesbaden, v. 34, p. 1177-1185, 1979.

McLENNAN, N.; MASTERS, M. GroE is vital for cell-wall synthesis. **Nature**, London, v. 392, p. 139-139, 1998.

MÉCHIN, V.; BALLIAU, T.; CHÂTEAU, S.; DAVANTURE, M.; LANGELLA, O.; NÉGRONI, L.; PRIOUL, J-L.; THÉVENOT, C.; ZIVY, M.; DAMERVAL, C. A two-dimensional proteome map of maize endosperm. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 1609-1818, 2004.

MERTZ, E.T.; BATES, L.S.; NELSON, O.E. Mutant gene that changes protein composition and Increases lysine content of maize endosperm. **Science**, Washington, v.145, p.279-280, 1964.

MILLWARD, D.J. The nutritional value of plant-based diets in relation to human maino acid and protein requirements. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v.58, p.249-260, 1999.

MITTELMANN, A. **Variação genética para qualidade nutricional em milho com endosperma normal**. 2001. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

MIYAJIMA, R.; SHIO, I. Regulation of Aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 71, p. 219-226, 1972.

MOLINA, S.M.G.; GAZIOLA, S.A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Manipulação de cereais para acúmulo de lisina em sementes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p.205-211, 2001.

MONSANTO. **New releases**. Disponível em: <http://monsanto.mediaroom.com>. Acesso em: 04 Jan. 2009.

MOTTO M, MAROTTA R, DIFONZO N, SOAVE C, SALAMINI F Ds-Induced Alleles At The Opaque-2 Locus of Maize. **Genetics**, Baltimore, v. 112, p. 121-133, 1986.

MOTTO, M.; MADDALONI, M.; PONZIANI, G.; BREMBILLA, M.; MAROTTA, R.; DIFONZO, N.; SOAVE, C.; THOMPSON, R.; SALAMINI, F. Molecular cloning of the *o2-m5* allele of *Zea mays* using transposon marking. **Molecular and General Genetic**, New York, v. 212, p. 488-494, 1988.

MUHITCH, M.J.; WILSON, K.G. Chloroplast are the subcellular location of both soluble and membrane-associated homoserine kinases in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Germany, v. 110, p. 39-46, 1983.

NAVES, M.M.V.; SILVA, M.S.; CERQUEIRA, F.M.; PAES, M.C.D. Avaliação química e biológica da proteína do grão em cultivares de milho de alta qualidade protéica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v. 34, p. 1-8, 2004.

NURIT, E.; TIESSEN, A.; PIXLEY, L.V.; PALACIOS-ROJAS, N. Reliable and inexpensive colorimetric method for determining protein-bound tryptophan in maize kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.57, p.7233-7238, 2009.

OENEMA, O. Governmental policies and measures regulating nitrogen and phosphorus from animal manure in European agriculture. **Journal Animal Science**, New York, v.82, p.E196-E206, 2004.

OLIVEIRA, J.P.; CHAVES, L.J.; DUARTE, J.B.; BRASIL, E.M.; FERREIRA JUNIOR, L.T.; RIBEIRO, K.O. Teor de proteína no grão em populações de milho de alta qualidade protéica e seus cruzamentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v.34, p. 45-51, 2004.

OSBORNE, T.B. **The proteins of the wheat kernel**. Washington DC:Carnegie Institute, 1907.

PACHECO, C.A.P.; GUIMARÃES, P.E.O.; PARENTONI, S.N.; LOPES, M.A.; SANTOS, M.X.; GAMA, E.E.G.; VASCONCELOS, M.J.V.; CORREA, L.A.; MEIRELLES, W.F. **O desenvolvimento de milho de alta qualidade nutricional no Brasil**. In: Anais... REUNIÃO LATINOAMERICANA DEL MAIZ, 18º, 1999, Sete Lagoas: EMBRAPA/CIMMYT, p. 13-26.

PRASANNA, B.M.; VASAL, S.K.; KASSAHUN, B.; SINGH, N.N. Quality protein maize. **Current Science**, Bagalore, v. 81, p. 1308-1319, 2001.

RELTON, J.M.; BONNER, P.L.R.; WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J. Physical and kinetic properties of lysine-sensitive aspartate kinase purified from carrot cell suspension culture. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 953, p. 48- 60, 1988.

RIESMEIER, J.; KLONUS, A.K.; PHOLENZ, H.D. Purification to homogeneity and characterization of Homoserine Kinase from wheat germ. **Phytochemistry**, Oxford, v. 32, 581-584, 1993.

RINDER, J.; CASAZZA, A.P.; HOEFGEN, R.; HESSE, H. Regulation of aspartate-derived amino acid homeostasis in potato plants (*Solanum tuberosum*) by expression of *E. coli* homoserine kinase. **Amino Acids**, New York, v. 34, p. 213-222, 2008.

ROGNES, S.E. Threonine biosynthesis. In: LEA, P.J. **Methods in plant biochemistry**. 3 ed th. London:Academic Press. 1990. p. 315-324.

ROGNES, S.E.; WALLSGROVE, R.M.; KUEH, J.S.H.; BRIGHT, S.W.J. Effects of exogenous amino acids on growth and activity of four aspartate pathway enzymes in barley. **Plant Science**, Clare, v. 43, p. 45-50, 1986.

SCHAEFFER, G.W.; SHARPE, F. T. Electrophoretic profiles and amino acid composition of rice endosperm proteins of a mutant with enhanced lysine and total protein after backcrosses for germplasm improvements. **Theoretical Applied Genetics**, Germany, v. 95, p.230-235, 1997.

SCHIMIDT, A.A.P. **Sorgo**. São Paulo: Ícone, 1987. 64 p.

SCHLOSS, J.V.; AULABAUGH, A. Acetolactate synthase and ketol-acid reductoisomerase: A search for reason and a reason for search. In: BARAK, Z.; CHIPMAN, D.M.; SCHLOSS, J.V. (Ed.). **Biosynthesis of branched chain amino acids**. Weinheim: VCH Publishers, 1989. p. 329-56.

SCHNYDER, J.; ROTTENBERG, M.; ERISMANN, K.H. The synthesis of threonine and thiothreonine from *o*-phospho-homoserine by extracts prepared from higher plants. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, Germany, v. 167, p. 605-608, 1975.

SEGAL, G.; SONG, R.T.; MESSING, J. A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. **Genetics**, Baltimore, v. 165, p. 387-397, 2003.

SHAMES, S.L.; ASH, D.E.; WEDLER, F.C.; VILLAFRANCA, J.J. Interaction of aspartate and aspartate-derived antimetabolites with the enzymes of the threonine biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 259, p. 15331-15339, 1984.

SHEWRY, P.; HALFORD, N. Cereal seed storage protein: structure, properties and role in grain utilization. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 947-958, 2002.

SHEWRY, P.R.; TATHAM, A.S. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. **Biochemical Journal**, London, v. 267, p. 1-12, 1990.

SHEWRY, P. R.; ELLIS, R. S.; PRATT, H. M.; MIFLIN, B. J. A comparison of methods for the extraction and separation of hordein fractions from 29 barley varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Easton, v.29, p.433-441, 1978.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 19, p. 1144-1150, 1971.

_____. Incorporation of leucine-C14 into protein in the developing of normal and opaque-2 corn. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 140, p. 29-38, 1970.

STEPANSKY, A.; LESS, H.; ANGELOVICI, R.; AHARON, R.; ZHU, X.H.; GALILI, G. Lysine catabolism an effective versatile regulator of lysine level in plants. **Amino Acids**, New York, v. 30, p. 121-125, 2006.

SWARUP, S.; TIMMERMANS, M.C.; CHAUDHURI, S.; MESSING, J. Determinants of the high-methionine traits in wild and exotic germplasm may have escaped selection during early cultivation of maize. **The Plant Journal**, Oxford, v. 8, p. 359-368, 1995.

TANG, G.; MIRON, D.; ZHU-SHIMONI, J.X.; GALILI, G. Regulation of lysine catabolism through lysine-oxoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v.9, p.1305-1316, 1997

TANG, G.L.; ZHU, X.H.; GAKIERE, B.; LEVANONY, H.; KAHANA, A.; GALILI, G. The bifunctional *lkr-sdh* locus of plants also encodes a highly active monofunctional lysine ketoglutarate reductase using a polyadenylation signal located within an intron. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 147-154, 2002.

THEZE, J.; KLEIDMAN, L.; GIRON, S. Homoserine Kinase from *Escherichia coli* K-12: Properties, inhibition by L-Threonine, and regulation of biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 118, p. 577-581, 1974.

THOEN, A.; ROGNES, S.E.; ARNES, H.A. Biosynthesis of Threonine from Homoserine in Pea seedlings: II Threonine Synthase. **Plant Science Letters**, Clare, v. 13, p. 113-119, 1978.

TORO, A.A. **Caracterização de proteínas de reserva de mutantes de endosperma de milho de alta lisina**. 2006. 250 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidades de São Paulo, Piracicaba, 2006.

TURNER, N.A.; REDGWELL, R.J. A mixed layer for separation of amino acids by thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, Washington, v. 21, p. 129-132, 1966.

UFAZ, S.; GALILI, G. Improving the content of essential amino acids in crop plants: Goals and opportunities. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, p. 954-961, 2008.

VARISI, V.A.; MEDICI, L.O.; VAN DER MEER, I.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Dihydrodipicolinate synthase in opaque and floury maize mutants. **Plant Science**, Clare, v. 173, p. 458-467, 2007.

VARISI, V.A.; CAMARGOS, L.S.; AGUIAR, L.F.; CHRISTOFOLETI, R.M.; MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A. Lysine biosynthesis and nitrogen metabolism in quinoa (*Chenopodium quinoa*): Study of enzymes and nitrogen-containing compounds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, p. 11-18, 2008.

VASAL, S. K. **Quality protein maize**. Ciudad del México: CIMMYT, 1999. (Improving human nutrition through agriculture: The Role of International Agricultural Research)

_____. High quality protein corn. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. Boca Raton: CRC Press. 2001. Chap. 4.

VILLEGAS, E.; VASAL, S.K.; BJARNASON, M. Quality protein maize: what is it and how was it developed? In: National Research council. **Quality protein maize**. Washington: Academy Press. 1992, 90 p.

VIOLA, R.E. The central enzymes of the aspartate family of amino acid biosynthesis. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v.34, p. 339-349, 2001.

WALLACE, J.C.; LOPES, M.A.; PAIVA, E.; LARKINS, B.A. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of γ -zein in modified opaque-2 Maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, p. 191-196, 1990.

WALLSGROVE, R.M.; MAZELIS, M. Spinach leaf dihydrodipicolinate synthase - partial-purification and characterization. **Phytochemistry**, Oxford, v.20, p.2651-2655, 1981.

WANG, X.L.; LARKINS, B.A. Genetic analysis of amino acid accumulation in *opaque-2* maize endosperm. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 1766-1777, 2001.

WANG, X.; LOPEZ-VALENZUELA, J.A.; GIBBON, B.C.; GAKIERE, B.; GALILI, G. Characterization of monofunctional aspartate kinase genes in maize and their relationship with free amino acid content in the endosperm. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v, 58, p. 2653-2660, 2007.

WILLIAMS, I.O.; AGIANG, M.A.; EKPE, O.O.; ALETAN, U.I.; EDET, E.O.; ATANGWHO, I.J. Nutritional quality of first generation quality protein maize diet and its effects on some biological indices of albino wistar rats. **American Journal of Food Technology**, New York, v.4, p.30-35, 2009

WU, Y.; GOETTEL, W.; MESSING, J. Non-Mendelian regulation and allelic variation of methionine-rich delta-zein genes in maize. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 119, p. 721-731, 2009.

XU, J.H.; MESSING, J. Organization of the prolamin gene family provides insight into the evolution of the maize genome and gene duplications in grass species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, p. 14330-14335, 2008.

XU, C; XU, Y; HUANG, B. Protein extraction for two-dimensional gel electrophoresis of proteomic profiling in turfgrass. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. 1608-1614, 2008.

ZEH, M.; CASAZZA, A.P.; KREFT, O.; ROSSNER, U.; BIEBRICH, K.; WILLMITZER, L.; HOFGEN, R.; HESSE, H. Antisense inhibition of threonine synthase leads to high methionine content in transgenic potato plants. **Plant Physiology**, Rockville, 127: 792–802, 2001.

ZHU, X.H.; GALILI, G. Lysine metabolism is concurrently regulated by synthesis and catabolism in both reproductive and vegetative tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 129-136, 2004.

_____. Increased lysine synthesis coupled with a knockout of its catabolism synergistically boosts lysine content and also transregulates the metabolism of other amino acids in arabidopsis seeds. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 845-853, 2003.

ZHU, X.H.; TANG, G.L.; GALILI, G. Characterization of the two saccharopine dehydrogenase isozymes of lysine catabolism encoded by the single composite at *Atlkr/sdh locus* of arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 1363-1371, 2000.

ZHU, X.H.; TANG, G.L.; GRANIER, F.; BOUCHEZ, D.; GALILI, G. A T-DNA insertion knockout of the bifunctional lysine-ketoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase gene elevates lysine levels in Arabidopsis seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, p. 1539-1545, 2001.