

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Transformação genética de milho com uma  
nova proteína – a Zeolina**

**Luciana Pimenta Ambrozevicius**

**Tese apresentada, para obtenção do título de  
Doutor em Agronomia. Área de concentração:  
Genética e Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba  
2010**

Luciana Pimenta Ambrozevicius  
Engenheiro Agrônomo

**Transformação genética de milho com uma nova proteína – a Zeolina**

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

**Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutor em Agronomia. Área de  
concentração: Genética e Melhoramento de  
Plantas**

**Piracicaba  
2010**

## RESUMO

### Transformação genética de milho com uma nova proteína – a Zeolina

A lisina é um dos aminoácidos essenciais e um dos fatores limitantes ao uso de cereais como o milho na alimentação pois, sem suplementação, não permite a obtenção de uma dieta balanceada. A fim de melhorar a qualidade nutricional dos cereais, várias tentativas têm sido feitas utilizando o melhoramento genético. Com o advento das técnicas de engenharia genética é possível, atualmente, utilizar a biotecnologia para aprofundar estes estudos, a fim de desvendar os complexos mecanismos que controlam o fluxo de aminoácidos nos grãos. O presente trabalho tem como objetivo principal testar uma nova estratégia que se baseia na expressão de uma proteína quimérica, a zeolina, sob controle de um promotor endosperma específico. A zeolina é uma combinação de 421 aminoácidos da faseolina do feijão com 89 aminoácidos da  $\gamma$ -zeína, inserida no genoma do milho sob controle de um promotor isolado da  $\gamma$ -kafirina de sorgo. Para que o objetivo do projeto fosse alcançado, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas: i) Síntese da construção e clonagem nos vetores; ii) Transformação de embriões e calos de milho utilizando biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*; iii) Cultura de tecidos para seleção e regeneração das plantas transformadas; iv) Verificação dos eventos de transformação através da análise do DNA, RNA e da proteína do transgene; v) Análises preliminares das plantas transformadas para o padrão das proteínas de reserva e perfil de aminoácidos dos grãos. A construção da zeolina foi amplificada por PCR com primers específicos e clonada nos vetores pCambia3301 e pTF102 sob controle do promotor da  $\gamma$ -kafirina. Os embriões e calos do milho híbrido Hill foram utilizados na transformação empregando-se a biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*. No final do processo foram produzidas e multiplicadas oito plantas de milho transformadas com a zeolina, confirmadas por testes biológicos, PCR, sequenciamento e testes imunocromatográficos, representando seis eventos de transformação. A expressão gênica, verificada pela detecção do mRNA por PCR, foi constatada em seis eventos de transformação. Para detecção da proteína expressa pelo transgene foi utilizado anticorpo específico para faseolina, através do Western Blot. A banda relativa ao transgene foi detectada em três eventos de transformação. Nas análises preliminares não houve alteração no padrão das frações zeína, globulina, glutelina ou albumina nas plantas transformadas quando comparados com os controles. Também não houve diferenças significantes no teor de aminoácidos solúveis totais entre as plantas transformadas e os controles. Na determinação do perfil de aminoácidos no HPLC, o evento ZEO-3(3) apresentou as maiores concentrações para todos os aminoácidos analisados. Neste evento de transformação o teor de lisina foi de 25,76 mg/g de proteína, enquanto os controles apresentaram valores de 9,77 e 15,89mg/g de proteína. O evento ZEO-3(3) apresenta-se, portanto, como um candidato para estudos posteriores a fim de revelar os complexos mecanismos que controlam o fluxo de aminoácidos e o acúmulo das proteínas de reserva nos grãos de milho.

Palavras-chave: Milho; Zeolina; Lisina; Proteínas de Reserva

## ABSTRACT

### Maize genetic transformation with a new protein – the Zeolin

Lysine is an essential amino acid and a major factor limiting the use of cereals such as maize for food and feed as, without supplementation, does not allow obtaining a balanced diet. In order to improve the nutritional quality of cereals, several attempts have been made using the conventional breeding. With the advent of genetic engineering techniques it is now possible to use biotechnology to develop further studies and to unravel the complex mechanisms that control the flow of amino acids in grains. The present work aimed at testing a new strategy based on the expression of a chimeric protein, the zeolin, under the control of an endosperm specific promoter. The zeolin is a combination of 421 amino acids of bean phaseolin with 89 amino acids of the maize  $\gamma$ -zein inserted into the maize genome under the control of a promoter isolated from the protein  $\gamma$ -kafirin from sorghum. For the goal of the project to be reached, the work was divided into the following steps: i) Synthesis of the construction and the cloning vectors; ii) Transformation of embryos and callus of maize using the biolistic and *Agrobacterium tumefaciens* methods; iii) Tissue culture for selection and regeneration of transformed plants iv) Verification of transformation events through the analysis of the DNA, RNA and protein from the transgene; v) Preliminary analysis of transformed plants for the storage proteins pattern and amino acid profile of the grains. The zeolin construction was amplified by PCR with specific primers and cloned into the vectors pCambia3301 and pTF102 under the control of the promoter  $\gamma$ -kafirin. Embryos and callus of Hill hybrid were used in the transformation using the biolistic and *Agrobacterium tumefaciens*. At the end of the process of transformation, eight maize plants transformed with zeolin were produced and multiplied, confirmed by biological tests, PCR, sequencing and immunochromatographic tests, representing six transformation events. The gene expression, verified by detection of mRNA by PCR, was found in six events of transformation. The protein translation, verified by Western Blot using an antibody specific for phaseolin, was found in three transformation events. In the preliminary analysis, the pattern of zein, globulin, glutelin or albumin fractions did not change comparing transformed plants with the controls. There were also no significant differences in the content of soluble amino acids among the Western positive transformed plants and the controls. In the HPLC amino acid profile, the event ZEO-3(3) showed the higher concentrations for all amino acids analyzed. In this transformation event the content of lysine was 25,76mg/g protein, while the controls exhibited values of 9,77 and 15,89mg/g protein. Therefore, ZEO-3(3) event presents itself as a candidate for further studies to reveal the complex mechanisms that control the flow of amino acids and accumulation of storage proteins in maize kernels.

Keywords: Maize; Zeolin; Lysine; Storage Protein

## 1 INTRODUÇÃO

O milho originou-se na América Central e, através das navegações nos séculos 16 e 17, foi rapidamente adotado pelos povos da África, Ásia e Europa. Com a introdução dos híbridos de milho de alta produção na década de 50, o milho tornou-se a cultura mais cultivada em todo o mundo. O United States Department of Agriculture - USDA estima para a safra 2008/09 uma produção mundial de 777,56 milhões de toneladas de milho e, no Brasil, a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB prevê que a produção deve variar entre 54,317 e 55,210 milhões de toneladas cultivados em uma área entre 14,483 e 14,643 milhões de hectares. Os três principais países produtores de milho são os Estados Unidos, a China e o Brasil.

O melhoramento convencional do milho teve uma enorme contribuição no aumento da produtividade dessa cultura (Figura 1). Tal aumento de produtividade foi essencial para uma maior oferta de alimentos, importância esta que só deverá aumentar nas próximas décadas, visto que a população mundial cresce a taxas exponenciais, sendo estimado pela Organização das Nações Unidas – ONU uma população de 9,1 bilhão de pessoas em 2050, um valor 34% maior do que os 6,8 bilhões atuais. Neste cenário previsto, a Food and Agriculture Organization - FAO estimou que a agricultura terá que crescer 70% globalmente (cerca de 100% nos países em desenvolvimento) para atender a demanda por alimentos.

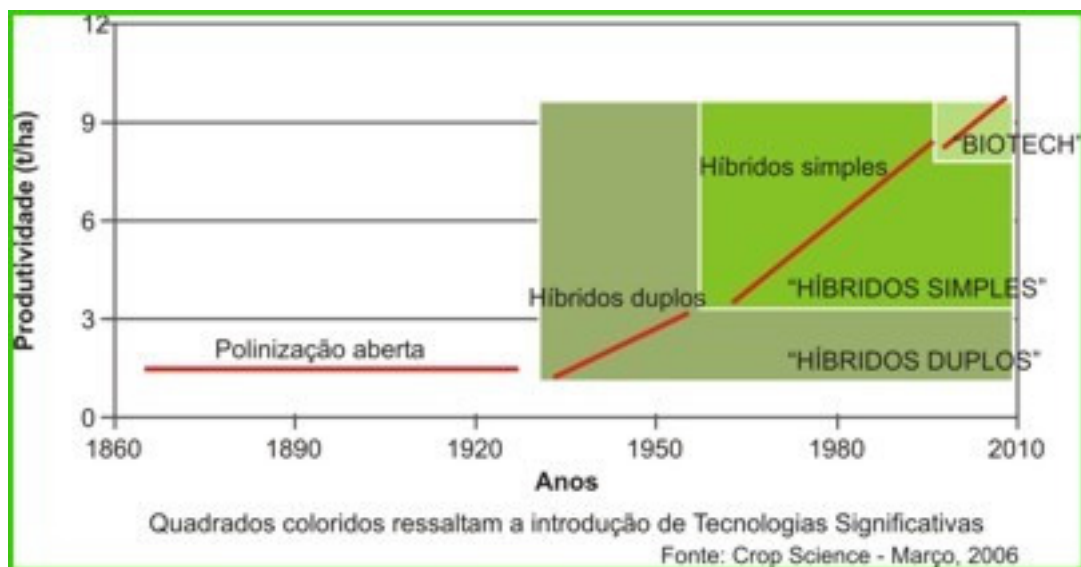


Figura 1 - Aumento da produtividade do milho ao longo dos anos com a adoção de novas tecnologias (<http://www.seednews.inf.br/portugues/seed125/artigocapa125.shtml>)

O milho é considerado uma cultura de grande importância na nutrição animal e humana, sendo uma importante fonte de energia metabolizável na forma de amido, mas que apresenta, no entanto, uma baixa qualidade protéica devido ao reduzido teor de alguns aminoácidos essenciais.

O teor de aminoácidos é um parâmetro de grande importância para determinar a qualidade nutricional das plantas. Dos 20 aminoácidos incorporados nas proteínas, 9 (lisina, treonina, metionina, fenilalanina, triptofano, isoleucina, leucina, valina e histidina) são considerados essenciais por não serem sintetizados por humanos e animais monogástricos e tem que ser, portanto, adquiridos através da alimentação (FERREIRA et al., 2005). Proteínas vegetais fornecem 65% do total de proteínas ingeridas no mundo inteiro, com grãos de cereais representando até 50% deste valor. Em países em desenvolvimento a importância dos cereais é ainda maior, sendo a principal fonte protéica na dieta da maioria da população (MILLWARD, 1999).

O quadro da Figura 2 adaptado da FAO (2002), apresenta, especificamente para lisina, as quantidades limitantes encontradas nos diferentes cereais. Visto que a qualidade protéica de um alimento está diretamente relacionada com a sua composição de aminoácidos, principalmente de aminoácidos essenciais, o milho apresenta os menores teores de lisina entre os cereais comparados.

<b>Cultura</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Lisina (%)</b>
Milho	8.0-11.0	1.80-2.00
Trigo	11.0-14.0	2.50-3.20
Arroz	7.0-9.0	3.50-4.00
Cevada	8.0-11.0	2.90-3.20
Aveia	12.0-14.0	3.80-4.00
Sorgo	9.0-11.0	2.00-2.80

Figura 2 - Comparação entre os teores de proteína e de lisina em diferentes cereais

Estas limitações representam, por um lado, problemas na nutrição humana e animal que acarretam a necessidade de complementação da dieta com outras fontes

protéicas (FAO, 1973), e por outro lado, o excesso de determinados aminoácidos causa problemas de contaminação ambiental devido ao excesso de nitrogênio excretado (OENEMA, 2004).

Estudos realizados por diferentes pesquisadores mostraram que crianças com problemas de nutrição alimentadas com variedades de milho com alta lisina obtêm melhoria de diferentes características, tais como ganho de peso e altura, quando comparadas à crianças alimentadas com o milho convencional (GRAHAM et al., 1980; ORTEGA et al., 2008). Da mesma forma o alto valor biológico do milho com alta lisina é importante na dieta animal, já que neste caso proteínas de plantas são as fontes primárias de proteínas. As formas comumente utilizadas para suplementar a dieta animal com relação à deficiência de determinados aminoácidos, no caso do milho em relação aos aminoácidos lisina, triptofano e treonina, são com o uso de farelo de soja, de aminoácidos produzidos por fermentação bacteriológica ou de variedades melhoradas para o aminoácido em questão. A utilização de lisina sintética para complementação da ração de porcos e frangos representa, no entanto, grandes gastos para o setor produtivo. Trabalho realizado nos EUA mostrou que, dobrando o conteúdo de lisina nos grãos de milho, sem alterar o conteúdo protéico, poderia representar uma economia de cerca de \$360 milhões anuais para os EUA no mercado mundial de rações (JOHNSON et al., 2001).

Um ponto constante do melhoramento genético de plantas tem sido então a alteração da composição dos aminoácidos a fim de torná-la mais adequada aos requerimentos nutricionais (FERREIRA et al., 2005). As estratégias utilizadas no melhoramento podem ser divididas em dois tipos, aquelas que utilizam o melhoramento convencional e as que utilizam técnicas de engenharia genética. O melhoramento convencional para aumento da lisina tem utilizado o mutante natural Opaco-2 (MERTZ; BATES; NELSON, 1964), que apresenta alteração no padrão das proteínas de reserva acumuladas e teores de lisina cerca de duas vezes maiores que o teor do milho convencional. Na engenharia genética, duas estratégias principais têm sido empregadas: a alteração de enzimas envolvidas no metabolismo da lisina ou a alteração do padrão das proteínas de reserva. A transgenia apresenta grandes atrativos por possibilitar a identificação do gene de interesse em organismos diversos e a sua inserção específica no genoma da planta, permitindo diversos estudos e aplicações desse transgene (ZHU et al., 2007).

Na definição da estratégia utilizada no projeto, a fim de produzir plantas de milho transgênico com alto teor de lisina, foi feita uma revisão bibliográfica que possibilitou a comparação das vantagens e desvantagens de cada uma, optando-se por concentrar esforços na estratégia de expressão de proteínas de reserva de outras espécies vegetais ricas em lisina e, neste caso, a proteína que se apresentou mais promissora foi a zeolina, uma proteína quimérica contendo uma combinação de 421 aminoácidos da faseolina do feijão com 89 aminoácidos da  $\gamma$ -zeína, descrita por Mainieri et al. (2004). Para o objetivo do trabalho a zeolina possui o grande atrativo de conter 25 resíduos de lisina na porção da faseolina e os domínios responsáveis pela retenção no retículo endoplasmático (RE) no fragmento da  $\gamma$ -zeína do milho, o que poderia aumentar a estabilidade da proteína quimérica expressa no milho.

Dessa forma a hipótese do presente trabalho é de que a expressão estável de uma proteína de reserva nutricionalmente balanceada no endosperma de milho acarretará em mudanças nas rotas metabólicas e, conseqüentemente, nos teores finais de aminoácidos, principalmente de lisina, nos grãos. A fim de investigar esta hipótese foi definida a estratégia baseada na expressão de uma proteína quimérica, a chamada zeolina, sob controle de um promotor endosperma específico isolado da  $\gamma$ -kafirina de sorgo e a transformação de plantas de milho com essa construção. Para que o objetivo proposto fosse alcançado, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- Síntese da construção a ser utilizada na transformação do milho: zeolina sob controle do promotor da  $\gamma$ -kafirina;
- Clonagem da construção nos vetores adequados para transformação;
- Transformação das plantas de milho com os plasmídeos contendo a construção  $\gamma$ -kafirina + zeolina, utilizando os métodos de biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*;
- Seleção e regeneração das plantas transformadas;
- Multiplicação dos eventos em casa-de-vegetação;
- Verificação dos eventos de transformação através da análise do DNA, do RNA transcrito e da proteína traduzida;
- Análises preliminares das plantas transformadas para características de interesse, como padrão das proteínas de reserva e perfil de aminoácidos nos grãos.



Com a obtenção de plantas transformadas expressando a zeolina, questões relacionadas à regulação das relações fonte/dreno de aminoácidos na planta e dos controles enzimáticos da síntese, catabolismo e acúmulo das proteínas de reserva poderão ser investigadas em trabalhos subsequentes. Com o objetivo do presente projeto alcançado, teremos um material que apresenta possibilidades e aplicações diversas na pesquisa, a fim de responder questões relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e acúmulo das proteínas de reserva que, se melhor esclarecidas, aumentam as chances de sucesso do melhoramento genético visando às características nutricionais do milho.

### 3 CONCLUSÕES

- Foi sintetizada a construção do promotor  $\gamma$ -kafirina + zeolina e clonada nos vetores pCambia 3301 e pTF102, confirmada por PCR e por sequenciamento;
- Na transformação dos explantes de milho via *Agrobacterium* e biobalística, somente a biobalística resultou em explantes transformados, com uma eficiência do processo de transformação de aproximadamente 1%;
- Na geração T<sub>1</sub> foi obtido um total de oito plantas transformadas, representando seis eventos de transformação. A presença do transgene foi detectada por PCR nas oito plantas, a expressão gênica através da detecção do mRNA por RT-PCR foi verificada em seis plantas e a proteína do transgene foi detectada por Western Blot em três dos eventos de transformação;
- Não houve diferenças visuais no padrão de bandas das frações protéicas zeína, globulina+albumina e glutelina, apresentado pelo controle e pelas plantas transformadas;
- Não houve diferenças significantes, devido à transformação, no teor de aminoácidos solúveis totais apresentado pelo controle e pelas plantas transformadas;
- A análise dos aminoácidos totais no HPLC apresentou diferenças significantes apenas para o evento ZEO-3(3). Este evento apresentou níveis 40% a 274% maiores do que o controle para todos os aminoácidos analisados;
- O nível de lisina total do evento ZEO-3(3) foi de 25,76mg/g de proteína, representando um aumento de 62% em relação aos controles, que apresentaram níveis que variaram de 9,77 a 15,89mg/g de proteína.

## REFERÊNCIAS

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.

ALVAREZ, I.; GELI, M.I.; PIMENTEL, E.; LUDEVID, D.; TORRENT, M. Lysine-rich gamma-zeins are secreted in transgenic Arabidopsis plants. **Planta**, Berlin, v. 205, n. 2, p. 420-427, 1998.

AZEVEDO, R.A.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; LEA, P.J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; LE GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A.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, n. 24, p. 4898-4908, 2003.

AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J. Lysine metabolism in higher plants. **Amino Acids**, New York, v. 20, n. 3, p. 261-279, 2001.

BAGGA, S.; ADAMS, H.; KEMP, J.D.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Accumulation of 15-kilodalton zein in novel protein bodies in transgenic tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n. 1, p. 13-23, 1995.

BELLUCCI, M.; DE MARCHIS, F.; NICOLETTI, I.; ARCIONI, S. Zeolin is a recombinant storage protein with different solubility and stability properties according to its localization in the endoplasmic reticulum or in the chloroplast. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 97-105, 2007.

BELLUCI, M.; DE MARCHIS, F.; ARCIONI, S. Zeolin is a recombinant storage protein that can be used to produce value-added proteins in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 90, n. 1, p. 85-91, 2007.

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**, London, v. 17, n. 1, p. 59-71, 2008.

BIELESKY, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.

- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROCHETTO-BRAGA, M.R.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate reductase in normal and *opaque-2* maize endosperms. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, n. 3, p. 1139-1147, 1992.
- CARBONARO, M. 7S globulins from *Phaseolus vulgaris* L.: Impact of structural aspects on the nutritional quality. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 70, n. 11, p. 2620-2626, 2006.
- CARNEIRO, A.A.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E. **Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2004. 44p. (Documentos, 32 – Embrapa Milho e Sorgo).
- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y.; Bi, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. **Scientia Sinica**, Peking, v. 18, n. 5, p. 659-668, 1975.
- COLEMAN, C.; HERMAN E.M.; TAKASAKI, K.; LARKINS, B.A. The maize gamma-zein sequesters alpha-zein and stabilizes its accumulation in protein bodies of transgenic tobacco endosperm. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 12, p. 2335-2345, 1996.
- CRACIUM, A.; JACOBS, M.; VAUTERIN, M. *Arabidopsis* loss-of-function mutant in the lysine pathway points out complex regulation mechanisms. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 487, n. 2, p. 234-238, 2000.
- DANNENHOFFER, J.M.; BOSTWICK, D.E.; OR, E.; LARKINS, B.A. Opaque-15, a maize mutation with properties of a defective *opaque-2* modifier. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 6, p. 1931-1935, 1995.
- DORAN, P.M. Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 9, p. 426-432, 2006.
- ESEN, A.; STETLER, D.A. Immunocytochemical localization of  $\delta$ -zein in protein bodies of maize endosperm cells. **American Journal of Botanical.**, Columbus, v. 79, n. 3, p. 243-248, 1992.
- FALCO, S.C.; GUIDA, T.; LOCKE, M.; MAUVAIS, J.; SANDRES, C.; WARD, R.T. ; WEBBER. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. **Nature Biotechnology**, New York, v. 13, p. 577-582, 1995.

FAO. **Energy and Protein Requirements: report of a Joint FAO/WHO Ad Hoc Experts Committee**. Rome, Italy, 1973. p.118 (FAO Nutritional Meeting Report Series, n. 52; WHO Technical Report Series, n. 522.)

FAO. Protein **Sources for the Animal Feed Industry**. Expert Consultation and Workshop Bangkok, 2002. p.25.

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, n. 7, p. 985-994, 2005.

FLINT-GARCIA SA, BODNAR, AL, SCOTT MP. Wide variability in kernel composition, seed characteristics, and zein profiles among diverse inbreds, landraces and teosinte. **Theoretical Applied Genetics**, Heidelberg, v. 119, p. 1129-1142, 2009.

FORSYTH, J.L.; BEAUDOIN, F.; HALFORD, N.G.; SESSIONS, R.B.; CLARKE, A.R.; SHEWRY, P.R. Design, expression and characterization of lysine-rich forms of the barley seed protein Cl-2. **Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects**, Amsterdam, v. 1747, v. 2, p. 221-227, 2005.

FRAME, B.; ZHANG, H.; COCCIOLONE, S.; SIDORENKO, L.; DIETRICCH, C.; PEGG, S.; ZHEN, S.; SCHNABLE, P.; WANG, K. Production of transgenic maize from bombarded Type II callus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. **In Vitro Cellular and Developmental. Biology- Plant**, Heidelberg, v. 36, n. 1, p. 21-29, 2000.

FRAME, B.R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R.K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T.M.; PEGG S.E.K.; LI, B.; NETTLETON, D.S.; PEI, D.; WANG, K. *Agrobacterium tumefaciens* – Mediated transformation of maize embryos using standard binary vector system. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 1, p. 13-22, 2002.

FREITAS, F.A.; YUNES, J.A.; da SILVA, M.J.; ARRUDA, P.; LEITE, A. Structural characterization and promoter activity analysis of the  $\gamma$ -kafirin gene from sorghum. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 245, n. 2, p. 177-186, 1994.

FRIGERIO, L.; VIRGILIO, M.; PRADA, A.; FAORO, F.; VITALE, A. Sorting of phaseolin to the vacuole is saturable and requires a short C-terminal peptide. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 6, p. 1031-1042, 1998.

FRIZZI, A.; HUANG, S.; GILBERTSON, L.A.; ARMSTRONG, T.A.; LUETHY, M.H.; MALVAR, T.M. Modifying lysine biosynthesis and catabolism in corn with a single bifunctional expression/silencing transgene cassette. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 13-21, 2008.

GALILI, G.; HÖFGEN, R. Metabolic engineering of amino acids and storage proteins in plants. **Metabolic Engineering**, Belgium, v. 4, n. 1, p. 3-11, 2002.

GAZIOLA, S.A.; ALESSI, E.S.; GUIMARÃES, 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, n. 3, p. 1268-1275, 1999.

GEETHA, K.; CRAIG R.; LENDING, B.; LOPES, JOHN, C.; WALLACE, C.; LARKINS, B.A. *opaque-2* modifiers increase  $\gamma$ -zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. **The Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 11, p. 1207-1219, 1991.

GELI, M.I.; TORRENT, M.; LUDEVID, D. Two structural domains mediate two sequential events in  $\gamma$ -zein targeting: Protein endoplasmic reticulum retention and protein body formation. **Plant Cell**, Rockville v. 6, n. 12, p. 1911-1922, 1994.

GIBBON, B.C.; LARKINS, B.A. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. **Trends in Genetics**, London, v. 21, n. 4, p. 227-233, 2005.

GIBBON, B.C.; WANG, X.L.; LARKINS, B.A. Altered starch structure is associated with endosperm modification in Quality Protein Maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15329-15334, 2003.

GODOI, R.E.Z. **Produção de sementes de milho híbrido**. Disponível em: <<http://www.seednews.inf.br/portugues/seed125/artigocapa125.shtml>>. Acesso em: 10 set. 2009.

GORDON-KAMM, W.; SPENCER, T.; MANGANO, M.L.; ADAMS, T.; DAINES, R.; START, W.; O'BRIEN, J.; CHAMBERS, S.; ADAMS, J.R.W., WILLETTS, N.; RICE, T.;

GRAHAM, G.G.; GLOVER, D.V.; ROMANA, G.L.; MORALES, E.; MACLEAN, W.C. Nutritional value of normal, *opaque-2* and *sugary-2*, *opaque-2* maize hybrids for infants and children. I. Digestibility and utilization. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 110, n. 5, p. 1061-1069, 1980.

HABBen, J. E.; KIRLEIS, A.W.; LARKINS, B.A. The origin of lysine-containing proteins in the *opaque-2* maize endosperm. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 23, n. 4, p. 825-838, 1993.

HACHAM, Y.; SONG, L.; SCHUSTER, G.; AMIR, R. Lysine enhances methionine content by modulating the expression of S-adenosylmethionine synthase. **The Plant Journal**, Oxford, v. 51, p. 850-861, 2007.

HAGAN, N.D.; UPADHYAYA, N.; TABE, L.M.; HIGGINS, T.J.V. The redistribution of protein sulfur in transgenic rice expressing a gene for a foreign, sulfur-rich protein. **The Plant Journal**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 1-11, 2003.

HE, X.Y.; TANG, M.Z.; LUO, Y.B.; LI, X.; CAO, S.S.; YU, J.J.; DELANEY, B.; HUANG, K.L. A 90-day toxicology study of transgenic lysine-rich maize grain (Y642) in Sprague–Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 425-432, 2009.

HENSEL, G.; KASTNER, C.; OLESZCZUK, S.; RIECHEN, J.; KUMLEHN, J. Agrobacterium-Mediated Gene Transfer to Cereal Crop Plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale, and Maize. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 2009, n. 835608, p. 1-9, 2009.

HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein storage bodies and vacuoles. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 4, p. 601-613, 1999.

HOFFMAN, L.M.; DONALDSON, D.D.; HERMAN, E.M. A modified storage protein is synthesized, processed and degraded in the seeds of transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 11, n. 6, p. 717-729, 1988.

HOLDING, D.R.; LARKINS, B.A. The development and importance of zein protein bodies in maize endosperm. **Maydica**, Bergamo, v. 51, n. 22, p. 243-254, 2006.

HORN, M., HARKEY, R., VINAS, A.K., DREES, C.F., BARKER, D.K. AND LANE, J.R. Use of Hi II-elite inbred hybrids in *Agrobacterium*-based transformation of maize. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, Heidelberg, v. 42, n. 4, p. 359–366, 2006.

HOUMARD, N.M.; MAINVILLE, J.L.; BONIN, C.P.; HUANG, S.; LUETHY, M.H.; MALVAR, T.M. High-lysine corn generated by endosperm-specific suppression of lysine catabolism using RNAi. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 605–614, 2007.

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 zein genes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 7, p. 1958-1964, 2004.

HUANG, S.; FRIZZI, A.; FLORIDA, C.A.; KRUGER, D.E.; LUETHY, M.H. High lysine and high tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD alpha-zeins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, n. 3, p. 525-535, 2006.

HUANG, 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, n. 6, p. 555-569, 2005.

HUDSON, A.O.; BLESS C.; MACEDO P.; CHATTERJEE, S.P.; SINGH, B.K.; GILVARG C.; LEUSTEK T. Biosynthesis of lysine in plants: evidence for a variant of the known bacterial pathways. **Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects**, Amsterdam, v. 1721, n. 1/3, p. 27-36, 2005.

HUDSON, A.O.; SINGH, B.K.; LEUSTEK, T.; GILVARG, C. An  $\text{LL}$ -diaminopimelate aminotransferase defines a novel variant of the lysine biosynthesis pathway in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 1, p. 292-301, 2006.

HUNTER, B.G.; BEATTY, M.K.; SINGLETARY, G.W.; HAMAKER, B.R.; DILKES, B.P.; LARKINS, B.A.; JUNG, R. Maize Opaque Endosperm Mutations Create Extensive Changes in Patterns of Gene Expression. **The Plant Cell**, Rockville v. 14, n. 10, p. 2591–2612, 2002.

JOHNSON, L.A.; HARDY, C.L.; BAUMEL, C.P.; YU, T.H.; SELL, J.L. Identifying valuable corn quality traits for livestock feed. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v.46, n. 10, p. 472-481, 2001.

KARCHI, H.; SHAUL, O.; GALILI, G. Lysine synthesis and catabolism are coordinately regulated during tobacco seed development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.91, n. 7, p. 2577-2581, 1994.

KEELER, S.J.; MALONEY, C.L.; WEBBER, P.Y.; PATTERSON, C.; HIRATA, L.T.; FALCO, S.C.; RICE, J.A. Expression of *de novo* high-lysine  $\alpha$ -helical coiled-coil proteins may significantly increase the accumulated levels of lysine in mature seeds of transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 15-29, 1997.

KEMPER, E.L.; CORD-NETO, G.; PAPES, F.; MORAES, K.C.M.; LEITE, A.; ARRUDA, P. The role of *Opaque2* in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 10, p. 1981–1993, 1999.

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, n. 3, p. 655-672, 2002.



KOWN, T.; SASAHARA T.; ABE T. Lysine accumulation in transgenic tobacco expressing dihydrodipicolinate synthase of *Escherichia coli*. **Journal of Plant Physiology**, Lancaster, v.146, n. 5/6, p.615-621, 1995.

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.; 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, n. 5, 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, n. 6, p. 549-556, 2005.

LENDING, C.R.; LARKINS, B.A. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development **Plant Cell**, Rockville, v. 1, n. 10, p. 1011-1023, 1989.

LUCAS, D,M,; TAYLOR, M.L.; HARTNELL, G.F.; NEMETH, M.A.; GLENN, K.C.; DAVIS, S.W. Broiler Performance and Carcass Characteristics When Fed Diets Containing Lysine Maize (LY038 or LY038 X MON 810), Control, or Conventional Reference Maize. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, n. 10, p. 2152–2161, 2007.

MAINIERI, D.; ROSSI, M.; ARCHINTI, M.; BELLUCCI, M; De MARCHIS, F.; VAVASSORI, S.; POMPA, A.; ARCIONI, S.; VITALE, A. Zeolin. A new recombinant storage protein constructed using maize gamma-zein and bean phaseolin. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 3, p. 3447-3456, 2004.

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**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 103-108, 1994.

MAZUR, B.; KREBBERS, E.; TINGEY, S. Gene discovery and product development for grain quality traits. **Science**, Washington, v. 285, n. 5426, p. 372-375, 1999.

McCOY, A.J.; ADAMS, N.E.; HUDSON, A.O.; GILVARG, C.; LEUSTEK, T.; MAURELLI, A.T. L,L-diaminopimelate aminotransferase, a trans-kingdom enzyme shared by Chlamydia and plants for synthesis of diaminopimelate-lysine. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 47, p. 17909-17914, 2006.

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, n. 3629, p. 279-280, 1964.

MILLWARD, D.J. The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 58, n. 2, p. 249-260, 1999.

MISHRA, A.; TOMAR, A.; BANSAL, S.; KHANNA, V.K.; GARG, G.K. Temporal and spatial expression analysis of *gamma* kafirin promoter from Sorghum (*Sorghum bicolor* L. moench) var. M 35-1. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 35, n. 2, p. 81-88, 2007.

MURILLO, I.; RAVENTOS, D.; JAECK, E.; SEGUNDO, B.S. Isolation of total RNA and mRNA from plant tissues. **Promega Notes Magazine**, Madison, n. 54, p. 02, 1995.

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

OHTANI, T.; GALILI, G.; WALLACE, J.C.; THOMPSON, G.A.; LARKINS, B.A. Normal and lysine-containing zeins are unstable in transgenic tobacco seeds. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 16, n. 1, p. 117-128, 1991.

ORTEGA ALEMÁN EDEL, C.; COULSON ROMERO, A.J.; ORDÓÑEZ ARGUETA, L.I.; PACHÓN, H. The effect of consuming quality protein maize or conventional maize on the growth and morbidity of malnourished Nicaraguan children 1 to 15 years of age. **Archives of Latinoamerica Nutrition**, Caracas, v. 58, n. 4, p. 377-85, 2008.

OSBORNE, T.B. **The vegetable proteins**, 2<sup>a</sup> ed., London: Longmans, 1924, p. 154.

PEDRAZZINI, E.; GIOVINAZZO, G.; BIELLI, A.; VIRGILIO, M.; FRIGERIO, L.; PESCA, M.; FAORO, F.; BOLLINI, R.; CERIOTTI, A.; VITALE, A. Protein quality control along the route to the plant vacuole. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 10, p. 1869–1880, 1997.

POMPA, A.; VITALE, A. Retention of a bean phaseolin/maize  $\gamma$ -zein fusion in the endoplasmic reticulum depends on disulfide bond formation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 10, p. 2608–2621, 2006.

PRASANNA, B.M.; VASAL, S.K.; KASSAHUN, B.; SINGH, N.N. Quality protein maize. **Current Science**, Bagalore, v. 81, n. 10, p. 1308-1319, 2001.

REGISTER, J.C.; PETERSON, D.J.; BELL, P.J.; BULLOCK, W.P.; EVANS, E.J.; FRAME, B.; GREENLAND, A.J.; HIGGS, N.S.; JEPSON, I.; JIAO, S.; KLEWNAU, C.J.; SILLICK, J.M.; WILSON, H.M. Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 25, n. 6, p. 951–961, 1994.

REYES, A.R.; BONIN, C.P.; HOUMARD, N.M.; HUANG, S.; MALVAR, T.M. Genetic manipulation of lysine catabolism in maize kernels. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 1/2, p. 81–89, 2009.

ROESLER, K.R.; RAO, A.G. Conformation and stability of barley chymotrypsin inhibitor-2 (CI-2) mutants containing multiple lysine substitutions. **Protein Engineering**, Oxford, v. 12, n. 11, p. 967-973, 1999.

SARROBERT, C.; THIBAUD, M-C.; CONTARD-DAVID, P.; GINESTE, S.; BECHTOLD, N.; ROBAGLIA, C.; NUSSAUME, L. Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutant accumulating threonine resulting from mutation in a new dihydropicolinate synthase gene. **The Plant Journal**, Washington, v. 24, n. 3, p. 357-367, 2000.

SCHMIDT, R.J.; KETUDAT, M.; AUKERMAN, M.J.; HOSCHEK, G. Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 6, p. 689-700, 1992.

SEGAL, G.; SONG, R.; MESSING, J. A New opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. **Genetics**, Baltimore, v. 165, n.1, p. 387-397, 2003.

SHAUL, O.; GALILI, G. Increased lysine synthesis in transgenic tobacco plants expressing a bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. **Plant Journal**, Oxford, v. 2, p. 203-209, 1992.

SHAVER, J.M.; BITTEL, D.C.; SELLNER, J.M.; FRISCH, D.A.; SOMERS, D.A.; GENGENBACHT, B.G. Single-amino acid substitutions eliminate lysine inhibition of maize dihydrodipicolinate synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 5, p. 1962-1966.

SHEWRY, P.; HALFORD, N. Cereal seed storage protein: structure, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 947-958, 2002.

SHRAWAT, A.K.; LÖRZ, H. Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 575-603, 2006.

STEPANSKI, A.; GALILI, G. Synthesis of the Arabidopsis bifunctional lysineketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase enzyme of lysine catabolism is concertedly regulated by metabolic and stress-associated signals. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, n. 3, p. 1407-1415, 2003.

STEPANSKY, A.; LESS, H.; ANGELOVICI, R.; AHARON, R.; ZHU, X.; GALILI, G. Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. **Amino Acids**, New York, v. 30, n. 2, 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. **Plant Journal**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 359-368, 1995.

TABE, L.; HAGAN, N.; HIGGINS, T.J.V. Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 3, p. 212-217, 2002.

TORRENT, M.; ALVAREZ, I.; GELI, M.I.; DALCOL, I.; LUDEVID, D. Lysine-rich modified gamma-zeins accumulate in protein bodies of transiently transformed maize endosperms. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 139-149, 1997.

TORRENT, M.; LLOMPART, B.; LASSERRE-RAMASSAMY, S.; LLOP-TOUS, I.; BASTIDA, M.; MARZABAL, P.; WESTERHOLM-PARVINEN, A.; SALOHEIMO, M.; HEIFETZ, P.B.; LUDEVID, M.D. Eukaryotic protein production in designed storage organelles. **BMC Biology**, London, v. 7, n. 5, p. 1-14, 2009.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

VARISI, V.A. **Caracterização de enzimas envolvidas na síntese de lisina de milho e quinoa**. 2007. 121p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Planta) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

VASAL, S.K. High quality protein corn. In: HALLAWER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. Local: CRC Press, 1994. p. 79-120.

VEGA, J.M.; YU, W.; KENNON, A.R.; CHEN, X.; ZHANG, Z.J. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, n. 2, p. 297-305, 2008.

VIRGILIO, M.; DE MARCHIS, F.; BELLUCI, M.; MAINIERI, D.; ROSSI, M.; BENVENUTO, E.; ARCIONI, S.; VITALE, A. The human immunodeficiency virus antigen Nef forms protein bodies in leaves of transgenic tobacco when fused to zeolin. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 10, p. 2815–2829, 2008.

VITALE, A.; CERIOTTI, A. Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests? **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 3, p. 3420-3426, 2004.

VITALE, A.; PEDRAZZINI, E. Recombinant Pharmaceuticals from Plants – The plant endomembrane system as a bioreactor. **Molecular Interventions**, Rockville, v. 5, n. 4, p. 216-225, 2005.

VOGEL, H.J. On biochemical evolution: lysine formation in higher plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 45, n. 12, p. 1717-1721, 1959.

WATANABE, N.; MAIA M.; CHERNEY, M.M; VAN BELKUM, M.J.; MARCUS, S.L.; FLEGEL, M.D.; CLAY, M.D.; DEYHOLOS, M.K.; VEDERAS, J.C.; JAMES, M.N.G. Crystal structure of LL-diaminopimelate aminotransferase from *Arabidopsis thaliana* a recently discovered enzyme in the biosynthesis of L-lysine by plants and chlamydia. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 371, n. 3, p. 685–702, 2007.

WOO, Y.M.; HU, D.W.N.; LARKINS, B.A.; JUNG, R. Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 10, p. 2297-2317, 2001.

YE, F.; SIGNER, E.R. RIGS (repeat-induced gene silencing) in *Arabidopsis* is transcriptional and alters chromatin configuration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 20, p. 10881-10886, 1996.

YU, J.J.; PENG, P.; ZHANG, X.; ZHAO, Q.; ZHY, D.; SUN, X.; LIU, J.; AO, G. Seed-specific expression of a lysine rich protein *sb401* gene significantly increases both lysine and total protein content in maize seeds. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, n. 1, p. 427-431, 2004.

ZARKADAS, C.G.; HAMILTON, R.I.; YU, Z.R.; CHOI, V.K.; KHANIZADEH, S.; ROSE, N.G.W.; PATTISON, P.L. Assessment of the protein quality of 15 new northern adapted cultivars of quality protein maize using amino acid analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 48, n. 11, p. 5351-5361, 2000.

ZHANG, X.L.; COLLEONI, C.; RATUSHNA, V.; SIRGHLE-COLLEONI, M.; JAMES, M.G.; MYERS, A.M. Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene *sugary2* codes for the starch synthase isoform SSIIa. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, n. 6, p. 865-879, 2004.

ZHAO, Z.Y.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; HONDRED, D.; BOND, D.; SCHROEDER, S.; RUDERT, M. AND PIERCE, D. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 8, n. 4, p. 323–333, 2001.

ZHENG, Z.; SUMI, K.; TANAKA, K.; MURAI, N. The bean seed storage protein  $\beta$ -phaseolin is synthesized, processed, and accumulated in the vacuolar type-II protein bodies of transgenic rice endosperm. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 3, p. 777-786, 1995.

ZHU, C.; NAQVI, S.; GOMEZ-GALERA, S.; PELACHO, A.M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 12, n. 12, p. 548-555, 2007.

ZHU, X.; GALILI, G. 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. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n.4, p. 845-853, 2003.

ZHU, X.; GALILI, G. Lysine metabolism is concurrently regulated by synthesis and catabolism in both reproductive and vegetative tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, n. 1, p. 129-136, 2004.