

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

**Caracterização de proteínas de reserva de mutantes de endosperma
de milho de alta lisina**

Alejandro Alberto Toro

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

Piracicaba
2006

Alejandro Alberto Toro
Licenciado em Genética

Caracterização de proteínas de reserva de mutantes de endosperma de milho de alta lisina

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
2006**

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

Alberto Toro, Alejandro

Caracterização de proteínas de reserva de mutantes de endosperma de milho de alta lisina / Alejandro Alberto Toro. - - Piracicaba, 2006.
250 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Aminoácido 2. Cromatografia líquida de alta eficiência 3. Eletroforese em gel
4. Endosperma 5. Grão 6. Milho 7. Mutação vegetal 8. Proteína de planta I. Título

CDD 633.15

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

Dedico este trabajo

A mi papá Lorenzo y mi mamá Carmen por el amor y la confianza depositadas...

A mis hermanos Daniel e Vanesa por el cariño y la fuerza transmitida a la distancia ...

A mi esposa Elizabeth por el amor infinito y el apoyo constante ...

A mi hijo Franco por bendecir nuestra vida con amor e alegría ...

A mis futuros hijos ...

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo pela ajuda profissional, pela confiança depositada e por enriquecer a minha carreira profissional.

A Cláudia M. Bellato pela co-orientação e dedicação constante para a realização dos géis.

A professora Siu M. Tsai por permitir a realização de parte do trabalho de pesquisa no Laboratório de Biologia Celular do CENA.

Ao conselho de Pós-graduação do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas por permitir a realização do curso de doutorado.

Aos amigos de sempre: Luis Arguello, José Luis Romero, Alejandro Safarov e Guillermo Salvatierra.

Aos colegas de trabalho: Berta Berdejo, Geórgia Pompeu, Priscilla L. Gratão, Karime García, Salete Gaziola, Lyndel W. Meinhardt, José A. Carmezini, Carlos A. Moldes, Vanderlei A. Varisi, Fabrício de Souza Delite e Rui A. Gómez Júnior.

A “Los muchachos de la Fiaca Blues Band”: Alejandro Dutka, Fabrício Antonini, Walter Painemal, Damián Méndez e Orlando Zenteno.

Agustín Zsogon pelas conversações descontraídas sobre ciência e críticas de trabalhos científicos.

A FAPESP pelo financiamento do Projeto de pesquisa.

Ao CNPq pela ajuda econômica fornecida durante os quatro anos de trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	21
2 DESENVOLVIMENTO	23
2.1 Revisão de Literatura	23
2.1.1 Aminoácidos.....	23
2.1.2 Contribuição nutricional do milho	24
2.1.3 Via metabólica do ácido aspártico.....	25
2.1.4 Regulação da via metabólica do ácido aspártico	27
2.1.5 Aspartato quinase	29
2.1.6 Aspartato quinase/homoserina desidrogenase	30
2.1.7 Síntese de lisina	31
2.1.8 Catabolismo de lisina	32
2.1.9 Mutantes bioquímicos.....	35
2.1.10 Plantas transgênicas	37
2.1.11 Metabolismo da lisina: Genes e proteínas.....	40
2.1.12 Fator de transcrição Opaco2.....	43
2.1.13 Proteínas de reserva da semente de milho	48
2.1.14 Mutantes de milho	50
2.2 Material e Métodos.....	56
2.2.1 Material Vegetal	56
2.2.2 Transmitância do infravermelho-próximo	57
2.2.3 Extração de aminoácidos solúveis	57
2.2.4 Extração de proteínas de reserva	58
2.2.5 Determinação de proteínas	58
2.2.6 Electroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio	59
2.2.7 Extração de aminoácidos das frações protéicas	60

2.2.8 Identificação de aminoácidos das frações protéicas.....	60
2.2.9 Determinação de lisina nas frações protéicas	61
2.2.10 Electroforese bi-dimensional.....	62
2.2.10.1 Primeira dimensão: Focalização isoelétrica.....	62
2.2.10.2 Equilíbrio das fitas da primeira dimensão	63
2.2.10.3 Segunda dimensão: SDS-PAGE.....	63
2.2.10.4 Coloração	63
2.2.10.5 Fotodocumentação e análise dos géis.....	64
2.2.11 Análise estatística	64
2.3 Resultados.....	65
2.3.1 Caracterização de sementes de milho por luz infravermelha	65
2.3.2 Aminoácidos solúveis da semente.....	68
2.3.3 Proteínas de reserva da semente.....	69
2.3.4 Perfil SDS-PAGE das proteínas de reserva da semente	71
2.3.5 Quantidade de aminoácidos nas frações protéicas da semente.....	78
2.3.6 Quantidades de LYS nas frações protéicas da semente	86
2.3.7 Quantidades de aminoácidos solúveis no endosperma de milho	87
2.3.8 Proteínas de reserva do endosperma.....	88
2.3.9 Perfil SDS-PAGE das proteínas de reserva do endosperma de milho	90
2.3.10 Quantidades de aminoácidos nas frações protéicas do endosperma.....	100
2.3.11 Quantidade de proteínas de reserva do embrião.....	109
2.3.12 Análise das proteínas de reserva de embrião por SDS-PAGE	110
2.3.13 Perfil bidimensional das proteínas de reserva do endosperma	121
2.3.13.1 Fração Globulina.....	121
2.3.13.2 Fração Albumina.....	123
2.3.13.3 Fração Glutelina.....	124
3 CONCLUSÕES.....	143
REFERÊNCIAS	145
ANEXO	167

RESUMO

Caracterização de proteínas de reserva de mutantes de endosperma de milho de alta lisina

A semente de milho representa uma importante fonte de proteínas para alimentação humana e de animais monogástricos. Porém, como membros da família dos cereais não apresentam proteínas com um balanço nutricional adequado, devido principalmente ao baixo conteúdo de lisina. As proteínas de reserva da semente de milho são classificadas como fração não-zeína (albumina, globulina e glutelina) e zeína. Mutantes de endosperma de milho, como *o2* apresentam quantidades maiores de lisina na semente. Porém, muitos mutantes considerados “alta lisina” não foram ainda caracterizados bioquimicamente. Uma série de mutantes, opaco (*o1*, *o2*, *o5*, *o7*, *o10*, *o11* e *o13*) e floury (*fl1* e *fl2*), foram estudadas para determinar as quantidades de proteínas de reserva, o perfil electroforético das proteínas e o conteúdo de LYS na semente, endosperma e embrião. Foi observado que os mutantes apresentaram redução no conteúdo de zeína e aumentos da fração não-zeína com variações dependendo do mutante, do background genético e do tecido analisado. A análise da semente determinou aumentos principalmente da fração albumina e globulina nos mutantes, exceto para *o5* com aumentos apenas da fração glutelina. No endosperma foi observado aumento principalmente de albumina em *o2*, *o7* e *o5*; e globulina em *fl2*, *o10*, *o11* e *o13*. No embrião foram registrados os níveis maiores de albumina e globulina da semente, porém a quantidade de proteínas de reserva foi similar entre os genótipos. As quantidades de lisina presentes nas frações protéicas foram sempre maiores nos mutantes, porém para *o10*, *o11* e *o13* diferenças significativas, foram observadas principalmente para LYS na fração glutelina. O perfil SDS-PAGE revelou a presença de numerosas bandas protéicas variando entre 100kDa e 10kDa, sendo que a fração não-zeína revelou maior heterogeneidade no número de bandas. Bandas protéicas de maior intensidade foram observadas nos mutantes. Análise 2D-PAGE de proteínas de reserva do endosperma de mutantes *o1*, *o2*, *fl1* e *fl2*, revelou padrões similares de distribuição de proteínas, aumentos de intensidade de spots protéicos e a presença de spots restrita ao perfil dos mutantes. Os resultados sugerem que os mutantes opacos e floury avaliados apresentam quantidades maiores de LYS na semente quando comparados aos genótipos selvagens que lhes deram origem. A futura análise dos spots que apresentaram alterações altamente significativas permitirá uma maior compreensão dos efeitos específicos dessas mutações sobre a regulação da biossíntese das proteínas de reserva e do acúmulo de lisina no grão.

Palavras-chave: Proteínas de reserva; Endosperma; Lisina; Mutante opaco.

ABSTRACT

Storage proteins characterization of high-lysine maize endosperm mutants

The maize seed is an important source of proteins for humans and monogastric animals. However, such as all cereals, maize storage proteins is nutritionally poor mainly due to the low content of lysine. Maize seed storage proteins can be classified as non-zeins (albumins, globulins and glutelins) and zein. Some storage proteins mutants such as the *o2* mutants exhibit higher contents of lysine. However, many of these high-lysine mutants have not yet been biochemically characterized. The opaque mutants *o1*, *o2*, *o5*, *o7*, *o10*, *o11*, *o13* and flouy mutants *f11* and *f12* were analyzed for storage proteins contents, eletrophoretic profile and lysine content in the seeds, endosperm, and embryo. It was observed that the mutants exhibited reduction in the zein fraction and increase in the non-zein fraction which varied according to the mutant, genetic background and tissue analyzed. The whole seed analysis revealed increases mainly in albumins and globulins, with the exception of the *o5* mutants which exhibited a higher increase in the glutelin fraction. In the endosperm it was observed increase in the albumin fraction in *o2*, *o7* and *o5* and in the globulin fraction in *f12*, *o10* and *o13*. Higher concentrations of albumin and globulin were observed in the embryo, but with similar concentrations of total proteins among the mutants. The lysine content was higher always higher in the storage proteins of the mutants, however, in *o10*, *o11* and *o13* significant differences for lysine content were observed mainly in the glutelin fraction. SDS-PAGE analysis revealed the presence of several band varying from 10kDa to 100kDa, with a higher heterogeneity among the non-zein fraction. Bands with higher intensity have been observed in the mutants. 2D-PAGE analysis revealed that the *o1*, *o2*, *f11* and *f12* mutants exhibited similar band patterns with increases in similar spots and mutant specific bands. The results suggest that the opaque and flouy mutants exhibited higher lysine content when compared to their respective wild-type counterparts. Future analysis of the protein spots that exhibited significant variations will allow a better understanding of the specific effects of each mutation on the regulation of storage protein synthesis and lysine accumulation in the seeds.

KeyWords:Storage proteins; Endosperm; Lysine; Opaque mutant.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Via Metabólica do ácido aspártico.....28
- Figura 2 - Processo de degradação da lisina. 1) Lisina Oxoglutarato Reductase (LOR); 2) Sacaropina Desidrogenase (SDH); 3) Acido Aminoadípico Semialdeído Desidrogenase (AADH); 4) Ácido Aminoadípico Aminotransferase (AAA); 5) Transaminase de α -aminoácidos. Abreviações: α -kA, α -ketoácidos; α -AA, α -aminoácidos. (Arruda et al., 2000).....34
- Figura 3 - Regulação pós-traducional da enzima bifuncional LOR-SDH. Papel regulatório do Ca^{+2} e da fosforilação (promovida por Caseína Quinase-CK) provavelmente dependente dos níveis de lisina no citosol. LCP- proteínas que incorporam lisina. (Arruda et al., 2000).....36
- Figura 4 - Estrutura dos genes *lor-sdh* de milho e *Arabidopsis* (Arruda et al., 2000).....42
- Figura 5 A - Perfil SDS-PAGE (8-18%) da fração albumina e globulina de sementes de milho. 1) Oh43+; 2) o1; 3) o2; 4) fl1; 5) fl2; 6) W22+; 7) o10; 8) o11; 9) o13; 10) B37+; 11) o7; 12) B7977+; 13) o5. P-padrão molecular New England BioLab Coloração com nitrato de prata.....72
- Figura 5 B - Análise SDS-PAGE* da fração albumina e globulina de sementes de milho.....73
- Figura 6 - Perfil SDS-PAGE da fração zeína1 de sementes de milho. 1) Oh43+; 2) o1; 3) (o2); 4) fl1; 5) fl2; 6) W22+; 7) o10; 8) o11; 9) o13; 10) B37+; 11) o7; 12) B7977+; 13) o5. Coloração com nitrato de prata. P-padrão molecular SIGMA (MW-SDS-70L).....74

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

