

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/9828
IB/80157

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1988



MUTANTES DA VIA METABÓLICA DO ÁCIDO ASPARTICO EM MILHO, OBTIDOS
ATRAVES DE CULTURA DE TECIDOS.

*Este exemplar corresponde a redação final da
tese defendida pelo candidato Ricardo Antunes
de Azevedo e aprovada pela comissão julgadora
09/08/88 Arruda*

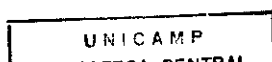
Ricardo Antunes de Azevedo

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para a
obtenção do Título de Mestre em
Ciências, na área de Genética
Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Arruda

UNICAMP - CAMPINAS - SP

1988



CLASSIF	T
AUTOR	A 2500
EX	
OMBO B. /	9828
B	

IB/80157

Bd 9829

A Juliana,

minha filha e minha maior alegria, pela força e pela inspiração que voce me dá e que me faz transpor qualquer obstáculo e atingir meus objetivos,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização desse trabalho e em especial:

- Ao Dr. Paulo Arruda, pela orientação segura, pela confiança em mim depositada para desenvolver este trabalho, pela sua compreensão, pela sua pronta disposição à discussão, pela sua paciência, pelos cursos ministrados e por sua amizade, fruto de respeito mútuo e respeito à ciência;
- Ao Dr. William José da Silva, pelas críticas, sugestões e comentários que foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho, além das discussões sobre Genética e Ciência em geral, que muito contribuíram para o início da minha formação científica;
- Ao Dr. Ladislav Sodek, pelas suas valiosas críticas, por sua pronta disposição a permitir o uso do Laboratório de Fisiologia Vegetal para preparação de alguns experimentos e pelos cursos ministrados, que foram fundamentais para a formação da minha base em bioquímica de plantas;
- Ao Dr. Antonio Celso N. Magalhães, Dra. Ana Maria Monteiro e Dr. Renato Bonatelli Junior, que realizaram o exame prévio desta tese, pelas importantes críticas e sugestões apresentadas;
- Ao Dr. Rubén H. Vallejos e Dr. José Luis Arana, pela oportunidade da realização dos experimentos envolvendo o uso de um aparelho de HPLC no Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos da Universidad Nacional de Rosario, Rosario-Argentina;
- À Dra. Laudénir M. Prioli e ao Dr. Alberto J. Prioli, pelas discussões e sugestões que muito auxiliaram esta tese;
- Ao MS. Jackson J. Fridman, ao Biólogo João Batista Rosolem e ao MS Juvérlande Lugli, pela colaboração, pelo incentivo, pelas sugestões e pela excelente convivência que nos fizeram grandes amigos;
- Aos companheiros de Pós Graduação, pelas críticas e sugestões que apresentaram e pela excelente convivência que tivemos;
- Aos Biólogos Olivete Bonfim e Sílvia Regina Turcinelli, e à Técnica Elizabeth Ribas Bilo, pelo auxílio técnico nos experimentos de cromatografia em camada delgada, determinação de nitrogênio e quantificação de aminoácidos;
- Aos funcionários do Laboratório de Genética Vegetal e do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética que na medida do possível minimizaram as dificuldades do dia a dia;
- À MS Laura M.M. Ottoboni, pela valiosa colaboração e assistência nos experimentos de eletroforese em géis de poliacrilamida e isoelétrofocalização;

- À Ione P. de Almeida e Edson P. Ribeiro, pela dedicação e paciência com que trabalharam na digitação e montagem dessa tese;
- Aos meus Pais, Cleuza e Dirceu e à minha Sogra Dirce, pela carinho, pelo cuidado, pelo incentivo constante e pela paciência que tiveram comigo, permitindo que com tranquilidade eu pudesse realizar esse mestrado;
- À minha esposa, Jacqueline, pelo incentivo, pela paciência, pelo apoio e pela ajuda na datilografia dos relatórios e realização de vários experimentos.

Esse trabalho foi financiado através de bolsas e auxílios recebidos das seguintes entidades: FINEP, PADCT, CNPq-PIG V, CAPES, FAPESP e FAP-UNICAMP.

INDICE

1- INTRODUÇÃO.....	001
2- REVISAO DA LITERATURA.....	004
2.1- Composição protéica da semente do milho.....	004
2.2- Via metabólica do ácido aspártico.....	007
2.2.1- Aspartato quinase.....	008
2.2.2- Dihidrodipicolinato sintase.....	014
2.3- Mutantes bioquímicos selecionados "in vitro".....	015
2.3.1- Mutantes que afetam a atividade da aspartato quinase.....	019
2.3.2- Mutantes que afetam a atividade da dihidrodipi- colinato sintase.....	021
2.4- Cultura de tecidos de milho.....	024
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	026
3.1- Seleção de mutantes resistentes a aminoetilcisteína....	026
3.1.1- Linhagens de calos embriogênicos friáveis de milho.....	026
3.1.2- Determinação da concentração seletiva da amino- etilcisteína.....	026
3.1.3- Indução de mutação e seleção.....	029
3.2- Transferência do gene Ltr*19 para as linhagens Cat 100-1 e Tux 100-1.....	031
3.3- Identificação da presença de genes que conferem resis- tência a lisina mais treonina e aminoetilcisteína.....	035
3.3.1- Cromatografia de aminoácidos em camada delgada..	035
3.3.2- Identificação da presença dos genes que confe- rem resistência a lisina mais treonina e amino- etilcisteína através da germinação em embriões em meio seletivo.....	036
3.4- Análise de aminoácidos livres nas sementes.....	036
3.4.1- Análise de aminoácidos livres totais.....	037
3.4.2- Análise da composição de aminoácidos livres por	



cromatografia líquida de alto desempenho.....	037
3.5- Análise das proteínas da semente.....	040
3.5.1- Fracionamento das proteínas do endosperma.....	040
3.5.2- Eletroforese e isoeletrofocalização das proteí- nas do endosperma.....	043
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	047
4.1- Seleção de mutantes resistentes a aminoetilcisteína....	047
4.2- Análise de aminoácidos livres nas sementes das plantas resistentes a aminoetilcisteína.....	068
4.3- Outros mutantes obtidos no processo de seleção de plantas resistentes a aminoetilcisteína.....	081
4.4- Transferência do gene Lrt*19 para as linhagens Cat 100-1 e Tux 100-1.....	081
4.5- Teores de aminoácidos livres nas sementes de mutantes simples e duplos.....	098
4.6- Análise de proteínas nas sementes mutantes simples e duplos.....	109
5- CONCLUSÕES.....	122
6- RESUMO.....	126
7- SUMMARY.....	128
8- BIBLIOGRAFIA.....	130

MUTANTES DA VIA METABÓLICA DO ÁCIDO ASPÁRTICO EM MILHO, OBTIDOS ATRAVÉS DE CULTURA DE TECIDOS.

1-INTRODUÇÃO:

Os cereais de uma maneira geral apresentam em suas sementes, proteínas com um balanço de aminoácidos que não atendem às necessidades nutricionais dos animais monogástricos incluindo o homem. O milho, o trigo e a cevada por exemplo, são deficientes em lisina, treonina e triptofano (Backer et al., 1969; Bressani, 1975; Eggum, 1977; Fuller et al., 1979). Assim, se esses cereais forem utilizados unicamente como fonte de proteínas, produzir-se-á todos os efeitos indesejáveis de uma dieta proteica inadequada (Bressani, 1966; Mertz, 1972; Bressani, 1975; Maner, 1975; Fuller et al., 1979; Bright et al., 1982).

Esse problema tem levado nos últimos 25 anos, inúmeros pesquisadores a estudar maneiras de se obter variedades de cereais geneticamente modificadas de forma a aumentar o conteúdo desses aminoácidos em suas sementes. Programas de melhoramento envolvendo mutantes naturais que ocorrem nas populações de cereais foram implantados na tentativa de se obter variedades com teores adequados principalmente de lisina e triptofano (Nelson, 1966; Aycock, 1972; Glover e Tosello, 1973; Glover et al., 1975). Entretanto todas as variedades obtidas, embora possuíssem teores elevados desses aminoácidos, apresentaram baixa produtividade e maior susceptibilidade a patógenos de sementes que as variedades normais (Elmore, 1970; Sreeramulu e Bauman, 1970; Aycock, 1972; Bauman, 1975).

Será que os genes que controlam os níveis desses aminoácidos nas

sementes de cereais estão associados com aqueles que condicionam baixa produtividade e susceptibilidade a patógenos de sementes ou ainda será que em se elevando o teor de aminoácidos essenciais na semente produz-se como consequência, variedades menos produtivas e mais sensíveis a doença ou estarão essas características associadas sómente com aqueles mutantes naturais estudados?

Uma forma de se testar qual a hipótese verdadeira e a possibilidade de se obter variedades com maior teor de aminoácidos essenciais e características agronômicas desejáveis é a obtenção de mutantes com alterações na via de biossíntese desses aminoácidos e verificar seus efeitos na produtividade e sensibilidade à doenças.

A via metabólica do ácido aspártico oferece uma boa oportunidade para esse tipo de estudo. Essa via metabólica leva à síntese de lisina, treonina, metionina e isoleucina. É uma via metabólica ramificada com uma série de enzimas que atuam nos pontos de ramificação e que são retroinibidas pelos aminoácidos produtos finais (Dunham e Bryan, 1969; Madison e Thompson, 1976, Bright et al., 1978a, 1978b; Hibberd et al., 1980; Rayan, 1980; Sainis et al., 1981; Wallsgrove e Mazelis, 1981; Thompson et al., 1982; Hibberd e Green, 1982). Através da manipulação genética, essas enzimas podem ser alteradas de forma a diminuir a sensibilidade ou mesmo tornarem-se completamente insensíveis aos aminoácidos que as regulam (Negrutiu et al., 1981; Bright et al., 1982; Hibberd e Green, 1982). Isso faz com que a via metabólica flua mais livremente, levando ao acúmulo dos aminoácidos produtos finais (Negrutiu et al., 1981; Bright et al., 1982; Hibberd e Green, 1982).

Esse sistema tem sido demonstrado em microorganismos (Demain, 1970; Eveleigh, 1981) e em algumas espécies de plantas superiores

(Widholm, 1972a, 1972b; Carlson, 1973; Widholm, 1976; Bourgin, 1978; Bright et al., 1979a; Bright et al., 1980; Cattoir-Reynaerts et al., 1981; Negrutiu et al., 1981; Bright et al., 1982; Hibberd e Green, 1982). No caso de plantas, a manipulação genética tem sido feita através de cultura de embriões, tecidos, células ou protoplastos "in vitro" (Widholm, 1972; Carlson, 1973; Widholm, 1976; Bourgin, 1978; Bright et al., 1979a; Bright et al., 1980; Cattoir-Reynaerts et al., 1981; Negrutiu et al., 1981; Bright et al., 1982; Hibberd e Green, 1982).

Neste trabalho procurou-se avaliar a natureza genética e as alterações no acúmulo de aminoácidos livres em mutantes de milho com modificações na via metabólica do ácido aspártico, obtidos através de cultura de tecidos.

Esse trabalho teve como objetivo o estudo de mutantes de milho resistentes à lisina mais treonina e a aminoetilcisteína, selecionados a partir de cultura e tecidos.

2-REVISÃO DA LITERATURA:

2.1-Composição proteica da semente do milho

Os cereais são caracterizados como excelente fonte de carboidratos (Backer et al., 1969). Suas proteínas entretanto são de baixa qualidade nutritiva devido à deficiência em alguns aminoácidos essenciais na semente (Mertz et al., 1964, 1968; Nelson, 1969; Glover et al., 1975; Malavolta e Dantas, 1978). São considerados essenciais os aminoácidos cisteína, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina e a valina. Esses 10 aminoácidos dentre os 20 aminoácidos comumente encontrados em proteínas não são sintetizados por animais monogástricos incluindo o homem. Portanto, esses aminoácidos, devem ser supridos em quantidades adequadas pois sua ausência na dieta pode causar uma deficiência nutricional proteica. A deficiência nutricional proteica no caso do homem afeta irreversivelmente o desenvolvimento intelectual, além de causar outros sérios problemas de saúde. Isso constitui-se num problema sério nos países subdesenvolvidos onde em torno de 70% das necessidades humanas em proteínas são fornecidas pelos cereais.

As proteínas constituem aproximadamente 10% do peso total do grão de milho sendo que aproximadamente 85% do conteúdo proteico da semente encontra-se localizado no endosperma. As proteínas do endosperma podem ser divididas em quatro diferentes frações com base nas suas solubilidades em solventes distintos, ou seja, as albumi-

nas solúveis em água, as globulinas solúveis em soluções salinas, as prolaminas solúveis em soluções alcoólicas e as glutelinas solúveis em alcali diluído (Osborne, 1924). As prolaminas do milho são denominadas de zeína. A zeína é a maior fração proteica no endosperma atingindo cerca de 50% a 70% do total de proteínas. (Mertz et al., 1964; Jimenes, 1966; Mossé et al., 1966; Nelson, 1967, 1969; Sodek e Wilson, 1971; Tosselo, 1978). A zeína caracteriza-se por apresentar apenas alguns resíduos de lisina e triptofano em sua composição (Mossé et al., 1966; Nelson, 1967, 1969; Sodek e Wilson, 1971). O fato da zeína apresentar apenas traços de lisina e triptofano e ser a maior fração do endosperma, faz com que essa fração proteica seja a responsável pela baixa qualidade nutricional de todo o grão. Como consequência disto, o sistema genético que codifica essas proteínas, tem sido alvo de extensos e detalhados estudos a nível fisiológico e molecular. A fração zeína é composta por uma família de cadeias polipeptídicas que podem ser agrupadas, de acordo com seus pesos moleculares, em quatro classes de 22, 20, 14 e 10 kilodaltons (Kd) (Larkins, 1981; Soave et al., 1981; Messing et al., 1983; Soave e Salamini, 1984).

As albuminas e as globulinas apresentam juntas de 3 a 6% da proteína total da semente. Essas proteínas são ricas em lisina e estão concentradas principalmente no embrião e na camada de aleurona. Elas são sintetizadas logo no início do desenvolvimento e provavelmente representam as enzimas envolvidas no metabolismo do grão em desenvolvimento (Payne e Rhodes, 1982).

As glutelinas também ricas em lisina, representam a segunda maior fração das proteínas em milho, em torno de 34%. Essa fração é difícil de ser caracterizada devido ao fato de não serem facilmente

solubilizadas e frequentemente apresentarem-se contaminadas com albuminas, globulinas e zeínas remanescentes de extrações sequenciais prévias (Payne e Rhodes, 1982).

Vários mutantes de milho aumentam o teor de lisina e triptofano no endosperma, quase sempre devido a uma diminuição no teor de zeína e aumento na proporção das outras frações proteicas ricas em lisina. Esses efeitos no metabolismo conferem um valor nutritivo superior à semente (Mertz et al., 1964; Jimenes, 1966; Nelson, 1967, 1969; Mertz, 1972; Malavolta e Dantas, 1978).

Dentre os mutantes de endosperma de milho que alteram a composição proteica destacam-se, o opaque-(o2, o6, o7), floury-(f12 e f13), shrunken-(sh2 e sh4), brittle-(bt1 e bt2) e sugary-(su2). Todos esses mutantes apresentam quantidades variáveis de lisina, mas sempre maior que os tipos normais (Mertz et al., 1964; Nelson, 1967, 1969; Mertz, 1972; Misra et al., 1972; Toselo, 1978).

O gene opaque-2 localizado no cromossomo 7, é um gene recessivo que atua especificamente no endosperma. Esse gene modifica as características fenotípicas do endosperma, tornando-o farináceo e não translucido como o grão normal. Essas características dão ao grão uma alta opacidade. O peso da semente e a produção de grãos são diminuídos (Nelson, 1967) enquanto que o teor de umidade do endosperma é aumentado em relação ao endosperma normal (Wilson e Alexander, 1967). A quantidade de zeína do endosperma opaque-2 é drasticamente diminuída enquanto que as albuminas, as globulinas e principalmente as glutelinas são proporcionalmente aumentadas (Mertz et al., 1964; Jimenes, 1966; Mossé et al., 1966)

O gene floury-2, localizado no cromossomo 4, é um gene semidominante que também aumenta o teor de lisina na semente. Esse gene as-

sim como o gene opaque-2, confere a semente uma textura farinácea (Nelson et al., 1965).

Outros mutantes como shrunken-2 e brittle-2 reduzem drasticamente o conteúdo de amido do endosperma, conferindo a semente aspecto enrugado. Além disso apresentam redução no nível de zeína e aumento do teor de lisina semelhante ao encontrado no mutante opaque-2 (Misra et al., 1972; Dalby e Tsai, 1974).

Embora esses mutantes de endosperma apresentem qualidade nutritiva superior ao milho normal e tenham contribuído para um grande aprofundamento do conhecimento dos mecanismos que controlam a biossíntese de proteínas e aminoácidos da semente, sua utilização prática é muito limitada, pois apresentam características agronômicas desfavoráveis como menor produtividade, aparência indesejável e maior susceptibilidade a patógenos. As modificações encontradas para certos aminoácidos principalmente a lisina, que é sintetizada pela via metabólica do ácido aspártico, nestes mutantes de endosperma de milho, coloca a via metabólica do ácido aspártico como muito importante para os cereais.

2.2- Via metabólica do Acido Aspártico

A síntese da maioria dos aminoácidos essenciais é regulada por feedback tanto em bactérias (Umbarger, 1978) como em plantas (Mifflin e Lea, 1982). Dentre os aminoácidos essenciais, a lisina (Lis), a treonina (Tre), a metionina (Met) e a isoleucina (Ile) são derivados do ácido aspártico em bactérias (Umbarger e Davies, 1962) e em plantas superiores (Naylor et al., 1958; Dougall, 1965; Dou-

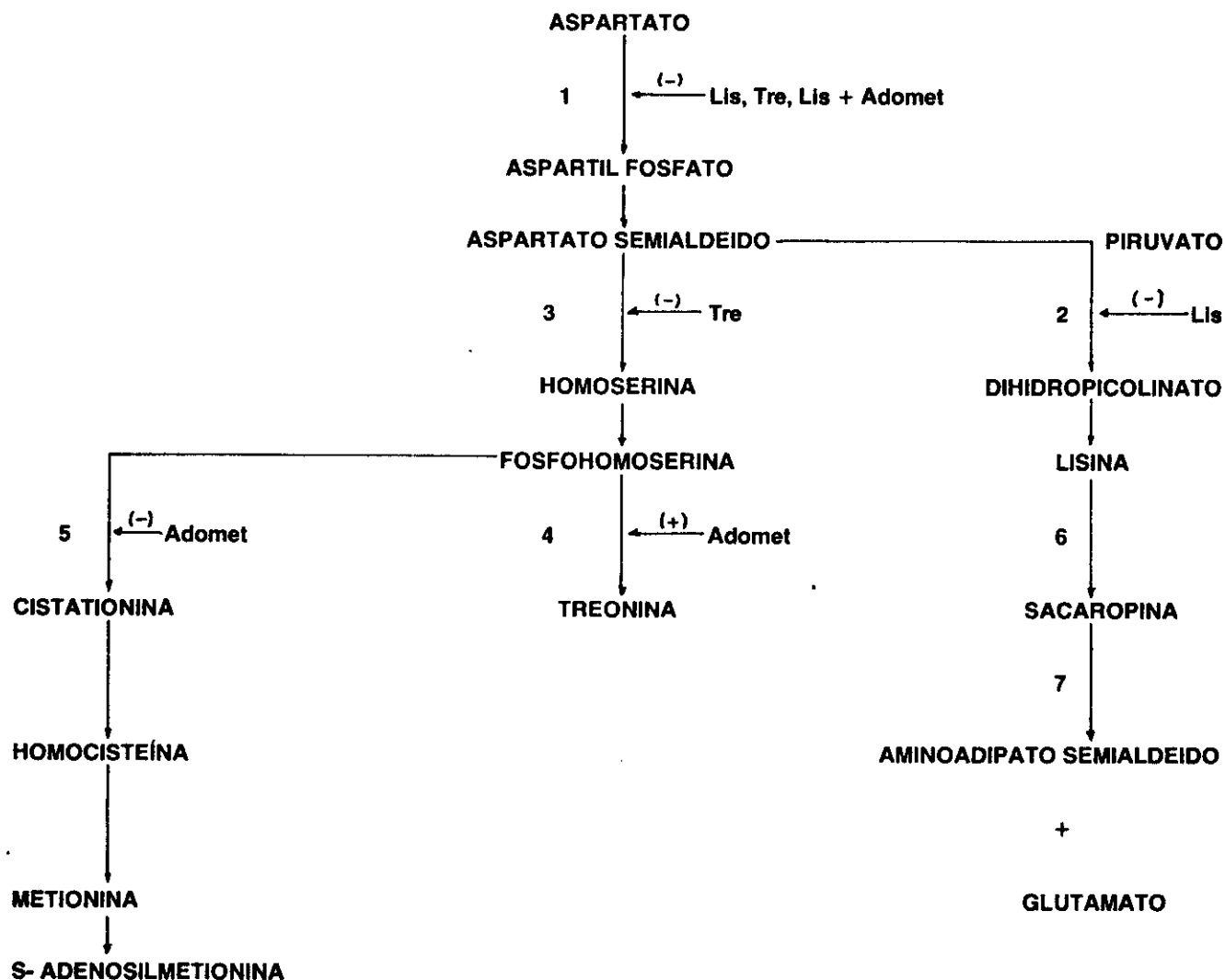
gall, 1966; Dougall e Fulton, 1967; Gengenbach et al., 1978 e Rayan, 1980).

A figura 1 apresenta um esquema simplificado da via metabólica do ácido aspártico em plantas superiores com alguns dos seus pontos regulatórios. A aspartato quinase, que é a primeira enzima da via metabólica, é uma enzima polimórfica apresentando formas sensíveis a retroinibição pela lisina ou pela treonina (Rognes et al., 1980). A sensibilidade à lisina é aumentada na presença de S-Adenosilmetionina (Adomet) (Rognes, 1980). A lisina por sua vez, atua em outro ponto de regulação retroinibindo a enzima dihidrodipicolinato sintase (Wallgrove e Mazelis, 1981) enquanto que a treonina inibe algumas formas de homoserina desidrogenase (Rayan, 1980; Sainis et al., 1981). A S-adenosilmetionina apresenta efeitos antagônicos nessa via metabólica pois, de um lado aumenta a sensibilidade da aspartato quinase a lisina (Rayan, 1980) e de outro estimula a atividade da treonina sintase (Madison e Thompson, 1976). A metionina ou a S-adenosilmetionina reprimem a síntese da cistationina sintase em certas plantas (Thompson et al., 1982).

A aspartato quinase e a dihidrodipicolinato sintase são consideradas duas enzimas chaves na via metabólica do ácido aspártico. A aspartato quinase é a primeira enzima de toda a via enquanto que a dihidrodipicolinato sintase é a primeira enzima na via de biossíntese de lisina.

2.2.1- Aspartato Quinase

Truffa-Bachi (1973) trabalhando com aspartato quinase de microorganismos determinou que a síntese da enzima está sob o contro-



ENZIMAS

1. Aspartato quinase
2. Dihidrodipicolinato sintase
3. Homoserina desidrogenase
4. Treonina sintase
5. Cistationina sintase
6. Lisina-cetoglutarato redutase
7. Sacaropina desidrogenase

Figura-1: Via metabólica para a biossíntese de lisina, treonina e metionina. Os pontos de regulação estão indicados pelas setas. (-) Indica a retroinibição. (+) Indica retroativação.

le de um sofisticado sistema de regulação com repressão pelo produto final. Stadman et al., (1961) purificaram e caracterizaram muito bem duas isoenzimas da aspartato quinase em *E. coli*, cada uma inibida especificamente por treonina ou por lisina. Uma terceira forma da aspartato quinase foi encontrada em *E. coli* k12 que não apresenta regulação por feedback mas sua síntese é reprimida pela metionina (Patte et al., 1967). Outras bactérias possuem somente uma forma de aspartato quinase, mas é regulada de diferentes modos dependendo da espécie. A aspartato quinase de *Rhodopseudomonas spheroides* é inibida por aspartato semialdeído (Datta e Prakash, 1966), enquanto que a enzima de *Rhodospirillum rubrum* é inibida por treonina (Datta e Gest, 1964a). Em bactérias tais como *Rhodopseudomonas capsulatus* (Datta e Gest, 1964a; 1964b), *Brevibacterium flavum* (Shio e Miyajima, 1969) e algumas espécies de *Bacillus* (Paulus e Gray, 1967; Kuramitsu, 1970) a enzima é inibida por ação conjunta da lisina e treonina.

Mutantes de bactérias com aspartato quinase insensível aos aminoácidos lisina e treonina, produzem esses aminoácidos em grandes quantidades. A lisina é comercialmente produzida por esses mutantes em fermentadores (Demain, 1970; Eveleigh, 1981).

A aspartato quinase tem sido extraída e caracterizada em muitas espécies de plantas superiores (Bryan et al., 1970; Wong e Dennis, 1973a, 1973b; Aarnes, 1974; Aarnes e Rognes, 1974; Cheshire e Mifflin, 1975; Davies e Mifflin, 1977; Shewry e Mifflin, 1977; Bright et al., 1978a, 1978b; Sakano e Komamine, 1978; Yamada et al., 1986) sendo que a grande maioria dos trabalhos foram feitos com cenoura, cevada, trigo e milho.

Trabalhos desenvolvidos em diversos laboratórios, demonstraram



que existem duas formas de aspartato quinase em cenoura. A análise de cultura de células de raízes em suspensão, demonstrou que a atividade da aspartato quinase é reduzida quando as células crescem em meio contendo lisina ou treonina e lisina mais treonina. A aspartato quinase sensível a lisina reduz a atividade quando em meio contendo lisina e a aspartato quinase sensível a treonina reduz a atividade quando em meio contendo treonina. Portanto haveria duas formas de aspartato quinase, uma sensível a lisina e outra sensível a treonina (Davies e Mifflin, 1977; Davies e Mifflin, 1978; Matthews e Widholm, 1978). Sakano e Komamine (1978) trabalhando com tecidos de raízes, determinaram que a aspartato quinase sensível a treonina constitui 70% da atividade total e a aspartato quinase sensível a lisina ao redor de 20%. Matthews e Widholm (1978) trabalhando com cultura de células de raízes em meio contendo lisina e treonina, verificaram que a atividade das duas formas de aspartato quinase estavam 100% inibidas, sendo que os dois aminoácidos apresentavam efeitos aditivos. Sane et al. (1984) relataram que a aspartato quinase de cenoura é ativada por cálcio ou calmodulina. Entretanto, Bonner et al. (1986) trabalhando com aspartato quinase altamente purificada de cenoura, sensível a lisina, altamente purificada, não encontraram nenhum tipo de regulação por cálcio ou calmodulina.

Wong e Dennis (1973a) trabalhando com germe de trigo, determinaram que a aspartato quinase é inibida cooperativamente por lisina mais treonina. A lisina inibiu a aspartato quinase em baixas concentrações e a treonina em altas concentrações. Wong e Dennis (1973a) sugerem ainda que o efeito sinérgico da lisina mais treonina na inibição do crescimento de plântulas pode ser devido a inibição cooperativa da aspartato quinase, impedindo a síntese de



metionina. Yamada et al. (1986) trabalhando com cultura de células de cenoura em suspensão, determinaram que a aspartato quinase era fortemente inibida pela lisina. Determinaram também que a treonina e a metionina individualmente ou em combinação com a lisina não inibiam a atividade da aspartato quinase. A S-adenosilmetionina quando adicionada em conjunto com a lisina aumentou a inibição da aspartato quinase. Também a aminoetilcisteína na concentração de 5mM inibiu 50% da atividade da aspartato quinase enquanto outros análogos de lisina não apresentam efeito inibitório nem na concentração de 10mM. Bright et al. (1978a) trabalhando com plântulas de trigo verificaram que a aspartato quinase é inibida pela lisina somente, e pela lisina mais treonina, e não é inibida pela treonina somente, contrastando com os resultados obtidos por Wong e Dennis (1973a). Bright et al. (1978a) verificaram também que a síntese de metionina praticamente não foi afetada sugerindo que existem outros pontos importantes de regulação.

A aspartato quinase de milho é dependente de ATP, Mg²⁺ ou Mn²⁺ e aspartato (Bryan et al., 1970; Henke e Wahnbaeck, 1977; Henke e Wahnbaeck, 1979). Henke e Wahnbaeck (1977) verificaram que a atividade da aspartato quinase em endosperma imaturo de milho é inibida por lisina mas não por metionina ou treonina. Bryan et al. (1970) verificaram que a atividade da aspartato quinase em plântulas de milho é inibida por lisina (80-85%) e por treonina (10-20%) não sendo inibida por leucina e metionina. A alanina, valina e isoleucina ativaram a atividade da aspartato quinase. Cheshire e Mifflin (1975) trabalhando com plântulas de milho verificaram que a lisina inibe a atividade da aspartato quinase. Gengenback et al. (1978) analisaram a atividade da aspartato quinase em diferentes tecidos

verificando que a enzima foi inibida por lisina em todos os tecidos, sendo que a concentração inibitória variou de 0.02-0.1mM. Combinações de lisina e treonina não aumentaram a inibição da atividade da aspartato quinase.

Aarnes (1977) verificou que a aspartato quinase de cevada é sensível a lisina. Shewry e Mifflin (1977) trabalhando com aspartato quinase purificada de plântulas de cevada verificaram que a enzima é inibida 50% por 0.7mM de lisina e quase completamente por 5mM de lisina. A metionina em baixas concentrações (0.1-1mM) aumentou a inibição em presença de lisina indicando que os dois aminoácidos agem cooperativamente.

Aarnes (1974) analisou a aspartato quinase em várias espécies de plantas. Verificou que em **Helianthus annuus** a lisina na concentração de 8mM inibiu 91% a atividade da aspartato quinase, enquanto que a treonina na concentração de 8mM inibiu 16% e lisina mais treonina na concentração de 8mM inibiu 88% a atividade da aspartato quinase. Em **Raphanus sativus**, lisina, treonina e lisina mais treonina na concentração de 8mM inibiram a atividade da aspartato quinase em 69%, 36% e 58% respectivamente. Em **Sinapsis alba**, lisina, treonina e lisina mais treonina na concentração de 8mM inibiram a atividade da aspartato quinase em 47%, 84% e 67% respectivamente. Em **Cucumis sativus**, lisina, treonina e lisina mais treonina na concentração de 8mM inibiram a atividade da aspartato quinase em 30%, 17% e 94% respectivamente, sugerindo inibição cooperativa.

Aarnes e Rognes (1974) verificaram que a treonina na concentração de 8mM inibe 86% da atividade da aspartato quinase em **Pisum sativum**. Nenhum efeito da lisina foi observado enquanto que a alanina, a valina e a isoleucina ativaram a aspartato quinase. Lea et

al. (1979) trabalhando com *Pisum sativum*, verificaram que a lisina na concentração de 5mM inibiu 60% a atividade da aspartato quinase sendo seu principal inibidor. Treonina, metionina, lisina mais treonina e lisina mais treonina mais metionina na concentração de 5mM inibiram 24%, 10%, 87% e 92% a atividade da aspartato quinase respectivamente.

Wong e Dennis (1973b) trabalhando com *Lemna minor*, verificaram que lisina na concentração de 0,3mM, treonina na concentração de 0,5mM e lisina na concentração de 0,3mM mais treonina na concentração de 0,5mM inibiram a atividade da aspartato quinase em 37%, 0% e 63% respectivamente indicando inibição cooperativa.

Matthews e Widholm (1979a) analisaram o efeito da lisina e treonina na atividade da aspartato quinase em cotiledones, calos e cultura de células em suspensão de *Glycine max*. Em cotiledone e calos, lisina e treonina na concentração de 1mM inibiram 30% e 70% respectivamente a atividade da aspartato quinase. Em células em suspensão lisina e treonina na concentração de 1mM inibiram 50% e 50% a atividade da aspartato quinase respectivamente.

2.2.2-Dihidrodipicolinato Sintase

A transformação do aspartato semialdeído em 2,3- Dihidrodipicolinato é a primeira reação da via do ácido aspártico unicamente ligado a biossíntese de lisina (figura 1). Essa reação é catalizada pela enzima dihidrodipicolinato sintase, que faz a condensação dos precursores aspartato semialdeído e piruvato. A catálise dessa reação, em extratos de plantas, foi demonstrada por Cheshire e Mifflin

(1975) usando plântulas de milho como fonte da enzima.

Como pode ser visto na figura 1 a dihidrodipicolinato sintase está sujeita a inibição por feedback pela lisina. Mazelis et al. (1977) detectaram a dihidrodipicolinato sintase em extratos de 6 diferentes famílias taxonômicas de plantas e purificaram parcialmente a enzima a partir de germe de trigo. Sómente o isômero L do aspartato semialdeído foi utilizado como substrato dessa enzima e uma forte cooperatividade foi notada quando a concentração de piruvato foi variada.

Matthews e Widholm (1979a) analisaram a dihidrodipicolinato sintase em cultura de células em suspensão, calos e cotilédones de soja (*Glycine max*). A atividade da enzima nos 3 tecidos foi inibida pelo menos 95% por 1.0mM de lisina. Através de análise eletroforética verificou-se que existia apenas uma forma de enzima.

Matthews e Widholm (1978, 1979b) detectaram sómente uma forma de dihidrodipicolinato sintase em raízes e cultura de células em suspensão de *Daucus carota L.* sendo que a enzima foi inibida em 80% por 0,5mM de lisina.

Atualmente, o conhecimento do sistema de regulação das vias metabólicas envolvidas na biossíntese dos aminoácidos essenciais tem possibilitado a seleção "in vitro" de mutantes bioquímicos que apresentam acúmulo de vários aminoácidos na semente.

2.3- Mutantes bioquímicos selecionados "in vitro"

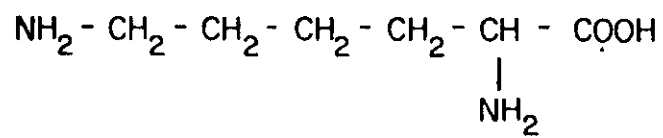
Com o desenvolvimento de técnicas de manipulação de culturas de células, tecidos ou órgãos de plantas "in vitro", foi possível se-



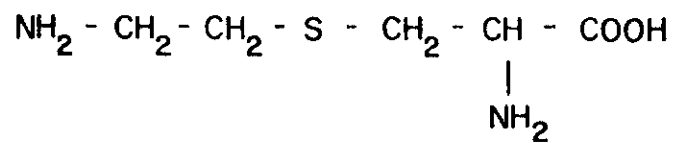
leccionar variantes genéticos onde alguns pontos regulatórios da via metabólica do aspartato estariam relaxados. Alguns desses mutantes apresentam alterações nas propriedades físico-químicas de determinadas enzimas, alterando suas sensibilidade aos efetores.

Para a seleção desses mutantes são utilizadas combinações de aminoácidos produtos finais ou análogos de aminoácidos. Os análogos de aminoácidos normalmente substituem os mesmos quanto ao efeito de regulação das enzimas alostéricas, podendo também, como no caso da S-2 aminoetil-L-cisteína (figura 2), substituí-los na síntese de proteínas (Bright et al., 1979a, 1979b). Assim, as culturas são drasticamente inibidas. Aquelas que eventualmente apresentam crescimento normal, tem grande chance de serem mutantes regulatórios.

Resultados positivos utilizando-se esse sistema tem sido obtidos em várias espécies de plantas. Adições equimolares de lisina mais treonina inibem o crescimento da cultura, inibindo a atividade da aspartato quinase e/ou a atividade da homoserina desidrogenase (Bright et al., 1978a; Hibberd et al., 1980). Isso leva a deficiência de metionina para a síntese de proteínas, impedindo o desenvolvimento da cultura (Bright et al., 1978b). Isso é demonstrado quando o crescimento da cultura é reestabelecido através da adição de baixas concentrações de metionina, homoserina ou homocisteína ao meio. Análogos de lisina, como a aminoetilcisteína, inibem a atividade da dihidrodipicolinato sintase, inibindo o crescimento da cultura pela deficiência em lisina (Bright et al., 1979a). Entretanto esse análogo é incorporado em proteínas em microorganismos (De Marco et al., 1976), plantas (Bright et al., 1979a, 1979b) e animais (Rabinovitz e Fisher, 1961). Portanto, uma planta que apresenta níveis mais altos de lisina livre, poderia ser resistente a amino-



LISINA



S-(2-AMINOETIL) - L- CISTEÍNA

Figura-2: Estruturas químicas do aminoácido lisina bem como seu análogo S-(2-Aminoetil)-L-cisteína.

tilcisteína através da diluição do efeito desse análogo pelo excesso de lisina. A etionina, um análogo da metionina, inibe o crescimento da cultura pela deficiência em metionina (Widholm, 1976).

Mutantes que apresentam acúmulo de aminoácidos foram obtidos em várias espécies de plantas onde acúmulo de lisina, treonina e metionina foram detectados em vários tecidos inclusive na semente (Cattoir-Reynaerts et al., 1981). Entretanto, em semente de milho, nenhum mutante obtido dessa maneira apresentou acúmulo de lisina (Miflin et al., 1982). A não acumulação de lisina pode ser devido a dois fatores: primeiro, no caso de mutantes resistentes a lisina mais treonina, a enzima dihidrodipicolinato sintase deve continuar sensível a lisina, bloqueando sua síntese no segundo ponto de regulação (Bright et al., 1982) (figura 1); no caso dos mutantes resistentes a aminoetilcisteína, a enzima dihidrodipicolinato sintase permanece sensível a aminoetilcisteína, sendo que a absorção da aminoetilcisteína é que está modificada (De Marco et al., 1976); em segundo lugar, endosperma de milho e cevada apresentam alta taxa de degradação de lisina durante o desenvolvimento da semente. Esse fato foi constatado inicialmente através de experimento com lisina C¹⁴ (Sodek e Wilson, 1970; Brandt, 1975). Recentemente, foram detectados e caracterizados duas enzimas envolvidas na degradação de lisina. A primeira enzima, lisina-cetoglutarato redutase (Figura 1), transforma a lisina em sacaropina (Arruda et al., 1982). Essa enzima apresenta alta atividade no endosperma em desenvolvimento, e está estreitamente correlacionada com a taxa de translocação de nitrogênio para a semente (Arruda e Silva, 1983). Dois fatos importantes contribuem para a hipótese da degradação da lisina como ponto importante no acúmulo desse aminoácido na semente. Em primeiro

lugar, durante o desenvolvimento da semente, ocorre translocação de lisina para o endosperma, em quantidades duas a três vezes superiores àquela necessária para a síntese de proteínas em sementes normais (Arruda e Silva, 1979). O excesso de lisina translocada deve ser degradada em endosperma normal, o que não ocorre nos endospermas mutantes, ricos em lisina (Arruda e Silva, 1979). Em segundo lugar, a primeira enzima da via de degradação de lisina, a lisina-cetoglutarato redutase, apresenta pouca ou nenhuma atividade em endospermas opaque-2, que é rico em lisina (Arruda et al., 1984).

Esse mutante não afeta a segunda enzima da via de degradação, a sacaropina desidrogenase (Arruda et al., 1984) (figura 1). Assim, a lisina cetoglutarato redutase pode estar degradando o excesso de lisina que seria acumulado nos mutantes resistentes.

2.3.1-Mutantes que afetam a atividade da aspartato quinase

Hibberd et al.(1980) selecionaram através de cultura de tecido uma linhagem de células de milho resistente a lisina mais treonina. A aspartato quinase desse mutante apresentou-se menos sensível a inibição causada pela lisina mais treonina, mas o mecanismo genético dessas alterações não foi estudado. Posteriormente, Hibberd e Green (1982) regeneraram plantas resistentes a inibição do crescimento causado pela lisina mais treonina. A análise genética desse mutante mostrou que a resistência é determinada por um gene dominante Ltr*19. O pool de treonina livre aumentou 6 vezes em culturas ini-



ciadas de embriões de plantas resistente a lisina mais treonina e 75-100 vezes em grãos homocigotos para o gene *Ltr*19* quando comparados com culturas e grãos de plantas sensíveis a lisina mais treonina. A aspartato quinase desse mutante mostrou-se menos sensível a inibição pela lisina do que as plantas normais.

Cattoir et al. (1983) trabalhando com cultura de células de cenoura mutagenizadas com N^o metil nitroso guanidina, selecionaram um mutante resistente a lisina mais treonina que apresentou a aspartato quinase menos sensível a esses aminoácidos.

Bourgin et al. (1980) através de cultura de protoplasto de *Nicotiana tabacum* (haplóide) submetida a mutagênese com ultra violeta e seleção em meio contendo lisina mais treonina, selecionaram dois mutantes resistentes que apresentaram acúmulo de alguns aminoácidos. Também se verificou que a resistência é determinada por um gene dominante.

Negrutiu et al. (1984) trabalhando com *Nicotiana sylvestris* submetida a mutagênese com ultra violeta selecionaram dois mutantes resistentes a lisina mais treonina que apresentaram acúmulo de alguns aminoácidos. A resistência é determinada por um gene dominante. Tanto no trabalho de Negrutiu como no de Bourgin a aspartato quinase não foi estudada.

Bright et al. (1982) selecionaram quatro mutantes em cevada resistente a lisina mais treonina. A análise genética desse mutante mostrou que a resistência de cada um é determinada por genes dominantes os quais foram denominados *Lt1a* e *Lt1b* (alélicos) e *Lt2*. A aspartato quinase de cevada pode ser separada em três picos de atividade cada uma correspondendo a uma isoenzima: aspartato quinase I, aspartato quinase II e aspartato quinase III (Bright et al.,

1982; Arruda et al., 1984). O estudo da sensibilidade ao feedback dessas isoenzimas em plantas normais mostrou que a AKI é predominantemente sensível a treonina enquanto que a AKII e AKIII são inibidas por lisina ou lisina mais S-adenosilmetionina. Os mutantes resistentes a lisina mais treonina selecionados em cevada mostraram que a AKII e AKIII são menos sensíveis a inibição pela lisina nos mutantes R2501, R3202 e R3004.

2.3.2-Mutantes que afetam a atividade da dihidrodipicolinato

Bright et al. (1979a) através de cultura de embriões maduros de cevada mutagenizadas com azida sódica, selecionaram um mutante resistente a 0,25mM de aminoetilcisteína. Através de cruzamento recíprocos com a variedade sensível, determinou-se que a herança da resistência é devida a um gene nuclear recessivo denominado AEC-1. A inibição do crescimento pela aminoetilcisteína é ativada pela lisina quando em grande concentração, indicando que a lisina deve estar competindo com a aminoetilcisteína por algum sítio de ação. Entretanto esse mutante não apresentou acúmulo de lisina em nenhum tecido da planta provavelmente porque esta mutação não atinge a enzima dihidrodipicolinato sintase, que permanece sensível a inibição pela lisina e aminoetilcisteína. Posteriormente verificou-se que a resistência é devida a redução da absorção de aminoetilcisteína pelas raízes e não pela alteração regulatória da dihidrodipicolinato.

Jacobsen (1985) trabalhando com cultura de células de *Solanum tuberosum* em suspensão, selecionaram uma linhagem de células resis-



tentes a 10 μ M de aminoetilcisteína. A análise de aminoácidos livres dessa linhagem variante apresentou um aumento de 244% no teor total de aminoácidos livres. Esse aumento entretanto, não é devido a uma superprodução de lisina, treonina e metionina, que apresentaram aumentos de 70%, 20% e 19% respectivamente.

Através de cultura de protoplastos de *Nicotiana sylvestris*, Negruțiu et al. (1984) selecionaram duas linhagens resistentes a aminoetilcisteína que se caracterizaram por um aumento de 10-20 vezes o teor normal de lisina livre, além de um pequeno aumento no teor total de aminoácidos livres. Tanto em calos como em folhas de plantas regeneradas dessas células mutantes, a enzima dihidrodipicolinato sintase mostrou-se insensível a inibição causada pela aminoetilcisteína. A aspartato quinase permaneceu inalterada nesses mutantes. Cruzamentos com o tipo selvagem indicaram que a resistência é devida a um gene nuclear dominante.

Linhagem de calos tolerantes a aminoetilcisteína isoladas de calos embriogênicos de *Pennisetum americanum*, foram selecionados em meio contendo aminoetilcisteína por Boyes e Vasil (1987). Calos tolerantes cresceram em meio contendo até 4,0mM de aminoetilcisteína enquanto calos não tolerantes foram inibidos na presença de 0,125 e 0,5mM de aminoetilcisteína. A análise de aminoácidos das linhagens de calos tolerantes demonstrou um aumento de 5 vezes no teor de lisina livre enquanto que em folhas de plantas regeneradas desses calos esse aumento atingiu 7 vezes.

Widholm (1976) trabalhando com cultura de células em suspensão de *Nicotiana tabacum* L, selecionou linhagens de células resistentes aos análogos de lisina, aminoetilcisteína e delta hidroxilisina. Essas linhagens celulares foram de 10 até mais de 1.000 vezes menos

IP

sensível aos análogos que a linhagem celular parental. As células resistentes a aminoetilcisteína e delta hidroxilisina apresentaram um aumento de mais de 10 vezes no teor de lisina livre em relação a linhagem normal.

Matthews et al. (1980) através de cultura de células em meio líquido contendo 0,3mM de aminoetilcisteína selecionaram células de *Daucus carota* L resistentes a aminoetilcisteína. A análise de aminoácidos livres mostrou os mesmos níveis de lisina livre tanto para células normais e células resistentes a aminoetilcisteína. A absorção de lisina-¹⁴C do meio de cultura foi altamente reduzida em células resistentes a aminoetilcisteína. As enzimas principais envolvidas na síntese de lisina e treonina foram examinadas e alterações na atividade da aspartato quinase e da dihidrodipicolinato foram observadas. A atividade da aspartato quinase foi reduzida em 33% e a atividade da dihidrodipicolinato aumentou duas vezes. A outra enzima analisada, a homoserina desidrogenase, não sofreu alterações na sua atividade.

Schaeffer e Sharpe (1981) a partir de cultura de anteras de arroz selecionadas em meio contendo 2mM de aminoetilcisteína, regeneraram 10 plantas das quais duas produziram semente. Essas sementes apresentaram níveis de lisina livre mais altos que o controle e também aumentou os níveis de alanina, arginina e asparagina livres. As plantas produzidas apresentaram os teores de suas proteínas mais altos que os controles.

Os resultados descritos na literatura discutida acima, mostram que o conhecimento da regulação da via metabólica do ácido aspártico pode ser utilizado para a seleção de mutantes que apresentam alterações em alguns dos pontos regulatórios, os quais podem ser ca-

racterizados e estudados sob o ponto de vista genético e bioquímico.

Entretanto na maioria das vezes, o sucesso da seleção depende da utilização de um sistema eficiente para a cultura de células ou tecidos "in vitro" e a posterior regeneração de plantas férteis.

2.4-Cultura de tecidos de milho

A tecnologia de cultura de células e tecidos vegetais tem sido largamente utilizada em algumas espécies de plantas, como uma técnica para a obtenção de variantes genéticas. Entretanto, para que isso seja possível, é necessário que sejam desenvolvidos protocolos para a obtenção de culturas de calos, cultura de células em suspensão e protoplastos que apresentem alta capacidade de regeneração de plantas.

A regeneração de plantas por cultura de tecidos em milho, foi primeiramente relatado por Green e Phillips (1975). Esse resultado tem sido repetido atualmente por muitos pesquisadores.

Um dos mais importantes avanços na cultura de tecidos em cereais, obtidos nos últimos anos, foi a descoberta da embriogênese somática (Dunstan et al., 1978; Thomas et al., 1979). Relativamente novo em cultura de cereais e gramíneas, esse fenômeno foi descrito primeiramente em cenoura por Steward e Mears (1958), e dois grupos, o de Vasil (Lu et al., 1982) na Florida e o de Green (Hibberd e Green, 1982) em Minnesota, conseguiram a regeneração de plantas de milho através de embriogênese somática, que parece ocorrer em linhagens com diferentes "backgrounds" genéticos, respondendo dife-

rentemente as concentrações de ácido 2,4- diclorophenoxiacético (2,4-D) e sacarose. Lu (1982) relata que, na regeneração de plantas por embriogênese somática, os calos apresentam embrióides que germinam e dão origem a plantas normais.

No Laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética e Evolução de Instituto de Biologia da Unicamp, foram identificadas várias linhagens de milho que apresentam alta frequência de embriogênese somática e que apresentam grande capacidade de regeneração de plantas (Prioli, 1987). Calos embriogênicos friáveis com alta capacidade de embriogênese somática são mantidos por longos períodos sem alteração na capacidade de regeneração de plantas. Isso faz com que esse tipo de calo seja o mais indicado para seleção "in vitro" de mutantes bioquímicos.

Para a obtenção de mutantes a partir de calos embriogênicos friáveis há dois fatores fundamentais a se considerar: o primeiro diz respeito a manutenção dos calos e de sua capacidade de regeneração, e o segundo, a estratégia a ser usada para a obtenção dos mutantes. Para mutantes resistentes a estresses, herbicidas, antibióticos e mudanças no metabolismo básico, tem se utilizado sistema de seleção positiva (Hibberd, 1984). Este sistema de seleção consiste na habilidade das células para crescer ou sobreviver na presença do agente seletivo. Contudo, a elaboração de estratégias de seleção depende em muito do conhecimento a nível celular e bioquímico da característica de interesse.



3- MATERIAIS E METODOS:

3.1-Seleção de mutantes resistentes a aminoetilcisteína

3.1.1-Linhagens de calos embriogênicos friáveis

Foi utilizada a linhagem de calos embriogênicos friáveis de milho Cat 100-1 do Laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética e Evolução-IB-UNICAMP. (figura 3). Essa linhagem foi estabelecida por Prioli (1987) a partir de embriões imaturos. Os calos foram mantidos em meio M09-2 (Tabela 1) através de subculturas realizadas a cada duas semanas.

3.1.2-Determinação da concentração seletiva de aminoetilcisteína

A determinação da concentração seletiva de aminoetilcisteína foi feita inicialmente utilizando-se a germinação de embriões imaturos da linhagem Cat 100-1 em meio M09-2 sem hormônio contendo um gradiente de concentração de aminoetilcisteína. Para isso espigas da linhagem Cat 100-1 coletadas aos 20 dias após a polinização foram esterilizadas superficialmente em hipoclorito de sódio a 1% por 30 minutos.

Após tres lavagens com água destilada esterilizada, os embriões com tamanho de 3-4mm foram removidos assepticamente das sementes e inoculadas em placas de Petri, contendo 20ml de meio M09-2 sem hormô-

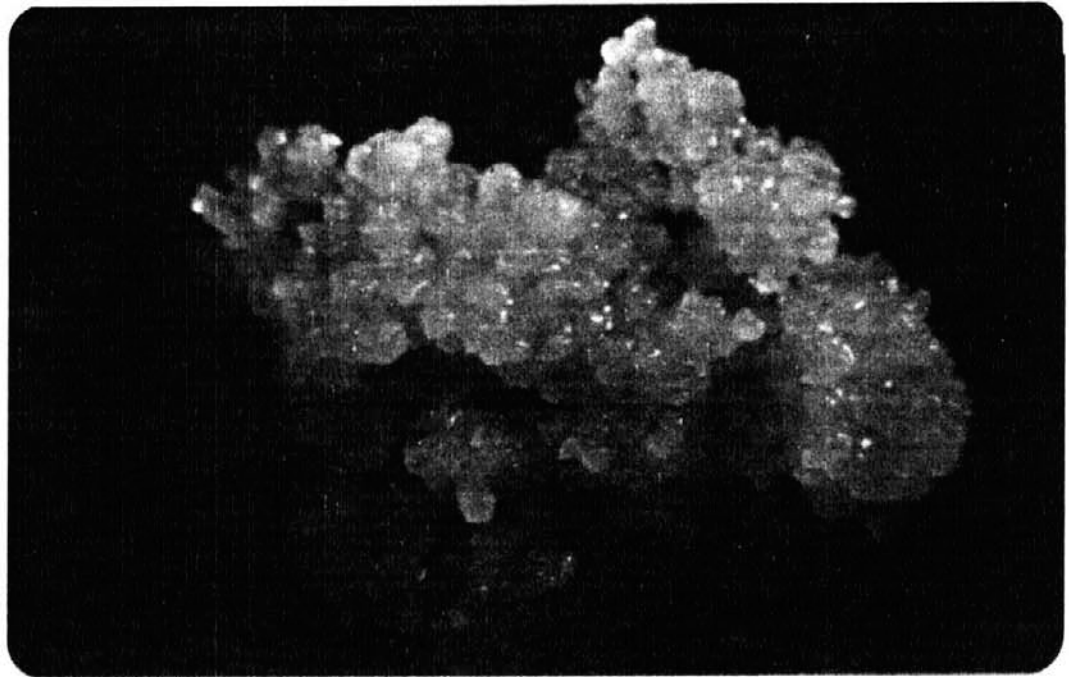
A**B**

Figura-3: Calo embriogênico friável da linhagem Cat 100-1 (A). Calo embriogênico friável da linhagem Cat 100-1 apresentando embrióides na superfície (B).

Tabela 1: Composição do meio de cultura M09-2.

MACRONUTRIENTES	mg/l
1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	463,0
2. KNO_3	2830,0
3. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	166,0
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185,0
5. KH_2PO_4	400,0
6. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,27,8
7. Na_2EDTA	37,2
MICRONUTRIENTES	mg/l
1. $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4,4
2. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5
3. H_3BO_3	1,6
4. KI	0,8
5. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
6. CoCl_2	0,025
7. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
VITAMINAS	mg/l
1. Tiamina	100,0
2. Piridoxina	50,0
3. Ac. Nicotínico	50,0
INOSITOL	9900,0
SACAROSE	3%
2,4D	2mg/l
GELRITE	2,5g/l

no e 0,07, 0,13, 0,27, 0,53 e 1mM de aminoetilcisteína. Foram inoculados 10 embriões por placa e estas foram mantidas em câmara de germinação com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e 16/8 horas de fotoperíodo. O comprimento da raiz principal de cada plântula foi medido após 8 dias de germinação. Com isso foi possível determinar a concentração que causa aproximadamente 80% de inibição do crescimento radicular. Para verificar se a resposta dos calos ao efeito inibitório causado pela aminoetilcisteína era semelhante àquela dos embriões imaturos foi determinada a concentração seletiva desse material.

Calos embriogênicos friáveis da linhagem Cat 100-1 pesando aproximadamente 30mg, foram inoculados em meio M09-2, contendo o mesmo gradiente de concentração de aminoetilcisteína do experimento realizado com embriões imaturos. As placas foram mantidas em câmara escura com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 30 dias do inóculo, foi feita a avaliação visual dos tratamentos.

3.1.3-Indução de mutação e seleção

Para iniciar a seleção de mutantes resistentes a aminoetilcisteína, foi seguido o protocolo esquematizado na figura 4. Os calos embriogênicos friáveis foram primeiramente tratados com um agente mutagênico. Para isso, calos pesando aproximadamente 30mg foram tratados com solução de 0,01 e 1mM de azida sódica em tampão fosfato 0.1M pH3.0 segundo Hibberd e Green (1982), e inoculados em meio M09-2. Após uma semana os calos foram transferidos para meio M09-2 contendo 0,25mM de aminoetilcisteína. Após uma semana em meio seletivo, a maioria dos calos apresentaram-se necróticos, com apareci-

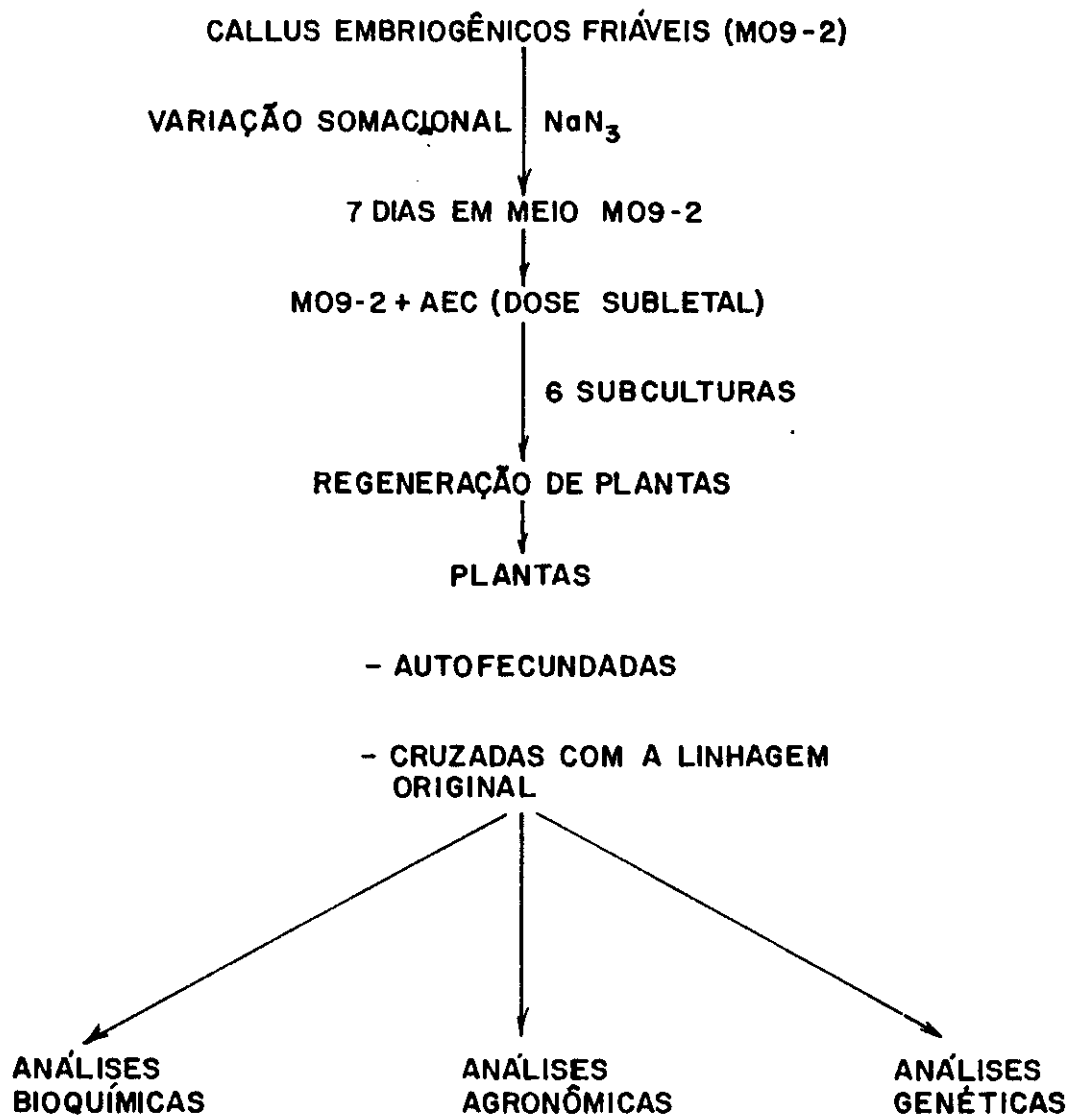


Figura-4: Representação esquemática do processo de seleção de calos e plantas resistentes à aminoetilcisteína.



MP

mento de setores não necróticos. Esses setores foram repicados quinzenalmente em meio seletivo até que apresentassem crescimento normal. Em alguns casos os calos foram repicados em meio contendo concentrações de até 1mM de aminoetilcisteína. Após um mínimo de 6 subculturas em meio seletivo, os calos foram transferidos para meio MS (Tabela 2) para regenerar plantas. Em alguns casos, 0,20mM de aminoetilcisteína foi adicionado ao meio de regeneração para evitar a regeneração de plantas não resistentes. As plantas regeneradas foram transferidas inicialmente para potes contendo vermiculita, regadas com solução nutritiva (Tabela 3) e mantidas em câmara úmida. Em seguida, as plantas foram transferida para o campo e cultivadas até a maturação. As plantas foram autofecundadas e/ou cruzadas com a linhagem Cat 100-1.

3.2-Transferência do gene Ltr*19 para as linhagens de milho Cat 100-1 e Tux 100-1

Uma linhagem de milho, contendo o gene Ltr*19 o qual confere resistência para lisina mais treonina, nos foi cedida pelo Dr. C. Green da Universidade de Minnesota U.S.A. Esse gene foi selecionado a partir de cultura de calos da linhagem A188 em meio contendo 2mM de lisina mais treonina. Posteriormente o gene foi transferido para a linhagem A619 através de retrocruzamentos sucessivos. Portanto as sementes por nós recebidas possuíam background genético da linhagem A619.

O gene Ltr*19 foi transferido para as linhagens Cat 100-1 e Tux 100-1 do Banco de Germoplasma do Laboratório de Genética Vegetal do

Tabela 2: Composição do meio de regeneração MS.

MACRONUTRIENTES	mg/l
1. NH_4NO_3	1650,0
2. KNO_3	1900,0
3. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,0
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,0
5. KH_2PO_4	170,0
6. Na_2EDTA	37,3
7. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
MICRONUTRIENTES	mg/l
1. H_3BO_3	6,2
2. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,9
3. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,6
4. KI	0,83
5. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
6. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
7. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
VITAMINAS	mg/l
1. Tiamina	506,0
2. Piridoxina	128,0
3. Ac. Nicotínico	93,0
INOSITOL	9900,0
SACAROSE	2%
GELRITE	2,3g/l

Tabela 3: Solução nutritiva para regar plantas regeneradas.

MACRONUTRIENTES	mg/l
1. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	810,0
2. NH_4NO_3	102,0
3. KCl	41,8
4. K_2SO_4	96,8
5. KNO_3	55,0
6. $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	213,0
7. KH_2PO_4	18,0
8. FeSO_4	16,9
9. Na_2EDTA	17,6
MICRONUTRIENTES	mg/l
1. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,6
2. H_3BO_3	1,43
3. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,62
4. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,14
5. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,14

Departamento de Genética e Evolução-IB-UNICAMP, através de retrocruzamentos sucessivos. No caso da linhagem Cat 100-1, o gene foi introduzido em plantas contendo endosperma normal, opaque-2, brittle-1 e shrunken-2 enquanto que para linhagem Tux 100-1 o gene foi introduzido em plantas com endosperma normal e opaque-2. Com isso foram produzidos mutantes simples e duplos.

Para a seleção dos duplos mutantes, plantas normais, opaque-2, brittle-1 e shrunken-2 foram utilizadas como fêmeas no cruzamento com a linhagem A619 que continha o gene Ltr*19. O F1 resultante apresentou fenótipos normais de semente. Plantas F1 foram retrocruzadas (BC1) com as plantas normais e mutantes de endosperma. As sementes resultantes do primeiro retrocruzamento apresentaram segregação para os mutantes de endosperma na proporção de 1:1. As sementes com fenótipo mutante foram então selecionadas e utilizadas para os retrocruzamentos seguintes. Com isso os mutantes de endosperma foram fixados, bastando apenas selecionar para o gene Ltr*19. Após dois ou mais retrocruzamentos, os materiais apresentavam um mínimo de 87,5% do background genético das linhagens Cat 100-1 e Tux 100-1. Esse material foi então autofecundado para a obtenção dos seguintes genótipos:

Linhagem	Genótipo	Fenótipo
Cat 100-1	o2o21t1t	normal
Cat 100-1	o2o21t1t	opaque
Cat 100-1	bt1bt11t1t	brittle
Cat 100-1	sh2sh21t1t	shrunken
Tux 100-1	o2o21t1t	normal
Tux 100-1	o2o21t1t	opaque

Durante todo o processo de retrocruzamentos para a obtenção dos mutantes simples e duplos, a presença do gene Ltr*19 foi monitorada com uma ou mais das metodologias descritas a seguir.



3.3-Identificação da presença de genes que conferem resistência a lisina mais treonina e aminoetilcisteína

3.3.1-Cromatografia de aminoácidos em camada delgada

Placas de vidro medindo 20x20cm foram preparadas com uma camada de 0,5mm de uma mistura de sílica gel e celulose na proporção de 2:5 (p/p).

Os aminoácidos livres de calos, coleoptiles e/ou anteras foram extraídos com água numa proporção variando entre 50-100mg de tecido para cada 50µl de água. A extração foi feita em tubos eppendorf de 1,5ml, macerando-se os tecidos com um bastão de vidro. Em seguida os extratos foram centrifugados a 15.000rpm numa microcentrífuga Spin I por 10 minutos. O sobrenadante foi então utilizado para a cromatografia.

Antes da aplicação das amostras, as placas de sílica/celulose foram ativadas a 100°C por 30 minutos. Em seguida, 10µl de cada amostra foram aplicados nas placas. Os cromatogramas foram desenvolvidos em cuba de vidro contendo uma mistura de álcool butílico normal, acetona, hidróxido de amônio e água nas proporções de 50:50:25:10ml respectivamente. Após 90-120 minutos de corrida, as placas foram secadas por 72 horas em estufa ventilada a 40° C. Os cromatogramas foram revelados com uma solução de 0,2% de ninidrina em acetona. Padrões foram incluídos em cada cromatograma para a identificação dos aminoácidos.



3.3.2-Identificação da presença dos genes que conferem resistência a lisina mais treonina e aminoetilcisteína através de germinação de embriões em meio seletivo

Embriões maduros e/ou imaturos das progênies regeneradas de calos resistentes à aminoetilcisteína ou das progênies nas quais foi introduzido o gene Ltr*19 por retrocruzamentos, foram colocados para germinar em meio M09-2 sem hormônio contendo 0,25mM de aminoetilcisteína ou 2mM de lisina mais treonina respectivamente. Para isso, as espigas ou os embriões isolados foram esterilizados superficialmente com hipoclorito de sódio 1% ou cloramina T a 1% por 20 minutos. Em seguida o material foi lavado tres vezes com água destilada estéril e inoculado assepticamente em capela de fluxo laminar no meio seletivo. Foram inoculados entre 10 e 12 embriões em placas de Petri contendo 20ml de meio. As placas foram incubadas em câmara de germinação a 27 ± 1 °C com fotoperíodo de 16/8 horas claro/escuro. Após 4 a 8 dias as plântulas foram avaliadas quanto ao desenvolvimento do sistema radicular e/ou parte aérea. No caso da resistência a lisina mais treonina foi utilizada também para avaliação o escurecimento ou não do escutelo em contacto com o meio (Bright et al., 1982).

3.4-Análise de aminoácidos nas sementes

Sementes das progênies regeneradas de calos resistentes a ami-

noetilcisteína e /ou das progênes nas quais foi introduzido o gene Ltr*19 através de retrocruzamentos, foram analisados individualmente e/ou em amostras compostas quanto ao teor e à composição de aminoácidos livres.

3.4.1-Análise de aminoácidos livres totais

Para a análise de aminoácidos livres totais foi utilizada a técnica descrita por Yemm e Cocking (1975). Para isso entre 20 e 100mg de farinha de endosperma foram homogeneizadas em tubos eppendorf com água numa proporção de 1:5 (p/v). Após 2 horas a 4°C o extrato foi centrifugado a 15.000 rpm em uma microcentrífuga Spin I. Os aminoácidos livres, reagiram com ninidrina, numa mistura de soluções contendo 20µl do sobrenadante, 980µl de água, 500µl de tampão citrato de sódio 0,2M pH 5,0, 200µl de ninidrina a 5% em etilenoglicol, e 1ml de KCN 0,2mM em etilenoglicol. A mistura foi incubada a 100°C por 20 minutos. Após resfriamento, a mistura de reação foi completada para 4ml com etanol a 60% e a absorbância medida em espectrofotômetro num comprimento de onda de 570nm. A concentração de aminoácidos livres totais foi estimada comparando-se a absorbância da amostra com aquela de uma curva padrão de leucina nas concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40µg/ml.

3.4.2-Análise da composição de aminoácidos livres por cromatografia líquida de alto desempenho

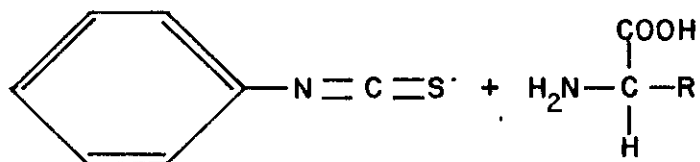


Para a determinação da composição de aminoácidos livres foi utilizada cromatografia líquida de alto desempenho, dos aminoácidos derivatizados com fenilisotiocianato segundo a nota 442 da LKB. Para isso, 100mg de farinha de endosperma foram homogeneizadas com 250ul de água em tubos eppendorf e deixados a 4°C por 1 hora. Em seguida o extrato foi centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo eppendorf. A extração foi repetida mais uma vez e os sobrenadantes foram combinados e liofilizados. O liofilizado foi redissolvido em 100ul de uma solução de acetonitrilo, piridina, trietilamina e água na proporção de 10:5:2:3ml respectivamente. Em seguida adicionou-se 5ul de fenilisotiocianato e os tubos foram deixados a temperatura ambiente por 5-20 minutos para a formação do derivado (figura 5). Após esse período, a solução foi liofilizada, e o resíduo redissolvido em 100ul de tampão fosfato de sódio 12mM pH6.4. Uma solução de 1% de hidroxiprolina derivatizada, foi utilizada como padrão interno e adicionada a cada amostra e alíquotas de 1 a 10ul, dependendo do genótipo, foi injetado no aparelho de HPLC. As condições de análise foram as seguintes:

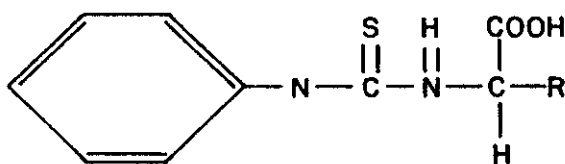
Coluna: LKB 2134-033 SuperPac Guard Cartridge, (3µm), 4,0x30mm e LKB 2134-103 SuperPac Cartridge Spherisorb, (3µm), 4,0x100mm

Eluentes: A- Tampão fosfato de sódio 12mM pH 6.4

B- 500ml acetonitrilo + 500ml tampão fosfato de sódio
24mM pH 6.4



FENILISOTIOCIANATO (PITC)



FENILTIOCARBAMIL (PTC)- Aminoácido

Figura-5: Reação para a formação de PTC-aminoácidos a partir de PITC (Reativo de Edman - Fenilisotiocianato).



Gradiente: 0%-60% B em 22 minutos

Fluxo: 1,0ml/minuto

Pressão: 1,5 bar

Deteccção: 254nm

Temperatura: 41°C

3.5- Análise das proteínas da semente

3.5.1-Fracionamento das proteínas do endosperma

As proteínas do endosperma foram extraídas sequencialmente segundo a metodologia descrita por Paulis et al. (1978) com algumas modificações de Nkonge e Ballance (1982). A tabela 4 apresenta a sequência de extração utilizada.

Para a extração da fração I, 250mg de farinha de endosperma foram homogeneizadas com 1,25ml de NaCl 0,5M por 1 hora a 4°C. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo e a extração foi repetida com 0,7ml do solvente. Os sobrenadantes foram combinados e o volume completado para 2ml. O resíduo foi então lavado com água destilada por duas vezes.

A fração II foi extraída, ressuspendendo-se o resíduo com 2,5ml

Tabela 4: Extração sequencial das proteínas do endosperma.

Fração	Proteínas
I- 0,5M NaCl 1x 5:1(v/p)+1x 5:2(v/p) 1h 4°C	Albuminas, globulinas e nitrogênio não proteico
II- 70% EtOH-0,5% NaOAc 3x 10:1(v/p) 1h 25°C	Zeina I
III- 70% EtOH-0,5% NaOAc+20%ME 2x 10:1(v/p) 30min 25°C	Zeina II
IV- resíduo	Glutelinas



de acetato de sódio 0,5% em etanol 70%. A extração foi conduzida por 1 hora a temperatura ambiente, com agitações ocasionais. Após esse período os extratos foram centrifugados a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo e a extração foi repetida mais duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados e o volume completado para 7,0ml.

A fração III foi extraída, ressuspendendo-se o resíduo com 2,5ml de acetato de sódio 0,5% mais mercaptoetanol 20% em etanol 70%. A extração foi conduzida por 30 minutos a temperatura ambiente com agitações ocasionais. Após esse período os extratos foram centrifugados a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo e a extração foi repetida mais uma vez. Os sobrenadantes foram combinados e o volume completado para 5,0ml.

As proteínas remanescentes no resíduo (fração IV) foram consideradas como sendo glutelinas.

A quantidade de proteínas presente em cada fração bem como a proteína total da farinha de endosperma foram estimada através da metodologia descrita por Paulis et al., (1978). Uma alíquota de 0,2 a 0,4ml de cada fração ou 50mg de farinha de endosperma foram digeridas com 1,5ml de ácido sulfúrico concentrado. O extrato digerido foi completado para 20ml ou 25ml com água destilada.

O nitrogênio proteico dos extratos foi estimado misturando-se 0,5ml de extrato, 1,5ml de uma mistura 1:1 das soluções A e B (solução A: Na_2HPO_4 0,2M; NaOH 0,2M; tartarato de sódio e potássio tetrahidratado 0,36M e solução B: NaOH 2,5M), 0,4ml de uma solução contendo 20g de salicilato de sódio e 30mg de nitroprussiato de sódio em 100ml de água destilada, 0,2ml de uma solução de hipoclorito de sódio contendo 5,2% de cloro ativo. A mistura foi incubada a 30°C

por 30-45 minutos. Após esse período foi adicionado 10ml de água destilada e a absorvância medida em espectrofotômetro a 660nm.

A concentração de nitrogênio foi estimada comparando-se a absorvância das amostras com aquela de soluções padrões contendo 0, 2, 4, 6, 8 e 10 μ g/ml de nitrogênio.

3.5.2-Eletroforese e isoeletrofocalização das proteínas do endosperma

As frações proteicas do endosperma, separadas como descrito acima, com algumas modificações foram submetidas a análise eletroforética em gel de poliacrilamida e isoeletrofocalização em gel de agarose. Foram introduzidas as seguintes modificações no fracionamento das proteínas: as zeínas foram extraídas em uma só fração com uma solução contendo 2% mercaptoetanol em isopropanol 55% e as glutelinas foram extraídas com uma solução de NaOH a 0,2%.

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo as metodologias descritas por Laemmli (1970) e Wilson (1984). O gel foi preparado de acordo com a tabela 5.

As amostras foram preparadas misturando-se de 10 a 100 μ l da amostra, dependendo da fração, com 100 μ l de um tampão composto de 1ml de Tris-HCL 12,5mM pH 8.5, 0,2ml de SDS 10%, 2,5ml de sacarose 40%, 6,2ml de água destilada, 0,1ml de azul de bromofenol 0,1% e 0,2 ml de 2-mercaptoetanol. A mistura foi em seguida fervida em banho maria por 3 minutos. Para o desenvolvimento da eletroforese, 20 a 100 μ l da amostra foram colocadas no gel. A eletroforese foi desenvolvida aplicando-se uma corrente de 25mA por 40 minutos até que

Tabela 5: Composição do gel e dos tampões de corrida da eletroforese em gel de poliacrilamida.

Soluções estoque	Volume em ml		
	Gel de Empilhamento (2,5%)	Gel de Resolução (12,5%)	Tampão do Reservatório
Acrilamida-bisacrilamida (30g e 0,8g/100 ml respect)	2,5	12,5	--
Tampão de empilhamento (0,5M Tris-HCl pH 6.8)	5,0	--	--
Tampão de resolução (3.0M Tris-HCl pH 8.8)	--	3,75	--
Tampão de reservatório (0.25M Tris;1.92M glicina,1% SDS pH 8.3)	--	--	100
SDS 10%	0,2	0,3	--
Persulfato de amonio 1,5%	1,0	1,5	--
Água	11,3	11,95	900
TEMED	0,015	0,015	--

a amostra entrasse no gel de resolução. Em seguida a corrente foi aumentada para 40mA até que a frente da corrida atingisse o final do gel. Após a corrida o gel foi corado por 2 horas com uma solução contendo 1,2g de coomassie blue R250, 500ml de água, 500ml de metanol e 200ml de ácido acético. O gel foi em seguida descorado com uma solução contendo 300ml de metanol, 70ml de ácido acético e 630ml de água destilada. Padrões de proteínas com pesos moleculares conhecidos foram separados da mesma forma no gel para se estimar os pesos moleculares das proteínas das amostras.

As proteínas das frações proteicas foram separadas através de isoeletrofocalização segundo a metodologia descrita por Wilson (1984). O gel foi preparado misturando-se 0,25g de agarose, com 15ml de água. A mistura foi incubada em banho maria fervente até a dissolução da agarose. Em seguida, a solução foi resfriada para 55-60°C e foi adicionado 0,25ml de anfólito pH 3.5-10 e 1ml de anfólito pH 5-8. Após a homogeneização, foram adicionados 1ml de di-tiotreitol 0,05M e uréia até a concentração final de de 5M. O volume foi ajustado para 25ml e a solução moldada em placas de vidro contendo nos lados películas de gel bond hidrofílica e hidrofóbica respectivamente. O gel foi mantido a 4°C durante a noite até gelificação completa. Após a gelificação, o gel foi retirado do molde, mantendo-o aderido na película de gel bond hidrofílica.

Para as amostras de zeína, 5µl da fração proteica foram colocados no gel a 75mm do cátodo, composto de uma solução de NaOH 1M, e a 15mm do anodo, composto de uma solução de ácido acético 0,04M. A isoeletrofocalização foi desenvolvida aplicando-se uma diferença de potencial de 200V por 15 minutos aumentando-se, decorrido esse tempo, para 600V por mais 25 minutos e aumentando-se novamente até

1.000V por mais uma hora, dando um total de 1.300Volts/hora. Após a focalização, as proteínas no gel foram precipitadas com uma solução de ácido tricloro acético a 5% por 1 hora e 30 minutos. O gel foi corado por 15 minutos com uma solução contendo coomassie blue R250 a 0,1% em 20ml de metanol, 10ml de ácido acético e 70ml de água. O gel foi em seguida descorado por 15 minutos com uma solução contendo 20ml de metanol, 10ml de ácido acético e 70ml de água destilada.

Para a isoeletrofocalização de glutelinas, foi introduzida uma modificação no preparo do gel, utilizando-se somente 1,25ml de anfólito de pH 3-10. A fração de glutelinas foi precipitada com 5 volumes de acetona gelada (0°C) por 10 minutos a -20°C para a concentração dessa fração proteica. Após centrifugação e evaporação com N₂, as proteínas foram resolubilizadas em 20µl de NaOH 0,1%, que foram utilizados na isoeletrofocalização



4-RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1-Seleção de mutantes resistentes a aminoetilcisteína

O primeiro passo para a obtenção de mutantes bioquímicos através de seleção em cultura de tecidos é a obtenção de calos embriogênicos friáveis com alta capacidade de regeneração de plantas, e que possam manter essas características por longo período em cultura.

Baseando-se nessas características fundamentais, utilizamos nesse trabalho calos embriogênicos friáveis obtidos de embriões imaturos da linhagem Cat 100-1 do Banco de Germoplasma do Laboratório de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP, estabelecidos por Prioli (1987). Esses calos no início do trabalho já tinham 6 meses de subculturas.

Inicialmente, antes de iniciarmos a indução de mutação dos calos e seleção em meio seletivo, procurou-se determinar qual a concentração de aminoetilcisteína que causaria ao redor de 80% de inibição do crescimento. Para isso, embriões imaturos da linhagem Cat 100-1, coletados aos 20 dias após a polinização, foram colocados para germinar em meio contendo um gradiente de concentração de aminoetilcisteína. Após 7 dias nesse meio, o crescimento do sistema radicular foi avaliado. Como pode ser visto na figura 6, o crescimento do sistema radicular das plântulas é fortemente inibido com baixas concentrações de aminoetilcisteína. Com base no desenvolvimento radicular, determinamos que a concentração de 0,125mM de aminoetilcisteína é suficiente para causar em torno de 80% de inibição no crescimento das raízes. Baseando-se nesse resultado, tres con-

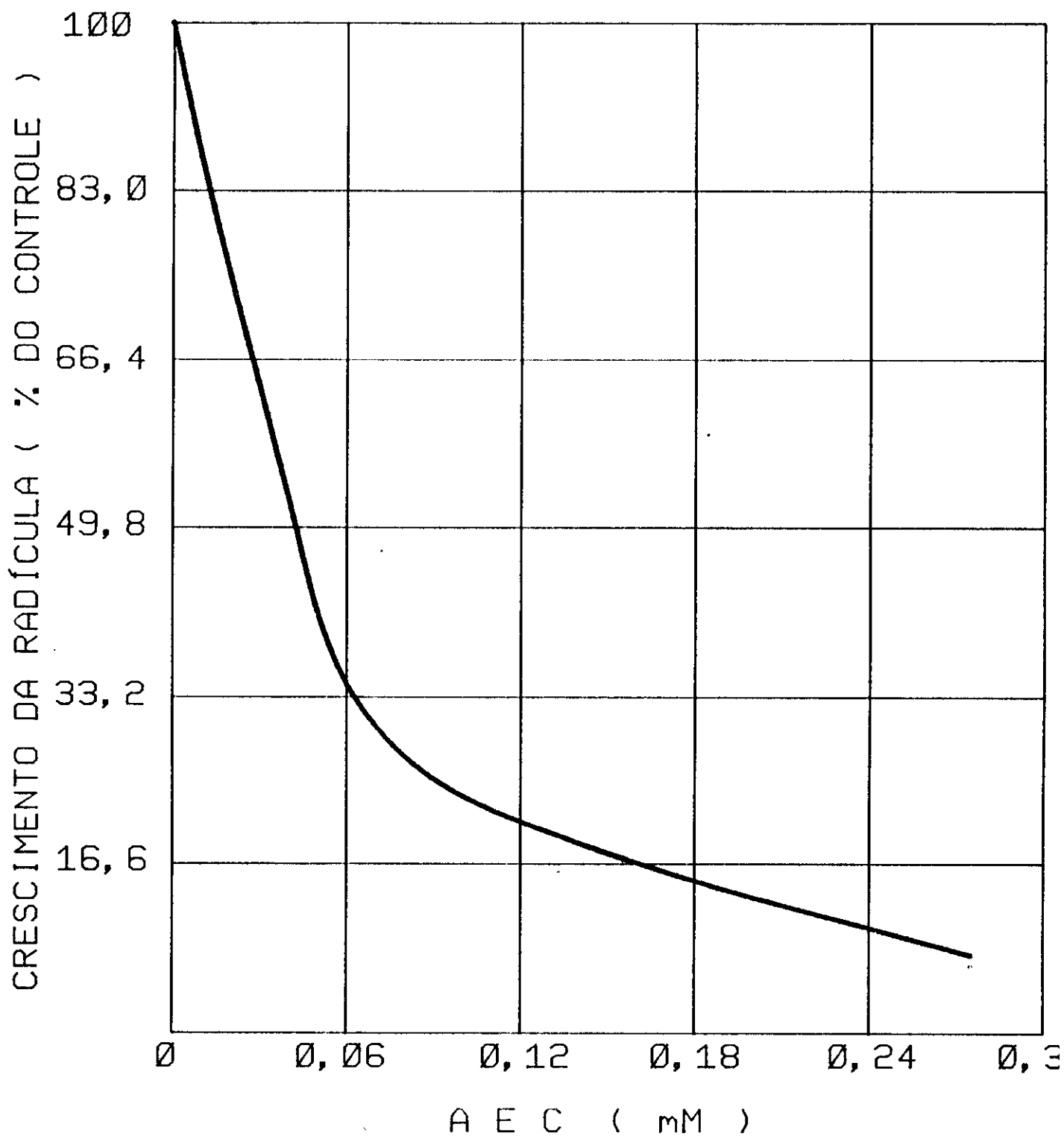


Figura-6: Inibição do crescimento da radícula de embriões inoculados em meio M9-2 sem hormônio, contendo várias concentrações de aminoetilcisteína.



concentrações de aminoetilcisteína, 0,07mM, 0,13mM e 0,27mM foram escolhidas para darmos início ao processo de seleção.

Calos embriogênicos friáveis foram repicados em pequenos pedaços no meio básico de manutenção M09-2 e então tratados com o agente mutagênico azida sódica (NaN₃), segundo Hibberd e Green (1982). Por uma semana os calos ficaram sob ação do agente mutagênico. Durante esse período verificou-se que a concentração de 1mM de NaN₃ foi muito drástica, levando a necrose e morte de quase a totalidade dos calos. Na concentração de 0,1mM de NaN₃, o efeito do agente mutagênico, foi sensivelmente menos drástico, observando-se uma sobrevivência de 80% dos calos. Os calos não mutagenizados cresceram normalmente.

Após 7 dias nessas condições, os calos foram transferidos para meio de cultura contendo 0,07, 0,13 e 0,27mM de aminoetilcisteína por 15 dias. Durante a primeira subcultura no meio seletivo, observamos que os calos apresentaram um ligeiro branqueamento e crescimento reduzido. No segundo repique, esse processo acentuou-se, de forma que as regiões mais claras se tornaram necrosadas. Porém, alguns setores de aparência normal começaram a surgir. Durante a segunda subcultura, os calos que haviam sido tratados com 1mM de NaN₃, independentemente da concentração de aminoetilcisteína morreram. Durante as subculturas subsequentes, as regiões necróticas (figura 7) tenderam a se reduzir enquanto que o crescimento do restante do calo estava se normalizando. Observou-se também que durante as quatro primeiras subculturas os calos se desenvolveram bem melhor nas concentrações de 0,07 e 0,13mM de aminoetilcisteína. A partir da quinta subcultura os calos foram transferidos para meio seletivo contendo 0,25mM de aminoetilcisteína (figura 8), aumentan-

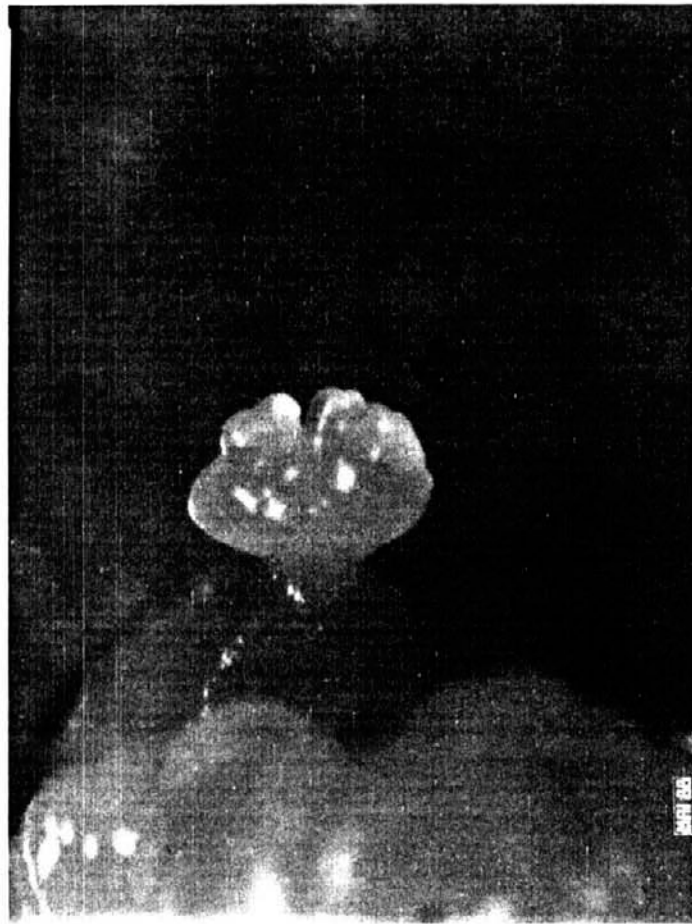


Figura-7: Calos friáveis mantidos em meio M09-2 contendo 0,25mM de aminoetilcisteína por 3 subcultura. As setas mostram o aparecimento de setores de calos saudios na superfície e setores escurecidos ou necrosados na base da cultura.

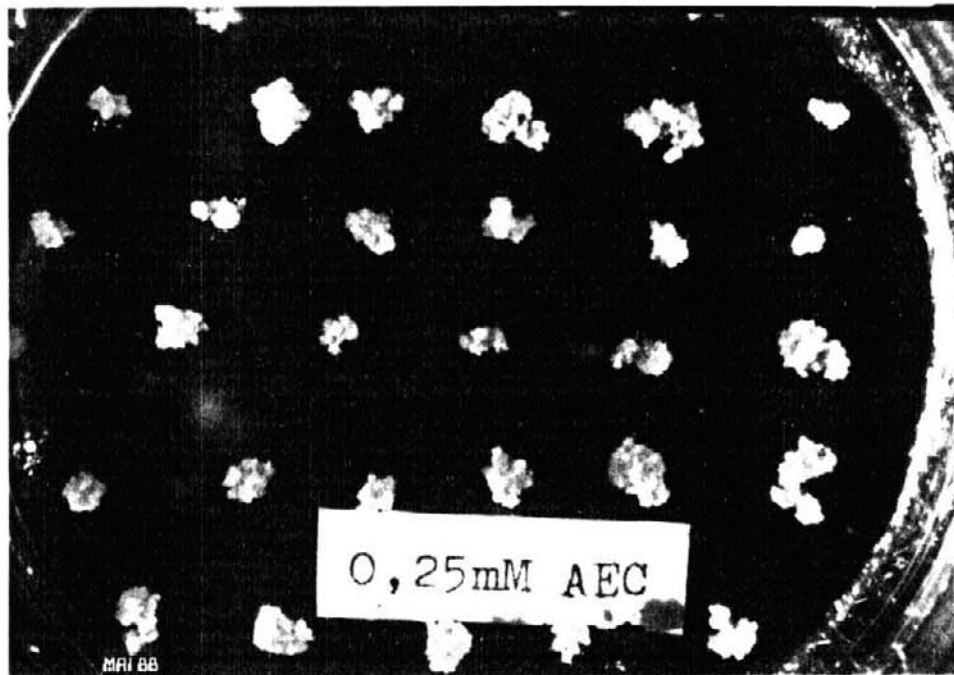


Figura-8: Calos embriogênicos sob seleção em meio de cultura contendo 0,25mM de aminoetilcisteína. A placa apresenta calos necrosados e calos com setores resistentes.



do-se dessa forma a pressão de seleção. Depois da sexta subcultura julgamos que os calos que apresentaram crescimento normal em 0,25mM de aminoetilcisteína poderiam ser resistentes, ou poderia estar acontecendo algum tipo de escape. A maneira de se comprovar qual das duas hipóteses era a verdadeira seria regenerarmos plantas e verificarmos a resistência das progênes. Outra indicação da resistência poderia ainda ser obtida através da análise de aminoácidos livres da semente.

Para a regeneração de plantas, vários calos foram transferidos para meio de regeneração contendo 0,2mM de aminoetilcisteína. Nesse meio, a grande maioria das plântulas apresentaram crescimento radicular reduzido, raízes grossas e finalmente vieram a morrer. Um número pequeno de plantas apresentou crescimento aparentemente normal. Essas plantas foram consideradas como possíveis mutantes resistentes a aminoetilcisteína. No entanto, nessa altura do processo, podemos concluir que o processo de seleção de calos resistentes a aminoetilcisteína não estava sendo totalmente eficaz, pois alguns setores estavam originando plântulas sensíveis.

As plantas regeneradas que apresentaram crescimento normal, foram transferidas para o campo e cultivadas até a maturação. As plantas que atingiram a maturidade fisiológica, com produção de pólen e espigas foram autofecundadas e/ou seu pólen ou sua espiga utilizadas em cruzamentos com a linhagem Cat 100-1.

No início desse trabalho, procurou-se determinar, utilizando-se a germinação de embriões em meio contendo um gradiente de aminoetilcisteína, qual a concentração que causaria aproximadamente 80% de inibição do crescimento. Essa concentração foi determinada como sendo 0,125mM de aminoetilcisteína. Entretanto desde as primeiras



subculturas em meio seletivo, verificou-se que boa parte dos calos apresentavam bom crescimento em concentração de até $0,25\text{mM}$. Além disso, a maioria das plântulas em meio de regeneração, obtidas a partir de calos selecionados em meio contendo $0,25\text{mM}$ de aminoetilcisteína, mostraram ser sensíveis. Esses resultados sugeriram que a sensibilidade a aminoetilcisteína dos calos poderia ser diferente daquela das plântulas obtidas em embrião imaturo. Para testar essa hipótese, calos sem seleção, mantidos em estoque, foram inoculados em meio de cultura com o mesmo gradiente de aminoetilcisteína utilizados para embriões. Após 30 dias nesse gradiente os calos foram avaliados quanto ao crescimento (figura 9A). Observou-se que os calos apresentaram aparência normal porém com crescimento reduzido em concentrações de até $0,27\text{mM}$ de aminoetilcisteína (figura 9B). Através desse experimento verificou-se que para a inibição do crescimento de calos seriam necessárias concentrações de até $0,53\text{mM}$ de aminoetilcisteína. Além disso os calos não apresentavam crescimento homogêneo. Na concentração de $0,53\text{mM}$ de aminoetilcisteína por exemplo alguns calos apresentaram crescimento semelhante ao controle.

Esses resultados se repetiram quando comparamos calos não selecionados com calos selecionados em $0,25\text{mM}$ de aminoetilcisteína por 14 subculturas. Como pode ser visto pela figura 10, de modo geral os calos selecionados em meio contendo aminoetilcisteína, apresentaram maior crescimento que os calos não selecionados. Como era esperado, baseado no experimento anterior, alguns calos não selecionados apresentaram setores que se desenvolveram bem em concentrações altas de aminoetilcisteína.

A resposta diferencial ao agente seletivo que ocorre entre plântulas e calos pode ser devido a dois fatores: primeiro sabe-se que

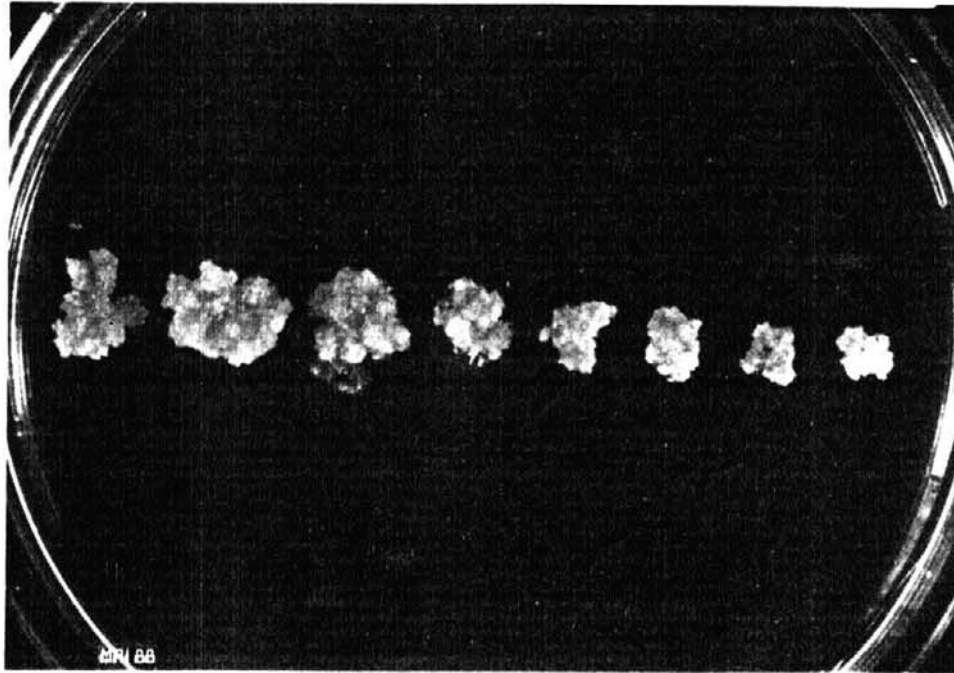
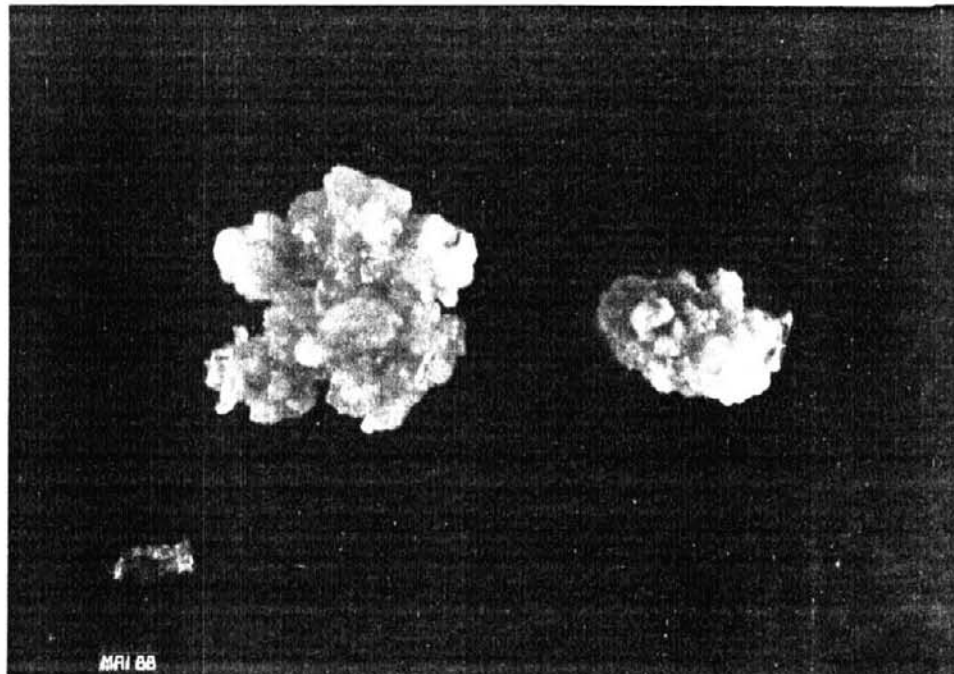
A**B**

Figura-9: Calos embriogênicos friáveis desenvolvidos em meio M09-2 contendo um gradiente de aminoetilcisteína. (A) Calos em diferentes concentrações de aminoetilcisteína após 30 dias do inóculo. (B) calos em 0 e 0,27mM de aminoetilcisteína respectivamente, após 30 dias do inóculo.

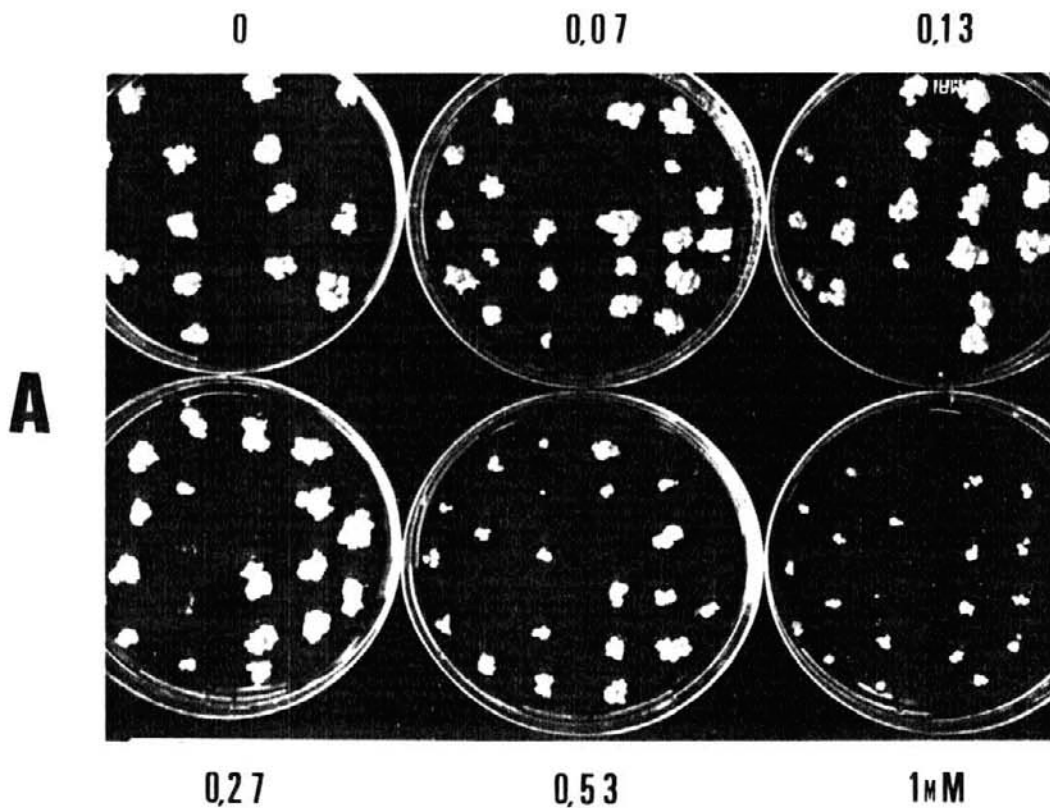
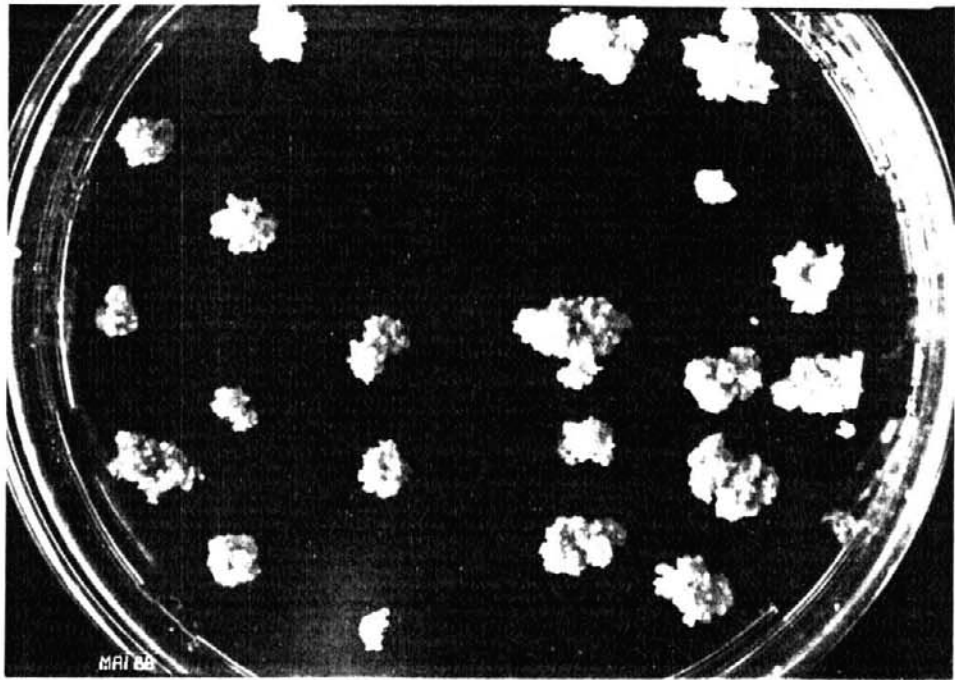
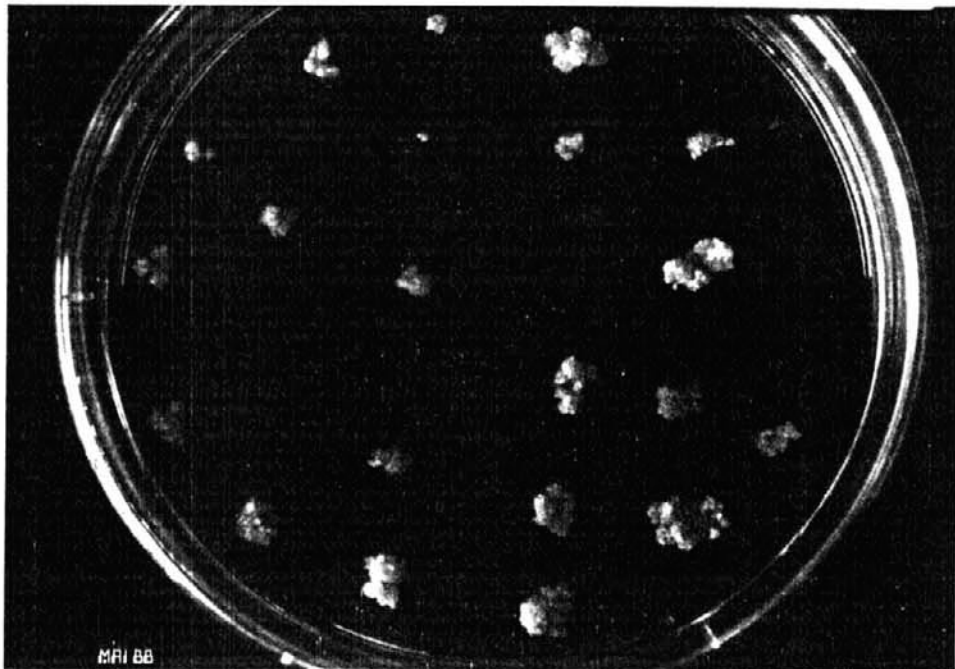


Figura-10: Crescimento de calos não selecionados (esquerda) e selecionados (direita) por quatorze subculturas em meio contendo aminoetilcisteína, submetidos a um gradiente de 0 a 1mM de aminoetilcisteína. (A) Crescimento de calos não selecionados (esquerda) e selecionados (direita) em gradiente contendo entre 0 e 1mM de aminoetilcisteína. (B) Detalhe de crescimento de calos não selecionados (esquerda) e selecionados (direita) em meio contendo 0,07mM de aminoetilcisteína. (C) Detalhe de crescimento de calos não selecionados (esquerda) e selecionados (direita) em meio contendo 0,53mM de aminoetilcisteína.

B



C



o efeito da sensibilidade à aminoetilcisteína é observado principalmente pela inibição do crescimento radicular (Miflin et al., 1982). Isso é verdadeiro tanto para a sensibilidade à aminoetilcisteína como também para lisina mais treonina, (Hibberd e Green, 1982). Segundo, as células dos calos em cultura podem apresentar um efeito de gradiente fazendo com que as células recebam quantidades desiguais do agente seletivo. (Shatner e Anderson, 1985).

Isso pode ter ocorrido em nossos experimentos, com a formação de um gradiente entre as células de forma que as células da parte superior dos calos tenham recebido menor quantidade de aminoetilcisteína. Portanto, repiques sucessivos dos calos em meio seletivo podem efetivamente minimizar o número de células sensíveis a aminoetilcisteína. Resultados semelhantes foram encontrados para a seleção de plantas de milho resistentes a herbicidas (Shatner e Anderson, 1985). Também em trabalhos utilizando-se cultura de células em suspensão ou protoplasto não se consegue obter 100% de plantas resistentes aos agente seletivos. Grandbastien et al. (1985) trabalhando com cultura de protoplastos de *Nicotiana tabacum* submetidas a seleção para resistência a valina, determinaram que ao redor de 25% de plantas regeneradas eram sensíveis. É possível que no sistema de seleção a partir de calos esta taxa possa ser bem maior, uma vez que a eficácia da seleção é menor que em cultura de células e protoplastos.

Esses resultados sugerem também que para se ter certeza ou não da resistência de uma planta a aminoetilcisteína ou a outro agente seletivo qualquer, as progênies das plantas regeneradas devem ser testadas em meio seletivo. Isso possibilitará a observação direta do efeito da aminoetilcisteína no crescimento radicular. Este pro-



cedimento tem sido utilizado em vários trabalhos de seleção de mutantes, (Bright et al., 1979; Bourgin et al., 1980; Negrutiu et al., 1981; Schaeffer e Sharpe, 1981; Hibberd e Green, 1982; Cattoir-Reynaerts et al., 1983; Grandbastien et al., 1985; Jacobsen, 1986; Boyes e Vasil, 1987) uma vez que avaliações em calos podem ser precipitadas.

O processo de seleção dos calos continuou em meio de cultura contendo de 0,25mM até 1mM de aminoetilcisteína. Em apenas uma subcultura em 1mM de aminoetilcisteína os calos ficaram totalmente necrosados morrendo em seguida. Para a concentração de 0,5mM de aminoetilcisteína, aproximadamente 20% dos calos sobreviveram, porem apresentando crescimento reduzido.

O processo de seleção continuou até a 23ª subcultura, em meio contendo 0,25mM e 0,5mM de aminoetilcisteína, quando diferentes calos foram individualizados em linhagens e repicados por 5 subculturas de 30 dias.

O objetivo desse procedimento foi de selecionar linhagens de calos que pudessem apresentar diferenças na resposta à sensibilidade a aminoetilcisteína. Foram selecionadas 35 linhagens, dentre as quais o nível de resistência variou de 0,25mM a 0,5mM de aminoetilcisteína. Calos de cada linhagem foram analisados qualitativamente por cromatografia em camada delgada, para o pool de aminoácidos livres. Como pode ser visto pela figura 11, de uma forma geral todas as linhagens apresentam um padrão praticamente semelhante das bandas com mínimas variações apreciáveis.

Calos dessas linhagens foram colocados em meio de regeneração (figura 12), não sendo observadas variações para a regeneração de plantas entre elas. Entretanto de uma forma geral, notou-se que os

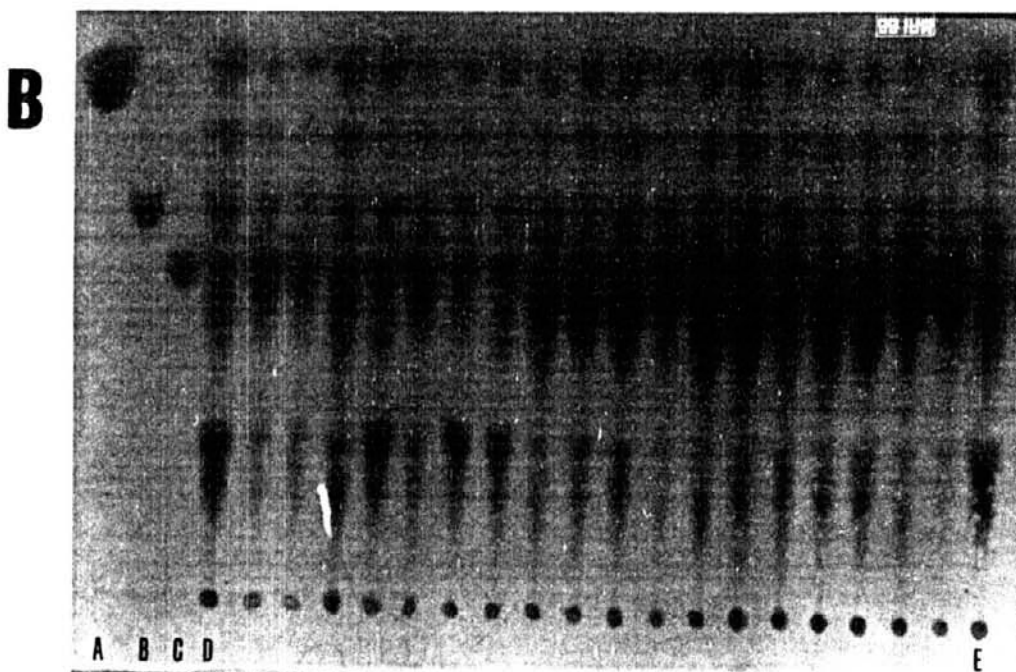
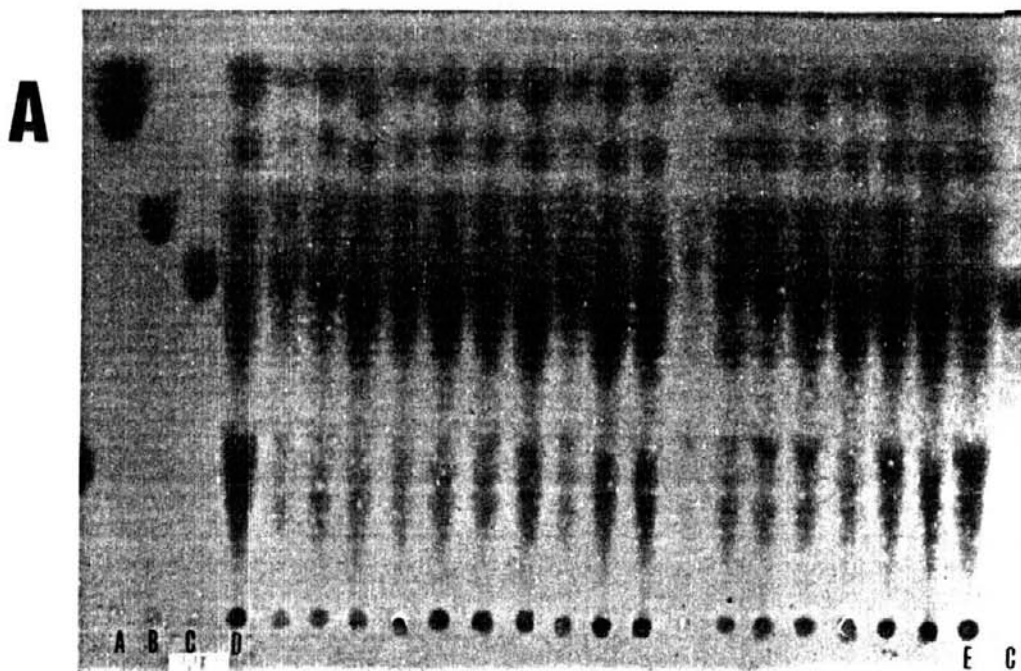


Figura-11: (A) e (B) cromatografia de aminoácidos em camada delgada de extratos de 35 linhagens de calos resistentes a aminoetilcisteína. A, B, C, D e E são respectivamente, treonina, aminoetilcisteína, lisina e Cat 100-1 original.



Figura-12: Calo da linhagem Cat 100-1, submetido à seleção em aminoetilcisteína, em meio para regeneração de plantas. Observa-se um grande número de plântulas sendo regeneradas.

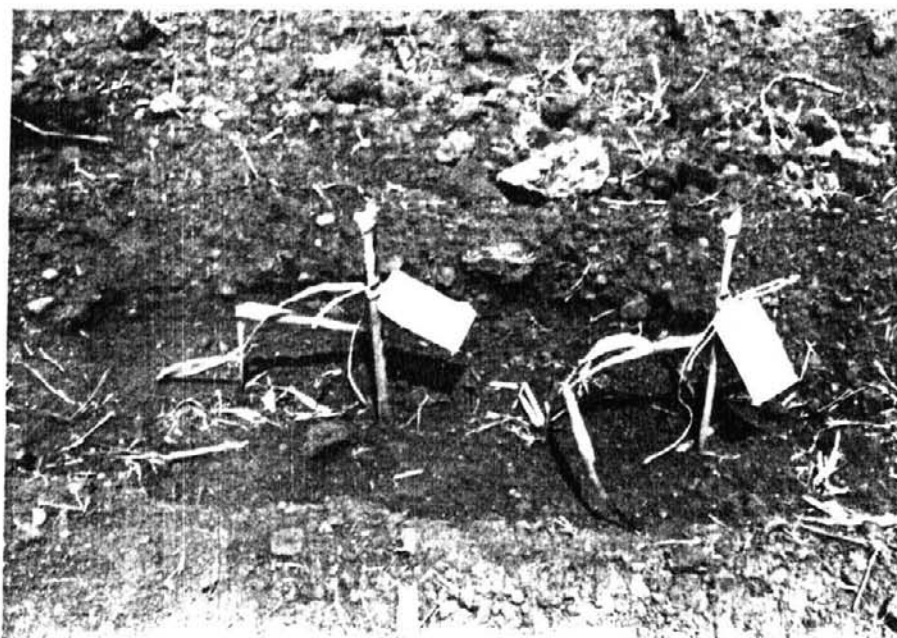
calos selecionados diminuíram a frequência de regeneração de plantas em relação aos calos não selecionados. Contudo, essa diminuição na frequência de regeneração não deve afetar a obtenção de plantas, pois muitas plantas podem ser obtidas aumentando-se o número de calos em meio de regeneração.

As observações e análises dos calos submetidos à seleção foram feitas até a 40ª subcultura. Essas linhagens resistentes a aminocetilcisteína são agora mantidas em estoque pelo Laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP.

A partir de 173 plantas regeneradas, 63 foram levadas ao campo, (figura 13), das quais, 35 atingiram a maturidade. Várias delas foram autofecundadas e/ou cruzadas com a linhagem Cat 100-1.

Cada planta regenerada que formou panícula, teve suas anteras analisadas por cromatografia em camada delgada com o objetivo de se verificar alterações, principalmente para a lisina, no pool de aminoácidos livres. Como pode ser visto na figura 14, bandas de diferentes intensidades foram observadas entre as diferentes progênies. Em alguns casos por exemplo para as progênies AEC-19, AEC-25 e AEC-26 que na figura 14 correspondem a O, U e V respectivamente, todas as bandas de aminoácidos, apresentaram-se reduzidas em relação as outras progênies. Isso pode ser devido ou a uma maior dificuldade na solubilização do pool de aminoácidos livres ou a menor concentração desses aminoácidos na espiguetta. A progênie AEC-18 (na figura 14 corresponde a N), apresenta uma banda única que esta ausente em todas as outras progênies analisadas. A progênie AEC-26 (na figura 14 corresponde a V) por sua vez, apresenta um aumento de intensidade em uma das bandas comum a todas as progênies. Com rela-

A



B

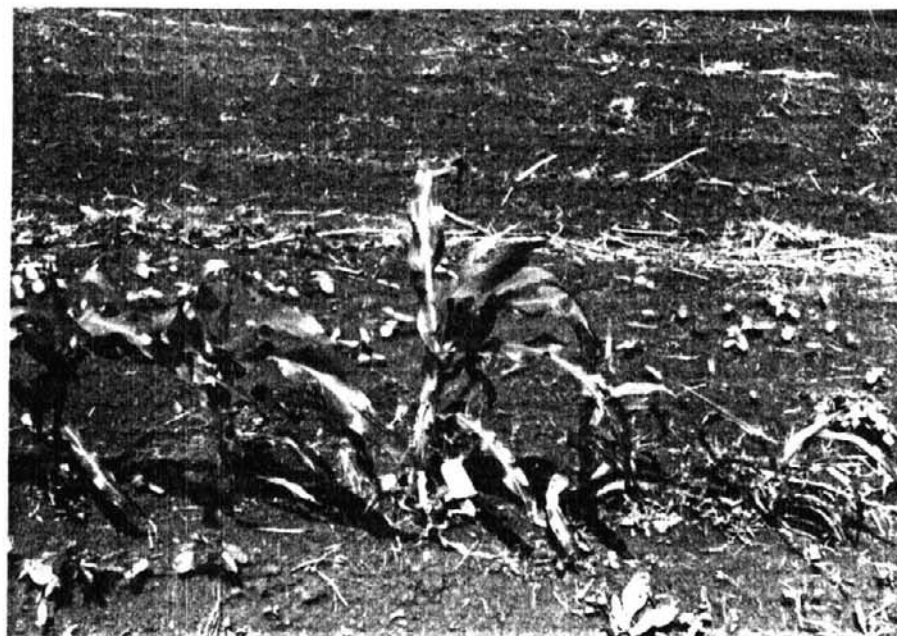


Figura-13: Plantas obtidas por embriogênese somática transferidas para o campo. (A) Plantas com 5 dias de campo. (B) Plantas com 30 dias de campo.

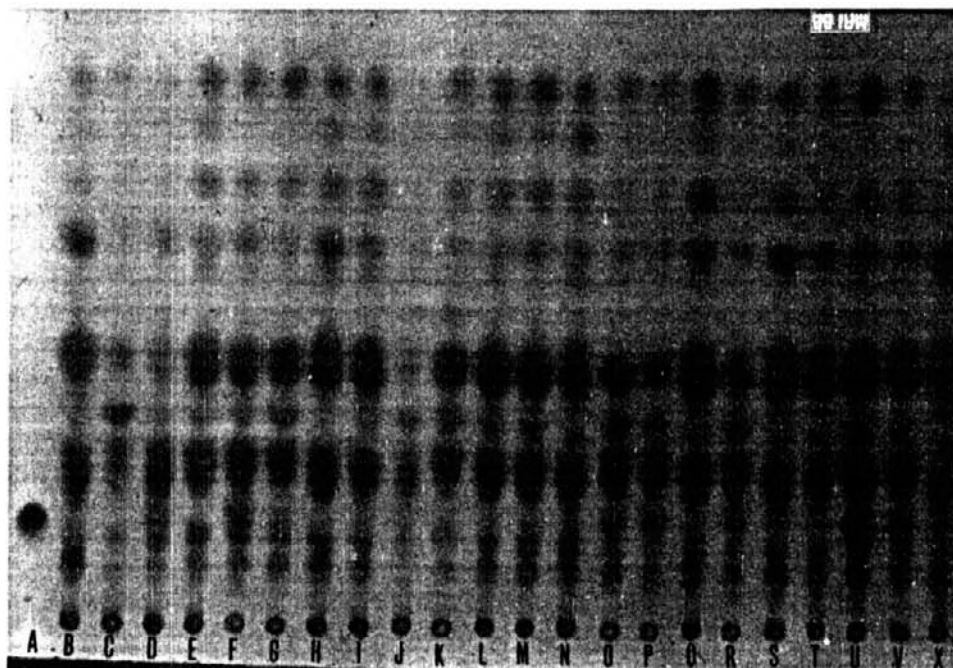


Figura-14: Cromatografia em camada delgada de extratos de anteras de plantas R0 resistentes a aminoetilcisteína. (A) Corresponde ao padrão de lisina. (B) e (X) à linhagem Cat 100-1 original e de (C) a (V), plantas regeneradas.



ção especificamente a lisina, o padrão de cromatografia mostra que as progênies AEC-5, AEC-6, AEC-11, AEC-B, AEC-14, AEC-23 e AEC-25 (na figura 14 correspondem respectivamente a: B, C, E, I, J, S e U) apresentam maior intensidade de uma banda que possui o mesmo R.F. da lisina. Essa banda não está presente na linhagem Cat 100-1, nem nas outras progênies analisadas.

As alterações verificadas em cromatografia em camada delgada de extratos de anteras indicam que existem modificações nos padrões dos aminoácidos entre as plantas regeneradas a partir dos calos submetidos a mutagênese e seleção.

Para testar a resistência à aminoetilcisteína das progênies regeneradas foi realizado o teste de germinação de embriões imaturos em meio contendo 0,25mM de aminoetilcisteína. De todas as progênies testadas, apenas duas (AEC-1 e AEC-5) apresentaram segregação para a resistência a 0,25mM de aminoetilcisteína.

Uma das progênies denominada de AEC-1, quando autofecundada apresentou uma segregação aproximada de 3:1 para plantas resistentes e sensíveis em 10 embriões R1 analisados (figura 15A). É interessante notar que as plântulas testadas podem ser agrupadas em três classes segregantes perfazendo a proporção de 1:2:1. Este resultado sugere a presença de um gene com dominância parcial para a resistência a aminoetilcisteína.

Isso foi confirmado em progênies retrocruzadas (figura 15B e C) entretanto uma análise genética mais precisa dessa progênie não foi realizada. Para a outra progênie resistente denominada de AEC-5 (figura 16), quando autofecundada também apresentou plântulas R1 resistentes a 0,25mM de aminoetilcisteína. Entretanto a proporção entre plantas resistentes e sensíveis foi de 1:3 (R:S) sugerindo

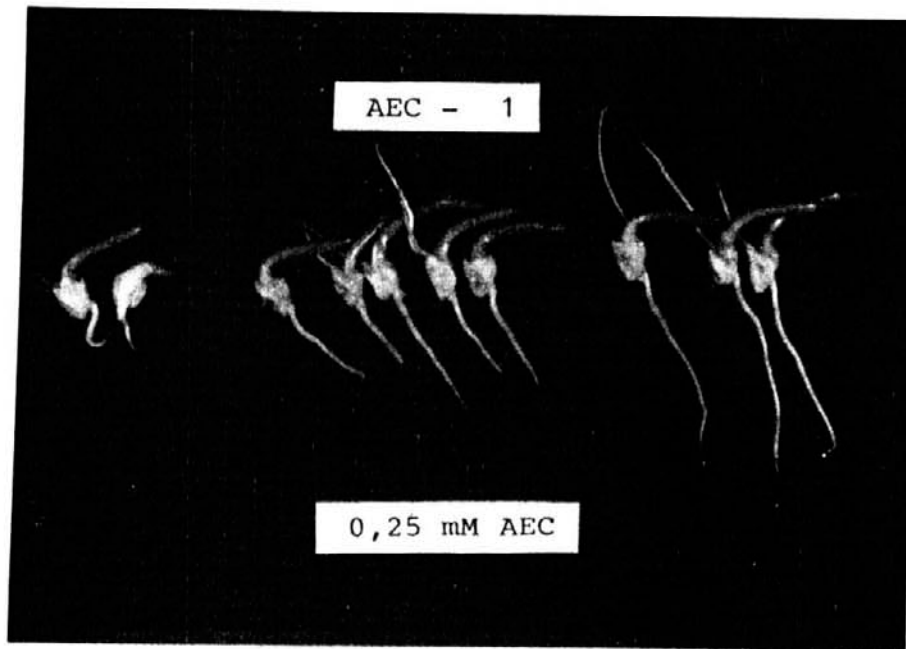
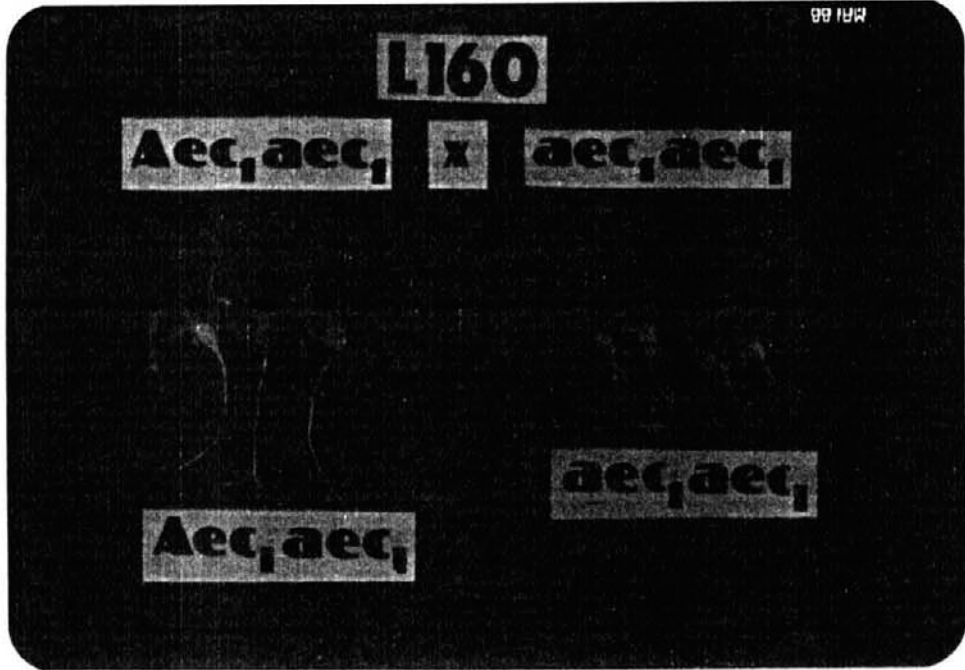
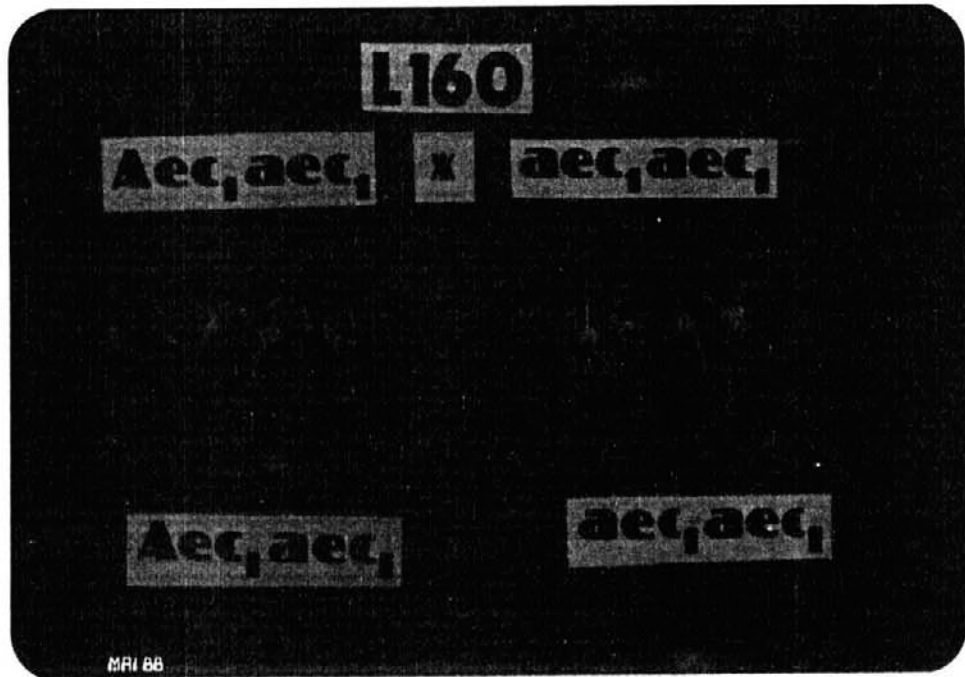
A

Figura-15: Segregação de plântulas sensíveis e resistentes a aminoetilcisteína. (A) Sementes da progênie AEC-1 resistente a aminoetilcisteína foram obtidas por autofecundação do R0. Embriões maduros foram colocados para germinar em meio contendo 0,25mM de aminoetilcisteína. A progênie AEC-1 mostra segregação de 1:2:1 para plântulas sensíveis e resistentes, indicando que a resistência é determinada por um gene com dominância parcial. (B) e (C) apresentam embriões maduros obtidos de sementes AEC1-R1 ⊗ Cat 100-1 segregando 1:1 para plântulas resistentes e plântulas sensíveis, confirmando o resultado de sementes R1. (L160 representa a progênie AEC-1).

B



C



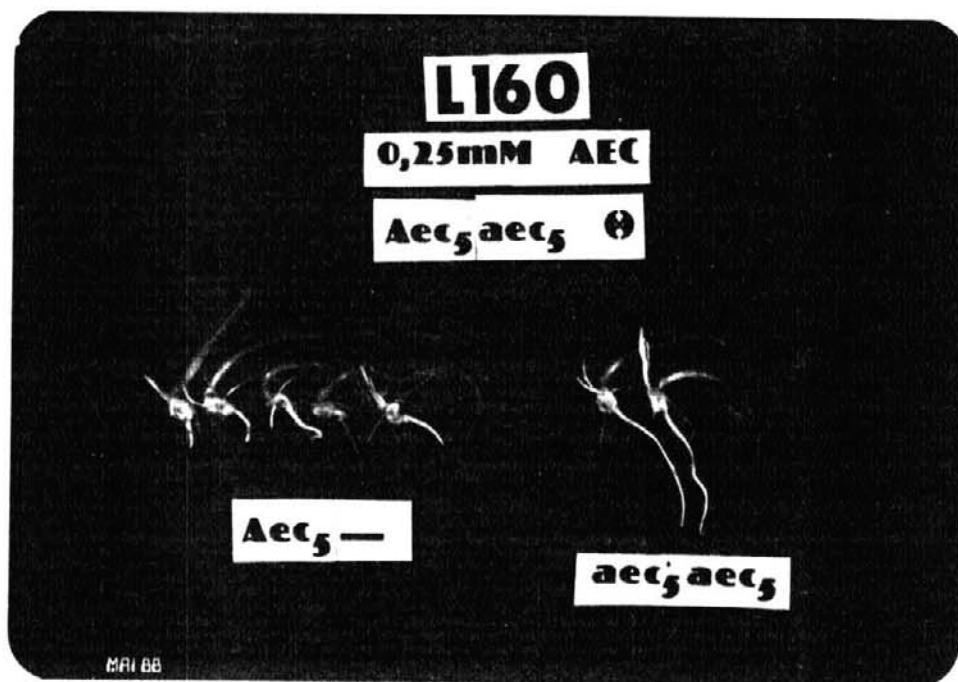
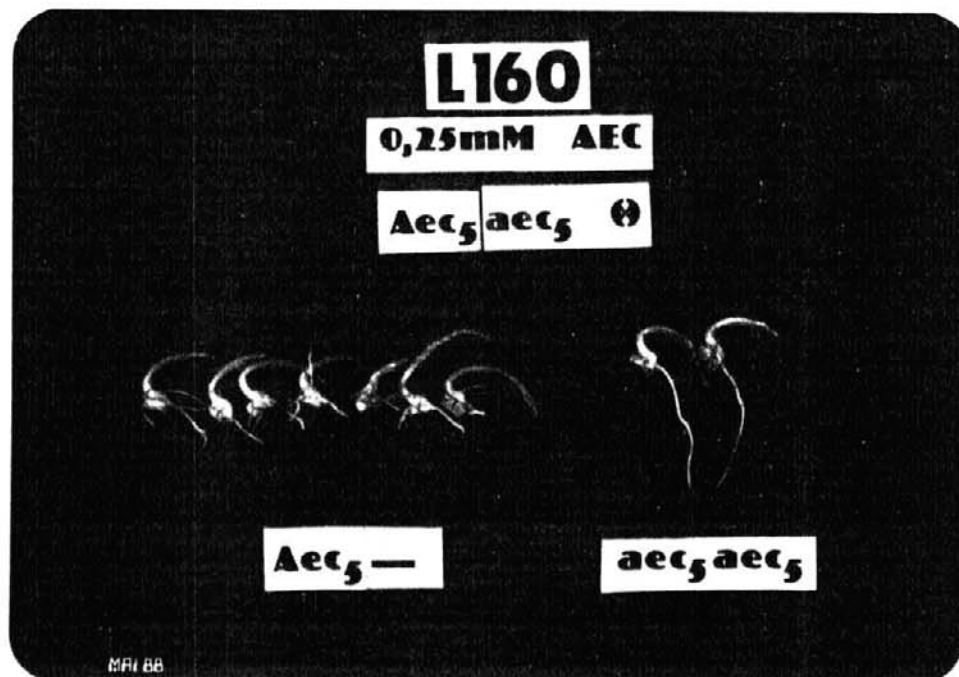
A**B**

Figura-16: Progenie AEC-5 (na figura representada por L160) apresentando segregação para resistência à aminoetilcisteína (AEC). (A) e (B) apresentam embriões de sementes R1 da planta AEC-5 R0 ⊗ germinados por 7 dias em meio de cultura contendo 0,25mM de aminoetilcisteína em placas distintas. Ambas apresentam resistência possivelmente determinada por um gene recessivo.

que nesse caso o sistema genético pode ser outro pois aparentemente a resistência nessa progênie estaria sendo determinada por um gene recessivo. Resultados semelhantes foram encontrados por Bright et al. (1979, e Jacobsen (1986).

Todas as outras progênies (figura 17) apresentam-se totalmente sensíveis a 0,25mM de aminoetilcisteína, similarmente ao padrão de sensibilidade da linhagem Cat 100-1 (figura 18).

5.2-Análise de aminoácidos livres nas sementes das plantas resistentes a aminoetilcisteína

Progênies derivadas das plantas AEC-1 e AEC-5 além de duas progênies sensíveis a 0,25mM de aminoetilcisteína, progênies AEC-10 e AEC-18, foram analisadas quanto ao teor e composição dos aminoácidos livres do endosperma. As progênies AEC-10 e AEC-18 foram incluídas na análise como um controle negativo. Para a progênie AEC-1 foram utilizadas tres espigas de plantas R1 provenientes de plantas R0 autofecundadas, as quais foram retrocruzadas com a linhagem Cat 100-1. Como as sementes R1 mostraram segregação de 3:1 (R:S) quando analisadas para resistência a aminoetilcisteína, sugerindo um gene dominante, a frequência desse gene nas amostras deve ser de 25%. Para a progênie AEC-5 foram analisadas 6 espigas de plantas R1 autofecundadas provenientes de plantas R0 também autofecundadas. Como as sementes R1 mostraram segregação aproximada de 3:1 (S:R) para sensibilidade e resistência, sugerindo um gene recessivo, a frequência desse gene deve ser de 50%.

Como pode ser visto pela tabela 6, o teor total de aminoácidos

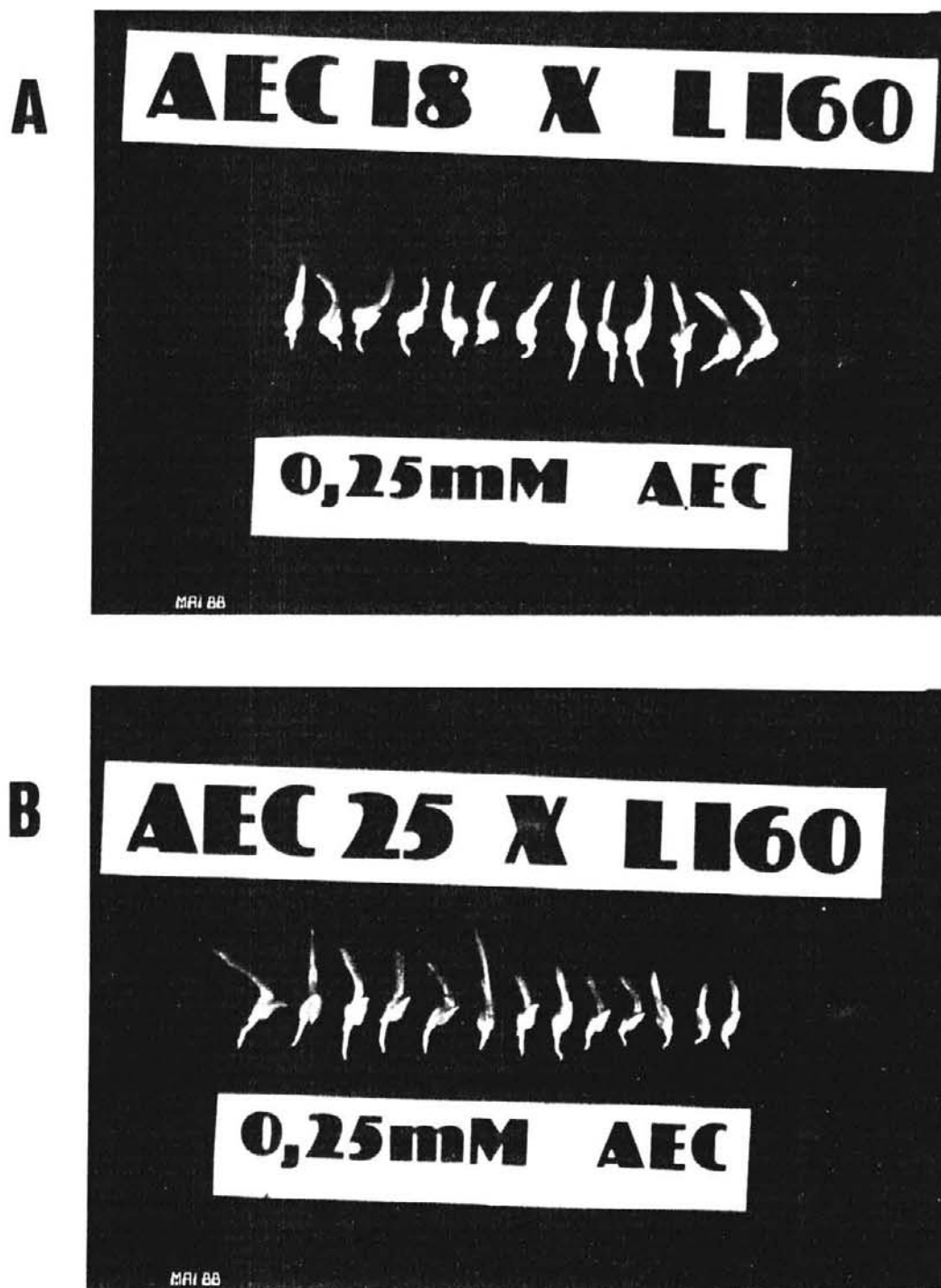


Figura-17: (A) e (B) apresentam embriões sensíveis à 0,25mM de aminoetilcisteína. Os embriões foram obtidos de sementes R1 provenientes do cruzamento de duas plantas regeneradas (AEC-18 e AEC-25) a partir de calos resistentes à aminoetilcisteína e cruzadas com a linhagem Cat 100-1 (na figura representada por LI60).

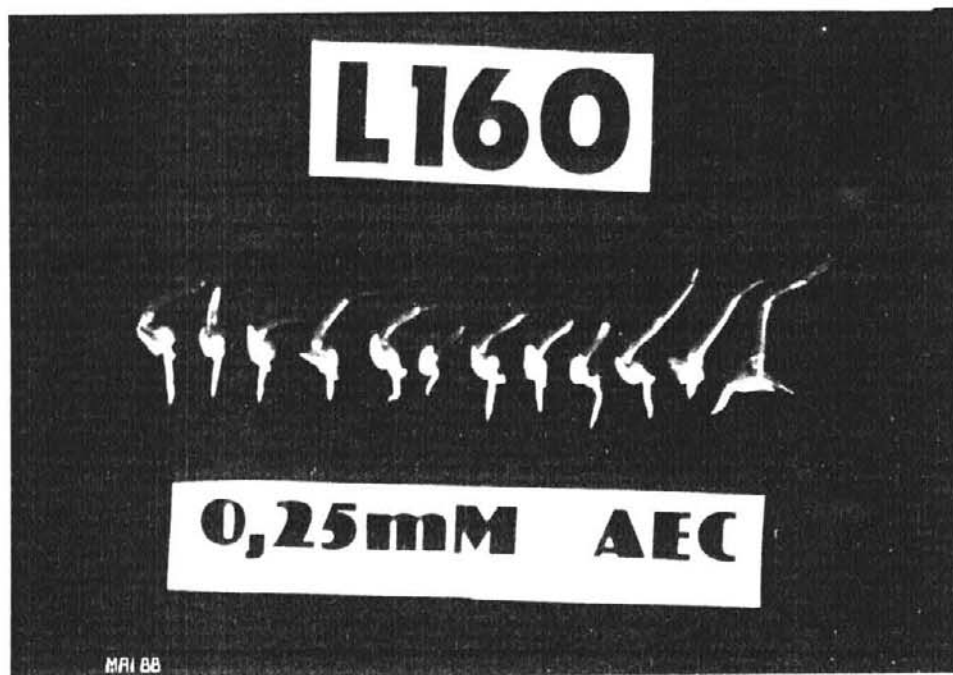


Figura-18: Embriões da linhagem Cat 100-1 (na figura representada por L160) germinados por 7 dias em meio de cultura contendo 0,25mM de aminoetilcisteína. Como pode ser visto, todos os embriões apresentam-se sensíveis à aminoetilcisteína.

TABELA 6: Aminoácidos livres de endospermas das progênies AEC-1 e AEC-18, quantificados em um HPLC, sensíveis a 0,25mM de aminoetilcisteína.

Aminoácidos	Progênies ($\mu\text{mol/g}$ endosperma \pm sd e % do total)					
	Cat 100-1*		AEC-18*		AEC-10*	
ASP	0.36 \pm 0.02	7.16	0.93 \pm 0.36	9.59	0.89 \pm 0.21	11.4
GLU	0.23 \pm 0.01	4.57	0.42 \pm 0.06	4.33	0.89 \pm 0.19	9.6
SER	0.07 \pm 0.01	1.39	0.35 \pm 0.07	3.61	0.31 \pm 0.07	3.8
GLY+ASN	0.94 \pm 0.01	18.69	3.72 \pm 0.61	38.35	1.94 \pm 0.63	24.2
THR	0.06 \pm 0.02	1.19	0.25 \pm 0.01	2.58	0.10 \pm 0.02	1.2
ALA	0.99 \pm 0.01	19.68	0.70 \pm 0.08	7.22	1.54 \pm 0.31	19.2
PRO	1.23 \pm 0.01	24.45	1.00 \pm 0.05	10.31	0.81 \pm 0.28	10.1
HIS	0.04 \pm 0.97	0.79	---	---	---	---
ARG	0.10 \pm 0.08	1.99	0.04 \pm 0.01	0.41	0.02	0.2
TYR+VAL+MET	0.50 \pm 0.11	9.94	0.90 \pm 0.19	9.28	0.70 \pm 0.11	8.7
ILE+LEU	0.12 \pm 0.04	2.38	0.62 \pm 0.22	6.39	0.38 \pm 0.07	4.7
PHE+TRY	0.16 \pm 0.04	3.18	0.53 \pm 0.06	5.46	0.25 \pm 0.04	3.1
LYS	0.19 \pm 0.01	3.78	0.21 \pm 0.02	2.16	0.24 \pm 0.04	3.0
TOTAL	5.03 \pm 0.74		9.70 \pm 0.54		7.99 \pm 0.37	

* : Análises feitas a partir de farinha de vários endospermas.

livres foi de 56% e 93% maior nas progênies AEC-10 e AEC-18 respectivamente em relação a linhagem Cat 100-1. A elevação do teor aminoácidos livres totais evidentemente reflete a elevação no teor de cada aminoácido em termos absolutos. Os valores percentuais os quais refletem as variações na composição de aminoácidos, apresentam também variações em relação a linhagem Cat 100-1. É interessante notar a redução no teor de prolina nas progênies AEC-10 e AEC-18 em relação a linhagem Cat 100-1. O teor de lisina livre entretanto não apresentou diferença quando comparamos as progênies AEC-10 e AEC-18 com a linhagem Cat 100-1.

Como as progênies AEC-1 e AEC-5 apresentaram segregação para resistência e sensibilidade à aminoetilcisteína, sendo que a frequência do gene que condiciona essa característica é variável nas amostras que foram analisadas, no caso da progênie AEC-1, sementes individuais de cada espiga e no caso da progênie AEC-5, amostras compostas representando cada espiga, foram utilizadas para análise.

A tabela 7 apresenta os teores de aminoácidos livres de sementes individuais de progênies R2 AEC-1 A, B e C obtidas pelos cruzamentos da progênie R1 AEC-1 com a linhagem Cat 100-1. O teor de aminoácidos livres totais variou de 2,58 a 4,52 $\mu\text{mol/g}$ na progênie A, de 6,52 a 12,26 $\mu\text{mol/g}$ na progênie B e 2,82 a 6,11 $\mu\text{mol/g}$ na progênie C. Como pode ser visto, enquanto que nas progênies A e C os valores das sementes individuais são bastante uniformes e em média menores que aqueles observados para a linhagem Cat 100-1, para a progênie B, os valores foram mais variáveis e bem superiores que aquelas da linhagem Cat 100-1.

Tendo em vista que o pool de aminoácidos livres totais também

Tabela 7: Composição dos aminoácidos livres em endospermas individuais de 3 progênies do cruzamento AEC-1 X Cat 100-quantificada em um HPLC.
(parte 1 de 5)

Aminoácidos	Endospermas AEC-1A ($\mu\text{mol/g}$ e % do total)											
	A1		A2		A3		A4		A5		A6	
ASP	0.51	16.04	0.22	7.33	0.23	8.91	0.53	12.15	0.37	0.18	0.18	4.61
GLU	0.27	8.49	0.34	11.33	0.25	9.69	0.35	8.03	0.41	9.07	0.30	7.69
SER	0.06	1.89	0.09	3.00	0.07	2.71	0.09	2.06	0.10	2.21	0.10	2.56
GLY+ASN	0.84	26.41	0.90	30.00	0.89	34.50	1.11	24.46	1.02	22.57	1.06	27.18
THR	0.03	0.94	0.05	1.67	0.05	1.94	0.08	1.83	0.10	2.21	0.08	2.05
ALA	0.29	9.12	0.43	14.33	0.29	11.24	0.72	16.51	0.87	19.25	0.89	22.82
PRO	0.61	19.18	0.31	10.33	0.29	11.24	0.84	19.27	0.62	13.72	0.32	8.20
HIS	--	--	--	--	--	--	0.01	0.23	0.10	2.21	0.07	1.79
ARG	0.03	0.94	0.06	2.00	0.06	2.32	0.09	2.06	0.14	3.10	0.21	5.38
TYR+VAL+MET	0.14	4.40	0.20	6.67	0.15	5.81	0.15	3.44	0.32	7.08	0.23	5.90
ILE+LEU	0.12	3.77	0.12	4.00	0.09	3.49	0.11	2.52	0.09	1.99	0.09	2.31
PHE+TRY	0.10	3.14	0.07	2.33	0.05	1.94	0.07	1.60	0.07	1.54	0.08	2.05
LYS	0.16	5.03	0.19	6.33	0.14	5.43	0.18	4.13	0.28	6.19	0.15	3.85
TOTAL	3.18		3.00		2.58		4.36		4.52		3.90	

Tabela 7: Composição dos aminoácidos livres em endospermas individuais de 3 progênies do cruzamento AEC-1 X Cat 100 quantificada em um HPLC.
(parte 2 de 5)

Aminoácidos	Endospermas AEC-1A ($\mu\text{mol/g}$ e % do total)											
	A7		A8		A9		A10		A11		A12	
ASP	0.32	8.16	0.25	8.44	0.28	6.78	0.28	7.09	0.21	5.37	0.47	13.31
GLU	0.27	0.69	0.37	12.50	0.45	10.89	0.35	8.86	0.31	7.93	0.31	8.78
SER	0.07	1.78	0.11	3.72	0.11	2.66	0.13	3.29	0.12	3.07	0.10	2.82
GLY+ASN	1.09	27.81	0.52	17.57	0.91	22.03	1.06	26.83	1.16	29.67	0.98	27.74
THR	0.07	1.78	0.10	3.38	0.12	2.90	0.09	2.28	0.12	3.07	0.09	2.55
ALA	0.53	13.52	0.55	18.58	0.93	22.52	0.71	17.97	0.79	20.20	0.55	15.55
PRO	0.76	19.39	0.14	4.73	0.35	8.47	0.39	9.87	0.27	6.90	0.47	13.31
HIS	0.09	2.29	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
ARG	0.09	2.29	0.14	4.73	0.22	5.33	0.15	3.80	0.19	4.86	0.07	1.98
TYR+VAL+MET	0.27	0.69	0.22	7.43	0.18	4.36	0.12	3.04	0.16	4.09	0.11	3.12
ILE+LEU	0.11	2.81	0.16	5.40	0.16	3.87	0.18	4.06	0.14	3.58	0.11	3.12
PHE+TRY	0.09	2.29	0.10	3.38	0.13	3.15	0.18	4.06	0.13	3.32	0.09	2.55
LYS	0.15	3.83	0.29	9.80	0.29	7.02	0.24	6.07	0.30	7.67	0.17	4.81
TOTAL	3.92		2.96		4.13		3.95		3.91		3.53	

Tabela 7: Composição dos aminoácidos livres em endospermas individuais de 3 progênies do cruzamento AEC-1 X Cat 100 quantificada em um HPLC. (parte 3 de 5)

Aminoácidos	Endospermas AEC-1B ($\mu\text{mol/g}$ e % do total)											
	B1		B2		B3		B4		B5		B6	
ASP	1.56	15.95	1.09	14.95	1.50	12.23	1.45	18.52	1.25	18.09	0.52	7.9
GLU	1.11	11.35	0.71	9.50	0.98	7.99	0.78	11.55	0.92	13.31	0.58	8.8
SER	0.07	0.71	0.13	1.74	0.11	.90	0.08	1.18	0.14	2.03	0.22	3.3
GLY+ASN	2.02	20.65	2.25	30.12	2.71	22.10	1.44	21.33	1.97	28.51	1.95	29.9
THR	0.06	0.61	0.09	1.20	0.14	1.14	0.06	0.89	0.06	0.87	0.10	1.5
ALA	1.28	13.09	1.09	14.59	1.64	13.38	0.72	10.67	0.94	13.60	1.24	19.0
PRO	2.15	21.98	0.94	12.58	3.61	29.44	1.42	21.04	0.86	12.44	0.61	9.3
HIS	0.09	2.29	--	--	--	--	0.03	0.44	--	--	--	--
ARG	0.32	3.27	0.18	2.41	0.26	2.12	0.07	1.04	0.07	1.01	0.29	4.4
TYR+VAL+MET	0.46	4.70	0.35	4.68	0.58	4.73	0.32	4.74	0.33	4.77	0.31	4.7
ILE+LEU	0.21	2.15	0.22	2.94	0.17	1.39	0.11	1.63	0.12	1.74	0.19	2.9
PHE+TRY	0.18	1.84	0.17	2.27	0.17	1.39	0.09	1.33	0.10	1.45	0.12	1.8
LYS	0.34	3.48	0.23	3.08	0.36	2.94	0.17	2.52	0.17	2.46	0.38	5.8
TOTAL	9.78		7.47		12.26		6.75		6.91		6.52	

Tabela 7: Composição dos aminoácidos livres em endospermas individuais de 3 progênies do cruzamento AEC-1 X Cat 10€ quantificada em um HPLC.
(parte 4 de 5)

Aminoácidos	Endospermas AEC-1C ($\mu\text{mol/g}$ e % do total)											
	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
ASP	0.22	6.94	0.24	8.51	0.39	8.24	0.32	8.62	0.49	8.02	0.42	10.0
GLU	0.17	5.36	0.15	5.32	0.27	5.71	0.25	6.74	0.26	4.25	0.29	7.0
SER	0.10	3.15	0.03	1.06	0.12	2.54	0.11	2.96	0.16	2.62	0.05	1.0
GLY+ASN	1.21	38.17	1.02	36.17	1.47	31.08	1.28	34.50	2.12	34.70	1.43	35.0
THR	0.07	2.21	0.09	3.19	0.10	2.11	0.08	2.16	0.12	1.96	0.09	2.0
ALA	0.42	13.25	0.52	18.44	0.81	17.12	0.62	16.71	0.96	15.71	0.57	14.0
PRO	0.31	9.78	0.25	8.86	0.69	15.59	0.30	8.09	0.72	11.78	0.44	10.0
HIS	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
ARG	0.14	4.42	0.09	3.19	0.18	3.80	0.16	4.31	0.27	4.42	0.16	3.0
TYR+VAL+MET	0.15	4.73	0.13	4.61	0.22	4.65	0.18	4.85	0.29	4.75	0.19	4.0
ILE+LEU	0.10	3.15	0.07	2.48	0.12	2.54	0.08	2.16	0.18	2.94	0.07	1.0
PHE+TRY	0.10	3.15	0.06	2.13	0.11	2.32	0.07	1.89	0.15	2.45	0.06	1.0
LYS	0.17	5.36	0.14	4.96	0.23	4.86	0.25	6.74	0.37	6.05	0.26	6.0
TOTAL	3.17		2.82		4.73		3.71		6.11		4.06	

Tabela 7: Composição dos aminoácidos livres em endospermas individuais de 3 progênies do cruzamento AEC-1 X Cat 100-quantificada em um HPLC.
(parte 5 de 5)

Aminoácidos	$\mu\text{mol/g}$ de endosperma \pm sd e \bar{X} do total							
	AEC-1A \bar{X}		AEC-1B \bar{X}		AEC-1C \bar{X}		AEC-1 \bar{X}	
ASP	0.32 \pm 0.12	8.74	1.23 \pm 0.35	14.85	0.35 \pm 0.10	8.54	0.55 \pm 0.44	11.16
GLU	0.33 \pm 0.06	9.02	0.85 \pm 0.18	10.26	0.23 \pm 0.05	5.61	0.43 \pm 0.26	8.72
SER	0.09 \pm 0.02	2.46	0.12 \pm 0.05	1.45	0.09 \pm 0.04	2.19	0.10 \pm 0.04	2.03
GLY+ASN	0.96 \pm 0.16	26.23	2.06 \pm 0.38	24.88	1.42 \pm 0.34	34.63	1.35 \pm 0.53	27.38
THR	0.08 \pm 0.03	2.18	0.08 \pm 0.03	0.97	0.09 \pm 0.01	2.19	0.08 \pm 0.02	1.62
ALA	0.63 \pm 0.21	17.21	1.15 \pm 0.29	13.89	0.65 \pm 0.18	15.85	0.76 \pm 0.32	15.41
PRO	0.45 \pm 0.20	12.29	1.60 \pm 1.03	19.32	0.45 \pm 0.19	10.97	0.74 \pm 0.74	15.01
HIS	--	--	--	--	--	--	0.01 \pm 0.03	0.20
ARG	0.12 \pm 0.06	3.28	0.20 \pm 0.10	2.41	0.17 \pm 0.05	4.15	0.15 \pm 0.08	3.04
TYR+VAL+MET	0.19 \pm 0.06	5.19	0.39 \pm 0.10	4.71	0.19 \pm 0.05	4.63	0.24 \pm 0.11	4.87
ILE+LEU	0.12 \pm 0.03	3.28	0.17 \pm 0.04	2.05	0.10 \pm 0.04	2.44	0.13 \pm 0.04	2.64
PHE+TRY	0.10 \pm 0.03	2.73	0.14 \pm 0.04	1.69	0.09 \pm 0.03	2.19	0.10 \pm 0.04	2.03
LYS	0.22 \pm 0.06	6.01	0.27 \pm 0.09	3.26	0.24 \pm 0.07	5.85	0.24 \pm 0.07	4.87
TOTAL	3.66 \pm 0.58	2.82	8.28 \pm 2.08		4.06 \pm 1.09		4.93 \pm 2.31	

foram maiores nas progênies AEC-10 e AEC-18 que a linhagem Cat 100-1, podemos supor que essa característica não deve estar ligada àquelas que condicionam a resistência a aminoetilcisteína. É possível que o processo de seleção tenha modificado outros pontos no metabolismo de aminoácidos.

Quanto à composição de aminoácidos das progênies AEC-1, A, B e C, pode-se verificar alterações variáveis no teor de vários aminoácidos, à exemplo do que ocorreu para as progênies AEC-10 e AEC-18. No que se refere ao teor de lisina, podemos verificar que as três progênies apresentaram teores, tanto em termos relativos como absolutos, maiores que aquele observado para a linhagem Cat 100-1. No caso da progênie A foram observados valores de até 9,8% de lisina no pool de aminoácidos livres totais da semente, o que representa 2,6 vezes mais que a linhagem Cat 100-1. Se considerarmos que a frequência do gene que confere resistência a aminoetilcisteína é de no máximo 50% nas três progênies analisadas, podemos esperar que em progênies homozigotas o acúmulo de lisina deve ser mais elevado.

Jacobsen (1986) selecionou plantas de batata resistentes à aminoetilcisteína que apresentaram um aumento de 3 a 4 vezes no pool de aminoácidos livres totais, mas que não se refletiu no aumento do conteúdo relativo da lisina.

A progênie AEC-5 (Tabela 8) apresentou teores de aminoácidos livres totais bastante altos variando de 3,55 até 24,14 $\mu\text{mol/g}$ este último representando 4,8 vezes mais que aquele observado para a linhagem Cat 100-1.

A composição de aminoácidos livres de cada progênie analisada, apresentou as variações características das progênies sensíveis ou

Tabela 8: Aminoácidos livres de endospermas individuais de progênies AEC5(R1) autofecundadas, quantificados em um HPLC, segregando para resistência a aminoetilcisteína.

Aminoácidos	Progenies ($\mu\text{mol/g}$ endosperma e % do total)												\bar{X} AEC5*	
	AEC5-1		AEC5-2		AEC5-3		AEC5-4		AEC5-5		AEC5-6			
ASP	2.04	14.68	0.28	7.23	0.64	10.44	0.18	5.07	0.23	4.49	2.59	10.73	0.99 ± 0.96	10.85
GLU	2.52	18.13	0.35	9.04	0.48	7.83	0.30	8.45	0.38	7.42	3.60	14.91	1.27 ± 1.30	13.92
SER	0.82	5.90	0.08	2.07	0.11	1.79	0.11	3.10	0.15	2.93	1.58	6.54	0.47 ± 0.56	5.15
GLY+ASN	1.82	13.09	0.85	21.96	1.93	31.48	0.93	26.20	1.75	34.18	2.37	9.82	1.61 ± 0.54	17.65
THR	0.36	2.59	0.07	1.81	0.07	1.14	0.10	2.82	0.11	2.15	0.61	2.53	0.22 ± 0.20	2.41
ALA	3.50	25.18	0.47	12.14	0.79	12.89	0.73	20.56	0.89	17.38	8.56	35.46	2.49 ± 2.90	27.3
PRO	0.77	5.54	0.76	19.64	0.38	6.20	0.29	8.17	0.40	7.81	1.36	5.63	0.66 ± 0.36	7.24
HIS	--	--	0.05	1.29	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
ARG	0.09	0.65	0.06	1.55	0.12	1.96	0.09	2.53	0.11	2.15	0.07	0.29	0.09 ± 0.02	0.99
TYR+VAL+MET	1.00	7.19	0.25	6.46	0.50	8.16	0.25	7.04	0.40	7.81	1.90	7.87	0.72 ± 0.59	7.89
ILE+LEU	0.48	3.24	0.23	5.94	0.44	7.18	0.19	5.35	0.25	4.88	0.84	3.48	0.40 ± 0.22	4.38
PHE+TRY	0.30	2.15	0.27	6.98	0.32	5.22	0.07	1.97	0.10	1.95	0.33	1.37	0.23 ± 0.10	2.52
LYS	0.22	1.58	0.14	3.62	0.34	5.55	0.32	9.01	0.33	6.44	0.33	1.37	0.28 ± 0.07	3.07
TOTAL	13.9	0.63	3.87	0.23	6.13	1.83	3.55	0.23	5.2	0.12	24.14	1.09	9.12 ± 7.97	

* : $\mu\text{mol/g}$ endosperma \pm sd e % do total.

resistentes à aminoetilcisteína. A característica mais marcante foi a redução bastante acentuada no teor de prolina. No que se refere à lisina, algumas progênies AEC-5 apresentaram valores bem superiores àqueles observados para a linhagem Cat 100-1. Em alguns casos, como na progênie AEC-5-4, o valor relativo foi de 2,4 vezes superior à linhagem Cat 100-1.

Esses resultados são até certo ponto intrigantes pois esperávamos algum acúmulo no teor de lisina livre sómente em progênies resistentes que apresentassem um gene dominante para essa característica, uma vez que plantas resistentes determinadas por genes recessivos como aquela encontrada em cevada por Bright et al. (1979a), não apresentou alteração na enzima envolvida na biossíntese de lisina, mas sim uma menor eficiência na absorção de aminoetilcisteína.

As progênies AEC-1, de maneira geral apresentaram maior quantidade de lisina livre na semente. Entretanto não temos certeza se isso é devido a uma alteração na enzima dihidrodipicolinato sintase (figura 1) tornando-se menos sensível a lisina como o que aconteceu com mutantes acumuladores de lisina em microorganismos (Sano e Shio, 1970) e certas plantas (Boyes e Vasil, 1987). Uma análise da sensibilidade da dihidrodipicolinato sintase poderá resolver isso. Por outro lado, o acúmulo de lisina nos mutantes pode não ocorrer devido a presença no endosperma de milho de alta atividade da enzima lisina-cetoglutarato-redutase (figura 1) (Arruda et al., 1982; Arruda e Silva, 1983; Arruda et al., 1984)

4.3-Outros mutantes obtidos no processo de seleção de plantas resistentes a aminoetilcisteína

Dentre as plantas regeneradas neste trabalho que foram levadas ao campo, outras mutações foram observadas.

Essas mutações incluem alterações na morfologia da planta, na produção de pólen e na biossíntese de pigmentos fotossintéticos. Em alguns casos as plantas não produziram inflorescências, em outros as plantas apresentaram esterilidade masculina (figura 19) sendo que algumas plantas produziram pólen mas estes mostraram-se inviáveis (figura 20).

A grande maioria das progênies apresentaram aspecto normal com relação as características da planta e das sementes. A progênie AEC-8 apresentou segregação 3:1 para um mutante luteos (figura 21). Esse mutante é condicionado por um gene recessivo apresentando ausência de clorofila nas folhas. A progênie AEC-17 apresentou segregação para cor da semente (figura-22).

4.4-Transferência do gene Ltr*19 para as linhagens Cat 100-1 e Tux 100-1

O gene dominante Ltr*19 foi obtido através de indução de mutação de calos de milho e seleção em meio de cultura contendo 2mM de lisina mais 2mM de treonina (Hibberd e Green, 1982). Esse mutante foi transferido para a linhagem A619, e sementes dessa linhagem segregando para o gene Ltr*19 nos foram cedidas pelos autores.

As sementes recebidas foram plantadas e apenas 4 plantas chegaram a maturidade apresentando produção de pólen. Para a identifica-



Figura-19: Panículas de plantas regeneradas após seleção em aminoe-
tilcisteína, uma delas normal e outra macho estéril.

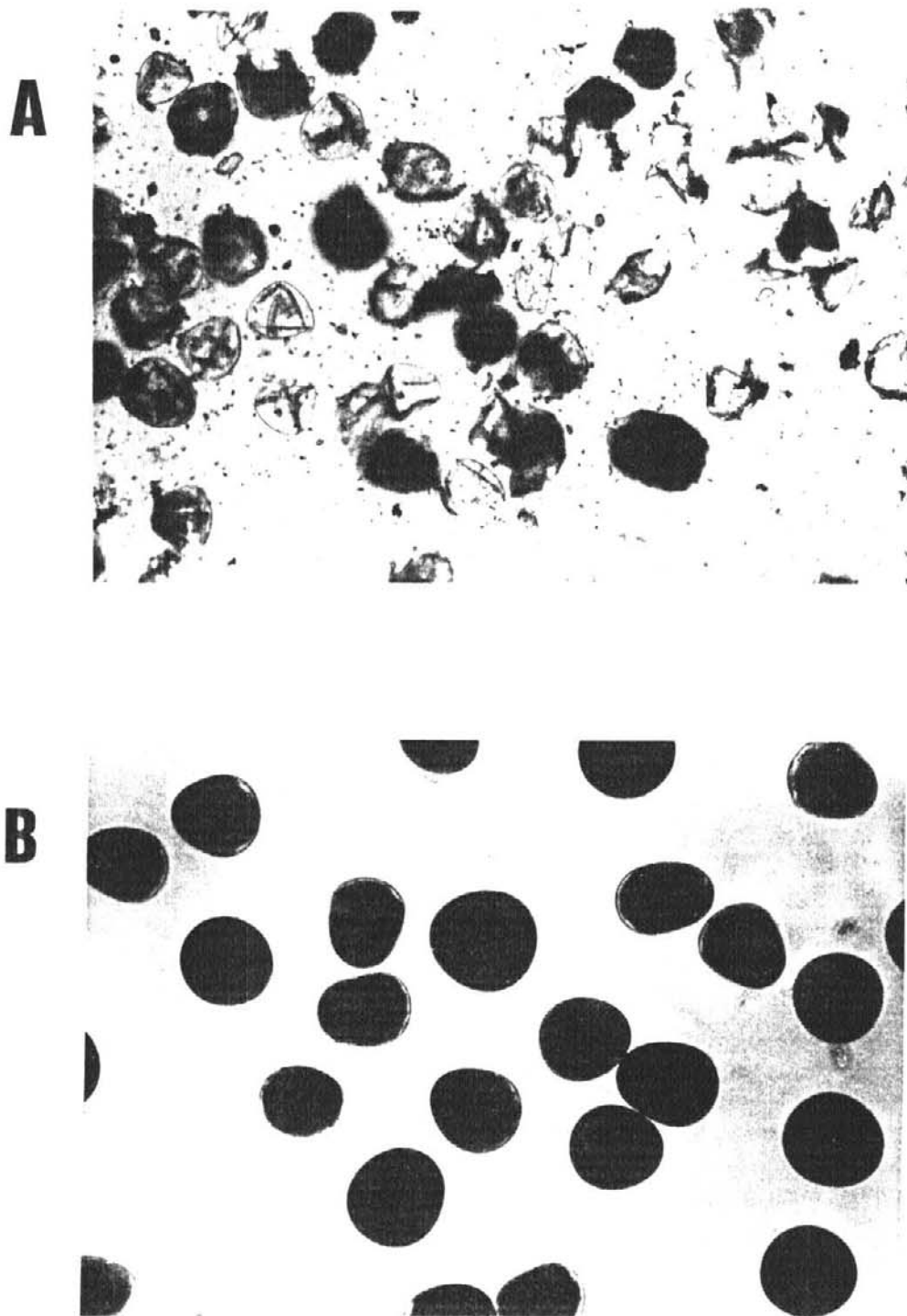


Figura-20: Grãos de pólen anormais (A) de plantas R0 resistentes a aminoetilcisteína e grãos normais (B) da linhagem original.

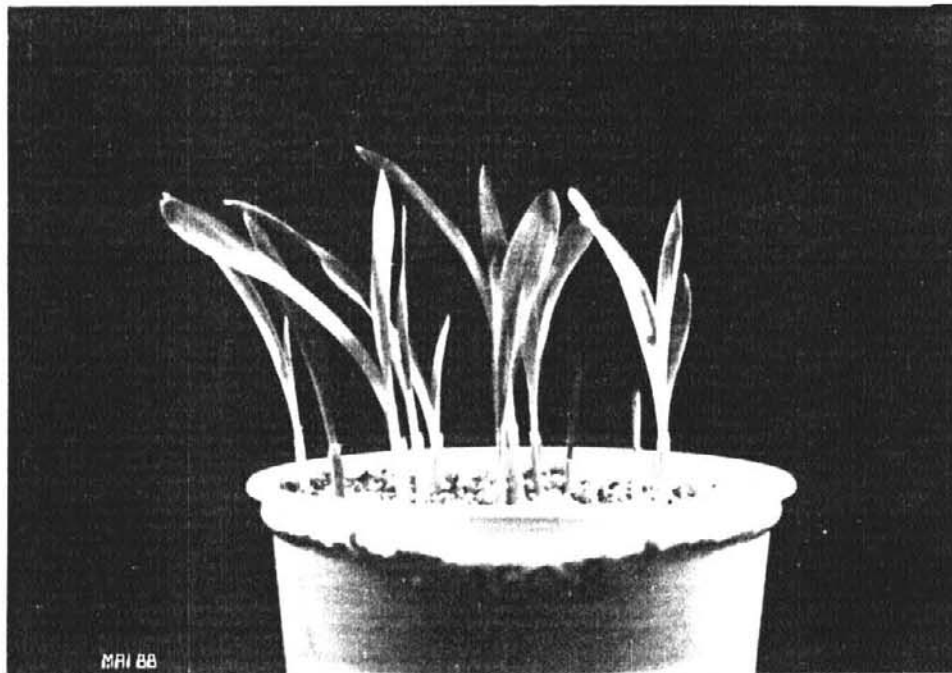
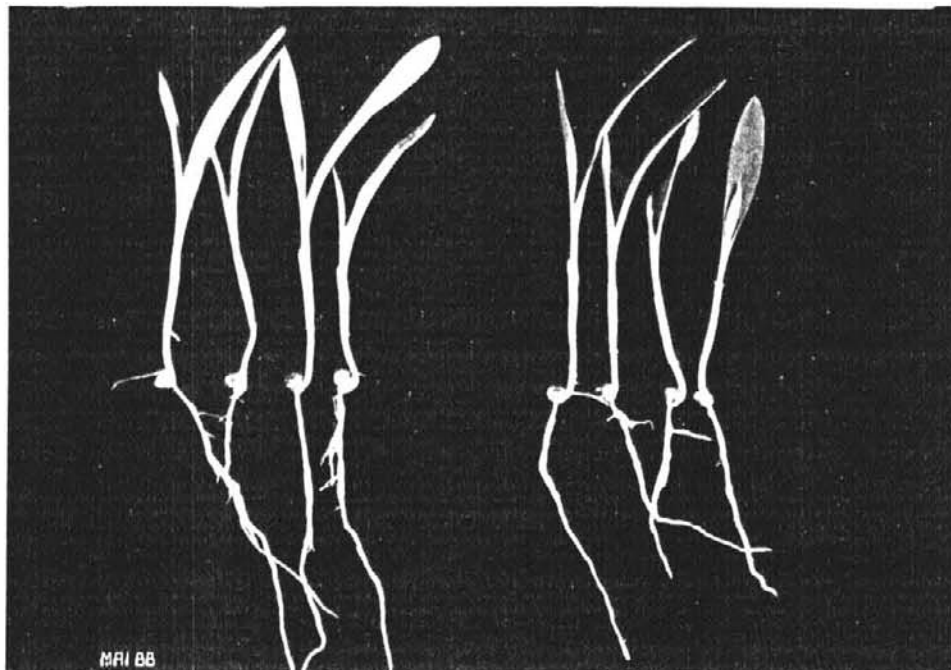
A**B**

Figura-21: Plantas da progênie AEC-8 segregando para o mutante Luteos. (A) Plântulas desta progênie crescendo em potes com vermiculita, apresentando segregação para presença e ausência de clorofila. (B) Detalhes de 8 plântulas, sendo 4 com ausência de clorofila e 4 com clorofila.

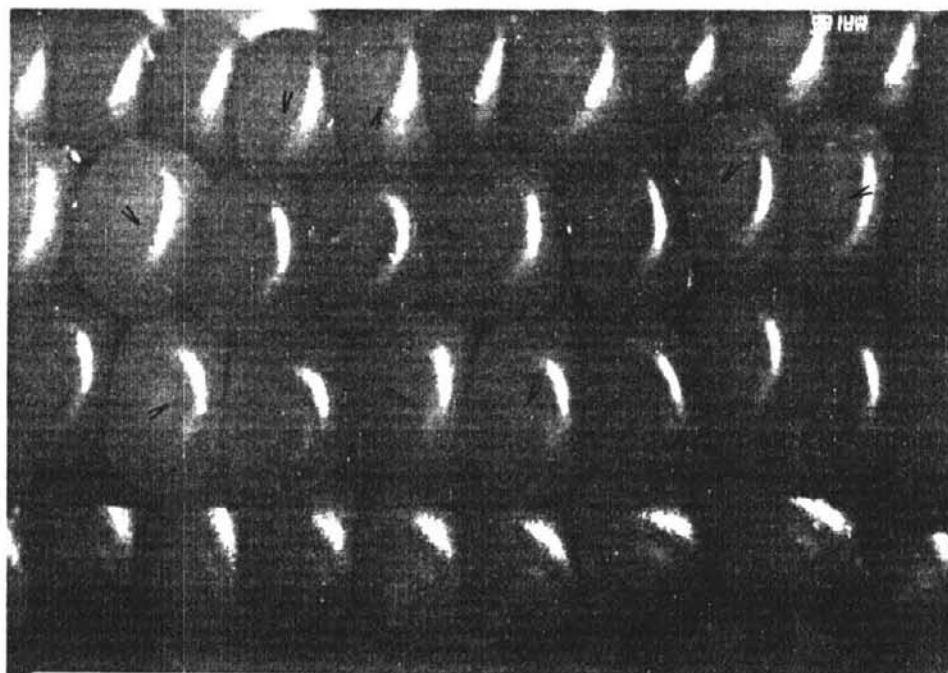


Figura-22: Espiga R1 da progênie AEC-17 que apresenta segregação para cor de semente. As setas indicam grãos de cor mais clara entre grãos de cor mais escura (normal) da linhagem Cat 100-1.

ção da presença do gene Ltr*19 nessas 4 plantas, utilizamos a análise do acúmulo de treonina nas anteras por cromatografia em camada delgada (Diedrich, 1984). As 4 plantas analisadas apresentaram bandas de treonina muito mais intensas que aquela observada para a linhagem Cat 100-1 utilizada como controle. Porém não foi possível determinar se plantas eram homozigotas ou heterozigotas para o gene pois aparentemente as bandas apresentavam padrões muito parecidos. O pólen das quatro plantas foi utilizado para cruzamentos com as linhagens Cat 100-1 normal e homozigotas para os genes opaque-2, brittle-1 e shrunken-2 e Tux 100-1 normal e homozigota para o gene opaque-2. Isso foi feito para transferirmos o gene Ltr*19 e selecionarmos mutantes simples e duplos mantendo o gene no background genético de linhagens adaptados as nossas condições de clima. Um bom número de progênes foi obtidos desses cruzamentos.

Para a determinação do genótipo das plantas F1 obtidas, assim como para determinar o genótipo das 4 plantas que continham o gene Ltr*19, sementes F1, com 20 dias após a polinização, provindas de cruzamentos com as 4 plantas A619, foram analisadas através de germinação de embriões imaturos em meio seletivo contendo 2mM de lisina mais treonina (figura 23). Plântulas sensíveis e resistentes foram observadas nesse experimento. As plântulas sensíveis apresentam o esculeto escurecido e a raiz pouco desenvolvida e espessa. Essas características também foram observadas em embriões de *Hordeum vulgare* sensíveis à inibição do crescimento pela lisina mais treonina (Bright et al., 1978b). Como pode ser visto pela tabela 9, os resultados de segregação confirmaram aqueles obtidos por cromatografia, indicando a presença do gene Ltr*19 nas 4 plantas A619. O teste de germinação em meio seletivo também permitiu determinar que as plan-

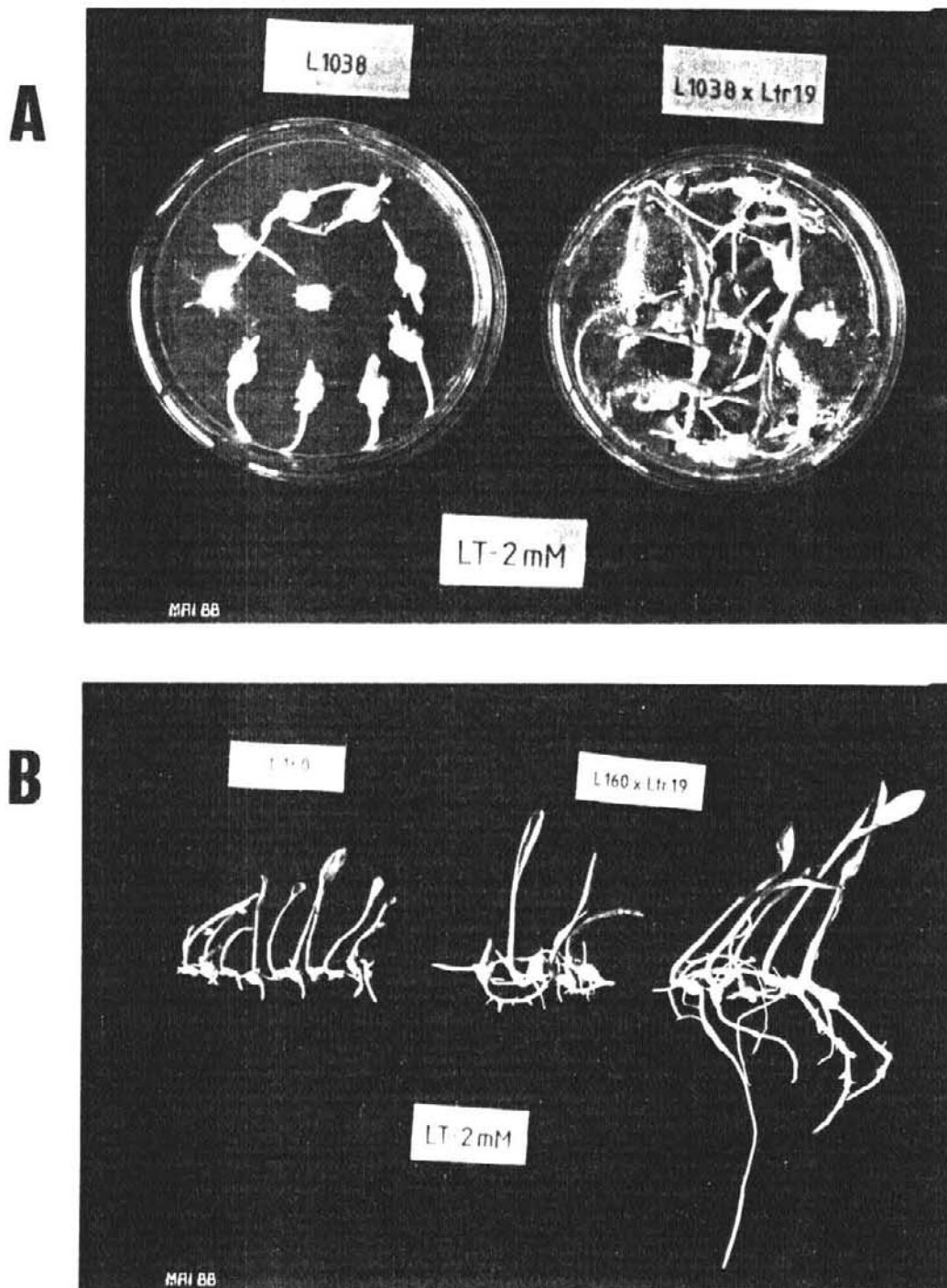


Figura-23: Germinação de embriões em meio seletivo com lisina mais treonina (2mM). (A) Embriões em placa com meio seletivo, uma delas contendo embriões da linhagem Tux 100-1 (na figura representada por L1038) e outra contendo embriões F1 obtidos pelo cruzamento da linhagem Tux 100-1 com A619 (na figura representada por Ltr*19). (B) Embriões da linhagem Cat 100-1 (na figura representada por L160) e embriões F1 segregado para a sensibilidade e resistência à lisina mais treonina.

TABELA 9: Segregação para o gene *Ltr19* em progêneses F1 utilizando germinação de embriões no meio M09-2 com adição de lisina + treonina (2mM).

Progênie	DATA		Parte Aérea				Raiz Principal				Maior Raiz Lateral				N. Embriões **			χ ² (df)	
			S		R		S		R		S		R		T	S	R		
			\bar{x}	sd	\bar{x}	sd	\bar{x}	sd	\bar{x}	sd	\bar{x}	sd	\bar{x}	sd	\bar{x}	sd	\bar{x}		sd
			DAF	POL.															
Cat 100-1	38	16/1	24.6	17.9	-	-	7.3	4.1	-	-	2.5	3.9	-	-	19	19	0	1	
F1 (Cat 100-1/A619)	40	14/1	50.0	23.1	80.6	10.9	17.2	10.6	69.6	27.7*	24.8	9.4	50.6	22.8	10	5	5	4	
F1 (Cat 100-1/A619)	35	19/1	77.7	9.4	91.4	17.2	20.2	6.0	57.3	13.6	50.7	12.6	52.7	15.0	11	4	7	0.83	
F1 (Cat 100-1/A619)	37	20/1	40.6	10.7	77.4	5.9	11.2	3.2	61.2	13.9	2.6	4.9	43.0	15.6	20	12	8	0.83	
F1 (Cat 100-1/A619)	36	21/1	23.7	12.1	72.5	7.3	12.9	4.8	36.2	10.5	9.3	4.8	28.2	4.3	19	15	4	6.33	
F1 (Cat 100-1/A619)	36	21/1	15.1	15.9	72.7	23.7	13.0	8.6	43.8	15.1	15.1	11.7	33.0	7.0	22	16	6	4.51	
F1 (Cat 100-1/A619, o2=1/2)	35	19/1	51.6	20.5	80.5	19.0	11.7	0.1	59.7	20.7	7.4	6.4	44.6	11.2	22	14	8	1.64	
F1 (Cat 100-1/A619, o2=1/2)	39	15/1	48.6	17.8	92.9	7.6	15.1	6.2	61.7	13.1	7.8	2.8	42.5	14.2	20	8	12	0.82	
F1 (Cat 100-1/A619, o2=1/2)	35	19/1	73.8	7.6	98.0	1.4	15.0	4.6	64.6	16.3	17.9	14.2	31.5	7.8	9	7	2	1.78	
F1 (Cat 100-1/A619, o2=1/2)	36	21/1	27.3	14.2	57.9	23.3	13.2	5.1	49.4	12.9	15.2	14.4	33.4	16.8	20	12	8	0.80	
F1 (Cat 100-1/A619.bt1=1/2)	36	21/1	42.7	18.2	74.7	23.9	13.0	5.0	52.5	13.5	10.7	5.0	37.7	5.7	7	3	4	0.57	
F1 (Cat 100-1/A619.bt1=1/2)	36	21/1	37.4	12.3	71.8	17.4	14.7	6.8	50.5	15.5	17.0	10.7	34.0	9.8	24	14	10	0.67	
F1 (Cat 100-1/A619.sh2=1/2)	37	20/1	37.0	10.1	84.8	13.1	10.9	2.8	63.2	7.3	12.2	10.9	42.5	8.0	18	12	6	2.00	
F1 (Cat 100-1/A619.sh2=1/2)	36	21/1	38.6	10.2	67.1	19.3	15.9	5.0	60.0	20.3	19.4	9.4	37.7	23.1	21	13	8	1.19	
Tux 100-1	40	14/1	13.3	9.8	-	-	18.5	7.2	-	-	6.2	7.3	-	-	20	20	0	0	
F1 (Tux 100-1/A619)	38	16/1	56.7	31.0	81.8	11.4	17.5	8.6	49.8	12.2	43.4	33.0	50.2	22.8	20	8	12	0.80	
F1 (Tux 100-1/A619)	37	20/1	38.5	3.5	48.7	27.1	19.0	0.0	37.7	6.7	39.0	5.7	39.2	26.0	6	2	4	1.50	

NS : Diferença não significativa ao nível de 5% de probabilidade.

* : Diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

** : Total(T) de embriões sensíveis(S) e resistentes(R) a lisina + treonina.

OBS: Para progêneses, cuja amostra foi menor que 10 indivíduos, foi aplicada a correção de YATES para o χ².

tas da linhagem A619 apresentavam o gene *Ltr*19* na forma heterozigota (*Ltr*19/ltr*19*), pois na maioria dos cruzamentos verificou-se segregação de 1:1 entre plantas resistentes (*Ltr*19/ltr*19*) e sensíveis (*ltr*19/ltr*19*) a 2mM de lisina mais treonina. Esse resultado é o esperado para heterozigotos, pois não se observou progênies derivadas dos cruzamentos com a linhagem A619 onde todas as plântulas fossem resistentes a lisina mais treonina. Além disso as linhagens utilizadas como controle neste experimento assim como aquelas utilizadas no programa de retrocruzamentos foram sensíveis à inibição causada pela lisina mais treonina. Dentre as progênies analisadas, duas tiveram desvios de segregação significativos, quando analisados pelo teste χ^2 para a proporção de 1:1. Esses desvios podem ser devido a fatores ambientais.

Continuando o programa de retrocruzamento, sementes das progênies segregantes (F1) foram coletadas e plantadas para a realização do primeiro retrocruzamento. As plantas foram cruzadas com as linhagens Cat 100-1 e Tux 100-1 normais e mutantes produzindo-se sementes com um retrocruzamento (BC1). Essas sementes secas foram submetidas ao teste de germinação em meio contendo lisina mais treonina. Este teste entretanto, não possibilitou a análise das sementes, pois, devido ao uso de sementes secas, ocorreu muita contaminação nas placas, devido a presença endógena de microorganismos nas sementes.

Sementes BC1 dos cruzamentos realizados com genes mutantes de endosperma, começaram a segregar para esses mutantes. Sómente as sementes mutantes homozigotas foram utilizadas para o plantio seguinte, fixando-se assim esse grupo de genes.

Para a seleção de plantas contendo o gene *Ltr*19* no segundo re-

trocruzamento (BC2), utilizou-se da técnica de cromatografia em camada delgada de extratos de anteras. Como a identificação das plantas BC1 ocorreu antes da ântese, foi possível utilizar nos cruzamentos somente as plantas identificadas como portadoras do gene Ltr*19. A tabela 10 mostra os resultados obtidos pela identificação por cromatografia em camada delgada de extratos de anteras das plantas utilizadas para o segundo retrocruzamento. Observa-se que ocorreram desvios de segregação significativos em todos os materiais analisados. Esses desvios podem ser explicados devido ao fato das progênies BC1 plantadas para esse período de cruzamento não terem sido identificadas previamente, portanto não sabíamos os seus genótipos. Para as progênies opaque-2, que não apresentaram nenhuma planta com o gene Ltr*19, foram feitos retrocruzamentos com as plantas normais identificadas como portadoras do gene Ltr*19. Portanto, no próximo retrocruzamento haveria segregação novamente para o gene opaque-2 e seria possível selecionar o duplo mutante.

Sementes da progênie BC2 identificadas e retrocruzadas pela segunda vez, foram plantadas para realização do terceiro retrocruzamento e primeira autofecundação do material que apresentou então 87,5% do background das linhagens Cat 100-1 ou Tux 100-1, nas versões normais e mutantes.

A análise das plantas no campo, para a identificação de presença do gene Ltr*19 foi feita por cromatografia em camada delgada de extratos de anteras. Após a identificação das plantas, aquelas que apresentaram o gene Ltr*19 foram autofecundadas e seu pólen utilizado para fazer o terceiro retrocruzamento com linhagens Cat 100-1 e Tux 100-1. A tabela 11 mostra os resultados obtidos de cada progênie avaliada. Como pode ser visto, 100% das progênies apresentam

Tabela 10. Segregação para o gene LTr*19 em progênies do primeiro retrocruzamento, utilizando-se cromatografia em camada delgada de extratos de anteras.

Progênies	Número de plantas analisadas	Genótipos		X ² (1)	
		lt/lt	LT/lt		
Cat 100-1 (BC1/A619)	49	46	3	37,73	**
Cat 100-1 o2o2 (BC1/A619)	56	56	0	56,00	**
Cat 100-1 bt1bt1 (BC1/A619)	17	14	3	7,12	*
Cat 100-1 sh2sh2 (BC1/A619)	69	53	16	19,84	**
Tux 100-1 (BC1/A619)	31	24	7	9,32	*
Tux 100-1 o2o2 (BC1/A619)	71	70	1	67,06	**

* : Diferença significativa ao nível de 0,01% de probabilidade.
 **: Diferença significativa menor que 0,001% de probabilidade.

Tabela 11: Segregação para o gene Ltr*19 em progênies do segundo retrocruzamento (BC2), utilizando cromatografia em camada delgada de extratos de anteras.

Progênies	Número de plantas analisadas	Genótipos		X ² (1)	
		lt/lt	LT/lt		
Cat 100-1(BC2/A619)	21	13	8	1.19	NS
Cat 100-1(BC2/A619)	22	9	13	0.72	NS
Cat 100-1(BC2/A619)	18	11	7	0.89	NS
Cat 100-1(BC2/A619)	12	4	8	1.33	NS
Cat 100-1(BC2/A619)	17	11	6	1.47	NS
Cat 100-1(BC2/A619, o2=1/2)	24	15	8	1.50	NS
Cat 100-1(BC2/A619, o2=1/2)	16	8	8	0.00	NS
Cat 100-1bt1bt1 (BC2/A619)	11	5	6	0.09	NS
Cat 100-1bt1bt1 (BC2/A619)	4	0	4	2.25	NS
Cat 100-1sh2sh2 (BC2/A619)	11	4	7	0.82	NS
Cat 100-1sh2sh2 (BC2/A619)	15	6	9	0.60	NS
Cat 100-1sh2sh2 (BC2/A619)	13	7	6	0.08	NS
Cat 100-1sh2sh2 (BC2/A619)	5	1	4	0.08	NS
Cat 100-1sh2sh2 (BC2/A619)	5	3	2	0.08	NS
Tux 100-1bt1bt1 (BC2/A619)	5	1	4	0.08	NS
Tux 100-1bt1bt1 (BC2/A619)	7	3	4	0.00	NS
Tux 100-1bt1bt1 (BC2/A619)	18	7	11	0.89	NS
Tux 100-1bt1bt1 (BC2/A619)	3	0	3	1.33	NS
Tux 100-1bt1bt1 (BC2/A619)	16	9	7	0.25	NS
Tux 100-1(BC2/A619, o2=1/2)	11	7	4	0.82	NS
Tux 100-1(BC2/A619, o2=1/2)	13	8	5	0.69	NS

NS : Diferença não significativa ao nível de 5% de probabilidade.

OBS : Para progênies cuja amostra foi menor que 10 indivíduos, foi aplicada a correção de Yates para o X².

segregação dentro do esperado ($1 \text{ Ltr}^*19/1\text{tr}^*19 : 1 \text{ ltr}^*19/1\text{tr}^*19$) para um gene dominante.

Dando seqüência aos cruzamentos, progênies BC2 que foram autofecundadas, foram plantadas para a realização da segunda autofecundação. As progênies BC2 autofecundadas foram analisadas para a presença do gene Ltr^*19 por cromatografia em camada delgada de extratos de anteras.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 12. Como pode ser visto, a maioria das progênies apresentaram segregação de 3:1 para o gene Ltr^*19 . Entretanto, algumas progênies apresentaram desvios de segregação altamente significativos. Esses desvios só ocorreram em progênies que apresentam o gene opaque-2. A primeira vista, os resultados sugerem a ocorrência de ligação entre o gene Ltr^*19 e o gene opaque-2.

Para testar essa hipótese, progênies BC3 segregando 1:1 para sementes heterozigotas e homozigotas para os genes opaque-2 e Ltr^*19 , foram plantadas e anteras destas plantas foram utilizadas para analisar a segregação do gene Ltr^*19 através de cromatografia em camada delgada. A tabela 13 apresenta os resultados das segregações encontradas para as progênies BC3. Como pode ser visto, tanto as plantas homozigotas como as plantas heterozigotas para o gene opaque-2, apresentaram desvios altamente significativos para a segregação do gene Ltr^*19 . Esses resultados confirmam a hipótese de ligação entre os genes Ltr^*19 e opaque-2 (figura 24).

No plantio seguinte, foram produzidas progênies BC4 as quais foram utilizadas para novas análises de segregação do gene Ltr^*19 através de cromatografia em camada delgada de extratos de coleoptile. Como pode ser visto pela tabela 14 tanto as sementes heterozigi-

Tabela 12: Segregação para o gene Ltr*19 em progênies com dois retrocruzamentos e uma autofecundação (BC2 1 ⓧ), utilizando-se cromatografia em camada delgada de extratos de anteras.

	Genótipos para mutantes de endosperma	Número de plantas analisadas	Genótipos para o gene LTr*19		χ ² (1)	
			lt/lt	LT/..		
Cat 100-1 (BC2 ⓧ /A619)	++	37	13	24	2.03	NS
Cat 100-1 (BC2 ⓧ /A619)	++	43	14	29	1.31	NS
Cat 100-1 (BC2 ⓧ /A619)	o2o2	16	7	9	3.00	NS
Cat 100-1 (BC2 ⓧ /A619)	o2o2	21	16	5	29.35	*
Cat 100-1 (BC2 ⓧ /A619)	o2o2	18	17	1	46.29	*
Cat 100-1 (BC2 ⓧ /A619)	o2o2	32	27	5	60.16	*
Cat 100-1 (BC2 ⓧ /A619)	btibt1	33	9	24	0.08	NS
Tux 100-1 (BC2 ⓧ /A619)	++	22	5	17	0.06	NS

NS: Diferença não significativa ao nível de 5% de probabilidade.

* : Diferença significativa menor que 0,001%.

Tabela 13: Segregação para o gene Ltr*19 em progênies do terceiro retrocruzamento (BC3), utilizando-se cromatografia em camada delgada de extratos de anteras.

Progênies	Número de plantas analisadas	Genótipos						χ ²	X
		0202LT1t	02021t1t	02o2LT1t	02o21t1t	o2o2LT1t	o2o21t1t		
Cat 100-1 (BC3/A619)	25	14	11	--	--	--	--	0.36	NS
Cat 100-1 (BC3/A619)	34	--	--	13	2	1	18	24.59	**
Cat 100-1 (BC3/A619)	12	--	--	7	0	0	5	12.67	*
Tux 100-1 (BC3/A619)	24	8	16	--	--	--	--	2.67	NS
Tux 100-1 (BC3/A619)	42	--	--	18	4	1	19	24.56	**
Tux 100-1 (BC3/A619)	66	--	--	26	3	2	35	50.00	**

NS: Diferença não significativa ao nível de 5% de probabilidade.

* : Diferença significativa ao nível de 0,001% de probabilidade.

** : Diferença significativa menor que 0,001% de probabilidade.

° : Para 1 grau de liberdade.

°° : Para 3 graus de liberdade.

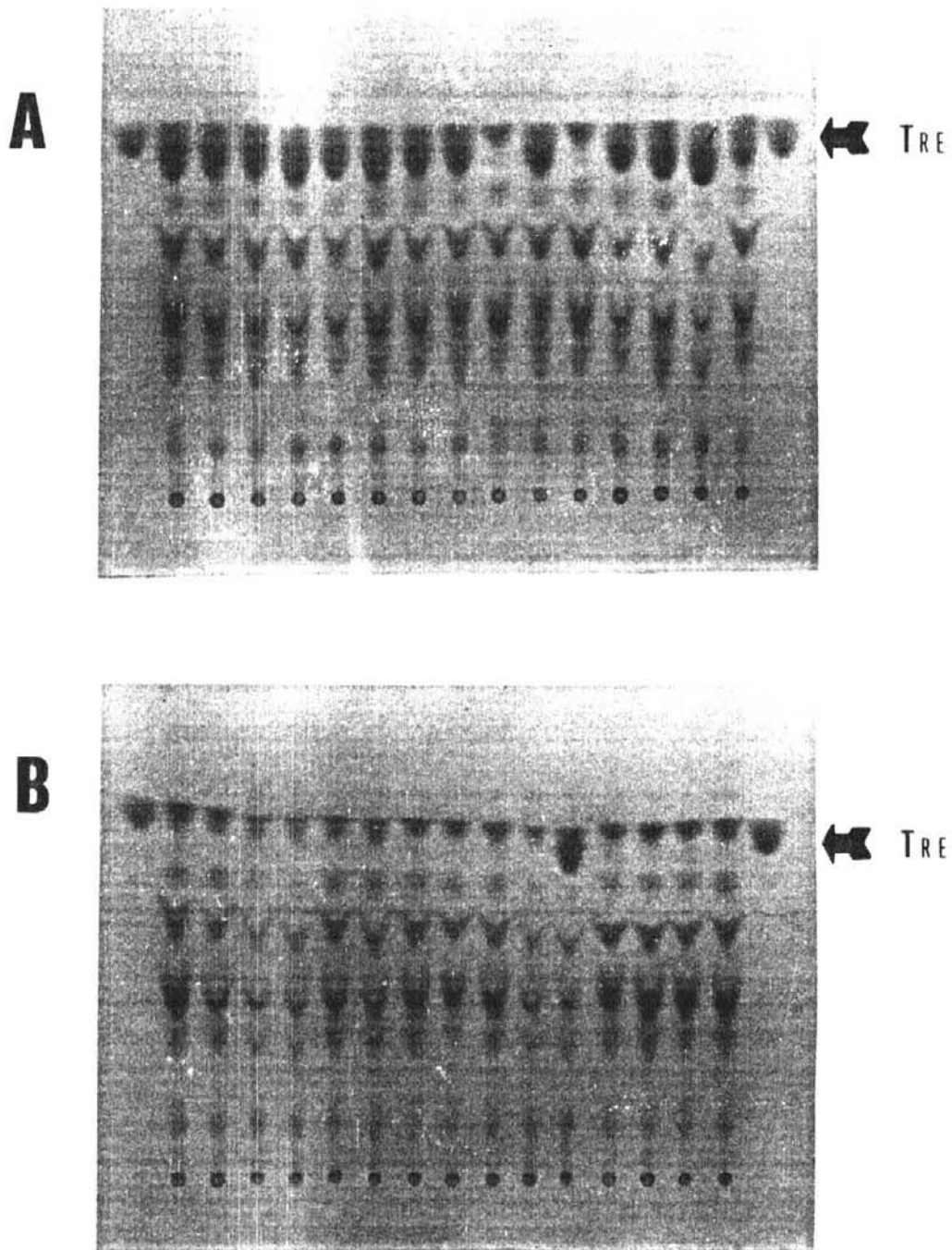


Figura-24: Cromatografia em camada delgada de extratos de anteras obtidas de progênies BC3 segregando 1:1 para sementes normais e opaquê-2. (A) Segregação para o gene Ltr*19 em sementes heterozigotas para o gene opaquê-2. (B) Segregação para o gene Ltr*19 em sementes homozigotas para o gene opaquê-2. Tanto em (A) como em (B), Ltr*19 respectivamente observado pelo acúmulo ou não de treonina (Tre) nas anteras.

Tabela 14: Segregação para o gene Ltr*19 em progênies do quarto retrocruzamento (BC4), utilizando-se cromatografia em camada delgada de extratos de coleoptile.

Progênies	Número de plantas analisadas	Genótipos				2 X (3)
		02o2LT1t	02o2lt1t	o2o2LT1t	o2o2lt1t	
Cat 100-1 (BC4/A619)	101	47	5	7	42	59.18 *
Cat 100-1 (BC4/A619)	46	18	5	4	19	17.12 *
Tux 100-1 (BC4/A619)	68	30	2	2	34	53.41 *
Tux 100-1 (BC4/A619)	130	52	6	8	64	82.31 *

* : Diferença significativa menor que 0,001% de probabilidade.

gotas como as homozigotas para o gene opaque-2 apresentam desvios altamente significativos para a segregação do gene Ltr*19. Os resultados obtidos de progênies BC4 confirmaram aqueles obtidos nas gerações anteriores.

Considerando-se os resultados obtidos em todos os cruzamentos efetuados, F1, BC1, BC2 1⊗, BC3 e BC4, podemos observar claramente que os genes Ltr*19, shrunken-2 e brittle-1, apresentam segregação independente. O mesmo entretanto não ocorre entre os genes Ltr*19 e opaque-2.

Para confirmar a hipótese de ligação, os resultados de BC3 e BC4 foram agrupados e testados quanto à homogeneidade das progênies pelo teste de Brandt e Snedecor (1956). Foram comparados os números de indivíduos das quatro classes genotípicas esperadas nos retrocruzamentos. Os resultados confirmaram que os genes opaque-2 e Ltr*19 não segregam independentemente, pois para isso o número de genótipos recombinantes deveria ser igual ao número de genótipos paternos. Outros efeitos como problemas de germinação e viabilidade de grãos de pólen poderiam estar envolvidos nesses desvios de segregação. Isto entretanto não ocorre, pois observou-se que o gene Ltr*19 e opaque-2 segregam nas proporções esperadas quando analisados separadamente (figura 25). Assim, para os resultados obtidos, atribuímos os desvios encontrados à posição do gene Ltr*19 no braço curto do cromossomo 7 a $10,57 \pm 1,38$ centimorgans do gene opaque-2 (figura 26).

4.5-Teores de aminoácidos livres nas sementes de mutantes simples e duplos

	o2o2 L11t	o2o2 1t1t	o2o2 L11t	o2o2 1t1t
BC3	64	9	4	77
BC4	148	17	22	159

Segregação do gene opaque-2:

$$\frac{(238 - 261)^2}{499} = 1.06 \quad \text{NS}$$

Segregação do gene Ltr*19:

$$\frac{(238 - 261)^2}{499} = 1.06 \quad \text{NS}$$

Ligação:

$$\frac{(447 - 52)^2}{499} = 312.67 \quad *$$

NS: Diferença não significativa ao nível de 5% de probabilidade.

*: Diferença significativa ao nível de 0.01% de probabilidade.

Figura-25: Análise para a segregação independente entre os genes Ltr*19 e opaque-2 em progênies BC3 e BC4. O teste de X2 indica que o gene opaque-2 e o gene Ltr*19 não apresentam desvios de segregação quando analisados individualmente. A hipótese de ligação entretanto, apresenta um X2 altamente significativo. Portanto o gene Ltr*19 e o gene opaque-2 não segregam independentemente, estando ligados.

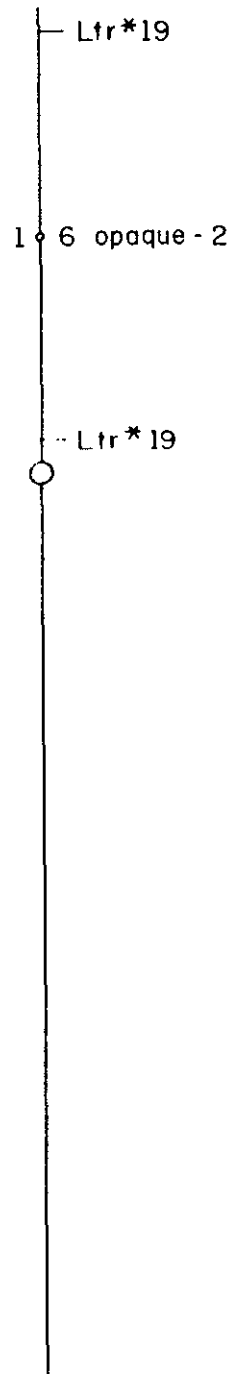


Figura-26: Representação esquemática do cromossomo 7 de milho, apresentando as duas possíveis posições do gene Ltr*19.

Para análise do teor de aminoácidos livres em endospermas secos, utilizou-se o método PTC aminoácidos em um aparelho de cromatografia de alto desempenho (HPLC).

Várias progênies foram analisadas para o pool total de aminoácidos livres e pelo menos uma de cada genótipo duplo mutante foi analisada quanto à composição de aminoácidos livres.

As quatro linhagens, Cat 100-1, Cat 100-1 o2, Cat 100-1 bt1, Cat 100-1 sh2 foram analisadas quanto ao teor e composição de aminoácidos livres a partir de farinha feita de uma mistura de 20 a 50 endospermas de 5 espigas.

Para os genótipos Cat 100-1 0202LtLt, Cat 100-1 02o2 LtLt e Cat 100-1 o2o2 LtLt, endospermas individuais foram analisados quanto ao teor dos aminoácidos livres totais, sendo que uma progênie de cada foi analisada quanto a composição de aminoácidos livres. Os outros genótipos normais e opaque-2 foram analisados a partir de endospermas individuais apenas para determinação do pool total de aminoácidos livres.

Para os genótipos envolvendo os mutantes brittle-1 e shrunken-2, a realização de análises de endospermas individuais é praticamente impossível, devido às características da semente que apresenta pouco endosperma. Portanto, apenas farinhas compostas foram utilizadas, de progênies segregando para o gene Ltr*19.

A tabela 15 apresenta os teores de aminoácidos livres totais nos endospermas das linhagens Cat 100-1 contendo os genes opaque-2, shrunken-2, brittle-1 e Ltr*19, nas formas simples e duplo mutantes. Como pode ser visto, os genes opaque-2, shrunken-2 e brittle-1, produzem um aumento de 3,3, 10,0 e 4,8 vezes no conteúdo de

Tabela 15: Teor total de aminoácidos livres de endospermas da linhagem contendo o gene Ltr*19 na forma simples e em combinação com os genes opaque-2, brittle-1 e shrunken-2.

Progênes	Genótipos	aminoácidos livres totais
		μmol/g endospermas ± sd
Cat 100-1*	normal	5.03 ± 0.74
Cat 100-1*	opaque-2	16.66 ± 2.79
Cat 100-1*	brittle-1	24.27 ± 1.24
Cat 100-1*	shrunken-2	50.17 ± 2.92
Cat 100-1 (BC2/A619)2 ⊗ **	02021t1t	4.33 ± 0.54
Cat 100-1 (BC2/A619)2 ⊗ **	02o21t1t	5.66 ± 0.44
Cat 100-1 (BC2/A619)2 ⊗ **	o2o21t1t	17.77 ± 1.81
Cat 100-1 (BC2/A619)2 ⊗ **	0202LtLt	6.56 ± 1.28
Cat 100-1 (BC2/A619)2 ⊗ **	02o2Lt1t	6.9 ± 0.28
Cat 100-1 (BC2/A619)2 ⊗ **	02o2LtLt	8.92 ± 0.62
Cat 100-1 (BC2/A619)2 ⊗ **	o2o2Lt1t	34.63 ± 5.16
Cat 100-1 (BC2/A619)2 ⊗ **	o2o2LtLt	51.63 ± 2.81
Cat 100-1 (BC2/A619,LT=1/2)2 ⊗ *	bt1bt1LT1t	36.7 ± 2.6
Cat 100-1 (BC2/A619,LT=1/2)2 ⊗ *	sh2sh2LT1t	39.98 ± 4.18
Cat 100-1 (BC2/A619,Lt=1/4)2 ⊗ *	sh2sh2LT1t	49.45 ± 2.58

** : Análise feita a partir de farinha de vários endospermas.
 * : Análise feita a partir de endospermas individuais.

aminoácidos livres totais do endosperma. O efeito genético e bioquímico desses genes no metabolismo do endosperma está muito bem caracterizado. O gene *opaque-2* é um gene regulador, que controla a biossíntese de alguns polipeptídeos de 22Kd de zeína além de outras enzimas como RNase e lisina cetoglutarato redutase (Larkins, 1981; Soave et al., 1981; Arruda et al., 1982; Arruda e Silva, 1983; Arruda et al., 1984; Soave e Salamune, 1984), enquanto que os genes *shrunken-2* e *brittle-1*, reduzem drasticamente a atividade da enzima glicose-6-fosfato pirofosforilase. Esses efeitos causam inúmeras modificações no metabolismo de proteínas e carboidratos do endosperma. Assim podemos concluir que o aumento no conteúdo de aminoácidos livres totais é uma consequência indireta do efeito primário desses genes.

A introdução do gene *Ltr*19* em endospermas normais da linhagem *Cat 100-1* produziu um aumento de 1,5 vezes no conteúdo total de aminoácidos livres. Esse efeito foi grandemente intensificado, quando o gene *Ltr*19* foi combinado com o gene *opaque-2*. O duplo mutante homocigoto produziu um aumento no conteúdo total de aminoácidos livres de 3 vezes em relação ao endosperma *opaque-2* e de 12 vezes em relação ao endosperma normal. Além disso, um claro efeito de dosagem tanto para o gene *opaque-2* como para o gene *Ltr*19* foi observado. O efeito sinérgico no aumento do conteúdo de aminoácidos livres totais foi observado também quando combinamos os genes *Ltr*19* e *brittle-1*, tendo sido um aumento de 1,5 vezes no duplo mutante em relação do endosperma *brittle*. Esse efeito entretanto não foi observado no duplo mutante *shrunken-2* e *Ltr*19*.

O gene *Ltr*19* altera a sensibilidade da enzima aspartato quinase a lisina, tornando muito menos sensível à retroinibição causada pe-

lo aminoácido (Hibberd et al., 1980). O efeito sinérgico no aumento do conteúdo de aminoácidos livres totais, quando combinamos o gene Ltr*19 com mutantes de endosperma, principalmente com o gene opaque-2, sugere que o gene Ltr*19 assim como o gene opaque-2 produz efeitos indiretos reduzindo a síntese de proteínas, o que leva ao acúmulo de aminoácidos livres, ou que talvez o gene Ltr*19 simplesmente intensifique o efeito do gene opaque-2 no metabolismo de proteínas.

Para verificar o efeito do gene Ltr*19 na forma simples ou em duplo mutante sobre o conteúdo de cada aminoácido livre do endosperma, estes foram analisados através de cromatografia líquida de alto desempenho. Como pode ser visto pela tabela 16, em geral a presença do gene Ltr*19 diminui o teor de alanina e aumenta levemente o conteúdo de serina tanto nos endospermas normais como opaque-2. A treonina por sua vez foi grandemente aumentada nos endospermas contendo o gene Ltr*19. No caso dos endospermas normais a presença do gene Ltr*19 em homozigose provocou um aumento no teor relativo de treonina de 6,3 vezes para endospermas homozigotos dominantes para o gene opaque-2 e de 10,8 para endospermas heterozigotos. No duplo mutante opaque-2/Ltr*19 o aumento no teor relativo de treonina livre foi ao redor de 13 vezes tanto em relação ao endosperma normal como opaque-2. Como o teor total de aminoácidos livres dos endospermas foi muito maior naqueles que apresentam o gene Ltr*19, é claro que isso refletirá num aumento ainda maior de treonina. Assim por exemplo, o aumento no teor absoluto de treonina foi de 8,2 vezes no mutante simples, 18,2 vezes no heterozigoto para o gene opaque-2 e de 144 vezes no duplo mutante homozigoto para os dois genes.

Tabela 16: Composição de aminoácidos livres em endospermas da linhagem Cat 100-1 com genótipos normal, opaque-2, brittle-1, shrunken-2 e em mutantes simples e duplos envolvendo o gene Ltr*19, quantificada em um HPLC.
(parte 1 de 3)

Aminoácidos	Progênie (µmol/g endosperma ± sd e % do total)							
	Cat 100-1** (o2o21t1t)		Cat 100-1** (o2o21t1t)		Cat 100-1** (bt1bt11t1t)		Cat 100-1** (sh2sh21t1t)	
ASP	0.36 ± 0.02	7.16	5.63 ± 0.53	33.79	1.91 ± 0.06	7.07	4.80 ± 0.35	9.57
GLU	0.23 ± 0.01	4.57	0.43 ± 0.03	2.58	0.67 ± 0.01	2.76	5.66 ± 0.16	11.28
SER	0.07 ± 0.01	1.39	0.18 ± 0.01	1.08	0.13 ± 0.01	0.53	0.72 ± 0.03	1.43
GLY+ASN	0.94 ± 0.01	18.69	3.84 ± 0.12	23.05	3.10 ± 0.06	12.77	3.25	6.48
THR	0.06	1.19	0.19	1.14	0.05 ± 0.21		0.42 ± 0.02	0.84
ALA	0.99 ± 0.01	19.68	2.06 ± 0.12	12.36	3.06 ± 0.17	12.61	7.51 ± 0.39	14.97
PRO	1.23 ± 0.01	24.45	2.30 ± 0.15	13.80	11.30 ± 0.42	46.56	22.51 ± 0.42	44.87
HIS	0.04	0.79	0.12	0.72			--	
ARG	0.10	1.99	0.28	1.68	0.05	0.21	--	
TYR+VAL+MET	0.50	9.94	0.79 ± 0.05	4.74	3.14 ± 0.42	12.94	2.38	4.74
ILE+LEU	0.12	2.38	0.20 ± 0.03	1.20	0.20 ± 0.02	0.82	1.41 ± 0.35	2.81
PHE+TRY	0.16	3.18	0.26 ± 0.02	1.56	0.19 ± 0.78	0.78	0.76 ± 0.10	1.51
LYS	0.19 ± 0.01	3.78	0.37	2.22	0.43 ± 0.02	1.77	0.71 ± 0.31	1.41
TOTAL	5.03 ± 0.74		16.66 ± 2.79		24.27 ± 1.24		50.17 ± 2.92	
PROTEINA TOTAL*	9.89 ± 0.97		8.18 ± 0.38		15.78 ± 1.15		15.46 ± 0.83	

* : Percentual / matéria seca.

** : Análise feita a partir de farinha de vários endospermas.

***: Análise feita a partir de endospermas individuais.

Tabela 16: Composição de aminoácidos livres em endospermas da linhagem Cat 100-1 com genótipos normal, opaque-brittle-1, shrunken-2 e em mutantes simples e duplos envolvendo o gene Ltr*19, quantificada em um HPLC. (parte 2 de 3)

Aminoácidos	Progênes ($\mu\text{mol/g}$ endosperma \pm sd e % do total)					
	Cat 100-1(BC2/A619,LT=1)2 \otimes ***		Cat 100-1(BC2/A619,o2=1/2,LT=2)2 \otimes ***		Cat 100-1(BC2/A619,LT=1)2 \otimes (o2o2LTLT)	
ASP	0.56 \pm 0.17	8.54	1.01 \pm 0.36	11.95	7.22 \pm 1.25	13.15
GLU	0.45 \pm 0.13	6.86	0.46 \pm 0.15	5.44	4.92 \pm 1.59	8.96
SER	0.31 \pm 0.09	4.72	0.32 \pm 0.09	3.79	1.47 \pm 0.55	2.68
GLY+ASN	1.12 \pm 0.19	17.07	1.64 \pm 0.36	19.41	5.14 \pm 1.08	9.36
THR	0.49 \pm 0.17	7.47	1.09 \pm 0.53	12.90	8.64 \pm 3.89	15.74
ALA	0.90 \pm 0.20	13.72	0.99 \pm 0.22	11.71	4.48 \pm 0.88	8.16
PRO	1.46 \pm 0.32	22.26	1.43 \pm 0.45	16.92	10.55 \pm 2.45	19.22
HIS	0.04 \pm 0.04	0.61	0.12	0.72	0.47 \pm 0.07	0.86
ARG	0.11 \pm 0.03	1.68	0.16 \pm 0.04	1.89	0.70 \pm 0.13	1.27
TYR+VAL+MET	0.37 \pm 0.11	5.64	0.71 \pm 0.23	8.40	2.61 \pm 0.98	4.75
ILE+LEU	0.34 \pm 0.08	5.19	0.23 \pm 0.07	2.72	1.63 \pm 0.87	2.96
PHE+TRY	0.12 \pm 0.04	1.83	0.12 \pm 0.03	1.42	0.62 \pm 0.15	1.13
LYS	0.26 \pm 0.05	3.96	0.26 \pm 0.05	3.01	1.25 \pm 0.31	2.28
TOTAL	6.56 \pm 1.28		8.45 \pm 2.18		54.89 \pm 20.50	
PROTEINA TOTAL*	12.17 \pm 0.97		11.58 \pm 1.54		9.39 \pm 1.96	

* : Percentual / matéria seca.

** : Análise feita a partir de farinha de vários endospermas.

***: Análise feita a partir de endospermas individuais.

Tabela 16: Composição de aminoácidos livres em endospermas da linhagem Cat 100-1 com genótipos normal, opaque-brittle-1, shrunken-2 e em mutantes simples e duplos envolvendo o gene Ltr*19, quantificada em um HPLC. (parte 3 de 3)

Aminoácidos	Progênie (µmol/g endosperma ± sd e % do total)					
	Cat 100-1bt1(BC2/A619,LT=1/2)2 ⊗ ** (bt1bt1lt1t)		Cat 100-1sh2(BC4/A619,LT=1/4)** (1 LT1t : 1 lt1t)		Cat 100-1sh2(BC2/A619,LT=1/2)2 ⊗ (1 LTLT : 2 LT1t : 1 lt1t)	
ASP	2.46 ± 0.31	6.70	3.79 ± 0.42	7.66	1.85 ± 0.26	4.63
GLU	1.47 ± 0.07	4.00	3.39 ± 0.32	6.85	3.52 ± 0.35	8.80
SER	0.77 ± 0.05	2.10	1.98 ± 0.35	4.00	2.26 ± 0.58	5.65
GLY+ASN	5.23 ± 0.16	14.25	7.30 ± 1.06	14.55	5.79 ± 0.80	14.48
THR	2.25 ± 0.43	6.13	1.82 ± 0.39	3.63	4.61 ± 0.10	11.53
ALA	6.15 ± 0.17	16.67	7.77 ± 0.22	15.49	6.33 ± 0.32	15.83
PRO	14.12 ± 0.66	38.47	16.17 ± 0.45	32.70	10.08 ± 0.05	25.21
HIS	0.04 ± 0.04	0.61	--	0.72	--	0.86
ARG	0.51 ± 0.04	1.39	0.28 ± 0.04	0.57	0.25 ± 0.01	0.62
TYR+VAL+MET	1.88 ± 0.13	5.12	2.45 ± 0.10	4.95	1.89 ± 0.05	4.73
ILE+LEU	1.16 ± 0.64	3.16	2.38 ± 1.05	4.81	1.81 ± 0.98	4.53
PHE+TRY	0.29 ± 0.15	0.79	0.63 ± 0.16	1.27	0.44 ± 0.12	1.10
LYS	1.38 ± 0.41	3.76	1.55 ± 0.36	3.13	1.12 ± 0.44	2.80
TOTAL	36.70 ± 2.60		49.45 ± 2.58		39.98 ± 4.18	
PROTEINA TOTAL*	12.17 ± 0.97		11.58 ± 1.54		9.39 ± 1.96	

* : Percentual / matéria seca.

** : Análise feita a partir de farinha de vários endospermas.

***: Análise feita a partir de endospermas individuais.

O aumento no teor de treonina determinado pelo gene Ltr*19, nas plantas originalmente selecionadas por Hibberd e Green (1982) foi muito maior do que aquele encontrado nesse trabalho. Entretanto devemos considerar que o background genético do nosso material é completamente diferente daquele utilizado pelos autores, e isso pode exercer uma grande influência na expressão desse gene.

Os outros aminoácidos derivados do ácido aspártico não apresentaram grandes variações nos seus teores relativos.

A tabela 16 mostra ainda a composição de aminoácidos livres em duplo mutantes contendo os genes Ltr*19, shrunken-2 e brittle-1.

Um aspecto bastante interessante é que tanto o mutante shrunken-2 como o brittle-1 apresentam um alto teor de prolina livre no endosperma correspondendo a 44,9% no shrunken-2 e 46,6% no brittle-1. O teor de prolina livre diminui no duplo mutante contendo o gene Ltr*19. No caso do duplo mutante sh2/Ltr*19 as amostras analisadas continham o gene Ltr*19 na frequência de 1/4 e 1/2 respectivamente. Com isso é claramente evidenciado o efeito de dosagem desse gene na diminuição do teor de prolina. Esta caiu para 32,7 e 25,2% nas amostras contendo a frequência de 1/4 e 1/2 respectivamente. No caso do duplo mutante bt1/Ltr*19 cuja amostra analisada continha o gene Ltr*19 na frequência de 1/2 o teor de prolina caiu para 38,5%. O contrario ocorre quanto aos teores de serina e treonina com o aumento da dosagem do gene Ltr*19 nos duplos mutantes ocorre um aumento no teor desses dois aminoácidos. O acúmulo de treonina nos duplos mutantes sh2/Ltr*19 e bt1/Ltr*19 também foi bastante acentuado. Entretanto como não foi possível obter sementes homozigotas para o gene Ltr*19 nesses materiais não sabemos qual a

extensão da interação desse gene com aqueles que alteram o metabolismo de carboidratos da semente.

4.6-Análise de proteínas nas sementes de mutantes simples e duplos

Algumas progênies da linhagem Cat 100-1 contendo mutantes simples e duplos envolvendo os genes Ltr*19, opaque-2, brittle-1 e shrunken-2, foram analisados quanto ao teor das diferentes frações proteicas que compõem as proteínas de reserva do endosperma. Como pode ser visto pela tabela 17, os genes o2, sh2 e bt1 aumentam o conteúdo da fração I e do resíduo que são constituídas de albuminas, globulinas, aminoácidos livres e glutelinas respectivamente, e diminuem o teor de zeína I e II. A diminuição no teor de zeína é muito mais acentuada no mutante opaque-2 que no shrunken-2 e brittle-1. De forma geral não houve nenhuma modificação nos teores das frações proteicas que pudessem ser atribuída ao gene Ltr*19, a não ser quando em combinação com o gene opaque-2 parece que o gene Ltr*19 intensifica o efeito desse gene no conteúdo das frações proteicas do endosperma.

As frações proteicas foram extraídas do endosperma das linhagens Tux 100-1 0202 e Tux 100-1 o2o2 além de uma progênie Tux 100-1(BC4/A619, o2=1/2), segregando os seguintes genótipos: 0-2o2ltlt: 02o2LTlt: o2o2ltlt: o2o2Lltlt (1:1:1:1), que foi identificada por cromatografia em camada delgada de extratos de coleoptile e endosperma com cada genótipo agrupados.

As frações proteicas foram extraídas de forma distinta àquela extração feita para quantificação de proteínas, dividindo-se as frações em Alb., Glob. mais AAl, zeínas e glutelinas. Essas frações

Tabela 17: Distribuição percentual das frações proteicas do endosperma da linhagem Cat 100-1 contendo mutantes simples e duplos envolvendo os genes Ltr*19, opaque-2, brittle-1 e shrunken-2.

	Frações Proteicas (%)				Proteína Total**		
	Alb,Glo,NNP*	Zeína I	Zeína II	Resíduo			
Cat 100-1	9.53	21.91	35.70	32.86	9.89 +	9.89	0.97
Cat 100-1 o2o2(BC2/A619,Lt=1)2 ⊗	6.09	8.31	60.20	25.35	12.17	12.17	1.67
Cat 100-1 o2o2(BC2/A619,Lt=1)2 ⊗	8.45	12.99	39.80	38.71	11.58	11.58	1.54
Cat 100-1 o2o2	22.62	10.27	16.70	50.71	8.18	8.18	0.38
Cat 100-1 o2o2(BC2/A619,Lt=1)2 ⊗	25.33	7.61	13.24	53.80	9.39	9.39	1.96
Cat 100-1 bt1bt1	26.72	11.80	30.26	31.22	15.78	15.78	1.15
Cat 100-1 bt1bt1(BC2/A619,Lt=1/2)2 ⊗	29.02	15.36	27.49	28.12	17.16	17.16	0.14
Cat 100-1 sh2sh2	29.98	11.80	25.66	32.55	15.46	15.46	0.83
Cat 100-1 sh2sh2(BC2/A619,Lt=1/2)2 ⊗	23.14	14.31	48.35	14.19	16.37	16.37	1.23
Cat 100-1 sh2sh2(BC2/A619,Lt=1/4)2 ⊗	27.21	22.67	25.74	24.38	16.36	16.36	0.16

*: Albuminas, Globulinas e Nitrogênio não proteico.

** : Percentual / matéria seca \pm sd.

OBS: Média de quatro repetições.

foram submetidas a géis de SDS-poliacrilamida e a zeína e glutelinas também em géis de isoeletrofocalização. Pretendia-se com isso determinar se alguma alteração a nível de uma ou outra banda proteica poderia estar alterada a nível de identificação qualitativa.

Um total de 12 polipeptídeos (figura 27) de pesos moleculares distintos (Tabela 18) foram encontrados para as albuminas e globulinas nos géis de PAGE-SDS. Estes 12 polipeptídeos estão presentes, sem excessão, em todos os genótipos analisados. Nenhuma diferença que pudesse ser atribuída ao gene Ltr*19, foi encontrada. O efeito do gene opaque-2 nas albuminas e globulinas foi o esperado. Os genótipos normais apresentaram bandas menos intensas que os genótipos contendo o gene opaque-2. Isto ocorre porque quando o gene opaque-2 inibe a síntese de zeína, automaticamente ocorre um aumento das outras frações proteicas. Nenhuma alteração aparente que afetasse as albuminas e globulinas devido ao gene Ltr*19, foi encontrado no duplo mutante Ltr*19 e opaque-2.

Os polipeptídeos da zeína (figura 28) se subdividem em 4 bandas de pesos moleculares distintos (Tabela 19) quando analisados em PAGE-SDS. Os pesos moleculares dessas quatro bandas foram 22.500, 20.000, 10.000 daltons. Como no caso das albuminas e globulinas, nenhuma diferença que pudesse indicar algum efeito do gene Ltr*19 foi observada.

Como era de se esperar, os genótipos contendo o gene opaque-2 apresentaram uma intensidade menor das bandas, já que esta proteína é inibida pelo gene opaque-2. Outra característica encontrada nos genótipos contendo o gene opaque-2, foi a completa inibição da banda de peso molecular de 22.500 daltons.

Dez bandas de pesos moleculares distintos foram identificadas

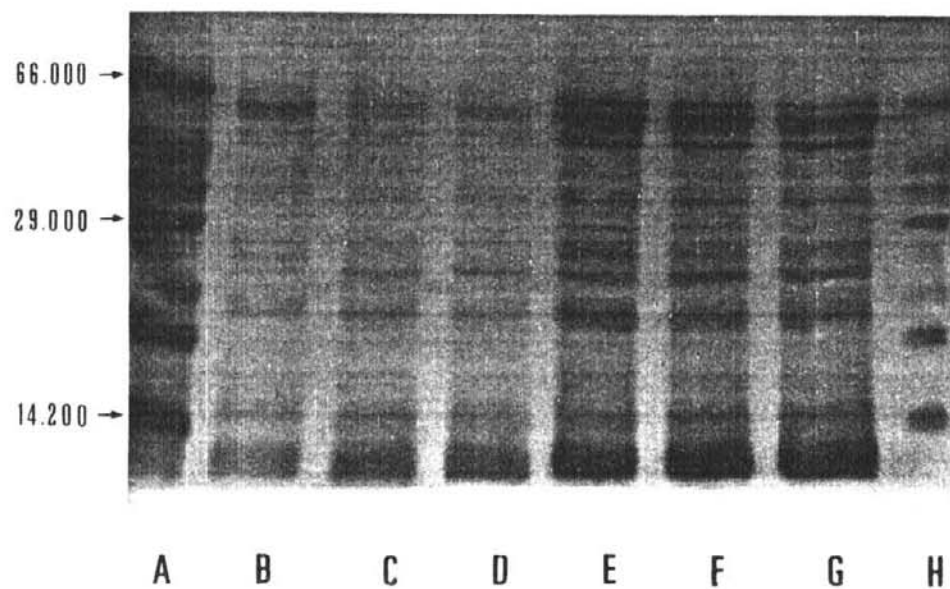


Figura-27: Eletroforese em gel de SDS-acrilamida de albuminas e globulinas. Cada canaleta corresponde a diferentes genótipos da linhagem Tux 100-1. (A) e (H) padrões de pesos moleculares (SDS-7), (B) 02021t1t, (C) 02o21t1t, (D) 0-2o2LT1t, (E) o2o21t1t, (F) o2o21t1t (G) o2o2LT1t.

Tabela 18: Padrão de pesos moleculares das bandas de albuminas e globulinas, resolvidas em gel PAGE-SDS de endospermas contendo os genes Ltr*19 e opaque-2 em diferentes combinações.

Peso Molecular	Genótipos *					
	02021t1t	02o21t1t	02o2LT1t	o2o21t1t	o2o21t1t	o2o2LT1t
64.000	---	---	---	---	---	---
60.000	---	---	---	---	---	---
50.000	---	---	---	---	---	---
44.500	---	---	---	---	---	---
38.000	---	---	---	---	---	---
31.000	---	---	---	---	---	---
24.000	---	---	---	---	---	---
21.000	---	---	---	---	---	---
19.100	---	---	---	---	---	---
13.000	---	---	---	---	---	---
10.700	---	---	---	---	---	---
10.000	---	---	---	---	---	---

* : Todos os genótipos foram obtidos no "background" genético da linhagem Tux 100-1.

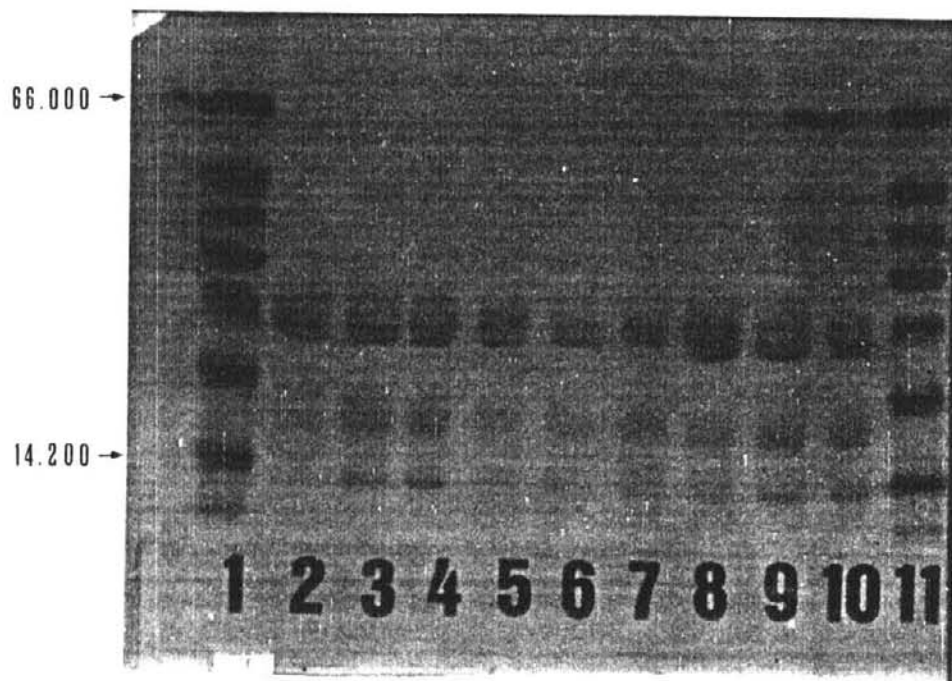


Figura-28: Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida de zeína. Cada canaleta corresponde a diferentes genótipos dentro do background genético da linhagem Tux 100-1. (1) e (11) padrões de pesos moleculares (SDS-7), (2) e (18) 0-2021t1t, (3) e (9) 02o21t1t, (4) e (10) 02o2LT1t, (5) o-2o21t1t, (6) o2o21t1t, (7) o2o2LT1t.

Tabela 19: Padrão de pesos moleculares das bandas de zeína, resolvidas em gel PAGE-SDS de endospermas contendo os genes Ltr*19 e opaque-2 em diferentes combinações. ,

Peso Molecular	Genótipos *					
	02021t1t	02o21t1t	02o2LT1t	o2o21t1t	o2o21t1t	o2o2LT1t
22.500	---	---	---			
20.000	---	---	---	---	---	---
14.000	---	---	---	---	---	---
10.000	---	---	---		---	---

* : Todos os genótipos foram obtidos no 'background' genético da linhagem Tux 100-1.

para as glutelinas. Como no caso das albuminas, globulinas e zeína, nenhuma diferença que pudesse ser atribuída ao gene Ltr*19 foi encontrada nas glutelinas. Devido ao efeito do gene opaque-2, os genótipos o2o2 apresentam bandas mais intensas que os genótipos normais, isto indica um maior acúmulo de glutelinas nos genótipos o-2o2. Nenhuma interação entre os genes Ltr*19 e opaque-2 foram identificadas para as glutelinas em géis de PAGE-SDS (figura 29) (Tabela 20).

Devido ao fato da resolução de proteínas ser melhor em géis de focalização isoeétrica do que em PAGE-SDS, nós submetemos a zeína à isoeletrofocalização em géis de agarose contendo anfólito de pH 5-8. Os diferentes genótipos de milho apresentaram padrões de isoeletrofocalização bastante específicos. Nos genótipos o2o2 as bandas de isoeletrofocalização mais básicas estavam inibidas. Nenhuma modificação nos padrões de isoeletrofocalização que pudesse ser atribuída ao gene Ltr*19 foi encontrada. Também não foram encontradas modificações que pudessem ser atribuídas a interações entre os genes Ltr*19 e opaque-2 (figura 30).

A proteína de reserva glutelina também foi submetida a isoeletrofocalização em géis de pH 3-10. Um total de 19 bandas foram identificadas para o genótipo analisado. Todos os genótipos examinados exibiram o mesmo padrão de isoeletrofocalização para as glutelinas. Nenhum efeito do gene Ltr*19 e opaque-2 foram identificados (figura 31).

Esses resultados indicam que a alteração no pool de aminoácidos livres encontrada para duplo mutantes Ltr*19 opaque-2, neste caso, heterozigotas para o gene Ltr*19 (O2o2LTlt e o2o2LTlt) tanto material opaque-2 como o normal, não apresentaram alterações a níveis

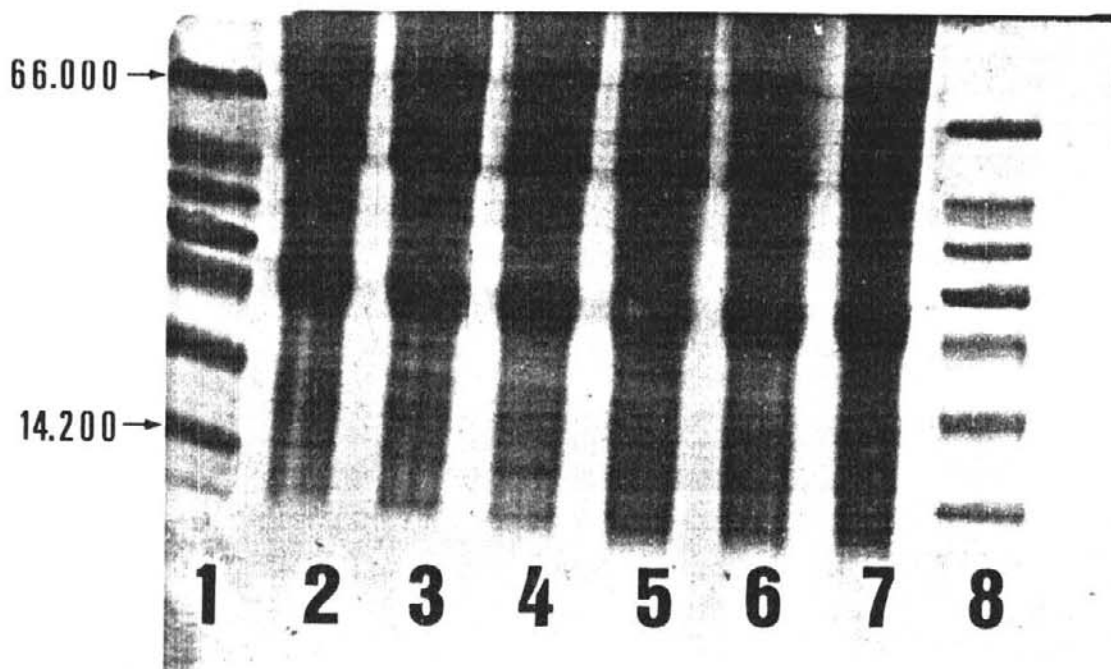


Figura-29: Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida de glutelinas. Cada canaleta corresponde a diferentes genótipos dentro do background genético da linhagem Tux 100-1. (1) e (8) padrões de pesos moleculares (SDS-7), (2) O2O2ltlt, (3) O2o2ltlt, (4) O2o2LTlt, (5) o2o2ltlt, (6) o2o2ltlt, (7) o2o2LTlt.

Tabela 20: Padrão de pesos moleculares das bandas de glutelinas, resolvidas em gel PAGE-SDS de endospermas contendo os genes Ltr*19 e opaque-2 em diferentes combinações.

Peso Molecular	Genótipos *					
	02021t1t	02o21t1t	02o2LT1t	o2o21t1t	o2o21t1t	o2o2LT1t
73.000	---	---	---	---	---	---
56.000	---	---	---	---	---	---
51.000	---	---	---	---	---	---
44.000	---	---	---	---	---	---
38.000	---	---	---	---	---	---
35.000	---	---	---	---	---	---
21.500	---	---	---	---	---	---
15.200	---	---	---	---	---	---
12.100	---	---	---	---	---	---
10.100	---	---	---	---	---	---

* : Todos os genótipos foram obtidos no "background" genético da linhagem Tux 100-1.

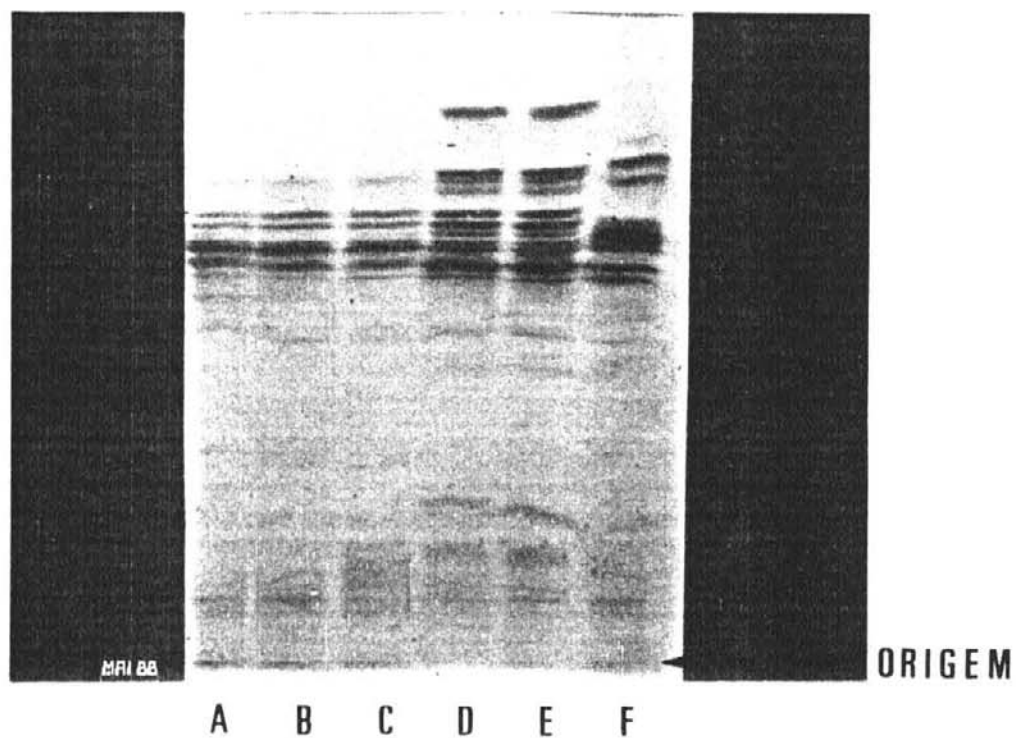


Figura-30: Isoeletrofocalização em gel de agarose de zeína. Cada canaleta corresponde a diferentes genótipos dentro do background genético da linhagem Tux 100-1. (A) o2o2Ltl1t. (B) o2o21t1t. (C) o2o21t1t. (D) O2o2Ltl1t. (E) O2o21t1t. (F) O2O21t1t.



Figura-31: Isoeletrofocalização em gel de agarose de glutelinas. Cada canaleta corresponde a diferentes genótipos dentro do background genético da linhagem Tux 100-1. (A) O-2O21tlt. (B) O2o21tlt. (C) O2o2Ltlt. (D) o2o21tlt. (E) o2o21tlt. (F) o2o2Ltlt.

mais drásticos como eliminação de bandas proteicas ou a níveis qualitativos. Talvez se um material duplo mutante homocigoto para o gene Ltr*19 (o2o2LTLT) tivesse sido usado, as alterações a níveis qualitativos pudessem ser então observadas.

5-CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a metodologia de seleção de mutantes bioquímicos, com alterações na biossíntese de aminoácidos, através de cultura de tecido é bastante promissora. Entretanto é fundamental conhecermos muito bem os efeitos dos agentes seletivos nas vias metabólicas a serem estudadas, para que possamos interpretar corretamente os resultados.

No caso da seleção para a resistência à aminoetilcisteína, sabe-se que esse análogo da lisina, além de inibir a atividade da dihidrodipicolinato sintase também pode substituir a lisina na síntese de proteína (Bright et al., 1979b). Ambos efeitos podem ser letais para o desenvolvimento da cultura e não é possível sabermos, se nas condições em que trabalhamos, as duas coisas estão ocorrendo simultaneamente ou em separado na cultura de células. Isso pode levar a resultados não esperados.

O processo de seleção de calos resistentes a aminoetilcisteína, não mostrou ser simples, pois a resposta ao agente seletivo, parece depender da eficiência com que este alcance as células em seleção. Mesmo assim foi possível selecionar plantas resistentes.

Os resultados da análise das plantas sensíveis e resistentes à aminoetilcisteína mostram que as plantas apresentam modificações genéticas e bioquímicas associadas a aminoetilcisteína. A resistência a esse análogo de lisina foi determinado por um gene dominante em um caso e recessivo em outro. Dois mecanismos diferentes podem estar envolvidos. No caso da dominância, a enzima dihidrodipicolinato sintase pode ter se tornado, através de uma mutação, menos

474
15

sensível a retroinibição pela lisina a exemplo do que ocorre em microorganismos e algumas plantas (Hibberd e Green, 1982; Yamada et al., 1986) ou algum outro mecanismo pode estar agindo. No caso da recessividade, carreadores de membranas podem ter sido afetados de modo a impedir a absorção da aminoetilcisteína pelas membranas das raízes a exemplo do que ocorre em cevada (Bright et. al, 1979). Isso só poderá ser elucidado quando analisarmos as propriedades físico-químicas da enzima.

A análise de aminoácidos da semente, sugere que algumas progênies derivadas de plantas resistentes possuem aumentos no acúmulo de lisina. Porém outros aminoácidos foram alterados, não sendo possível determinarmos a causa dessa modificação.

A ocorrência de outras mutações nas plantas regeneradas a partir de calos resistentes à aminoetilcisteína, mostra claramente que o processo empregado, utilizando-se mutagênese em adição à variação somaclonal natural do sistema produz efetivamente variabilidade genética, a qual pode ser explorada para efeito de seleção de mutantes bioquímicos.

A utilização do gene Ltr*19 nesse trabalho, possibilitou o entendimento de vários aspectos da regulação do metabolismo de aminoácido em semente de milho.

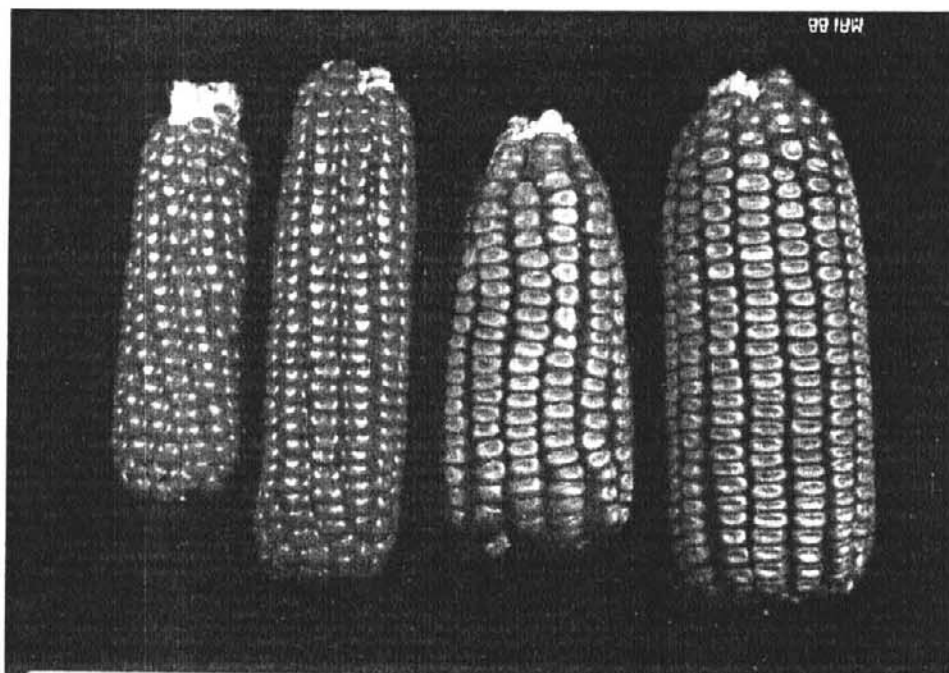
Em primeiro lugar, surpreendentemente, esse gene, o qual presumivelmente é um gene estrutural para a enzima aspartato quinase (Hibberd e Green, 1982), mostrou estar localizado no braço curto do cromossomo 7, a apenas 10 centimorgans do gene opaque-2. Em segundo lugar o gene Ltr*19 parece intensificar o efeito do gene opaque-2 tanto no metabolismo de aminoácidos como de proteína. Como o gene opaque-2 diminui a síntese de zeína a qual é pobre em lisina e au-



menta as frações ricas em lisina (Mertz et al, 1964; Nelson, 1967; Mertz, 1972) e como o gene Ltr*19 codifica a primeira enzima da via metabólica do ácido aspártico, a qual leva a síntese de lisina, é possível que esses dois genes estejam evolutivamente associados tanto do ponto de vista genético como bioquímico.

A análise de aminoácidos das sementes contendo o gene Ltr*19 mostrou que uma alteração na enzima aspartato quinase, diminuirá a sensibilidade a lisina (Hibberd e Green, 1982), efetivamente faz com que a via metabólica flua mais livremente levando ao acúmulo de treonina. Esse efeito é aumentado na presença de mutantes de endosperma. A não acumulação dos outros aminoácidos derivados do ácido aspártico pode ser devido a outros sítios de regulação tanto na via de síntese como de degradação desses aminoácidos. Essa hipótese poderá ser testada quando for possível acumularmos numa mesma planta mutantes que possuam alterações simultâneas em todos esses pontos regulatórios.

Sob o ponto de vista aplicado, as alterações genéticas produzidas no metabolismo de aminoácidos tanto das plantas resistentes à aminoetilcisteína como aquelas resistentes à lisina mais treonina, não afetou as características agronômicas, nem da parte vegetativa nem da parte reprodutiva. Por exemplo, espigas segregando para o gene Ltr*19 são apresentadas na figura 32. Como pode ser visto, é impossível identificarmos as sementes mutantes pois estas apresentam fenótipo absolutamente normal.



A B C D

Figura-32: (A) Espiga da linhagem Cat 100-1. (B) Espiga segregando para o gene *Ltr*19* 1:2:1 (Cat 100-1 (BC2/A619) 2X). (C) Espiga da linhagem Tux 100-1. (D) Espiga segregando para o gene *Ltr*19* 1:2:1 (Tux 100-1 (BC2/A619) 2X).

6-RESUMO:

Estudos recentes tem demonstrado a grande importância da via metabólica do ácido aspártico em plantas. Por esta via metabólica se produz os aminoácidos essenciais: lisina, treonina e metionina. Estes aminoácidos encontram-se em baixos teores em todos os cereais caracterizando esse grupo vegetal como de baixa qualidade nutritiva. Os conhecimentos adquiridos a respeito do sistema de regulação da via de biossíntese desses aminoácidos levou alguns pesquisadores a elaborarem uma estratégia para a seleção de mutantes, através de cultura de tecidos, que apresentam pontos de regulação relaxados. Com isso a via metabólica como um todo fluiria de forma a levar ao acúmulo dos aminoácidos que atuam como produtos finais. Para a seleção desses mutantes, são utilizadas combinações de aminoácidos produtos finais ou análogos de aminoácidos que quando adicionados ao meio inibem drasticamente o crescimento da cultura. Células que eventualmente apresentam crescimento normal tem grande chance de serem mutantes regulatórios. Resultados positivos tem sido obtidos em várias espécies de plantas.

Nesse trabalho utilizamos a metodologia para a seleção de cultura de tecido de milho de mutantes resistentes ao análogo de lisina, aminoetilcisteína, que apresentassem acúmulo de lisina livre na semente. Obtivemos calos embriogênicos friáveis com resistência a aminoetilcisteína variando de 0,25mM até 0,5mM. Destes calos obtivemos várias plantas dentre as quais duas apresentaram dois sistemas genéticos diferentes para a resistência. Um com dominância para a resistência e outro com característica recessiva para a resistên-

cia. Em ambos os casos um aumento no teor de lisina livre foi observado.

Além disso, um mutante de milho dominante para a resistência a lisina mais treonina, obtido também por cultura de tecidos por Hibberd e Green (1982), teve suas características genéticas, bioquímicas e agrônômicas parcialmente estudadas. Determinou-se que o gene *Ltr*19*, responsável pela resistência à lisina mais treonina, está localizado no braço curto do cromossomo 7 a 10.57 ± 1.38 centimorgans do gene *opaque-2*. Este gene foi combinado com os genes mutantes de endospermas *opaque-2*, *brittle-1* e *shrunken-2* e suas interações observadas através da análise do teor e composição dos aminoácidos livres em sementes. Verificou-se que o gene *Ltr*19* é responsável diretamente por um acúmulo de 8 vezes no teor de treonina e de 4,5 vezes no teor de serina. Determinou-se também que o duplo mutante *Ltr*19* e *opaque-2* apresenta um aumento extremamente acentuado nos teores de treonina e serina além de um aumento no teor total de aminoácidos livres. Este aumento não se deve somente ao aumento de treonina e serina, mas também a um aumento dos outros aminoácidos. A quantificação das frações proteicas deste duplo mutante, parece indicar que o gene *Ltr*19* intensifica o efeito do gene *opaque-2*, diminuindo o teor de zeína e aumentando os teores de albuminas, globulinas, aminoácidos livres e glutelinas.

Entretanto, essas modificações não se dão a nível de alterações de bandas proteicas, pois a comparação eletroforética das frações proteicas entre o duplo mutante *Ltr*19*, *opaque-2* e as sementes normais não mostrou nenhuma diferença.

7-SUMMARY:

The essential amino acids lysine, threonine and methionine are derived from the aspartate family of amino acids in plants. Since the cereals are devoid in at least one of these amino acids, the aspartate pathway has received great attention in the last recent years. Biochemical, molecular and genetic studies has lead to a deep understand of the regulation of the aspartate family showing that many branch point enzymes are positively or negatively regulated by feedback.

Many investigators have proved the regulation of the key points by finding mutants with altered regulation of aspartate pathway. Several studies showed that the regulatory mutants has increased levels of some of the amino acids end products.

With the advance of the tissue culture technics and plant regeneration selection of biochemical mutants became as an important system to study mutants with altered regulation of amino acid biosynthesis. Such mutants can be easily selected in a petri dish containing millions of cells plated on selective medium added of combinations of the amino acids end products or amino acids analogs.

In this study maize tissue culture was used to select plants resistant to the lysine analog aminoethylcysteine. In addition, a mutant resistant to lysine plus threonine which was selected by Hibberd and Green (1982), was included in the studies. Combinations of the lysine plus threonine resistant mutant, with the maize endosperm mutants opaque-2, brittle-1 and shrunken-2, were



performed to study the effect of such combination on the biosynthesis of amino acid and proteins in the seeds.

Resistance embryogenic calli of a maize inbred line were selected in medium containing from 0,25 to 0,5mM of aminoethylcysteine. These calli were used for plant regeneration. From 63 regenerated plants two presented R1 progenies which when selfed polinated segregates resistant and sensitive plants. The resistance of one R0 plants showed to be determined by a single dominant gene while the other showed to be determined by a single recessive gene. Both resistant mutant presented increased free lysine level when compared with sensitive plants.

The resistance of the lysine plus threonine mutant is determined by a single dominant gene, named Ltr*19. This gene was transferred to two maize inbred lines containing normal, opaque-2, brittle-1 and shrunken-2 endosperms by successive backcrosses. The genetic analysis of single and double mutants revealed that the Ltr*19 gene is located in the short arm of chromosome 7, at 10.57 ± 1.38 centimorgans of the opaque-2 gene.

The presence of the Ltr*19 gene increase 8 times the free threonine level in the normal endosperm. A synergistic effect on the increase of free threonine was observed when the Ltr*19 gene was combined in a double mutant with the opaque-2 gene. It was observed also that the Ltr*19 gene intensify the effect of opaque-2 gene on amino acid and protein synthesis in the endosperm.

SDS-PAGE and IEF analysis of single and double mutants containing the Ltr*19 and endosperm mutant did not show any difference in the polypeptide profile which could be attributed to the Ltr*19 gene.

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarnes, H. 1974. Aspartate kinase from some higher plants and algae. **Physiol. Plant** 32:400-402.
- Aarnes, H. 1977. A lysine-sensitive aspartate kinase and two molecular forms of homoserine dehydrogenase from barley seedlings. **Plant Sci. Lett.** 9:137-145.
- Aarnes, H. e Rognes, S.E. 1974. Threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from **Pisum sativum**. **Phytochemistry** 13:2717-2724.
- Arruda, P., Bright, S.W.J., Kueh, J.S.H., Lea, P.J. e Rognes, S.E. 1984. Regulation of Aspartate Kinase Isoenzymes in Barley Mutants Resistant to Lysine plus Threonine. **Plant Physiol.** 76:442-446.
- Arruda, P. e Silva, W.J. 1979. Amino acid composition of vascular sap of maize ear peduncle. **Phytochemistry** 18:409-410.
- Arruda, P. e Silva, W.J. 1983. Lysine-Ketoglutarato reductase activity in maize: It is possible role in lysine metabolism of developing endosperm. **Phytochemistry** 22:2687-2689.
- Arruda, P., Sodek, L. e Silva, W.J. 1982. Lysine-Ketoglutarato reductase activity in developing maize endosperm. **Plant Physiol.** 69:988-989.
- Arruda, P., Toccozzilli, J.M.G., Vieira, A. e Silva, W.J. 1984. Degradation of lysine in maize: possible pathway and genetic control. **Maize Genetics Cooperation News Letter** 58:50-52.
- Aycock, H.S. 1972. Recurrent selection for mutant Kernel Weight as a percent of normal in heterozigous opaque-2 and floury-2 maize population. **Tese de Ph.D.**, Purdue University, W. Lafayette Indiana, USA.
- Baker, D.H., Becker, D.E., Norton, H.W., Jensen, A.H. e Harmon, B.G. 1969. Lysine imbalance of corn protein in growing pigs. **J. Anim. Sci.** 28:23.
- Bauman, L.F. 1975. Germ and endosperm variability, mineral elements, oil content, and modifier genes in opaque-2 maize In: **High Quality Protein Maize**. Purdue Univ. e CIMMYT, editores, Halted Press.
- Bonner, P.L.R., Hetherington e Lea, P.J. 1986. Lysine-sensitive plant aspartate kinase is not regulated by calcium or calmodulin. **FEBS Letters** 195:119-121.
- Bourgin, J.P., Hommel, M.C. e Missioner, C. 1980. Amino acid resistant plants from tobacco cells selected in vitro In: **Regeneration of plants from cell and tissue culture and genetic variability**. Proc CNRS-NSF Workshop. Orsay France 1-12.

Boges, C.J. e Vasil, I.K. 1987. In vitro selection for tolerance to S-(2-aminoethyl) L-cysteine and overproduction of lysine by embryogenic calli and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. *Plant Science* 50:195-203.

Brandt, A.B. 1975. In vivo incorporation of lysine-14C into the endosperm proteins of wild type and high lysine barley. *FEBS letters* 52:288-291.

Bressani, R. 1966. Protein quality of opaque-2 maize in children. In: *Proc. High Lysine Corn Conf.*, E.T. Mertz e O.E. Nelson, editores. Corn Ind. Res. Found. Washington, D.C.

Bressani, R. 1975. Improving maize diets with amino acid and protein supplements. In: *High Quality Protein Maize*, Purdue Univ. e CIMMYT, editores. Halsted Press.

Bright, S.W.J., Featherstone, L.C. e Mifflin, B.J. 1979b. Lysine metabolism in a barley mutant resistant to S-(2-aminoethyl) L-cysteine. *Planta* 146:629.

Bright, S.W.J., Mifflin, B.J. e Rognes, S.E. 1982. Threonine Accumulation in the Seed of a Barley Mutant with an Altered Aspartate Kinase. *Biochemical Genetics* 20:229-243.

Bright, S.W.J., Norbury, P.B. and Mifflin, B.J. 1979a. Isolation of a recessive barley mutant resistant to S-2 aminoethyl-L-cysteine. *Theo. Appl. Genet.* 55:1-8.

Bright, S.W.J., Shewry, P.R. e Mifflin, B.J. 1978a. Aspartate kinase and the synthesis of aspartate derived amino acids in wheat. *Planta* 139:119-125.

Bright, S.W.J., Wood, E.A. e Mifflin, B.J. 1978b. The effect of aspartate derived amino acids (lysine, threonine, methionine) on the grow of excised embryos of wheat and barley. *Planta* 139:113-118.

Bryan, P.A., Cawley, R.D., Brunner, C.E. e Bryan, J.K. 1970. Isolation and characterization of a lysine-sensitive aspartokinase from a multicellular plant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41:1211-1217.

Carlson, P.S. 1973. Methionine sulphoximine-resistant mutants of tobacco. *Science* 180:1366.

Cattoir-Reunaerts, A., Degryse E., Negrutiu, I., Aerts, M., Jacobs M. 1981. Effects of aspartate-derived amino acids on growth of *Arabidopsis* plants and callus. *Z Pflanzenphysiol.* 101:67-64.

Cattoir-Reynaerts, A., Degryse, E., Verbruggen, I. e Jacobs, M. 1983. Isolation and characterization of a lysine+threonine-resistant variant in *Daucus canota*. *Biochem. Physiol. Pflanz* 178:81-90.

Cheshire, R.M. e Mifflin, B.J. 1975. Control of lysine biosynthesis in maize. *Phytochemistry* 14:655-658.

Dalby, A. e Tsai, C.Y. 1974. Zein accumulation in phenotypically modified lines of opaque-2 maize. **Cereal Chem.** 51:821-825.

Datta, P. e Gest, H. 1964a. Alternate patterns of end-product control in biosynthesis of amino acids of the aspartic family. **Nature** 203:1259-1261.

Datta, P. e Gest, H. 1964b. Control of enzyme activity by concerted feedback inhibition. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 52:1004-1009.

Datta, P. e Prakash, L. 1966. Aspartokinase of **Rhodospseudomonas spheroides**. Regulation of enzyme activity by aspartate B-sensialdehyde. **J. Biol. Chem.** 241:5827-5835.

Davies, H.M. e Mifflin, B.J. 1977. Aspartate kinase from carrot cell suspension culture. **Plant Sci. Letters** 9:323-332.

Davies, H.M. e Mifflin, B.J. 1978. Regulatory isoenzymes of aspartate kinase and the control of lysine and threonine biosynthesis in carrot cell suspension culture. **Plant Physiol.** 62:536-554.

Demain, A.L. 1970. Overproduction of microbial metabolites and enzymes due to alteration of regulation. **Adv. Biochem. Engin.** 1:113-142.

De Marco, C., Busello, V., Di Erolamo, M. e Cavallini, D. 1976. Selenalysine and protein synthesis. **Biochim. Biophys. Acta,** 454:298.

Diedrich, T. 1984. **Tese de Ph.D.**. University of Minnesota. USA.

Dougall, D.K. 1965. The biosynthesis of protein amino acids in plant tissue cultures. I. Isotopes competition experiments using glucose-U-C and the protein amino acids. **Plant Physiol.** 40:891-897.

Dougall, D.K. 1966. The biosynthesis of protein amino acids in plant tissue cultures. II. Further isotope competition experiments using protein amino acids. **Plant Physiol.** 41:1411-1415.

Dougall, D.K. e Fulton, M.M. 1967. Biosynthesis of protein amino acids in plant tissue culture. IV. Isotope competition experiments using glucose-U-C and potential intermediates. **Plant Physiol.** 42:941-945.

Dunham, V.L., e Bryan, J.K. 1969. Synergistic effects of metabolically related amino acids on the growth of a multicellular plant. **Plant Physiol.** 44:1601-1608.

Dunstan, D.I., Short, K.C. e Thomas, E. 1978. The anatomy of secondary morphogenesis in cultured scutellum tissues of **Sorghum bicolor**. **Protoplasma** 97:251-260.

Eggum, B.O. 1977. Nutricional aspects of cereal proteins in "Genetic

Diversity in Plants". Mohammed, A., Akse, R. e Von Borstel, R.C., Eds., Phenom Press. New York, 349.

Elmore, C.D. 1970. Some effects of opaque-2 on kernel characteristics and the performance of counterpart maize (*Zea mays* L.) hybrids. **Tese de Ph.D.** University of Illinois-USA.

Eveleigh, D.E. 1981. The microbiological production of industrial chemicals. **Scientific American** 245:120.

Fuller, M.F., Livingstone, R.M., Baird, B.A. e Atkinson, T. 1979. The optimal amino acid supplementation of barley for the growing pig. I. Response of nitrogen metabolism to progressive supplementation. **Br. J. Nuts.** 41:321.

Gengenbach, B.G., Walter, T.J., Green, C.E. e Hibberd, K.A. 1978. Feedback regulation of lysine, threonine and methionine biosynthetic enzymes in corn. **Crop Sci.** 18:472-476.

Glover, D.V., Grane, P.L., Misra, P.S. e Mertz, E.T. 1975. Genetics of endosperm mutants in maize as related to protein quality and quantity. In: **Proc High Quality Protein Maize**, Purdue Univ. CIMMYT, editores Halsted Press.

Glover, D.V. e Tosello, G.A. 1973. Kernel characteristics, protein quality and biological value of the sugary-2 mutation on its combination with opaque-2 in *Zea mays* L. **Agron. Abstr.** pp5.

Grandbastien, M.A., Bourgin, J.P., Caboche, M. 1985. Valine resistance, a potential marker in plant cell genetics. II. Optimization of UV mutagenesis and selection of valine-resistant colonies derived from tobacco mesophyll protoplasts. **Genetics** 109:409-425.

Green, C.E. e Phillips, R.L. 1975. Plant regeneration from tissue culture of maize. **Crop. Sci.** 15:417-421.

Henke, R.R. e Wahnbaeck, R. 1977. B-Aspartokinase from developing endosperm of maize. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 70:38-44.

Henke, R.R. e Wahnbaeck-Spencer, R. 1979. Variations in B-aspartate kinase activity during the development of maize endosperm. **FEBS Letters** 99:113-115.

Hibberd, K.A. 1984. Induction, Selection, and Characterization of Mutants In Maize Cell Cultures. **Genetics of Plants Vol.I.** pp571-576.

Hibberd, K.A. e Green, C.E. 1982. Inheritance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue culture. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 79:559-563.

Hibberd, K.A., Walter, T., Green, C.E. e Gengenbach, B.G. 1980. Selection and characterization of a feedback insensitive tissue culture of maize. **Planta** 148:183-188.



Jacobsen, E. 1986. Isolation, characterization and regeneration of an S-(2-aminoethyl) cysteine resistant cell line of dihaploid potato. *J. Plant. Physiol.* 123:307-315.

Jimenes, J.R. 1966. Protein fractionation studies of high lysine corn. In: *Proc. High Lysine Corn. Conf.*, E.T. Mertz e O.E. Nelson, editores. Corn Ind. Res. Found Washington, D.C.

Kuramitsu, H.K. 1970. Concerted feedback inhibition of aspartokinase from *Bacillus stearothermophilus* I. Catalitic and regulatory properties. *J. Biol. Chem.* 245:2951-2957.

Laemmli, V.K. 1970. *Nature* 227:680.

Larkins, B.A. 1981. *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise Vol. IV.* Marcus, O. (ed.). Academic Press, New York.

Lea, P.J., Mills, W.R. e Mifflin, B.J. 1979. The isolation of a lysine-sensitive aspartate kinase from pea leaves and its involvement in homoserine biosynthesis in isolated chloroplasts. *FEBS Lett.* 98:165-168.

LKB. High performance liquid chromatography in protein research: High resolution amino acid analysis of PITC derivatized amino acids. Note 442.

Lu, C., Vasil, I.K. e Ozias-Akins, P. 1982. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theo. Appel. Genet.* 62:109-112.

Madison, J.T. e Thompson, J.F. 1976. Threonine synthase from higher plants-stimulation by S - adenosylmethionine and inhibition by cysteine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:684.

Malavolta, E. e Dantas, J.P. 1978. *Nutrição e Adubação do Milho. Melhoramento e produção do milho no Brasil-Piracicaba.* ESALQ-Marprint, Fundação Cargill.

Maner, J.H. 1975. Quality protein maize in swine nutrition. In: *High Quality Protein Maize*, Perdue Univ. e CIMMYT, editores. Halsted Press.

Matthews, B.F. e Widholm, J.M. 1978. Regulation of lysine and threonine synthesis in carrot cell suspension cultures and whole carrot roots. *Planta* 141:315-323.

Matthews, B.F. e Widholm, J.M. 1979a. Enzyme expresion in soybean cotyledon, callus and suspension culture. *Can. J. Bot.* 57:299-304.

Matthews, B.F. e Widholm, J.M. 1979b. Expression of aspartokinase, dihydrodipicolinate acid synthase and homoserine dehydrogenase during growth of carrot cell suspension cultures on lysine and threonine supplemented media. *Z. Naturforsch* 34:1177-1185.

Matthews, B.F., Shye, S.C.H. e Widholm, J.M. 1980. Mechanism of

resistance of a selected carrot cell suspension culture to S(2-aminoethyl) L-cysteine. *Z. Pflanzenphysiol.* 96:453-463.

Mazelis, M., Whatley, F.R. & Whatley, J. 1977. The enzymology of lysine biosynthesis in higher plants; the occurrence, characterization and some regulatory properties of dihydrodipicolinate synthase. *FEBS Lett.* 84:236-240.

Mertz, E.T. 1972. Recent improvements in corn protein. In: **Symposium: Seed Protein** (G.E. Inglett-ed.). The AVI Publ. Co. Inc. pp. 136-143.

Mertz, E.T., Bates, L.S. & Nelson, O.E. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. *Science* 145:279-280.

Mertz, E.T., Lloyd, N.E. & Bressani, R. 1968. Studies on corn protein II. Electrophoretic of germ and endosperm extracts. *Cereal Chem.* 35:146-149.

Messing, J., Geraghty, D., Heidecker, G., Hu, N.T., Kride, J. & Rubenstein, J. 1983. **Genetics Engineering of Plants**. Tsune Kosuge, Carole P. Meredith and Alexander Hollaender (eds.) Plenum Press, New York.

Mifflin, B.J., Bright, S.W.J., Rodges, S.E. & Kueh, J.S.H. 1982. Amino acids, nutrition and stress: The role of biochemical mutants in solving problems of crop quality. In: **Genetic Engineering of Plants. An Agricultural Perspective**. Kosuge, T., Meredith, C. and Hollaender, A. (eds.). Plenum Press, New York, London 391-414.

Mifflin, B.J. & Lea, P.J. 1982. Ammonia assimilation and amino acid metabolism. In: Boulter, D. and Parthier, B. (eds). **Encyclopedia of Plant Physiology New Series, Volume 14A**. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1-64

Misra, P.S., Janbunathan, R., Mertz, E.T., Elover, D.V., Barbosa, H.M. & Mc Whirter, K.S. 1972. Endosperm protein synthesis in maize mutants with increased lysine content. *Science* 176:1425-1426.

Mossé, J. 1966. Alcohol soluble proteins of cereal grains. *Federation Proc.* 25:1663-1669.

Mossé, J., Baudet, J., Landry, J. & Moreaux, T. 1966. Etude sur les proteines du maïs. II. Comparaison entre les compositions en acide amines et les proportions mutuelles des fractions proteiques de grains normaux et mutants. *Ann. Physiol. Vegetable* 8:331-334.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-496.

Naylor, A.W., Robson, R. & Tolbert, N.E. 1958. Aspartic-14C acid metabolism in leaves, roots and stems. *Physiol. Plant* 11:537-547.

- Negrutiu, I., Cattoir-Reynearts, A., Verbruggen, I. e Jacobs, M. 1981. Lysine-over-production in an S - aminoethylcysteine resistant, isolated in protoplast culture of *Nicotiana sylvestris*. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 89:188-189.
- Negrutiu, I., Cattoir-Reynearts, A., Verbruggen, I. e Jacobs, M. 1984. Lysine overproducer mutants with an altered dihydrodipicolinate synthase from protoplast culture of *Nicotiana sylvestris*(Spegazzini and Comes). *Theor Appl. Genet.* 68:11-20.
- Nelson, O.E. 1966. Opaque-2, floury-2 and high-lysine maize. In: *Proc. High lysine Corn Conf.*, E.T.Mertz e O.E.Nelson, ed. Corn Ind. Res. Found Washington. D.C.
- Nelson, O.E. 1967. A mutant gene affecting protein synthesis in the maize endosperm. *Maydica* 12:81-96.
- Nelson, O.E. 1969. Genetic modification of protein quality in plants. *Advan. Agron.* 21:171-193.
- Nelson, O.E., Mertz, E.T. e Bates, L.S. 1965. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm protein. *Science* 150:1469-1470.
- Nkonge, C. e Ballance, G.M. 1982. A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in Micro-Kjeldahl digests. *J. Agric. Food. Chem.* 30:416-420.
- Osborne, T.B. 1924. *The vegetable proteins*. 2nd Ed. Longmans, Green and Co., London, 154pp.
- Patte, J.C., Le Bras, G. e Cohen, G.N. 1967. Regulation by methionine of the synthesis of a third aspartokinase and a second homoserine dehydrogenase in *Escherichia coli* K12. *Biochim. Biophys. Acta* 136:245-257.
- Payne, P.J. e Rhoades, A.P. 1982. *Encyclopedia of Plant. Physiology Vol 14A*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg and New York.
- Paulis, J.W., Wall, J.S. e Sanderson, J. 1978. Origin of high methionine content in sugary-1 corn endosperm. *Cereal Chem.* 55:705-712.
- Paulus, H. e Gray, E. 1967. Multivalent feedback inhibition of aspartokinase in *Bacillus polymyza*. I. Kinetic studies. *J. Biol. Chem.* 242:4980-4986.
- Prioli, L.M. 1987. *Tese de doutorado-UNICAMP*.
- Rabinovitz, M. e Fisher, J.M. 1961. Formation of a ribosomal lesion in rabbit reticulocytes by the lysine antagonist S-(2-aminoethyl) cysteine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6:449.
- Rayan, J.K. 1980. Synthesis of the aspartate family and branched-chain amino acids. In: Mifflin, B.J.(ed). *The Biochemistry*

of Plants. Vol V. Amino Acids and their derivations. Academic Press, London, New York pp403.

Rognes, S.E., Lea, P.J. e Mifflin, B.J. 1980. S - Adenosylmethionine, a novel regulator of aspartate kinase. **Nature** 287:357-358.

Sainis, J., Mayne, R.G., Wallsgrove, R.M., Lea, P.J. e Mifflin, B.J. 1981. Localization and characterization of homoserine dehydrogenase isolated from barley and pea leaves. **Planta** 152:491.

Sakano, K. e Komamine, A. 1978. Change in the proportion of two aspartokinases in carrot root tissue in response to in vitro culture. **Plant Physiol.** 61:115-118.

Sane, P.V., Kochhar, S., Kumar, N. e Kochhar, V.K. 1984. **FEBS Lett.** 175:238-242.

Sano, K e Shilo, I. 1970. Microbial production of lysine. 3. Production by mutants resistant to S - aminoethylcysteine. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 16:373-391.

Schaeffer, G.W. e Sharpe JR, F.T. 1981. Lysine in seed protein from S- aminoethyl- L- cysteine resistant anther derived tissue culture of rice. **In vitro** 17:345-352.

Shatner, D.L. e Anderson, P.C. 1985. Mechanism of the action of the imidazolinones and cell culture selection of tolerant maize. **Biotechnology in Plant Science** 287-299.

Shewry, P.R. e Mifflin, B.J. 1977. Properties and regulation of aspartate kinase from barley seedling. **Plant Physiol.** 56:69-73.

Shilo, I. e Miyajima, R. 1969. Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in **Brevibacterium flavum**. **J. Biochem.** 65:849-859.

Snedecor, G.W. 1956. **Statistical methods**. Iowa State College Press, Ames, Iowa. 5th ed. 534pp.

Soave, C., Riggiani, R., Di Fonzo, N. e Salamini, F. 1981. **Genetics** 97:363.

Soave, C. e Salamini, F. 1984. **Phylosophycal Trans. R. Soc. Lond.** 304:341.

Sodek, L. e Wilson, C.M. 1970. Incorporation of Leucine-14C and Lysine-14C into protein in the developing endosperm of normal and opaque-2 corn. **Arch. Biochem. and Biophy.** 140:25-38.

Sodek, L. e Wilson, C.M. 1971. Amino acids composition of proteins isolated from normal, opaque-2 and floury-2 endosperms by a modified Osborne procedure. **Agric. Food Chem.** 19:1144.

Sreeramulu, C. e Bauman, I.f. 1970. Yield components and protein quality of opaque-2 and normal diallels of maize. **Crop Sci.**

10:262-265.

Stadtman, E.R., Cohen, E.N., Le Bras, G. e Robinchon-szulmajster H. 1961. Feedback inhibition and repression of aspartokinase activity in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 236:2033-2038.

Steward, F.C., Mapes, M.O. e Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grow from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45:705-708.

Thomas, E., King, P.J. e Potrykus, I. 1979. Improvement of crop plants via single cells in vitro an assessment. *Z. flanzarznecht* 82:1-30.

Thompson, G.A., Datko, A.H., Mudd, S.H. e Giovanelli, J. 1982. Methionine biosynthesis in Lemna. *Plant Physiol.* 69:1077.

Tosello, G.A. 1978. Milhos especiais e seus valores nutritivos. **Melhoramento e produção do milho no Brasil.** Piracicaba ESALQ. Marprint, Fundação Cargill.

Truffa-Bachi, P. 1973. Microbial aspartatokinases. In P.D. Bayer ed. **The Enzymes. Vol III,** Academic Press, New York 509-553.

Umbarger, H.E. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 47:533.

Umbarger, H.E. e Davies, B.D. 1962. Pathway of amino acids biosynthesis. In: I.C. Gunsalus and R.Y. Stanier, eds. **The Bacteria Vol III.** Academic Press, Inc., New York 167-251.

Wallsgrove, R.M. e Mazelis, M.M. 1981. Spinach leaf dihydrodipicolinate synthase: partial purification and characterization. *Phytochemistry* 20:2651-2655.

Widholm, J.M. 1972a. Cultured *Nicotiana tabacum* cells with an altered anthranilate synthetase which is less sensitive to feedback inhibition. *Biochim. Biophys. Acta.* 261:52-58.

Widholm, J.M. 1972b. Anthranilate synthetase from 5 - methyltryptophan - susceptible and -resistant cultured *Daucus carota* cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 279:48-57.

Widholm, J.M. 1976. Selection and characterization of cultured carrot and tobacco cells resistant to lysine, methionine and proline analogs. *Can. J. Bot.* 54:1523-1527.

Wilson, C.M. 1984. Isoelectric focusing of zein in agarose. *Cereal Chemistry* 61:198-200.

Wilson, C.M. e Alexander, D.P. 1967. Ribonuclease activity in normal and opaque mutant endosperm of maize. *Science* 155:1575-1576.

Wong, K.F. e Dennis, D.T. 1973a. Aspartokinase from wheat germ. *Plant Physiol.* 51:322-326.

Wong, K.F. e Dennis, D.T. 1973b. Aspartokinase in *Lemna minor* L.. Studies on the in vivo and in vitro regulation of the enzyme. **Plant Physiol.** 51:327-331.

Yamada, Y., Kompaisal, R., Hashimoto, T., Sugimoto, Y. e Suzuki, A. 1986. Growth and aspartate kinase activity in wheat cell suspension culture: Effects of lysine analogs and aspartate-derived amino acids. **Plant Cell Physiol.** 27:607-617.

Yemm, E.W. & Cocking E.C. 1975. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst** 80:209-213.