



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE RESERVA DO ARROZ SILVESTRE *Oryza glumaepatula* E
DE LINHAGENS INTERESPECÍFICAS *Oryza sativa* x *O. glumaepatula*

KARINA FREIRE D'EÇA NOGUEIRA SANTOS

Orientador: Dr. Claudio Brondani

Goiânia
2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE RESERVA DO ARROZ SILVESTRE *Oryza glumaepatula* E
DE LINHAGENS INTERESPECÍFICAS *Oryza sativa* x *O. glumaepatula*

Karina Freire d'Eça Nogueira Santos

Orientador: Dr. Claudio Brondani

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biologia, área de concentração: Biologia Molecular e Celular.

Goiânia

2010

Dedicatória

À minha mãe, pelo seu amor incondicional e ao meu pai (*in memoriam*) que sempre foi um exemplo de vida para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, ao Laercio pelo seu amor, paciência e inúmeras contribuições nesta dissertação. À toda a minha família, que sempre foi meu porto seguro.

À todos os colegas da Embrapa em especial ao João Batista, João Antônio, e a Gerusa pela enorme ajuda com as sementes utilizadas neste trabalho. Aos meus queridos amigos do laboratório de Biotecnologia, em especial ao Ricardo pela sua amizade, companheirismo e contribuições científicas.

Agradeço, ao meu orientador Dr. Claudio Brondani por sua dedicação, incentivo, competência e pela oportunidade de desenvolver este trabalho. À minha co-orientadora Dr.^a Claudia Cristina pela amizade e por todos os preciosos ensinamentos ao longo dos anos.

À Dr.^a Tereza Cristina pela prestatividade durante todo o meu mestrado.

Aos professores da Universidade Federal de Goiás pelos conhecimentos adquiridos durante as disciplinas.

A CAPES pela concessão da bolsa e a Embrapa Arroz e Feijão pela infra-estrutura necessária para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 A importância do arroz como fonte nutricional	16
3.3 A espécie silvestre <i>Oryza glumaepatula</i>	20
3.4 Proteínas	24
3.5 Proteínas de reserva dos cereais	26
3.6 Estudos proteômicos	29
3.6.1 Eletroforese SDS-PAGE e 2D-PAGE.....	29
3.6.2 Espectrometria de massa	30
3.7 Proteoma em plantas	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
5. Artigo 1: Análise quantitativa e do padrão em SDS-PAGE das proteínas de reserva do arroz silvestre nativo do Brasil <i>Oryza glumaepatula</i>	45
RESUMO	45
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	49
5.2.2 Extração das proteínas totais e das frações protéicas para análise quantitativa	52
5.2.3 Dosagens de proteínas	54
5.2.4 Preparo das amostras de proteína total para análise em eletroforese SDS-PAGE	54
5.2.5 Extração das quatro frações e preparo das amostras para análise em eletroforese SDS-PAGE	54
5.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE	57
5.2.7 Análise estatística	57
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.3.1 Análise de variância e teste de médias para os teores protéicos dos genótipos de arroz <i>O. glumaepatula</i>	59
5.3.2 Análise de Ward	62
5.3.3 Análise qualitativa por eletroforese SDS-PAGE das proteínas totais dos 29 genótipos de arroz <i>O. glumaepatula</i>	65
5.3.4 Análise qualitativa por eletroforese SDS-PAGE das frações protéicas de 12 genótipos representativos de <i>O. glumaepatula</i>	71
5.4 CONCLUSÕES.....	78
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
6. ARTIGO 2: Análise quantitativa e de SDS-PAGE das proteínas de reserva de linhagens interespecíficas <i>Oryza sativa</i> x <i>Oryza glumaepatula</i>	83
RESUMO	83
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	87

6.2.1 Material vegetal.....	87
6.2.3 Dosagens de proteínas.....	91
6.2.4 Preparo das amostras de proteína total para análise em eletroforese	91
6.2.5 Extração das quatro frações e preparo das amostras para análise em eletroforese	91
6.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE	92
6.2.7 Análise estatística.....	93
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
6.3.1 Análise de variância e teste de médias para as proteínas totais e frações protéicas das linhagens interespecíficas.....	94
6.3.3 Análise qualitativa por SDS-PAGE das frações albumina, globulina, prolamina e glutelina das linhagens interespecíficas	105
6.4 CONCLUSÕES.....	112
6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de cromossomos, espécie, genoma e distribuições do gênero <i>Oryza</i>	23
Tabela 2. Mapa proteômico disponível em bancos de dados de arroz.....	33
Tabela 1. Relação dos 29 genótipos, espécie e o local de origem dos materiais silvestres de arroz.....	51
Tabela 2. Relação dos teores de proteína total e frações protéicas dos 29 genótipos de arroz silvestre <i>O. glumaepatula</i> e dos controles <i>O. sativa</i> Primavera e BRS Bonança.....	60
Tabela 3. Análise descritiva e resumo da análise de variância dos 29 genótipos silvestres de arroz <i>O. glumaepatula</i>	61
Tabela 4. Relação das α -glutelinas de diferentes massas moleculares de 29 genótipos silvestres de arroz <i>O. glumaepatula</i> e dos controles <i>O. sativa</i> Primavera e BRS Bonança.....	70
Tabela 1. Relação das 34 Linhagens interespecíficas do cruzamento BG 90-2 x RS-16 e relação das 36 Linhagens interespecíficas do cruzamento CICA-8 x RS-16.....	88
Tabela 2. Relação dos teores protéicos presentes nas linhagens interespecíficas <i>O. sativa</i> BG 90-2 x <i>O. glumaepatula</i> RS-16.....	95
Tabela 3. Análise descritiva e resumo da análise de variância das linhagens interespecíficas do cruzamento <i>O. sativa</i> BG90-2 x <i>O. glumaepatula</i> RS-16.....	96
Tabela 4. Relação dos teores protéicos presentes nas linhagens interespecíficas <i>O. sativa</i> CICA-8 x <i>O. glumaepatula</i> RS-16.....	97
Tabela 5. Análise descritiva e resumo da análise de variância das linhagens interespecíficas do cruzamento: <i>O. sativa</i> CICA-8 x <i>O. glumaepatula</i> RS-16.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência dos aminoácidos em sua estrutura primária.....	25
Figura 2. Níveis de estruturação das proteínas.....	26
Figura 3. Localização intracelular dos corpos protéicos I e II através do método de microscopia imunoelétrica.....	28
Figura 1. Exemplo da variabilidade de sementes de arroz com casca, sem casca e polidas de populações de <i>O. glumaepatula</i> utilizadas neste trabalho.....	49
Figura 2. Pontos de coleta no Brasil de populações da espécie silvestre de arroz <i>O. glumaepatula</i> utilizadas neste trabalho.....	50
Figura 3. Fluxograma da metodologia de extração de proteína total e frações protéicas.....	53
Figura 4. Fluxograma da extração das frações protéicas para análise em SDS-PAGE.....	56
Figura 5. Dendrograma gerado pelo método de Ward.....	64
Figura 6. Eletroforese SDS-PAGE de proteína total extraída das sementes dos genótipos silvestres de arroz <i>O. glumaepatula</i> e das cultivares <i>O. sativa</i> BRS Bonança e Primavera.....	67
Figura 7. Imagem comparativa entre três genótipos <i>O. glumaepatula</i> e a espécie <i>O. sativa</i>	67
Figura 8. Eletroforese SDS-PAGE de proteína total extraída das sementes dos genótipos silvestres de arroz <i>O. glumaepatula</i>	68
Figura 9. Eletroforese SDS-PAGE de proteína total extraída das sementes dos genótipos silvestres de arroz <i>O. glumaepatula</i>	69
Figura 10. Eletroforese SDS-PAGE da fração albumina extraída da semente de arroz <i>O. glumaepatula</i> e <i>O. sativa</i>	74
Figura 11. Eletroforese SDS-PAGE da fração globulina extraída da semente de arroz <i>O. glumaepatula</i> e <i>O. sativa</i>	75
Figura 12. Eletroforese SDS-PAGE da fração prolamina extraída da semente de arroz <i>O. glumaepatula</i> e <i>O. sativa</i>	76
Figura 13. Eletroforese SDS-PAGE da fração glutelina extraída da semente de arroz <i>O. glumaepatula</i> e <i>O. sativa</i>	77
Figura 14. Imagem comparativa entre cinco genótipos <i>O. glumaepatula</i> e a espécie <i>O. sativa</i>	77
Figura 1: Sementes do arroz cultivado BG 90-2, sementes do arroz silvestre e das linhagens interespecíficas.....	89
Figura 2: Sementes de arroz cultivado CICA-8, sementes de arroz silvestre e sementes das linhagens interespecíficas.....	89
Figura 3. Comparação das médias dos maiores teores protéicos encontrados nos cruzamentos interespecíficos e nas frações protéicas de seus parentais.....	100
Figura 4. Eletroforese SDS-PAGE de proteína total extraída das sementes de linhagens interespecíficas e de seus parentais BG90-2 e RS-16.....	103
Figura 5. Eletroforese SDS-PAGE de proteína total extraída das sementes de linhagens interespecíficas e de seus parentais CICA-8 e RS-16.....	104
Figura 6. Eletroforese SDS-PAGE da fração albumina extraída das sementes de linhagens interespecíficas e de seus parentais.....	107
Figura 7. Eletroforese SDS-PAGE da fração globulina extraída das sementes de linhagens interespecíficas e de seus parentais.....	108
Figura 8. Eletroforese SDS-PAGE da fração prolamina extraída das sementes de linhagens interespecíficas e de seus parentais.....	109

Figura 9. Eletroforese SDS-PAGE da fração glutelina extraída das sementes de linhagens interespecíficas e de seus parentais.....	110
Figura 10. Eletroforese SDS-PAGE das frações protéicas extraídas do endosperma do arroz.....	111

RESUMO

O objetivo desta dissertação foi analisar quantitativa e qualitativamente proteínas de reserva totais e as frações albumina, globulina, prolamina e glutelina presentes no grão de 29 genótipos de arroz silvestre *Oryza glumaepatula* e de 70 linhagens interespecíficas Retrocruzamento 2 desenvolvidas a partir do cruzamento *O. sativa* x *O. glumaepatula*. Destas linhagens, 34 (RC2F8) foram obtidas do cruzamento *O. sativa* BG90-2 x *O. glumaepatula* RS-16, e 36 (RC2F10) foram desenvolvidas a partir do cruzamento *O. sativa* CICA-8 x *O. glumaepatula* RS-16. Através da análise de variância para o teor de proteína total e frações protéicas, foram encontradas diferenças altamente significativas ($P < 0,01$) entre os genótipos silvestres e entre as linhagens interespecíficas. O teor médio de proteína total dos genótipos silvestres foi de 12,17%, enquanto as linhagens do cruzamento BG90-2 x RS-16 apresentaram média de 7,05% e as linhagens do cruzamento CICA-8 x RS-16 apresentaram média de 8,40%. O genótipo silvestre BGA14280 destacou-se por apresentar o maior teor de proteína total (14,94%). Na análise comparativa envolvendo as linhagens interespecíficas e seus parentais, foram encontradas cinco linhagens com maior conteúdo de proteína total (teor médio de 10,95%), sendo significativamente superiores aos parentais cultivados BG 90-2 (10,0%) e CICA-8 (9,61%). No entanto, essas linhagens apresentaram teor inferior ao parental silvestre RS-16 (14,06%). Em relação às frações protéicas, 40 linhagens interespecíficas apresentaram valores mais elevados em relação aos seus parentais, exceto em uma ocasião, onde o parental silvestre RS-16 apresentou alto teor de glutelina. Entre os 29 genótipos silvestres, foram encontrados os maiores teores de albumina, prolamina e glutelina, exceto para a fração globulina, onde o genótipo silvestre BGA14162 não diferiu significativamente da cultivar BRS Bonança. A análise de SDS-PAGE da proteína total e da fração glutelina foi encontrada um perfil diferencial de α -glutelinas entre os genótipos silvestres, com destaque para o genótipo BGA14232 que não apresentou α -polipeptídeos comuns aos demais genótipos. Entre as linhagens interespecíficas e os seus parentais, foram encontrados perfis de proteína total e α -glutelinas bastante similares, havendo diferença em relação a α -glutelina de 40 kDa presentes apenas no parental silvestre RS-16, o que pode indicar uma constituição protéica diferencial em *O. glumaepatula*, já que a *O. sativa* apresentou α -glutelinas de 39 kDa. Em relação às frações albumina, globulina e prolamina os genótipos silvestres apresentaram um perfil protéico diferenciado comparado às linhagens interespecíficas e o arroz cultivado, e a provável causa foram os dois cruzamentos em direção à BG90-2 e CICA-8, que foram os parentais recorrentes durante o desenvolvimento das linhagens interespecíficas. Os maiores teores de proteína encontrados para a espécie *O. glumaepatula*, os diferentes perfis protéicos e a identificação de linhagens interespecíficas com maior conteúdo protéico em relação aos parentais cultivados, deixam claro a contribuição favorável desta espécie para o melhoramento visando o aumento do valor nutricional do grão do arroz cultivado no Brasil.

ABSTRACT

The objective of this dissertation was to analyze quantitative and qualitatively the total storage protein content and its fractions albumin, globulin, prolamin and glutelin from the grain of 29 genotypes of the wild rice *Oryza glumaepatula* and 70 interspecific lines backcross 2 obtained from the cross *O. sativa* x *O. glumaepatula*. From these lines, 34 BC2F8 were obtained from the cross *O. sativa* BG 90-2 x *O. glumaepatula* RS-16 and 36 BC2F10 were obtained from the cross *O. sativa* CICA-8 x *O. glumaepatula* RS-16. From the analysis of variance for the total protein content and its fractions, it were found highly significant differences ($P < 0.01$) between the wild genotypes and the interspecific lines. The average of total protein content of wild genotypes was 12.17%, whereas the lines of BG 90-2 x RS-16 showed an average of 7.05% and the lines of CICA-8 x RS-16 showed an average of 8.40%. The wild genotype BGA14280 showed the highest total protein content (14.94%). In the comparative analysis of interspecific lines and their parents, it were found five lines with higher total protein content (average of 10.95%), which was significantly superior to the cultivated parent BG 90-2 (10.0%) and CICA-8 (9.61%). However, these lines showed lower content in relation to the wild parent RS-16 (14.06%). In relation to the protein fractions, 40 interspecific lines showed higher values in relation to their parents, excepting in one occasion, where the wild parent RS-16 showed higher value to the glutelin fraction. Considering the 29 wild genotypes, it were found the highest contents of albumin, prolamin and glutelin, excepting to the globulin fraction, where the wild genotype was not significantly different from the cultivar BRS Bonança. The SDS-PAGE analyses of the total protein and the glutelin fraction showed a differential profile of α -glutelins for the wild genotypes, emphasizing the BGA14232 genotype, which did not showed the α -polypeptides commonly identified in the remaining genotypes. Considering the interspecific lines and their parents, it was found similar profile of total protein and α -globulins, with differences in relation to the 40 kDa α -glutelin, which was found just in the wild parent RS-16, indicating a differential expression in *O. glumaepatula*, since the *O. sativa* showed a 39 kDa α -glutelin. In relation to albumin, globulin and prolamin fractions, the wild genotypes showed a different protein profile in comparison to the interspecific lines and the cultivated rice, probably due to the two crosses in direction to BG 90-2 and CICA-8, which were the recurrent parents during the interspecific lines development. The highest protein content found to the *O. glumaepatula*, the different protein profile and the finding of interspecific lines with higher protein content in relation to their cultivated parents clearly show the positive contribution of this species to the genetic breeding aiming the increase of the nutritional value for the grain of the cultivated rice in Brazil.

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é produzido em mais de 100 países e representa mais de 25% da produção mundial de grãos (HERNANDEZ et al., 2000). A China é o maior produtor mundial de arroz, e a sua produção atinge 187 milhões de toneladas por ano. O Brasil é o maior produtor da América Latina e o décimo maior produtor mundial, com produção anual de 11 milhões de toneladas (FAO, 2007). Além disso, o arroz é consumido por cerca de 60% da população mundial e em países em desenvolvimento é a principal fonte de proteínas e carboidratos (KAWAKATSU et al., 2008). No Brasil, o arroz é responsável por 14% da energia e 10% da proteína consumidas diariamente pela população (NAVES & BASSINELLO, 2006).

As proteínas de reserva e o amido são armazenados no endosperma do arroz, e durante a germinação das sementes são utilizados como fonte de nitrogênio e carbono (KAWAKATSU et al., 2008). Dentro do endosperma do arroz são encontradas estruturas especiais, denominadas de corpos protéicos, onde ficam armazenadas essas proteínas de reserva (CAGAMPANG et al., 1966; LASZTITY, 1996). Existe uma grande variação no conteúdo protéico da semente do arroz. Segundo Cao et al.,(2009), o teor de proteína total encontrado em variedades chinesas de arroz (*O. sativa*) variou entre 7,4 a 15,4%. Já Lumen & Chow (1995) encontraram valores que variaram de 4,3 a 18,2%. Essa grande variação é esperada pois, além da diferença genotípica, existem variações ambientais como radiação solar, temperatura e a adubação nitrogenada, que interferem no crescimento e no teor protéico do endosperma da semente (JULIANO & BECHTEL, 1985).

Existem quatro principais classes de proteínas de reserva no arroz - albumina, globulina, prolamina e glutelina, e essas proteínas são isoladas e caracterizadas pelo método de Osborne (1924) de acordo com suas diferentes solubilidades (MARSHALL & WADSWORTH, 1994). A glutelina é a principal fração do arroz, correspondendo a cerca de 80% da proteína total do endosperma (CAGAMPANG et al., 1966; YAMAGATA et al., 1982), enquanto a albumina corresponde a cerca de 5%, globulina 10% e prolamina de 5 a 8% do conteúdo protéico do grão (TAIRA, 1995; SGARBIERI, 1996). O valor nutricional da glutelina é superior ao da prolamina e da globulina por possuir maior teor do aminoácido essencial lisina (OGAWA et al.,1987; TANAKA et al., 1975; TANAKA, et al., 1980). Porém, a glutelina contém menores teores de

lisina, em relação à fração albumina. Isso significa que um aumento da concentração protéica total pode causar uma redução na proporção de lisina na proteína do grão (TAIRA, 1995; SGARBIERI, 1996)

Existem duas espécies de arroz cultivado, *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima*, e 21 espécies silvestres do gênero *Oryza*. A espécie *O. sativa* começou a ser cultivada na China e depois passou a ser amplamente cultivado em diversos países. A espécie *O. glaberrima* é cultivada em uma pequena região do Oeste da África (KHUSH, 1997). As espécies silvestres do gênero *Oryza* são encontradas em diferentes habitats como savanas, florestas, montanhas, rios e lagos (VAUGHAN, 2003). Quanto à localização geográfica, são encontradas dez espécies silvestres na Ásia, cinco na África, duas na Austrália e quatro na América (OLIVEIRA et al., 1991). Dentre as quatro espécies americanas (*O. glumaepatula*, *O. alta*, *O. grandiglumis* e *O. latifolia*) apenas a *O. glumaepatula* possui o genoma diplóide, o que torna viável seu cruzamento com a espécie cultivada *O. sativa*, resultando em descendentes férteis (BRONDANI et al., 2001; BRONDANI et al., 2005).

A partir da década de 1990 começaram os estudos de introgressões de genes de espécies silvestres do gênero *Oryza* para o arroz cultivado *Oryza sativa* por meio de cruzamentos interespecíficos (BRAR et al., 1996; JENA et al., 1990; MULTANI et al., 1994). Segundo Mahmoud et al., (2008), as espécies silvestres são reservatórios de variabilidade genética podendo transferir para a espécie cultivada características como resistência a doenças, melhoria da produtividade, aumento do teor protéicos do grão, entre outras características. No Brasil, o desenvolvimento de linhagens interespecíficas *O. sativa* x *O. glumaepatula* iniciou em 1995 (BRONDANI et al., 2001). Nestas linhagens foram identificadas características de interesse agrônomo como rápido crescimento vegetativo e maior potencial produtivo (BRONDANI et al., 2002). Linhagens interespecíficas derivadas destes cruzamentos estão disponíveis para uso em programas de melhoramento do arroz no Brasil (RANGEL et al., 2007).

Os principais objetivos desta dissertação foram quantificar as proteínas de reserva total, frações protéicas (albumina, globulina, prolamina e glutelina) e determinar os perfis protéicos por eletroforese SDS-PAGE em acessos de *Oryza glumaepatula* e linhagens derivadas de cruzamentos interespecíficos. Esta dissertação foi dividida em dois artigos. No primeiro artigo foram quantificadas as proteínas de reserva presentes em vinte nove genótipos de *Oryza*

glumaepatula e determinados os seus perfis protéicos por eletroforese SDS-PAGE. No segundo artigo foram determinados os perfis protéicos e análise quantitativa das proteínas de reserva de linhagens interespecíficas derivadas dos cruzamentos *O. glumaepatula* RS-16 x *O. sativa* BG90-2 e *O. glumaepatula* RS-16 x *O. sativa* CICA-8.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar as análises quantitativa e qualitativa das proteínas de reserva da espécie silvestre *Oryza glumaepatula* e de linhagens interespecíficas derivadas dos cruzamentos *O. glumaepatula* x *O. sativa*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as proteínas de reserva totais de genótipos de *Oryza glumaepatula* provenientes dos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Amazonas e Roraima;
- Analisar as proteínas de reserva de linhagens interespecíficas derivadas dos cruzamentos *O. sativa* BG 90-2 x *O. glumaepatula* RS-16 e *O. sativa* CICA-8 x RS-16;
- Separar e quantificar as frações protéicas albumina, globulina, prolamina e glutelina dos acessos silvestres e das linhagens interespecíficas.
- Realizar a análise qualitativa por eletroforese SDS-PAGE das proteínas de reserva totais e dessas frações protéicas;
- Comparar, por meio das análises quantitativa e qualitativa das proteínas de reserva do grão, cultivares de *O. sativa*, genótipos de *O. glumaepatula*, e linhagens interespecíficas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A importância do arroz como fonte nutricional

A desnutrição é apontada como a responsável direta pelos maiores índices de morbidade e mortalidade em todo o mundo (WAITZBERG, 2001). Segundo dados da OMS (2000) a desnutrição energético-proteica afeta o mundo todo e cerca de 150 milhões de crianças estão abaixo do peso. Geograficamente, mais de 70% das crianças desnutridas vivem na Ásia, 26% vivem na África e 4% na América Latina e no Caribe. Muitas crianças já nascem desnutridas devido à desnutrição de suas mães. A desnutrição é um termo que se refere a distúrbios clínicos que resultam da carência de proteínas e energia no organismo (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998). Indivíduos desnutridos pela falta de ingestão adequada de proteína apresentam o sistema imune deprimido, o que pode levar à morte por infecções secundárias (CHAMPE & HARVEY, 2000).

Os países desenvolvidos consomem uma ampla variedade de fontes nutricionais. No entanto, essa não é a realidade de países menos desenvolvidos o qual uma única fonte nutricional é responsável por grande parte ou por todo o conteúdo protéico diário (SHEWRY, 2007). Assim é necessária a busca por fontes alternativas de nutrientes, como o estudo do valor protéico de alimentos de origem vegetal, que podem servir como suplemento alimentar na dieta dessas populações mais carentes (MADRUGA et al., 2004). Segundo Friedman (1996) e Galland-Irmouli et al., (1999), 80% das proteínas vegetais são consumidas pela população de países em desenvolvimento. Entre as fontes vegetais protéicas para o consumo humano, os grupos mais importantes de alimentos são os cereais e as leguminosas (YOUNG & PELLETT, 1994).

Segundo dados da FAO (2007) os principais cereais produzidos no mundo são o milho (791 milhões de toneladas), o arroz (659 milhões de toneladas) e o trigo (605 milhões de toneladas). Além disso, esses cereais constituem a base da alimentação humana, contribuindo com cerca da metade da ingestão energética e protéica dos indivíduos (YOUNG & PELLETT, 1994). Os cereais apresentam uma quantidade menor de proteína de reserva (cerca de 10-12%) em comparação as sementes de leguminosas (20-40%). No entanto, pelo fato dos cereais serem mais consumidos, fornecem mais de 200 milhões de toneladas de proteína para a alimentação de

humanos e animais, correspondendo cerca de três vezes mais o montante de proteínas fornecidas por sementes de leguminosas (SHEWRY & HALFORD, 2001).

Os cereais podem ser consumidos sobre a forma de semente, como o arroz e o milho, ou então podem ser utilizados no processamento de outros alimentos. O trigo, por exemplo, é amplamente utilizado na fabricação de pães e outros produtos alimentícios. A soja, embora seja menos consumida para alimentação humana, possui alto teor do aminoácido essencial lisina e por isso a sua farinha tem sido acrescentada na fabricação de alimentos (INDRANI et al., 1997 e DHINGRA et al., 2001).

A China é o maior produtor de arroz (*Oryza sativa*) do mundo. A sua produção atinge 187 milhões de toneladas (FAO, 2007). O Brasil é o maior produtor de arroz da América Latina e o décimo maior produtor mundial, com produção anual de 11 milhões de toneladas. O arroz é consumido por cerca de 60% da população mundial e em países em desenvolvimento é a principal fonte de proteínas e carboidratos (KAWAKATSU et al., 2008). No arroz são encontrados carboidratos complexos, como o amido, que possuem absorção lenta e por isso são capazes de prover o organismo com energia por períodos prolongados (BASSINELLO & NAVES, 2006). Além disso, entre os cereais, o arroz é o que possui maior teor de vitamina B6 (piridoxina) e carotenóides com atividade pró-vitâmica (FAO, 2004).

A qualidade nutricional protéica é determinada pela proporção de aminoácidos essenciais, o qual não é sintetizado pelos animais e que por isso deve ser requerido na dieta alimentar. Dez aminoácidos são estritamente essenciais: lisina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina, treonina, triptofano, valina, histidina e metionina. No entanto, a cisteína também é muitas vezes incluída por ser sintetizada a partir da metionina. Fontes nutricionais limitadas a poucos tipos de aminoácidos restringem a disponibilidade de nitrogênio no organismo comprometendo o seu funcionamento (SHEWRY, 2007). A proteína do arroz é considerada de boa qualidade, porque contém oito dos dez aminoácidos essenciais ao homem. Em termos nutricionais o arroz possui um perfil de aminoácidos essenciais mais adequados em comparação ao milho e o trigo, por possuir alto teor do aminoácido essencial lisina, fornecendo alta digestibilidade e consequentemente alta qualidade nutricional (NALIVKO et al., 1975; HUEBNER et al., 1990). Ainda quando combinado com leguminosas, como o feijão, ou com proteína animal, como o leite ou carne, torna-se uma fonte protéica mais valiosa (GOMEZ & DE DATTA, 1975; NANDA &

COFFMAN, 1979). A tradicional mistura brasileira de arroz com feijão, resulta em um aumento protéico acima de 80% em relação ao consumo isolado do arroz (JOSEPH & SWANSON, 1993). Isso ocorre devido à complementaridade de diferentes aminoácidos encontrados em leguminosas e nos cereais (YOUNG & PELLETT, 1994). Nesse sentido, o arroz constitui uma boa fonte de proteína quando complementado com quantidades similares de proteínas de leguminosas (NAVES et al., 2004).

Além disso, o arroz é importante na dieta da população mundial por representar cerca de 20% do aporte energético e 15% do aporte protéico. No Brasil, o arroz é responsável por 14% da energia e 10% da proteína consumidas diariamente pela população (NAVES & BASSINELLO, 2006). Além desses aspectos positivos sobre o valor nutricional do arroz, o aumento do seu teor protéico é especialmente importante, sobretudo para a população de baixa renda, como ocorre em certas áreas da Ásia, onde o consumo do arroz representa mais da metade do consumo de energia e proteína dessas populações (KENNEDY & BURLINGAME, 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) uma dieta saudável deve conter mais metade de sua energia proveniente dos carboidratos e apenas 30%, no máximo, proveniente de lipídios (NAVES & BASSINELLO, 2006). Isto reforça o conceito de que o arroz é um alimento importante, pois apresenta em sua composição grande parte de carboidratos (80%) e apenas 0,5% de lipídios (NAVES & BASSINELLO, 2006). Por isso, o arroz é considerado um alimento saudável, cujo consumo é recomendável em países em desenvolvimento como o Brasil, devido à elevada prevalência de obesidade e doenças cardiovasculares nessas populações (SICHERI et al., 2000).

A caracterização adequada dos recursos genéticos de arroz quanto ao seu valor protéico é o primeiro passo para identificar os genótipos superiores que serão utilizados como genitores por programas de melhoramento genético para a transferência desta característica a futuras cultivares comerciais, aumentando o valor nutricional do arroz, importante sobretudo para a população de baixa renda.

3.2 O gênero *Oryza*

O gênero *Oryza* surgiu há cerca de 130 milhões de anos e disseminou-se como uma gramínea silvestre por todo o supercontinente de Gondwana que posteriormente separou-se originando os Continentes Asiático, Africano, Americano, Australiano e Antártico. Ainda hoje, é possível encontrar o gênero *Oryza* distribuído por todos esses continentes, exceto na Antártica (KHUSH, 1997).

Há mais de 10.000 anos, os humanos começaram a consumir a espécie de arroz *Oryza rufipogon*, uma gramínea silvestre que crescia em pântano por toda a Ásia tropical e subtropical. Os primeiros agricultores, lentamente através de processos contínuos de seleção para características desejáveis, obtiveram plantas com características diferenciadas dessa espécie silvestre de arroz, originando uma nova espécie *Oryza sativa* (KHUSH, 1997). Inúmeros estudos genéticos utilizando marcadores moleculares e análises filogenéticas mostram que as cultivares de *O. sativa* são mais estreitamente relacionadas com *O. rufipogon* do que outras espécies do gênero *Oryza*, comprovando a ligação entre essas espécies (LU et al., 2002; RAKSHIT et al., 2007).

Segundo estudos arqueológicos o arroz (*O. sativa*) começou a ser domesticado no vale do rio Yangtze, na China (NORMILE, 1997). A partir da Ásia, o arroz foi introduzido na Grécia e posteriormente na Europa, onde somente no século XV passou a ser cultivado em maior escala (KHUSH, 1997). No Brasil, antes da chegada dos portugueses, populações indígenas utilizavam a espécie silvestre *Oryza glumaepatula* para a sua alimentação. Por volta de 1550, os portugueses introduziram o arroz cultivado *O. sativa* em terras brasileiras (PEREIRA, 2002).

Segundo Chang (1976) o gênero *Oryza* está classificado na tribo Oryzeae, subfamília Oryzoideae, família Poacea (Graminae). Este gênero possui 21 espécies silvestres e duas espécies cultivadas *Oryza sativa* e *O. glaberrima* (KHUSH, 1997 & VAUGHAN et al., 2003). A espécie *O. sativa* é originária do continente Asiático, e ocupa a maior parte da área cultivada do mundo (JOSHI et al., 2000). Segundo Kush e Brar (2002) esta espécie representa mais de 90% do arroz cultivado. Já a espécie *O. glaberrima*, originária do continente Africano, é cultivada apenas em uma área limitada da África (JOSHI et al., 2000).

A espécie *O. sativa* pode ser representada por dois grupos geneticamente distintos, que formam as subespécies *indica* e *japonica*. Estas subespécies originaram-se a partir da espécie silvestre *O. rufipogon* e posteriormente, devido à adaptabilidade ambiental diferenciada, teriam surgido variações morfológicas que ocasionaram inúmeras barreiras reprodutivas levando a formação dessas duas subespécies (LU et al., 2002; WANG, 1984; OKA & MORISHIMA, 1982; HARUSHIMA et al., 2002). A subespécie *japonica* é largamente cultivada nas zonas temperadas (Taiwan, Coréia, Japão, parte da Austrália, Califórnia, Europa e Egito), por possuírem alta capacidade de sobrevivência em áreas não irrigadas. Possuem colmos curtos e rígidos, mediana capacidade de perfilhamento, folhas escuras e eretas e ciclo precoce (PINHEIRO, 1998). No Brasil, a maioria das cultivares do sistema de cultivo de sequeiro são da subespécie *japonica*. As variedades de arroz irrigado cultivadas no Brasil pertencem ao grupo *indica* e possuem características morfológicas como colmos longos, alta capacidade de perfilhamento, folhas longas e decumbentes e ciclo tardio (DALRYMPLE, 1986).

3.3 A espécie silvestre *Oryza glumaepatula*

Tateoka, (1963) analisou diversas espécies do gênero *Oryza* e sugeriu, de forma a facilitar o estudo dessas espécies, dividi-las em complexos. Assim segundo Vaughan et al., (2005), o gênero *Oryza* pode ser dividido em quatro complexos: *O. sativa* (AA), *O. officinalis* (BB, CC, BBCC, CCDD, EE), *O. ridleyi* (HHJJ) e *O. granulata* (GG). As espécies do complexo *O. sativa* são todas diplóides (AA) e incluem espécies como: *O. glumaepatula*, *O. nivara*, *O. meridionalis*, *O. rufipogon*, *O. breviligulata*, *O. glaberrima*, *O. barthi*, *O. longistaminata* e *O. sativa* (AGGARAWAL et al., 1997; YAN et al., 1999). O complexo *O. officinalis* é representado pelas espécies *O. minuta* (BBCC), *O. australiensis* (EE), *O. alta* (CCDD), *O. grandiglumis* (CCDD), *O. latifolia* (CCDD), *O. officinalis* (CC), *O. rhizomatis* (CC), *O. eichingeri* (CC), *O. punctata* (BB ou BBCC) e *O. malapuzhaensis* (BBCC). As espécies *O. granulata* e *O. meyeriana* possuem genoma GG e são agrupadas no complexo *O. granulata*. O complexo *O. ridleyi* é formado pelas espécies *O. longiglumis* e *O. ridleyi*, ambas com genoma HHJJ. As espécies *O. schlechteri* e *O. brachyantha* não são agrupadas em nenhum destes complexos, pois apresentam características que poderiam classificá-las como pertencentes a outro gênero (*Leersia*) e, portanto, estariam no

limite da classificação do gênero *Oryza* (VAUGHAN et al., 2003; VAUGHAN et al., 2005) (Tabela 1).

Essas espécies silvestres do gênero *Oryza* estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (MORISHIMA, 1994). Sendo que, dez espécies silvestres habitam a Ásia, cinco a África, duas a Austrália e quatro a América. Todas as quatro espécies americanas (*O. glumaepatula*, *O. alta*, *O. grandiglumis* e *O. latifolia*) que estão distribuídas do México até o norte da Argentina, existem no Brasil e são hidrófitas (OLIVEIRA et al., 1991). A espécie *O. glumaepatula* é encontrada também na Bolívia, Colômbia, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, Guiana Francesa, Guiana, Honduras, México, Panamá, Suriname e Venezuela (IRRI, 2005). No Brasil, ela ocorre nas regiões Norte, ocupando a região da Bacia Amazônica, e Centro-Oeste, sendo encontrada no Pantanal Mato-Grossense e no Cerrado Goiano (BUSO et al., 2001).

O Brasil é um dos poucos países que ainda dispõem de populações extensivas de germoplasma silvestre de arroz em condições naturais (RANGEL et al., 1996). Assim, a Embrapa Arroz e Feijão, juntamente com outras instituições de pesquisa, realizaram sete expedições de coleta as espécies silvestres de arroz no Brasil. Essas expedições ocorreram entre o período de 1992 e 2002. As coletas exploraram as bacias do Rio Negro e do Rio Solimões (ambas na Região Amazônica), Pantanal Matogrossense, Bacia do Rio Paraguai (no Pantanal Norte em torno das cidades de Cáceres e Poconé, e no Pantanal Sul em Corumbá). No estado de Goiás foram exploradas as veredas (áreas de várzeas que ocorrem nos Cerrados, totalmente isoladas das bacias dos grandes rios) onde foi verificada apenas a presença de *O. glumaepatula* e, em alguns locais, constatou-se que essa espécie corre sérios riscos de extinção devido à expansão da agricultura e pecuária no Cerrado goiano. Nessas expedições foram coletados 136 acessos das espécies silvestres *O. glumaepatula*, *O. grandiglumis*, *O. alta* e *O. latifolia* (FONSECA et al., 2006).

Dentre as quatro espécies que ocorrem no continente Americano, *Oryza glumaepatula* tem despertado maior interesse, especialmente no que diz respeito à sua conservação e utilização como reservatório gênico por possuir o genoma diplóide, o que torna viável seu cruzamento com a espécie cultivada *O. sativa*, resultando em descendentes férteis, além de estar adaptada a condições edafoclimáticas brasileiras (BRONDANI et al., 2001; BRONDANI et al., 2005).

O aumento da produtividade tem sido um dos principais alvos dos programas de melhoramento de arroz. Porém, o ganho de produtividade obtido pelos programas de melhoramento tem sido pequeno e está intimamente relacionado com o estreitamento da base genética das cultivares modernas de arroz (RANGEL et al., 1996; TANKSLEY & NELSON, 1996). Este estreitamento advém da utilização de genitores geneticamente relacionados nos programas de melhoramento para a obtenção de novas linhagens (MONCADA et al., 2001). Segundo Rangel et al., (1996), no Brasil, apenas dez genitores são responsáveis por 68% do “pool” gênico das variedades mais plantadas de arroz. Como consequência, este cereal atingiu o seu platô de produtividade e o ganho obtido pela seleção está em declínio. Diversos estudos reportam ganhos genéticos para a produtividade de grãos menores que 1% nos programas de melhoramento do arroz irrigado conduzidos no Brasil (SOARES et al., 1994; BRESEGHELLO et al., 1999; SANTOS et al., 1999; RANGEL et al., 2000). Logo, o uso de materiais geneticamente distintos do arroz cultivado, como genótipos exóticos (espécies silvestres e variedades tradicionais de arroz), é imprescindível para a ampliação da base genética desta cultura. Neste caso, estes materiais seriam utilizados em cruzamentos amplos com o arroz cultivado, incorporando nova variabilidade genética, e derivando linhagens de base genética ampla, as quais seriam utilizadas pelo programa de melhoramento no desenvolvimento de novas cultivares comerciais (BRONDANI et al., 2002).

No Brasil, o desenvolvimento de linhagens interespecíficas *O. sativa* x *O. glumaepatula* iniciou em 1995 (BRONDANI et al., 2001). Nestas linhagens foram identificadas características de interesse agrônomo como rápido crescimento vegetativo e potencial produtivo (BRONDANI et al., 2002). Linhagens interespecíficas derivadas destes cruzamentos estão disponíveis para uso de programas de melhoramento do arroz no Brasil (RANGEL et al., 2007).

Tabela 1. Número de cromossomos, espécie, genoma e distribuições do gênero *Oryza*.

Espécie	Número de cromossomos	Genoma	Distribuição
Complexo <i>O. sativa</i>			
<i>O. sativa</i> L.	24	AA	Mundial
<i>O. nivara</i> Sharma et Shastry	24	AA	Ásia tropical e subtropical
<i>O. rufipogon</i> Griff	24	AA	Ásia tropical e subtropical
<i>O. breviligulata</i> A. Chev. et Roehr	24	AA	África
<i>O. glaberrima</i> Steud	24	AA	Oeste da África
<i>O. barthii</i> A. Chev.*	24	AA	- *
<i>O. longistaminata</i> A. Chev. Et Roehr	24	AA	África
<i>O. meridionalis</i> Ng	24	AA	Austrália Tropical
<i>O. glumaepatula</i> Steud	24	AA	América Central e do Sul
Complexo <i>O. officinalis</i>			
<i>O. minuta</i> J.S.Pels. ex C.B.Presl.	48	BBCC	Filipina e Papua Nova Guiné
<i>O. officinalis</i> Wall ex Watt	24	CC	Ásia tropical e subtropical, Austrália tropical
<i>O. rhizomatis</i> Vaughan	24	CC	Sri Lanka
<i>O. eichingeri</i> A. Peter	24	CC	Sul da África e Leste da África
<i>O. latifolia</i> Desv.	48	CCDD	América central e do Sul
<i>O. alta</i> Swallen	48	CCDD	América central e do Sul
<i>O. grandiglumis</i>	48	CCDD	América central e do Sul
<i>O. punctata</i> Kotschy ex Steud.	24, 48	BB, BBCC	África
<i>O. australiensis</i> Domin.	24	EE	Austrália Tropical
<i>O. malapuzhaensis</i> Krishnaswamy e Chandrasakaran*	48	BBCC	- *
Complexo <i>O. granulata</i>			
<i>O. granulata</i> Nees et Arn ex Watt	24	GG	Sul e sudeste da Ásia
<i>O. meyeriana</i> (Zoll. Et Mor. ex Steud) Baill	24	GG	Sudestes da Ásia
Complexo <i>O. ridleyi</i>			
<i>O. longiglumis</i> Jansen	48	HHJJ	Indonésia, Irian Jaya e Papua-Nova Guiné
<i>O. ridleyi</i> Hook.f.	48	HHJJ	Sul da Ásia
Genoma desconhecido/ <i>Ridleyanae</i>			
Tateoka			
<i>O. schlechteri</i> Pilger**	48	- **	Papua Nova Guiné
Brachyantha B.R. Lu			
<i>O. brachyantha</i> A. Chev et Roehr	24	FF	África

Fonte: Modificado de Khush, 1997 e Vaughan, 2003.

*Dados não disponíveis

** Estudos moleculares afirmam que o genoma desta espécie é HHKK, porém, estudos recentes confrontaram estes resultados. Atualmente, seu genoma é considerado desconhecido sendo necessário um estudo mais aprofundado para caracterizar este genoma (GE et al., 1999; GE et al., 2001).

3.4 Proteínas

A transcrição e a tradução são os meios pelos quais as células interpretam ou expressam suas instruções genéticas. A transcrição ocorre a partir de uma sequência de DNA, a qual é transcrita em uma sequência de ribonucleotídeos. Diversas cópias idênticas de RNA podem ser produzidas a partir do mesmo gene e cada molécula de RNA pode dirigir a síntese de diversas cópias idênticas de proteínas (ALBERTS et al., 1999). Muitas moléculas de RNA são processadas depois de serem sintetizadas, em reações pós-transcricionais como a fosforilação e a glicosilação. O destino final de qualquer RNA é a sua degradação completa. Isso é importante, pois certas proteínas são expressas apenas em um estágio de desenvolvimento de um organismo, e o RNA mensageiro (mRNA), que codifica tal proteína, deve ser destruído no momento apropriado (NELSON & COX, 2002).

A tradução ocorre a partir da mensagem genética unidimensional do mRNA, que é convertido em uma estrutura tridimensional de proteína (NELSON & COX, 2002). Algumas proteínas recém sintetizadas não atingem sua conformação final biologicamente ativa e por isso são alteradas por uma ou mais reações de processamento, chamadas de modificações pós-traducionais, como fosforilação, metilação, acetilação, clivagem proteolítica, entre outras. Essas modificações podem ocorrer durante ou após a síntese protéica, e por isso, a estrutura final e função das diversas proteínas não podem ser definidas com base apenas nas sequências nucleotídicas dos genes que as codificam (CAHILL et al., 2001).

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas, podendo ocorrer em milhares de diferentes tipos, desde peptídeos de tamanho relativamente pequeno até enormes polímeros com massas moleculares na faixa de milhões (NELSON & COX, 2002). Proteínas são compostas de nitrogênio, carbono e oxigênio, e diferem de carboidratos e gorduras pelo seu conteúdo de nitrogênio (WAITZBERG, 2001). Algumas proteínas contêm componentes químicos permanentemente associados além dos aminoácidos, e são denominadas de proteínas conjugadas. As proteínas também exibem uma grande diversidade de funções biológicas, sendo os produtos finais mais importantes das vias de informação, além de instrumentos moleculares por meio dos quais a informação genética é expressa. As suas subunidades monoméricas relativamente simples fornecem a chave para a estrutura de milhares de proteínas diferentes

(Figura 1). Todas as proteínas são construídas com o mesmo conjunto de 20 aminoácidos, ligados covalentemente em sequências lineares características. As células são capazes de produzir proteínas com propriedades e atividades extraordinariamente diferentes, pela reunião dos mesmos vinte aminoácidos em muitas combinações e sequências diversas (NELSON & COX, 2002).

As proteínas, por serem macromoléculas, possuem diferentes níveis de complexidade e por isso são estudadas em quatro níveis conceituais. As estruturas primárias são formadas por resíduos de aminoácidos unidos através de ligações covalentes (principalmente as ligações peptídicas e dissulfeto), e o elemento mais importante desta estrutura é a sua sequência de aminoácidos. A estrutura secundária refere-se aos arranjos particularmente estáveis dos resíduos de aminoácidos, e são frequentemente representadas por estruturas alfa-hélice e conformações β . A estrutura terciária descreve todos os aspectos do dobramento tridimensional de um polipeptídeo. Quando uma proteína possui duas ou mais subunidades polipeptídicas, seu arranjo espacial é denominado de estrutura quaternária (NELSON & COX, 2002) (Figura 2). Conhecer a estrutura tridimensional das proteínas é importante para compreender melhor a sua função. Somente quando uma proteína está em sua estrutura tridimensional correta é capaz de funcionar de maneira eficiente. Um conceito importante para o entendimento das proteínas é que a função é derivada da estrutura tridimensional, e a estrutura tridimensional é especificada pela sequência de aminoácidos (LODISH et al., 2005).

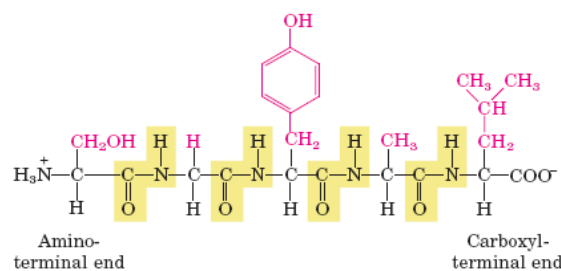


Figura 1. Sequência dos aminoácidos Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu em sua estrutura primária. Os peptídeos são nomeados a partir da extremidade aminoterminal. As ligações peptídicas estão sombreadas em amarelo, e os grupos laterais estão em vermelho.
Fonte: Modificado de NELSON & COX, (2002).

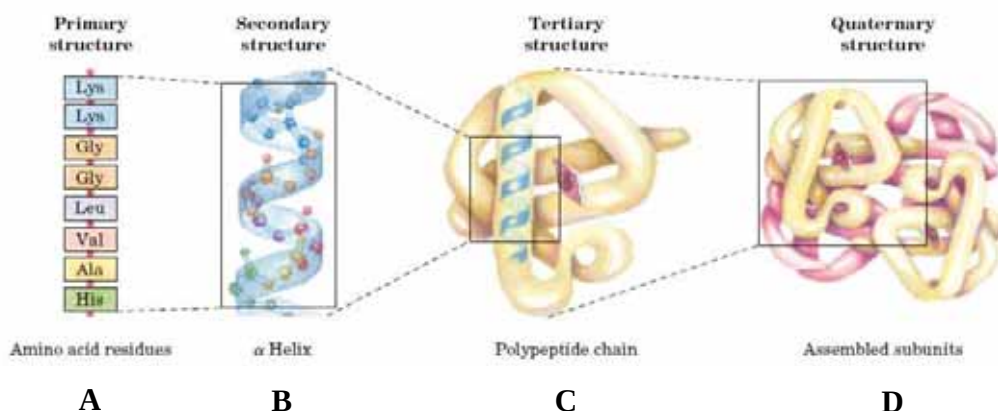


Figura 2. Níveis de estruturação das proteínas. **A)** Estrutura primária: Sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas e ligações dissulfeto. **B)** Estrutura secundária: Polipeptídeo enovelado em conformação α -hélice. **C)** Estrutura Terciária: Dobramento tridimensional de um polipeptídeo formado por estruturas do tipo α -hélice. **D)** Estrutura quartenária: É constituída por várias subunidades de estruturas terciárias.

Fonte: Modificado de NELSON & COX, (2002).

3.5 Proteínas de reserva dos cereais

As proteínas de reserva dos cereais têm sido estudadas há mais de 250 anos, quando foi isolado pela primeira vez do glúten de trigo (BECCARI, 1745). Estas proteínas são divididas em quatro grupos principais: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em sais), prolamina (solúveis em álcool) e as glutelinas (solúveis em soluções ácidas ou básicas) (OSBORNE, 1924; SHOTWELL & LARKINS, 1989). Embora a classificação de Osborne ainda seja bastante utilizada, recentemente as proteínas foram divididas em três classes; proteínas de reserva, estruturais e metabólicas. As proteínas de reserva apresentam algumas características próprias, tais como: a) a possibilidade de serem acumuladas em grandes quantidades durante o desenvolvimento da semente, para permitir a germinação; b) são sintetizadas somente na semente e não em outros tecidos; c) não possuem outra atividade funcional fora da semente e, d) são depositadas principalmente em organelas especiais chamadas de corpos protéicos (SHEWRY & HALFORD, 2001).

O teor de proteína de reserva total do grão varia entre os diferentes cereais, como para o arroz, que varia em torno de 5 – 13% (NAVES et al., 2006), a cevada, que varia entre 8 - 15% (SHEWRY, 1993), o milho, de 9 - 11% (ZUBER & DARRAH, 1987) e o trigo, de 7 – 22%

(VOGEL et al., 1978). Os teores de diferentes aminoácidos também variam entre os cereais, como para o arroz e aveia, que possuem um alto teor de lisina comparado ao trigo e ao milho. Ou então, o triptofano, que está ausente na fração prolamina em milho. A proteína de reserva mais abundante nos cereais é a prolamina, com exceção do arroz e da aveia, onde são encontradas em maior abundância a glutelina e a globulina, respectivamente. Assim como as leguminosas, o arroz e a aveia possuem um baixo teor de prolamina, e apresentam um alto teor do aminoácido essencial lisina (SHEWRY, 2007).

Os diferentes teores protéicos das sementes encontrados em espécies distintas são influenciados fortemente por fatores ambientais, como temperatura, umidade, composição e fertilidade do solo (SOTELO et al., 1994). O aumento de nitrogênio no solo levou a um aumento no teor de lisina em diferentes cereais como o milho, o arroz, a cevada, a aveia, o trigo e o sorgo (MOSSÉ & HUET, 1990). Da mesma forma, o manejo da cultura afeta o acúmulo de proteína na cariopse, e a literatura disponível a esse respeito relata que a baixa densidade de semeadura, a maior disponibilidade de nitrogênio no solo, o controle adequado de doenças e um bom manejo de água contribuem para aumentar o teor protéico do arroz (DE DATTA et al., 1972; GOMEZ & DE DATTA, 1975).

Dentre as quatro principais proteínas de reserva dos cereais, as globulinas apresentam coeficiente de sedimentação em torno de 7S e são similares as globulinas presentes em leguminosas e outras plantas dicotiledôneas (KRIZ, 1999). No entanto, essas proteínas não são estritamente necessárias para a função de reserva, pelo menos em variedades de milho, onde um mutante nulo comportou-se normalmente em termos de desenvolvimento e germinação (KRIZ & WALLACE, 1991).

As prolaminas receberam essa denominação porque inicialmente acreditava-se que essa proteína era formada apenas por prolina e nitrogênio amida derivados de glutamina. Atualmente sabe-se que as proporções destes aminoácidos variam cerca de 30-70% entre diferentes grupos desta proteína e entre diferentes cereais (SHEWRY & HALFORD, 2001). A maioria das prolaminas apresenta duas características estruturais comuns. A primeira é a presença de domínios distintos e a segunda é a presença de aminoácidos constituídos por sequências repetidas em blocos, com base em um ou mais motivos de peptídeos curtos, enriquecidos por resíduos de aminoácidos específicos tais como a metionina. Estas características são responsáveis pela alta

proporção de glutamina, prolina e outros aminoácidos específicos como histidina, glicina, metionina e fenilalanina em alguns grupos de prolamina (SHOTWELL, 1999 & TAKAIWA et al., 1999).

As albuminas no milho, além de funcionar como proteína de reserva auxiliando na germinação do embrião, pode funcionar também como inibidora de insetos e fungos patógenos antes da germinação (SINGH et al., 1991,1993).

As glutelinas são as proteínas mais abundantes no endosperma do arroz, e correspondem a cerca de 80% do conteúdo protéico do grão (TAKAIWA et al., 1991). Essas proteínas são sintetizadas como subunidades de 57 kDa no retículo endoplasmático (RE) e depois de serem processadas formam polipeptídeos de 37 kDa (α -polipeptídeo ou α -glutelina) e de 20 kDa (β -polipeptídeo ou β -glutelina) (YAMAGATA et al., 1982; FURUTA et al., 1986; KRISHNAN & OKITA, 1986; KATSUDE-TANAKA et al.; 2004).

No arroz, as proteínas de reserva glutelina e globulina são sintetizadas no retículo endoplasmático e armazenadas nos grãos de aleurona, onde são denominadas de corpos protéicos II (*protein body II*) (YAMAGATA & TANAKA, 1986; FUTURA et al.; 1986). Já as prolaminas ficam armazenadas no retículo endoplasmático rugoso (RER), em estruturas especiais, denominadas de corpos protéicos I (*protein body I*) (TAKAIWA et al., 1999). Segundo Okita et al., (1993b) existem mecanismos específicos, como as chaperonas BiP (*biding protein*), que fazem com que as prolaminas permaneçam dentro do RER e não sejam endereçadas pra outros locais na célula (Figura 3).

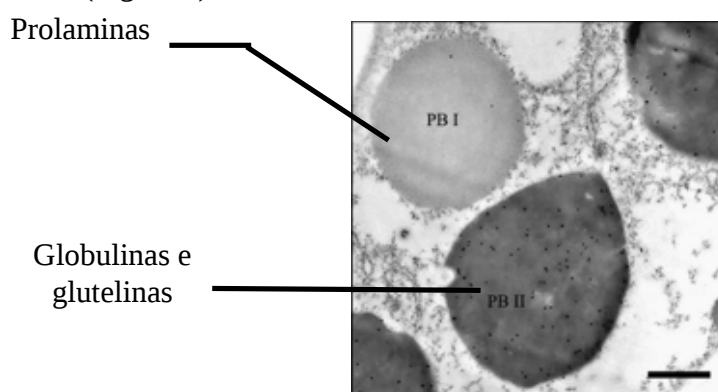


Figura 3. Localização intracelular dos corpos protéicos I e II através do método de microscopia imunoelétrica.

Fonte: Modificado de Kawakatsu et al., (2008).

3.6 Estudos proteômicos

3.6.1 Eletroforese SDS-PAGE e 2D-PAGE

As proteínas podem diferir quanto ao tamanho, forma, carga, hidrofobicidade e por sua afinidade por outras moléculas. Todas essas propriedades podem ser exploradas, possibilitando assim separá-las (ALBERTS, 1999). A eletroforese é uma técnica importante para a separação de proteínas e consiste na migração de proteínas carregadas em um campo elétrico. Um sistema de eletroforese bastante utilizado é o SDS-PAGE, onde as cadeias polipeptídicas formam complexos com as moléculas de carga negativa do sódio dodecil sulfato (SDS) e migram como complexos SDS-proteína, fazendo com que a carga da proteína se torne insignificante, e conferindo a cada proteína uma razão entre carga e massa semelhante. Um agente redutor, β -mercaptoetanol, é geralmente adicionado para romper quaisquer ligações dissulfeto dentre e entre as proteínas. Nessas condições as proteínas migram a uma velocidade que reflete a suas massas moleculares através do gel de poliacrilamida (ALBERTS, 1999; NELSON & COX, 2002). Assim, as proteínas podem ser fracionadas por SDS-PAGE, sendo agrupadas em diferentes mono ou polipeptídeos, de acordo com suas massas moleculares (YAMAGATA et al., 1982; YAMAGATA & TANAKA, 1986).

O' Farrell & Klose (1975) demonstraram que era possível separar as proteínas com base em seus diferentes pontos isoelétricos (pI) por focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão, e de acordo com sua massa molecular através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na segunda dimensão. A associação destas duas técnicas é denominada de eletroforese em duas dimensões (2D-PAGE). Esta técnica também é bastante utilizada e é um meio eficiente para separar misturas complexas de proteínas (BLACKSTOCK & WEI, 1999). Após a eletroforese, as proteínas são visualizadas pela adição de um corante, como o *Coomassie blue*, que se liga às proteínas, mas não ao gel (ALBERTS, 1999; NELSON & COX, 2002).

3.6.2 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é um método utilizado para identificação de proteínas e caracterização de modificações pós-transcricionais. O MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser-Desorption Ionization Time Of flight*) é uma técnica de espectrometria que fornece uma rápida identificação dos peptídeos a partir da excisão de proteínas do gel, seguido por digestão proteolítica (BLACKSTOCK & WEI, 1999). A tripsina é geralmente utilizada para a digestão das proteínas, cliva a região C-terminal adjacente a resíduos de arginina e lisina, gerando um conjunto de peptídeos únicos cujas massas são determinadas através de espectrometria de massa. Nessa técnica os peptídeos são cristalizados, através de uma matriz química, e as amostras são secas sobre uma placa. Em seguida, são bombardeadas por um laser, resultando em íons isolados, o que possibilita a análise em função de sua razão massa/carga (AGRAWAL & RAKWAL, 2005).

Outra técnica de espectrometria de massa é por *electrospray*, especificamente nano-*electrospray* (EST), que é capaz de adicionar informações parciais da sequência, para complementar suas informações de massa. Sob a forma de “*peptide-sequence tag*” pode-se procurar em bancos dados EST com elevada especificidade (MANN & WILM, 1994).

Através do MALDI-TOF é possível detectar milhões de proteínas por semana, sendo possível automatizar o processo de excisão dos *spots* e adição de enzima ao peptídeo. Por outro lado, a técnica de *electrospray*, embora possua menor eficiência, oferece informações adicionais da sequência, bem como a massa do peptídeo e são especialmente úteis para identificação de modificações pós-transcricionais (BETTS et al., 1997).

A partir da espectrometria de massa é possível identificar variações nas expressões protéicas em diferentes tecidos ou em diferentes condições fisiológicas e posteriormente analisar e comparar essas diferenças em bancos de dados, como:

- Mascot: http://www.matrixscience.com/search_form_select.html
- MultiIdent: <http://www.expasy.ch/tools/multiident>
- Tagdent: <http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>
- Rice Proteome Database: <http://gene64.dna.affrc.go.jp/RPD/>

3.7 Proteoma em plantas

O sequenciamento do genoma estrutural de plantas representou um importante marco na história da biologia vegetal. No entanto, ainda é necessária uma análise sistemática para a descoberta da função genômica. Para isso, é fundamental o auxílio do transcriptoma (análise da expressão dos genes), proteoma (análise dos polipeptídeos) e metaboloma (análise ampla dos metabólitos primário e secundários). Através dessas informações será possível entender o funcionamento do sistema biológico e a sua interação com o meio ambiente (AGRAWAL & RAKWAL, 2005). Portanto, o estudo das proteínas é essencial e indispensável para o entendimento das funções genômicas (GEISOW, 1998).

Marc Wilkins e Keith Williams em 1993 propuseram pela primeira vez o termo “proteoma” para o estudo das proteínas em complemento ao estudo do genoma (BLACKSTOCK & WEI, 1999). O estudo das proteínas de um organismo é mais complexo do que o estudo genômico devido à dinâmica protéica em resposta às variações externas e internas na célula, além de diferirem de indivíduo para indivíduo, e até mesmo de uma célula para outra (CANOVAS et al., 2004). Assim, de maneira geral, o proteoma estuda as proteínas presentes em uma célula, tecido, órgão ou organismo em um estágio definido de seu desenvolvimento. O estudo de proteínas começou com as análises de eletroforese em duas dimensões na década de 70 e avançou durante a década de 90, com o desenvolvimento de diferentes metodologias, como espectrometria de massa (PANDEY & MANN, 2000).

O proteoma em plantas está em sua fase inicial, comparado a outros organismos como fungos, bactérias e mamíferos (BLACKSTOCK & WEI, 1999). Porém, nos últimos anos, este estudo em plantas tem avançado devido à espectrometria de massa associada a ferramentas de bioinformática (ROSSIGNOL et al., 2006; JORRIN et al., 2007). Além disso, o fato de algumas espécies possuírem o genoma estrutural de tamanho reduzido e já sequenciado, como *Arabidopsis thaliana* e o arroz (*Oryza sativa*), impulsionou o estudo proteômico (SUN et al., 2009). Em 2002 foi publicada a sequência genômica completa do arroz *Oryza sativa* L. ssp. *indica* e *Oryza sativa* L. ssp. *japonica*, possibilitando uma melhor compreensão dos seus processos biológicos (GOFF et al., 2002; YU et al., 2002). O milho (*Zea mays*), o arroz (*O. sativa*) e *Arabidopsis* são considerados organismos-modelo para estudos proteômicos, sendo

identificadas mais de 5.000 proteínas de cada uma dessas espécies. Além disso, existem mais de 80 publicações de estudos proteômicos em *Arabidopsis* relacionados a organelas ou tecidos (SUN et al., 2009). A espécie *Nicotiana tabacum*, apesar de não ter a sua sequência genômica completamente sequenciada, já possui proteínas identificadas, e essas informações estão disponíveis em bancos de dados proteômicos como Tobacco Proteome Database (<http://www.pdata.ua.ac.be/BY2/modules/main/>) (LAUKENS et al., 2004). A soja (*Glycine max*) e outras oleaginosas também possuem mapas proteômicos disponíveis em bancos de dados, como Proteomics of oilseeds (<http://oilseedproteomics.missouri.edu>) (HAJDUCH et al., 2005).

Nos últimos anos, o conhecimento do proteoma de arroz teve um notável progresso, e atualmente existem 23 mapas de referências com informações relacionadas a culturas de células em suspensão, endosperma, embrião, panículas antes e pós-maturação, parede celular, membrana plasmática, núcleo, cloroplasto entre outros (Tabela 2). Já foram detectadas 13.129 proteínas expressas em diferentes tecidos e organelas, das quais 5.755 foram identificadas (KOMATSU, 2006). Na folha do arroz, por exemplo, foram encontradas proteínas relacionadas com metabolismo primário e secundário, refletindo o complexo sistema fototrófico relacionado a este tecido. Além de proteínas relacionadas à produção de energia (possivelmente estão relacionadas com o transporte de elétrons ou síntese de ATP), também foram encontradas proteínas associadas com a defesa da planta contra doenças e variações ambientais. Na raiz foram identificadas proteínas relacionadas à defesa, assim como proteínas associadas ao metabolismo de amido, aminoácidos, lipídios e proteínas relacionadas à produção de energia, como o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Em relação às proteínas presentes nas organelas das células de arroz, foram encontradas 464 proteínas na membrana plasmática, 141 proteínas na membrana do vacúolo (tonoplasto), 361 proteínas da membrana do complexo de Golgi, 672 em mitocôndrias e 252 em cloroplastos (KOMATSU & TANAKA, 2004).

Apesar do grande avanço na identificação de proteínas presentes em tecidos e organelas de arroz (KOMATSU et al., 2004), ainda há pouca informação sobre o proteoma do endosperma deste cereal (KOMATSU, 2006). Logo, adicionar informações a respeito destas proteínas é fundamental para complementar o seu mapa proteômico.

Tabela 2. Mapa proteômico disponível em bancos de dados de arroz

Mapa	Spots detectados *	Spots identificados	Nº de entradas
Cultura de células em suspensão	962	245	245
Endosperma	100	37	37
Embrião	639	409	409
Crescimento	700	480	480
Raiz de plântulas	508	48	48
Folhas de plântulas	431	145	145
Lâmina foliar de plântulas	679	235	200
Talo	567	186	186
Raiz de planta adulta	265	100	100
Folhas de plantas adultas	509	115	115
Lâmina foliar de planta adulta	718	350	350
Antera	1080	365	365
Panícula antes de maturação	704	441	441
Panícula após a maturação	559	361	361
Panícula uma semana após o florescimento	1073	324	324
Parede celular	513	111	111
Membrana plasmática	464	159	90
Membrana do vacúolo (tonoplasto)	141	74	43
Membrana de Golgi	361	187	44
Mitocôndria	672	369	121
Cloroplasto	252	159	66
Núcleo	549	503	503
Fração citoplasmática	683	352	325
Total	13129	5755	5109

* Proteínas detectadas a partir de 2D-PAGE

Fonte: KOMATSU, S. Plant proteomics Databases: Their Status in 2005. Current Bioinformatics, v.1, p. 33-36, 2006.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARAWAL, R.K; BRAR, D.S; KHUSH, G.S. Two new genomes in the *Oryza* complex identified on the basis of molecular divergence analysis using total genomic DNA hybridization. **Mol Gen Genet.**, n° 249, p.65-73, 1997.

AGRAWAL, G.K; RAKWAK, R. Rice proteomics: A cornerstone for cereal food crop proteomes. **Wiley InterScience**, v. 25, p.1-53, 2005.

ALBERTS, B; BRAY, D; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. Estrutura e função das proteínas. Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula; trad. Carlos Termignoni et al. Porto Alegre: **Artes Médicas Sul**, Cap. 5, 1999.

BECCARI, F.B. Scientiarum et **Artium Instituto atque Academia Commentarii**, II. Part I, p.122–127, 1745.

BETTS, J.C; BLACKSTOCK, W.P; WARD, M; ANDERTON, B.H.J. **Biol. Chem.**,v.272, p.12922–12927, 1997.

BLACKSTOCK, W.P; WEIR, MALCOLM. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Elsevier Science**,v.17, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, n°72, p.248-254, 1976.

BRAR, D.S; DALMACIO, R; ELLORAN, R; AGGARWAL, R; ANGELES, R.K; HUSH, G.S. Gene transfer and molecular characterization of introgression from wild *Oryza* species into rice. In G.S. Khush (ed). Rice Genetics III, **International Rice Research Institute**, P.O, p.477–486, n°933, Manila, Philippines, 1996.

BRESEGHELLO, F; RANGEL, P.H.N; MORAIS, O.P. Ganho de produtividade pelo melhoramento genético do arroz irrigado no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34. p.399-407, 1999.

BRESSANI, R. Protein quality of high lysine maize for humans. Am. Assoc. **Cereal Chem.**, 36 (9), p. 806-811, 1991

BRONDANI, C; BRONDANI, R.P.V; RANGEL, P.H.N; FERREIRA, M.E. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theor Appl Genet.**, v.104, p.1192-1203, 2002.

BRONDANI, C; BRONDANI, R.P.V; RANGEL, P.H.N; FERREIRA, M. E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *O. glumaepatula* x *O. sativa*. **Hereditas**, nº 134, p. 59 - 71, 2001.

BRONDANI, R.P.V; ZUCCHI, M.I; BRONDANI, C; RANGEL, P.H.N; BORBA T.C.O; RANGEL P.N; MAGALHAES M.R; VENCOSKY, R. Genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. **Genetica**, v. 125, p.115-123, 2005.

BUSO, G.S.C; RANGEL, P.H.N; FERREIRA, M. E. Analysis of random and specific sequences of nuclear and cytoplasmic DNA in diploid and tetraploid American wild rice species (*Oryza* spp.). **Genoma**, v.44, p. 476-494, 2001.

CAGAMPANG, G.B; PEREZ, C.M; JULIANO, B.O. .A gel consistency test for eating quality of rice. **J. Sci. Food Agric.**, 24, p.1589-1594, 1973.

CAGAMPANG, G.B; CRUZ, L.J; ESPIRITU, S.G; SANTIAGO, R.G; JULIANO, B.O. Studies on the extraction and composition of rice proteins. **Cereal Chemistry**, nº43, p.145–155, 1966.

CAHILL, D.J; NORDHOFF, E; O'BRIEN, J; EICKHOFF, H; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S;R; DUNN, M.J (Ed). Proteomics from protein sequence to function. **BIOS Scientific Publishers Limited**, p.1- 22, 2001.

CANOVAS F.M; DUMAS-GAUDOT, E; RECORBET, G; et al. Plant proteome analysis. **Proteomics**. nº4, p.285-298, 2004.

CAO, X; WEN, H; LI, C; GU, Z. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. **Journal of Cereal Science**, nº50, p.184-189, 2009.

CHAMPE, P.C; HARVEY R.A. Bioquímica. Trad. AR Bolner. 2º ed. Porto Alegre: **Artmed** Editora Ltda, 2000.

CHANG, T.T. Crop history and genetic conservation: rice a case study. **Iowa State Uni J Res**, 59, p. 425-455, 1985.

CHANG, T.T. The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of Asia and African rices. *Euphytica*, Wageningen, v. 25, n.2, p. 425-441, June. **Chem.**, v.44: p.1633–1639, 1976.

DALRYMPLE, D.G. Development and spread of high-yielding rice varieties in developing countries. Washington: **Agengy for International Development**, p.117, 1986

DAVI, C.C. The world rice economy: challenges ahead, In: KHUSH, G.S; TOENNIESSEN, G.H. **Rice biotechnology**. Wallingford: **CAB International**, p.1-18, 1991.

DAVI, C.C. The global rice situation. In: IRRI. Progress in irrigated rice research. **Manila**, p.9-24, 1989.

DE DATTA, S.K; OBCEMEA, W.N; JANA, R.K. Protein content of rice grain as affected by nitrogen fertilizer and some triazines and substituted ureas. **Agronomy Journal**, Madison, v.64, p.785-788, 1972.

DHINGRA, S; JOOD, S. Organoleptic and nutritional evaluation of wheat breads supplemented with soybean and barley flour. **Food Chem**, v.77, p.479-488, 2001.

FAO, 2004. Rice around the world. Disponível em: <<http://www.fao.org/rice2004>>, Acessado em: agost., 2009.

FAO/WHO/UNO, 2007. Necessidades de Energia y proteínas. World Health Organisation, Geneva. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>> Acessado em: 9 de agost., 2009.

FONSECA, J.R.F; BRONDANI, C; R.P.V, BRONDANI; RANGEL, P.H.N. Recursos genéticos. In: dos Santos, A.B; Stone L.F, Vieira N.R.A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2ºed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, Cap.8, p.257-283, 2006.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, nº44, p. 6-29, 1996.

FURUTA, M; YAMAGATA, H; TANAKA, K; KASAI, Z; FUJII, S. Cell-free synthesis of the Rice glutelin precursors. **Plant Cell Physiol.**, v.27, p.1201-1204, 1986.

GALLAND-IRMOULI, A.V.G; FLEURENCE, J; LAMGHARI, R; LUÇON, M; ROUXEL, C; BARBAROUX, O. Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmate* (Dulse). **Journal of nutritional Biochemistry**, v.10, p.353-359, 1999.

GEISOW, M.J. Proteomics: One small step for a digital computer, one giant leap for humankind. **Nat biotechnol.**, v.16, p.206-206, 1998.

GOFF, S.A; RICKE, D; LAN, T.H; PRESTING, G; WANG, R; DUNN, M; GLAZEBROOK, J; SESSIONS, A; OELLER, P; VARMA, H; HADLEY, D. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa L. ssp. japonica*). **Science**, v.296, p.92-100, 2002.

GOMEZ, K. A; DE DATTA, S.K. Influence of environment on protein content of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v.67, p.565-568, 1975.

HAJDUCH, M; GANAPATHY, A; STEIN, J.W; THELEN, J.J. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of highresolution two-dimensional reference maps,

expression profiles, and an interactive proteome database. **Plant Physiol**, n°137, p.1397-1419, 2005.

HARUSHIMA, Y. et al. Diverse variation of reproductive barriers in three intraspecific rice crosses. **Genetics**, v.160, p.313-322, 2002.

HERNANDEZ, N; RODRIGUEZ-ALEGRIA, M.E; GONZALEZ, F; LOPEZ-MUNGUIA, A.J. Enzymatic Treatment of Rice Bran to Improve. Processing. **J. Am Oil Chem Soc.**, n°77, p.177–180, 2000.

HUEBNER, F.R; BIETZ, J.A; JULIANO, B.O. Rice cultivar identification by high-performance liquid chromatography of endosperm proteins. **Cereal Chem.**, v.67, p.129- 135, 1990.

INDRANI, D; SAVITHRI, G.D; VENKATESWARA, G.R. Effect of defatted soy flour on the quality of buns, **J. Food Sci. Technol**, n°34, p.440–442, 1997.

IRRI - INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. Rice Knowledge Bank. Disponível em:<<http://www.knowledgebank.irri.org/wildricetaxonomy>>. Acesso em: mar., 2005.

JENA, K.K; KHUSH, G.S. Introgression of genes from *Oryza officinalis* Well exWatt to cultivated rice, *O. sativa* L. **Theor Appl Genet.**, n°80, p.737–745, 1990.

JORRIN, J.V; MALDONADO, A.M; CASTILLEJO, M.A. Plant proteome analysis: a 2006 update. **Proteomics**, n°7, p.2947–2962, 2007.

JOSEPH, E; SWANSON, B.G. Growth and nitrogen retention of rats fed bean (*Phaseolus vulgaris*) and bean and rice diets. **Food Research International**, Ottawa, v.26, n.4, p. 261-269, 1993.

JOSHI, S. P; GUPTA, V. S; AGGARWAL, R. K; RANJEKAR, P. K; BRAR, D.S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**. v.100, p.1311-1320, 2000.

JULIANO, B.O. Polysaccharides, proteins and lipids of rice. In: Juliano, B.O. (Ed.), **Rice Chemistry and Technology**, second ed. AACC, MN, USA, p. 59-174, 1985.

KAGAWA, H; HIRANO, H; KIKUCHI, F. Variation in glutelin seed storage protein in rice (*Oryza sativa* L.). **Japanese Journal of Breeding**, n°38, p.327–332, 1988.

KATSUDE-TANAKA, T; DULDULAO, J.B.A; KIMURA, Y; LIDA, S; YAMAGUCHI, T; NAKANO, J; UTSUMI, S. The two subfamilias of Rice glutelin differ in both primary and higher-order structures. **Biochem. Biophys. Acta**, p.95-102, 2004.

- KAWAKATSU, T; YAMAMOTO, P.M; HIROSE, S; YANO, M; TAKAIWA, F. Characterization of a new rice glutelin gene *GluD-1* expressed in the starchy endosperm. **Journal of Experimental Botany**. v.59, n°15, p.4233-4245, 2008.
- KENNEDY, G; BURLINGAME, B. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. **Food Chemistry, Barking**, v.80, n.4, p.589-596, Apr. 2003.
- KHAN, N; KATSUBE-TANAKA, T; IIDA, S; YAMAGUCHI, T; NAKANO, J; TSUJIMOTO, H. Diversity of rice glutelin polypeptides in wild species assessed by the higher temperature SDS-PAGE and subunit-specific antibodies. **Electrophoresis**, n°29, p.1308–1316, 2008.
- KHUSH, G.S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v.35, n° ½, p.25-34, 1997.
- KISHIMOTO, T; WATANABE, M; MITSUI, T; HORI, H. Glutelin basic subunits have mammalian mucin-type O-linked disaccharide side chain. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n°370, p.271–277, 1999.
- KOMATSU, S. Plant Proteomics Databases: Their Status in 2005. **Current Bioinformatics**, v.1, n°1, 2006.
- KOMATSU, S; TANAKA, N. Rice proteome analysis: A step toward functional analysis of the rice genome. **Proteomics**, v.4. p.938-949, 2004.
- KRISHNAN, H.B; OKITA, T.W. Structural relationship among the rice glutelina polypeptides. **Plant Physiology**, v.81, p.748-753, 1986.
- KRIZ, A.L; 7S globulins of cereals. In: SHEWRY, P.R; CASEY, R. eds. Seed proteins. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, p.477–498, 1999.
- KRIZ, A.L; WALLACE, N.H. Characterization of the maize Globulin-2 gene and analysis of two null alleles. **Biochemical Genetics**. v.29, p.241–254, 1991.
- KUSH G.S, BRAR D.S. Biotechnology for rice breeding: progress and potential impact. **FAO: The international rice commission**. Available at: <http://www.fao.org>, 2002.
- LASZTITY, R. The Chemistry of Cereal Proteins. **CRC Press**, Boca Raton, 2°ed., 1996.
- LAUKENS, K; DECKERS, P; ESMANS, E; ONCKELEN, H.V; WITTERS E. Construction of a two-dimensional gel electrophoresis protein database for the *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow-2 cell suspension culture. **Proteomics**; n°4, p.720-727, 2004.
- LODISH, H; KAISER, C.A; BERK, A; KRIEGER, M; MATSUDAIRA, P; SCOTT, M.P. *Biologia Celular e Molecular*. Tradução Ana Leonor Chies Santiago-Santos. 5° Ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2005.

LU, B.R; ZHENG, K.L; QIAN, H.R; ZHUANG, J.Y. Genetic differentiation of wild relatives of rice as assessed by RFLP analysis. **Theoretical Applied Genetics**. v.106, p.101-106, 2002.

MADRUGA, M.S; SANTOS, H.B; ANTUNES, N.L.M. Avaliação nutricional de uma dieta suplementada com multimistura: estudos em ratos. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v.24, p.129-133, 2004.

MAHAN, L.K; ESCOTT-STUMP, S. KRAUSE: Alimentos, nutrição e dioterapia. Trad. A Favano, 9º ed, São Paulo: Roca, 1998.

MAHMOUD, A.A; SUKUMAR, S; KRISHNAN, H.B. Interspecific Rice Hybrid of *Oryza sativa* × *Oryza nivara* Reveals a Significant Increase in Seed Protein Content. **Journal Agric. Food Chem**, v.56, p. 476-482, 2008.

MANN, M; WILM, M. Error- tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. **Anal. Chem**. v.66, p.4390-4399, 1994.

MAROCO, J. Análise estatística: Com utilização do SPSS. Lisboa: **Silabo**, 2ºed, p.293-328, 2003.

MARSHALL, W.E; WADSWORTH, J.I. Rice Science and Technology. **Marcel Dekker**, New York, 1994

MONCADA, P; MARTÍNEZ, C.P; BORRERO, J; CHÂTEL, M; GAUCH, J.R.H; GUIMARÃES, E.G; TOHME, J; MCCOUCH, S.R. Quantitative trait loci for yield and yield components in an *Oryza sativa* × *Oryza rufipogon* BC2F2 population evaluated in an upland environment. **Theor. Appl. Genet.**, v.102, p.41-52, 2001.

MORISHIMA, H. Reports of the study-tours for investigation of wild and cultivated rice species. Parts I and II. This report provides the complete record of the reports from study trips, 2002.

MORISHIMA, H. Background information about *Oryza* species in tropical America. In: Morishima, H; Martins, P. S. Investigations of plant genetic resources in the Amazon Basin with the emphasis on the genus *Oryza*. **Amazon Project**, 1994.

MOSSÉ, J; HUET, J.C. Amino acid composition and nutritional score for ten cereals and six legumes or oilseeds: causes and ranges of variations according to species and to seed nitrogen content. **Sciences de Alimentations**, 1990.

MULTANI, D.S; JENA, K.K; BRAR, D.S; DELOS-REYES, B.G; ANGELES E.R; KHUSH, G.S. Development of monosomic alien addition lines and introgression of genes from *Oryza australiensis* Domin to cultivated rice, *O. sativa* L. **Theor Appl Genet**. n°88, p.102–109, 1994.

NALIVKO, G. Y; PETIOSKAYA, V.S; DZYUBA, O. Variability of protein and amino acid content in rice grain. **App. Biochem. Microbiol.** v.2, p.506 - 510, 1975.

NANDA, J.S; COFFMAN, W.R. IRRI's efforts to improve the protein content of rice. In: Workshop on chemical aspects of rice grain quality, Philippines. Los Banos: **IRRI**. p.33-47, 1979

NAVES M.M.V; BASSINELLO, P.Z. Importância na nutrição humana. In: dos Santos, A.B; Stone L.F, Vieira N.R.A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2ºed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, Cap.1, p.17-30, 2006.

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

NELSON, D; COX, M. Lenhinger principios de bioquímica. 3º ed. São Paulo: **Sarvier**, 2002.

NORMILE, D. Archaeology: Yangtze seen as earliest rice site. **Science**, v.275, p.309-310, 1997.

O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v.250, p.4007-4021, 1975.

OGAWA, M; KUMAMARU, T; SATOH, H; IWATA, N; OMURA, T; KASAI, Z; TANAKA, K. Purification of protein body-I of rice seed and its polypeptide composition. **Plant Cell Physiol**, v.28 p.1517-1527, 1987.

OGAWA, M; KUMAMARU, T; SATOH, H; OMURA, T; PARK, K; SHINTAKU; SCHAEFFER, G.W., F.T. SHARPE; J.T. DUDLEY. Mutants of rice storage proteins. 2. Isolation five lysine-enhanced rice germplasm lines: 2K41, 2K539, 2K(C193), and characterization of protein bodies from rice mutants. Theor. 2K497, and 2K601. **Crop. Sci.**, nº34, p.1424-1425, 1994.

OKA, H.I; MORISHIMA, H. Phylogenetic differentiation of cultivated rice, potentiality of wild progenitors to evolve the *indica* and *japonica* types of rice cultivars. **Euphytica**. v.31, p-41-50, 1982.

OKITA, T.W; LI, X; W.U, Y; ZHANG, D-Z; GILLIKIN, J.W; BOSTON, R.S; FRANCESCHI, V.R. Rice prolamin protein body biogenesis: a BiP-mediated process. **Science**, v.262, p.1054-1056, 1993b.

OLIVEIRA, A. C; DERBYSHIRE, E; CARVALHO, M. T. V; ANDO, A. Perfis protéicos de variedades parentais e híbridos de arroz e sua correlação com heterose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.28, p.313 - 322, 1991.

OLIVEIRA, J.P; DEL PELOSO, M.J; MORAIS, O.P; MELO, L.C; SILVA, H.T; FONSECA, J.R; SILVA, S.C. Parecença entre acessos tradicionais de feijão carioca utilizando o método de ward. **IAC**, Campinas, v.85, 2008.

OMS/WHO/NHD. Turning the tide of malnutrition. Organization responding to the challenge of the 21st century. World Health Organization (WHO/OMS), 2000. Disponível em: < www.who.int/nut>. Acessado em: 21 de out. 2009.

OSBORNE, T.B. The Vegetable Proteins. **Longmans**. London, 1924.

PANDEY, A; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p.837-846, 2000.

PEREIRA, J.A. Cultura do arroz no Brasil: subsídios para a sua história. Teresina: **Embrapa Meio-Norte**, p.226, 2002.

PINHEIRO, B. da S. Morfologia e crescimento da planta de arroz. Goiânia: **EMBRAPA-CNPAF**. Não paginado. Palestra apresentada no I Curso Internacional de Melhoramento Genético de Arroz, Goiânia, mar., 1998.

RAKSHIT, S. et. al. Large-scale DNA polymorphism study of *Oryza sativa* and *Oryza rufipogon* reveals the origin and divergence of Asian rice. **Theor. Appl. Genet.** p.731-434, 2007.

RANGEL, P.N; BRONDANI, R.P.V; RANGEL, P.H.N; BRONDANI, C. Agronomic and molecular characterization of introgression lines from the interspecific cross *Oryza sativa* (BG 90-2) x *Oryza glumaepatula* (RS-16). **Genetics and Molecular Research**. v.7, n°1, p.184-195, 2007.

RANGEL, P. H; FERREIRA, M. E. Citometria de fluxo, contagem cromossômica e RAPD na identificação de genomas e espécies de *Oryza*. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, n°.10, p.44, 2000.

RANGEL, P.H.N; GUIMARÃES, E.P; NEVES, P.C.F. Base genética das cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, p.349-357, 1996.

ROSSIGNOL, M; PELTIER, J.B; MOCK, H.P; MATROS, A; MALDONADO, A.M; JORRIN, J.V. In: Plant proteome analysis: 2004-2006 update. **Proteomics**, n°6, p.5529-5548, 2006.

SANTOS, P.G; SOARES, P.C; SOARES, A.A.S; MORAIS, O.P; CORNÉLIO, V.M.O. Avaliação do progresso genético obtido em 22 anos no melhoramento do arroz irrigado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34. p.1889-1896, 1999.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades-degradações-modificações. São Paulo: **Varela**, p.139-257, 1996.

SHEWRY, P. R; HALFORD, N. G. Cereal seed storage protein: structures proprieties roli in grain utilization. **J. Exp. Botany**, v.53, p.947-958, 2001.

SHEWRY, P.R. Barley seed proteins. In: MacGregor, A.W., Bhatta, R.S. (Eds.), **Barley: Chemistry and Technology**. AACC, St. Paul, MN, p.131–197, 1993.

SHEWRY, P.R. Improving the protein content and composition of cereal grain. **Journal of Cereal Science**, v.46, p.239-250, 2007.

SHIH, F.F. Rice proteins. In: Champagne, E.T. (Ed.), **Rice Chemistry and Technology**, 3^{ed}. AACC, MN, USA, p.143-162, 2004.

SHOTWELL, M. A; LARKINS, B.A. The molecular biology and biochemistry of seed storage proteins. In: **The Biochemistry of Plants**. A Comprehensive Treatise. San Diego, v.15, p.297-345, 1989.

SHOTWELL, M.A. Oat globulins. In: SHEWRY, P.R; CASEY, R. Seed proteins. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.389–400, 1999.

SHU, X. L; SHEN, S.Q; BAO, J. S; WU, D. X; NAKAMURA, Y; SHU, Q.Y. Molecular and biochemical analysis of the gelatinization temperature characteristics of rice (*Oryza sativa* L.) Starch granules. **J. Cereal Sci.**, n°44, p.40-48, 2006.

SIMPSON, J.E; ADAIR, C.R; KHOLER, G.O; DAWSON, E.H; DEOBALD, H.J; KESTER, E.B; HOGAN, J.T; BATCHER, O.M; HALICK, J.V. Quality evaluation studies of foreign and domestic rices. Washington: USDA, USDA. **Technical Bulletin**, n°1331, p.183, 1965.

SINGH, N.K; DONOVAN, G.R; CARPENTER, H.C; SKERRITT, J.H; LANGRIDGE, P. Isolation and characterization of wheat cDNA revealing a unique lysine-rich repetitive domain. **Plant Molecular Biology**, v.22, p. 227–237, 1993.

SINGH, N.K; SHEPHERD, K.W; LANGRIDGE, P; GRUEN, L.C. Purification and biochemical characterization of triticin, a leguminlike protein in wheat endosperm. **Journal of Cereal Science**, v.13, p.207–219, 1991.

SOARES, A.A; RAMALHO, M.A.P; SOUSA, A.F. Estimativas do progresso genético obtido pelo programa de melhoramento de arroz irrigado da EPAMIG na década de oitenta. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.29, p.97-104, 1994.

SUN, Q.I; ZYBAILOV, B; WOJCIECH, M; FRISO, G; OLINARES, P.D.B; WIJK, K.J; PPDB, the Plant Proteomics Database at Cornell. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p.969–974, 2009.

TAIRA, H. Grain quality: physicochemical properties and quality of rice grains. In: MATSUO, T; KUMAZAWA, K; ISHII, R; ISHIHARA, K; HIRATA, H. (Ed.). Science of the rice plant. Tokyo: **Food and Agriculture Police Research Center**. v.2, p.1063-1089, 1995.

TAKAIWA, F; OGAMA, M; OKITA, T.W. Rice glutelins. In: Shewry, P; Casey, R. Seed proteins. Dordrecht, FL: Kluwer Academic Publishers, p.401-426, 1999.

TAKAIWA, F; OONO, K. Genomic DNA sequence of two new genes for new storage protein glutelin in rice. **Japanese Journal of Genetics**, v.66, p.161-171, 1991.

TANAKA T; HAYASHIDA S; HONGO M. The relationship of the feces protein particles to rice protein bodies. **Agric. Biol. Chem.**, v.39, p.515–518, 1975.

TANAKA, K; SUGIMOTO, M; OGAWA, M; KASAI, Z. Isolation and characterization of two types of protein bodies in rice endosperm. **Agric. Biol.**, 1980.

TANAKA.K. Purification of protein body-I of rice seed expressed in liquid suspension cultures: chitinases, b-glucanases and its polypeptide composition. *Plant Cell Physiol.* 28:1517–1527. and other proteins. **Theor. Appl. Genet.**, v.84, p.26–31, 1987.

TANKSLEY, S. D; NELSON, J.C. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. **Theor. App. Genetics.**, v.92, p.191-203, 1996.

TATEOKA, T. Taxonomic studies of *Oryza* III. Key to the species and their enumeration. **Bot Mag Tokyo.**, n°76, p.165-173, 1963.

VAUGHAN, D.A; KADOWAKI, K; KAGA, A; TOMOOKA, N. On the phylogeny and biogeography of the genus *Oryza*. **Breeding Science.**, n°55, p.113-122, 2005.

VAUGHAN, D.A; MORISHIMA, H; KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza* genus. **Current Opinion in Plant Biology.**, v.6, p.139-146, 2003.

VIEIRA, N. R de A; RABELO, R.R. Qualidade tecnológica. In: dos Santos, A.B; Stone L.F, Vieira N.R.A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2°ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, cap.23, p.878-888, 2006.

VOGEL, K.P; JOHNSON, V.A; MATTERN, P.J. Protein and lysine contents of endosperm and bran of the parents and progenies of crosses of common wheat. **Crop Science.**, v.18,751–754, 1978.

WAITZBERG, D.L. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3° ed, São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte: **Editora Atheneu**, 2001.

WANG, X. et al. Coordinated studies on genetics resources of Rice in Yunnan. Glabrous hull Rice (guangkeda) in Yunnan. **Res. Bull Beijing Agric.**, Univ. v.10, p.333-344, 1995.

WANG, X. et al. Coordinated studies on genetics resources of Rice in Yunnan. Glaborous hull Rice (guangkeda) in Yunnan. Res. **Bull Beijing Agric.**, Univ. v.10, p.333-344, 1984

YAMAGATA, H; SUGIMOTO, T; TANAKA, K.; KASAI, Z; Biosynthesis storage protein in developing rice seeds. **Plant Physiol.**, v.70, p.1094 -1100, 1982.

YAMAGATA, H; TANAKA, K; KASAI, Z. Evidence for a precursor form of rice glutelin subunits. **Agricultural and Biological Chemistry.**, v. 46, p.321-322, 1982.

YAMAGATA, H; TANAKA, K; The site of synthesis and accumulation of storage proteins. **Plant Cell Physiol.**, v.27, p.135-145, 1986.

YAN, H.H; MIN, S.K; ZHU, L.H. Visualization of *Oryza eichingeri* chromosomes in intergenomic hybrid plants from *O. sativa* - *O. eichingeri* via fluorescent in situ hybridization. **Genome**, n°42, p.48-51, 1999.

YOUNG, V.R; PELLET, P.L. Plant proteins in relation to human protein and amino-acid nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition.**, New York, v.59, n°5, p.1203S-1212S, 1994.

YU, J; HU, S; WANG, J; WONG, G. K.S, et al., A Draft Sequence of the Rice Genome *Oryza sativa* L. ssp. *indica*) **Science.**, n°296, p.79-92, 2002.

ZUBER, M.S; DARRAH, L.L. Breeding, genetics and seed corn production. In: Watson, S.A.; Ramstad, P.E. (Eds.), Corn: **Chemistry and Technology.**, AACC, St. Paul, MN, p.31–51, 1987.

5. Artigo 1: Análise quantitativa e do padrão em SDS-PAGE das proteínas de reserva do arroz silvestre nativo do Brasil *Oryza glumaepatula*

RESUMO

As espécies silvestres de arroz são importantes fontes de variabilidade genética e são utilizadas para o melhoramento da espécie cultivada *Oryza sativa*. A espécie silvestre *O. glumaepatula* possui especial interesse por ser nativa do Brasil e possuir o genoma diplóide, o que torna viável seu cruzamento com o arroz. Este trabalho teve como objetivo quantificar e determinar os perfis protéicos totais e as quatro frações protéicas (albumina, globulina, prolamina e glutelina) presentes no endosperma do grão de 29 genótipos de *O. glumaepatula*. Através da análise de variância para o teor de proteína total e frações protéicas, foram encontradas diferenças altamente significativas ($P < 0,01$) entre os genótipos. Os teores de proteína total dos genótipos silvestres apresentaram amplitude de variação de 14,94% (genótipo BGA14280) a 9,06% (BGA14179). As cultivares BRS Bonança e Primavera apresentaram valores inferiores de proteína total (8,65 e 8,70%, respectivamente). O genótipo BGA14210 destacou-se por apresentar o maior teor de albumina (11,07%), enquanto o menor valor foi de 3,33% (BGA14269). Para as cultivares Primavera e BRS Bonança os teores foram de 4,42 e 5,98%, respectivamente. O teor de globulina para os genótipos silvestres apresentou variação de 14,48% (BGA14162) a 6,24% (BGA14137). Enquanto o teor de prolamina apresentou variação de 8,68% (BGA14162) a 3,89% (BGA14195). A glutelina, maior fração protéica do grão de arroz, apresentou amplitude de variação de 85,40% (BGA14269) a 72,96% (BGA14162). Já as cultivares Primavera e BRS Bonança apresentaram os seguintes teores: globulina 9,27 e 14,42%; prolamina 6,23 e 6,13%; e glutelina 80,07 e 73,46%, respectivamente. Os genótipos silvestres apresentaram elevados teores de albumina e glutelina em relação à *O. sativa*. Através da análise de SDS-PAGE foi encontrado um padrão diferencial de α -glutelinas entre os genótipos silvestres, com destaque para o genótipo BGA14232, que não apresentou um α -polipeptídeo em torno de 38-37 kDa comum aos demais genótipos. As α -glutelinas de 40 kDa foram encontradas somente para a espécie *O. glumaepatula*, enquanto a *O. sativa* apresentou α -glutelinas de 39 kDa. As frações albumina, globulina e prolamina apresentaram um perfil de bandas protéicas similares entre os genótipos silvestres, havendo diferença apenas em relação à *O. sativa*. Através de cruzamentos interespecíficos, os padrões protéicos diferenciais e os elevados teores protéicos encontrados na espécie *O. glumaepatula* potencialmente poderão ser transferidos para a *O. sativa*, contribuindo para o aumento do valor protéico do grão de cultivares de arroz do Brasil.

Palavras-Chave: *Oryza glumaepatula*, teor protéico, globulina, prolamina, albumina e glutelina.

5.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Oryza* possui duas espécies cultivadas de arroz *Oryza sativa* e *O. glaberrima*, e 21 espécies silvestres que estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, são encontradas quatro espécies silvestres de arroz: *O. glumaepatula* (AA), *O. alta* (CCDD), *O. grandiglumis* (CCDD) e *O. latifolia* (CCDD), que estão distribuídas pela América Central e outros países da América do Sul (OLIVEIRA et al., 1991). Entre as quatro espécies que ocorrem no continente Americano, *Oryza glumaepatula* tem despertado maior interesse, especialmente no que diz respeito à sua conservação e utilização como reservatório gênico por possuir o genoma diplóide, o que torna viável seu cruzamento com a espécie cultivada *O. sativa*, resultando em descendentes férteis, além de estar adaptada a condições edafoclimáticas brasileiras (BRONDANI et al., 2001; BRONDANI et al., 2005).

No Brasil apenas 10 genitores são responsáveis por 68% do “pool” gênico das variedades mais plantadas de arroz. Como consequência, este cereal atingiu o seu platô de produtividade e o ganho obtido pela seleção está em declínio (RANGEL et al., 1996). Assim, a busca por materiais geneticamente distintos, como genótipos exóticos (espécies silvestres e variedades tradicionais de arroz), é imprescindível para a ampliação da base genética do arroz. Neste caso, estes materiais seriam utilizados em cruzamentos amplos com o arroz cultivado, incorporando nova variabilidade genética, a qual seria utilizada pelo programa de melhoramento para seleção de novas linhagens e cultivares (BRONDANI et al., 2002). No Brasil, o desenvolvimento de linhagens interespecíficas *O. sativa* x *O. glumaepatula* iniciou em 1995 (BRONDANI et al., 2001). Nestas linhagens foram identificadas características de interesse agrônomo como rápido crescimento vegetativo e potencial produtivo (BRONDANI et al., 2002). Linhagens interespecíficas derivadas destes cruzamentos estão disponíveis para uso de programas de melhoramento do arroz no Brasil (RANGEL et al., 2007).

A análise das proteínas expressas pelo genoma (proteoma) é uma poderosa ferramenta molecular para o estudo de processos biológicos complexos em organelas, células, órgão ou tecidos (KOMATSU & KHAN, 2004). O arroz (*O. sativa*) é uma planta modelo nos estudos genômicos e proteômicos devido ao seu pequeno genoma em comparação aos demais cereais, e possuir bancos de dados públicos bem estabelecidos (DEVOS & GALE, 2000). Nos últimos anos, têm ocorrido significativos progressos para a identificação e catalogação das proteínas

presentes no arroz (*O. sativa*). Já foram detectadas 13.129 proteínas expressas em diferentes tecidos e organelas, das quais 5.755 foram identificadas (KOMATSU, 2006; KOMATSU et al., 2004). Informações sobre o proteoma do arroz estão disponíveis em bancos de dados como Rice Proteome Database (<http://gene64.dna.affrc.go.jp/RPD/>). Assim como as técnicas de espectrometria de massa, a eletroforese das proteínas de reserva também é bastante utilizada para identificar diferentes padrões protéicos, permitindo traçar um perfil taxonômico e evolutivo entre as espécies (LUTHRA, 1999; RAO et al., 1990; DANDLANI et al., 1994 e RAN, 1996). Porém, há pouca informação nos bancos de dados sobre as proteínas de reserva do grão de arroz (KOMATSU, 2006).

As proteínas de reserva são acumuladas em grandes quantidades durante o desenvolvimento das sementes para permitir a germinação, sendo depositadas principalmente em organelas especiais chamadas de corpos protéicos (SHEWRY & HALFORD, 2001). Como constatado por Lúmen e Chow (1995) e relatado por Kim et al., (2009), o teor de proteína total no endosperma do arroz (*O. sativa*) varia entre 4,3 a 18,2%. Essas proteínas de reserva são divididas em quatro frações de acordo com as suas diferentes solubilidades: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em sais), prolamina (solúveis em álcool) e as glutelinas (solúveis em soluções ácidas ou básicas) (OSBORNE, 1924; SHOTWELL & LARKINS, 1989). Segundo Steenson & Sathe (1995), a média de albumina no grão de arroz polido é de 5,9%, globulina 13,8%, prolamina 5,8% e glutelina 74,5%.

A qualidade protéica de um alimento é determinada pela composição e biodisponibilidade de seus aminoácidos essenciais (BRESSANI, 1991; YOUNG & PELLETT, 1994), e por este motivo, a proteína do arroz é considerada de boa qualidade porque contém oito dos dez aminoácidos essenciais ao homem. Comparado a outros cereais como o milho e o trigo, o arroz possui alto teor do aminoácido essencial lisina, conferindo alta digestibilidade e qualidade nutricional (NALIVKO et al., 1975; HUEBNER et al., 1990). Sem dizer, que em países do Sudeste Asiático como Bangladesh, Laos, Vietnã, Mianmar e Camboja, o arroz é responsável por mais de 50% da energia e da proteína diária (FAOSTAT, 2001). No Brasil, o arroz é responsável por 14% da energia e 10% da proteína consumidas diariamente pela população (NAVES & BASSINELLO, 2006).

Apesar do arroz ser uma importante fonte de proteína e energia, a identificação de genótipos *O. glumaepatula* com alto teor protéico e o desenvolvimento de linhagens interespecíficas a partir desta espécie, poderá aumentar o conteúdo protéico do grão cultivado. Este aumento terá grande impacto para a alimentação humana, sobretudo na dieta da população de países pobres.

Este trabalho teve como objetivo quantificar as proteínas totais, quantificar as frações protéicas e identificar os perfis protéicos, através de eletroforese SDS-PAGE, das proteínas presentes no endosperma da semente de 29 genótipos da espécie *O. glumaepatula*, provenientes dos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Amazonas e Roraima;

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal

As atividades de extração, isolamento, análises por eletroforese em gel e as dosagens das proteínas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão.

As sementes de arroz foram fornecidas pelo programa de melhoramento da Embrapa (Figura 1), sendo utilizados 29 genótipos silvestres de arroz *Oryza glumaepatula* oriundos de coletas realizadas em cinco Estados brasileiros: Goiás (GO), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Amazonas (AM) e Roraima (RR) (Figura 2 e Tabela 1). Os 29 genótipos foram utilizados para a análise quantitativa das proteínas totais e frações protéicas e para a análise qualitativa de proteína total por eletroforese SDS-PAGE (Tabela 1). Para análise qualitativa das frações foram selecionados 12 genótipos representativos de diferentes Estados. Como controle foram utilizadas as cultivares sequeiras BRS Bonança e Primavera (Tabela 1).



Figura 1. Exemplo da variabilidade de sementes de arroz com casca, sem casca e polidas de populações de *O. glumaepatula* utilizadas neste trabalho.

Foto: Karina Santos



Figura 2. Pontos de coleta no Brasil de populações da espécie silvestre de arroz *O. glumaepatula* utilizadas neste trabalho.

Tabela 1. Relação dos 29 genótipos, espécie e o local de origem dos materiais silvestre de arroz.

Genótipos	Espécie	Estado/Município	Local de coleta
BGA 14280	<i>Oryza glumaepatula</i>	Goiás/Uruana	Fazenda Santo Antônio
BGA 14232	<i>Oryza glumaepatula</i>	Goiás/Itapirapuã	Fazenda Córrego Fundo
BGA 14233	<i>Oryza glumaepatula</i>	Goiás/Itapirapuã	Fazenda Córrego Fundo
BGA 14160	<i>Oryza glumaepatula</i>	Amazonas	Lago Caiambé - Rio Solimões
BGA 14162	<i>Oryza glumaepatula</i>	Amazonas	Lago Tefé - Rio Solimões
BGA 14170	<i>Oryza glumaepatula</i>	Amazonas	Lago Caldeirão - Rio Solimões
BGA14137	<i>Oryza glumaepatula</i>	Amazonas	Ilha Trocarí - Rio Solimões
BGA 14179	<i>Oryza glumaepatula</i>	Mato Grosso do Sul	Codraza - Ladário - Rio Paraguai
BGA 14188	<i>Oryza glumaepatula</i>	Mato Grosso do Sul	Porto Manga - Rio Taquari
BGA 14187	<i>Oryza glumaepatula</i>	Mato Grosso do Sul	Porto Manga - Rio Taquari
BGA 14186	<i>Oryza glumaepatula</i>	Mato Grosso do Sul	Porto Manga - Rio Taquari
BGA 14268	<i>Oryza glumaepatula</i>	Mato Grosso/Poconé	Rodovia Transpantaneira
BGA 14270	<i>Oryza glumaepatula</i>	Mato Grosso/Poconé	Rodovia Transpantaneira
BGA 14269	<i>Oryza glumaepatula</i>	Mato Grosso/Poconé	Rodovia Transpantaneira
BGA 14210	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Boa Vista	Rodovia BR 174 - Manaus/Boa Vista, km 626 - Vereda de Lavrado
BGA 14204	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Boa Vista	Fazenda Santa Glória - Vereda do lavrado
BGA 14202	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Boa Vista	Fazenda Campo Alegre - Vereda do lavrado
BGA 14203	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Boa Vista	Fazenda Novo Destino - Vereda do lavrado
BGA 14197	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Boa Vista	Estrada Boa Vista/Taiano - Vereda do Lavrado
BGA 14195	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Boa Vista	BR 174, km 575 Vereda do Lavrado
BGA 14200	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Boa Vista	Fazenda Campo Alegre - Vereda do lavrado
BGA 14198	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Boa Vista	Estrada para Vila São Francisco - Coleta na margem da estrada
BGA 14199	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Boa Vista	Estrada para Vila São Francisco - Coleta na margem da estrada
BGA 14206	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Cacarai	Parque Nacional do Viruá - Área de Capinarana
BGA 14207	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Cacarai	Rodovia BR 174 - Manaus/Boa Vista
BGA 14201	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Boa Vista	Fazenda Campo Alegre - Vereda do lavrado
BGA 14196	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Boa Vista	BR 174, km 560 Vereda do Lavrado
BGA 14205	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Alto Alegre	Estada São Vicente/Alto Alegre - Vereda do Lavrado
BGA 14208	<i>Oryza glumaepatula</i>	Roraima/Normandia	Estrada Normandia/Surumum - Vereda de Lavrado
Primavera	<i>Oryza sativa japonica</i>	Cultivado	-
BRS Bonança	<i>Oryza sativa japonica</i>	Cultivado	-

5.2.2 Extração das proteínas totais e das frações protéicas para análise quantitativa

O preparo das amostras protéicas foi realizado a partir dos grãos secos, polidos, moídos e desengordurado com acetona (P.A.), obtendo assim uma farinha seca e homogênea para o preparo dos extratos. A extração sequencial das proteínas totais e das frações protéicas foi realizada segundo Doll & Andersen (1981) e Turley & Ching (1986), com modificações, que exploram as características de solubilidade de cada fração protéica. A partir da farinha foi possível fazer a extração total e a extração das quatro frações (albumina, globulina, prolamina e glutelina) de cada genótipo.

Para a extração total foram pesadas 10mg de cada farinha em tubos de microcentrífuga e adicionado 250µL de NaOH 0,1M. Essa mistura foi agitada por 1 hora, centrifugada (13.000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante coletado.

A extração das frações foi realizada de modo sequencial de acordo com a característica de cada fração protéica. Para isto foram pesadas 20mg de cada farinha em tubos de microcentrífuga e adicionados 500µL de água destilada para a extração da albumina. Em seguida foi agitada por 1 hora, centrifugada (13.000 rpm por 5 minutos) e coletado o sobrenadante. O precipitado resultante foi utilizado para a extração da fração em sequência. No mesmo tubo foi adicionado 500µL de Tris 10mM pH 7,4 contendo NaCl 0,5M para a extração da globulina. Esta mistura foi agitada por 1 hora, centrifugada (13.000 rpm por 5 minutos) e coletado o sobrenadante. Ainda sobre o mesmo precipitado, foi adicionado 500µL de isopropanol 60%, utilizado para a extração da fração prolamina. Esta mistura também foi agitada por 1 hora, centrifugada 13.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante coletado. Por último foi adicionado 500µL de NaOH 0,1M, sobre o precipitado, agitado por 1 hora, centrifugado (13.000 rpm por 5 minutos) e depois o sobrenadante coletado em novo tubo.

Tanto para a extração total quanto para a extração fracionada as amostras foram submetidas a agitação, centrifugação e coleta do sobrenadante por duas vezes, a fim de extrair uma maior quantidade de proteína. Estes procedimentos foram realizados em três repetições independentes para cada genótipo, objetivando diminuir as variações prováveis (desvio-padrão) de cada amostra. Ao final das extrações as amostras foram mantidas a -20°C (Figura 3).

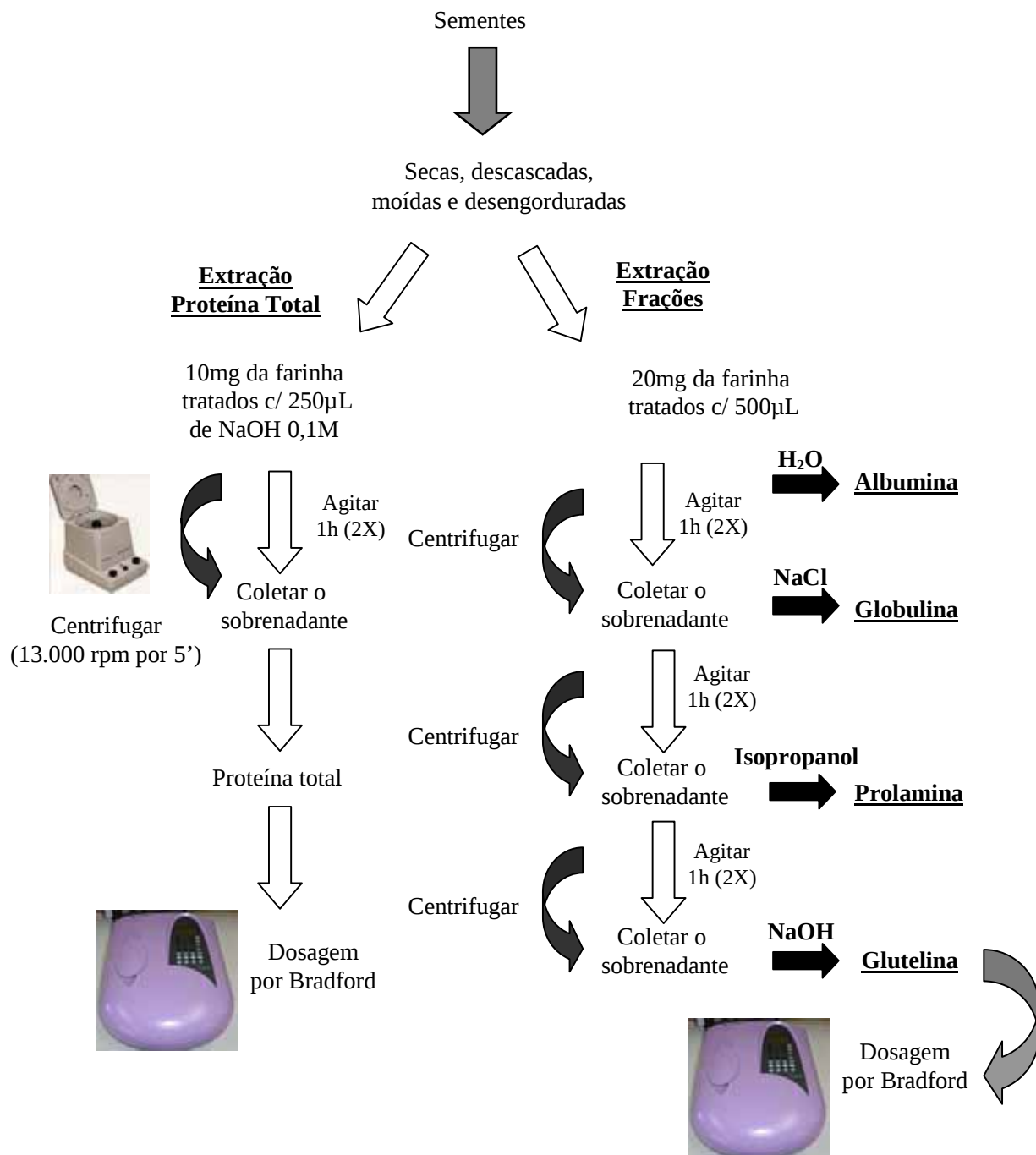


Figura 3. Fluxograma da metodologia de extração de proteína total e frações protéicas das sementes de arroz para análise quantitativa pelo método de Bradford.

5.2.3 Dosagens de proteínas

A partir das extrações das proteínas totais e das frações de cada genótipo, as amostras foram utilizadas para as dosagens de proteínas pelo método de Bradford (1976). As dosagens das proteínas totais e das frações foram realizadas em triplicatas a partir de cada uma das três repetições independentes de cada genótipo. Como padrão de comparação foi utilizada uma curva de calibração com BSA (soro albumina bovina) nas concentrações de 2,5 a 40 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$.

5.2.4 Preparo das amostras de proteína total para análise em eletroforese SDS-PAGE

O preparo das amostras de proteína total para a análise qualitativa em gel de poliacrilamida desnaturante foi realizado a partir de 20mg de farinha e 350 μL de tampão de amostra (Tris 10mmol.L⁻¹, 1% de β -mercaptoetanol, 2% de SDS, 3% de glicerol e azul de bromofenol). Em seguida as amostras foram fervidas por 10 minutos para a desnaturação e utilizadas para eletroforese SDS-PAGE.

5.2.5 Extração das quatro frações e preparo das amostras para análise em eletroforese SDS-PAGE

Para o preparo das amostras das frações foi utilizada 100mg de farinha e adicionado 500 μL de solução Tris-HCl (pH 7.5) e 1mM EDTA para a extração da albumina. Essa solução foi agitada por 1 hora e centrifugada durante 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 1,5mL de acetona P.A, homogeneizado por inversão e armazenado *overnight* a -20°C. Em seguida foi utilizado 500 μL de solução Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA e 0.5M NaCl para extrair a globulina. Essa solução foi agitada por 1 hora e centrifugada durante 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 1,5mL de acetona P.A, homogeneizado por inversão e armazenado *overnight* a -20°C. Ainda utilizando a mesma farinha inicial foi acrescentado 500 μL de isopropanol 60% para extrair a prolamina. Essa solução foi agitada por 1 hora e centrifugada durante 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 1,5mL de acetona P.A, homogeneizado por inversão e armazenado *overnight* no freezer. Depois

das frações serem precipitadas *overnight* no freezer, foram centrifugadas à 15°C por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida os precipitados foram secos em aparelho rotativo a vácuo (*speedvac*), e posteriormente as frações protéicas albumina, globulina e prolamina foram ressuspensas em 80µL de Tris-HCl 0.125M pH 6.8, 20% de glicerol, 0.001% de azul de bromofenol e 2% de β-mercaptoetanol. Essas amostras foram agitadas por 30 minutos e armazenada a -20°C.

Para a extração da glutelina foi utilizada 30mg de farinha desengordurada. Após extrair as demais frações, como citado acima, foi acrescentado 700µL de tampão de extração para glutelina (Tris-HCl 50mM pH 6.8, 4% de SDS, Uréia a 8M, 5% de β-mercaptoetanol e 20% de glicerol), segundo Kawakatsu et al., (2008). Esta mistura foi agitada durante 2 horas e centrifugada durante 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 1,5mL acetona P.A, homogeneizado por inversão e armazenado *overnight* no freezer. Após precipitar a glutelina *overnight* no freezer, esta proteína foi centrifugada à 15°C por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida os precipitados foram secos em aparelho rotativo a vácuo (*speedvac*), e posteriormente a glutelina foi ressuspensa em tampão de amostra (Tris 10mmol/L, 1% de β-mercaptoetanol, 2% de SDS, 3% de glicerol e azul de bromofenol). Essa fração protéica foi agitada durante 1 hora, fervida por 10 minutos e armazenada a -20°C (Figura 4). Foram consideradas três repetições de cada amostra para a determinação do perfil protéico dos genótipos silvestres.

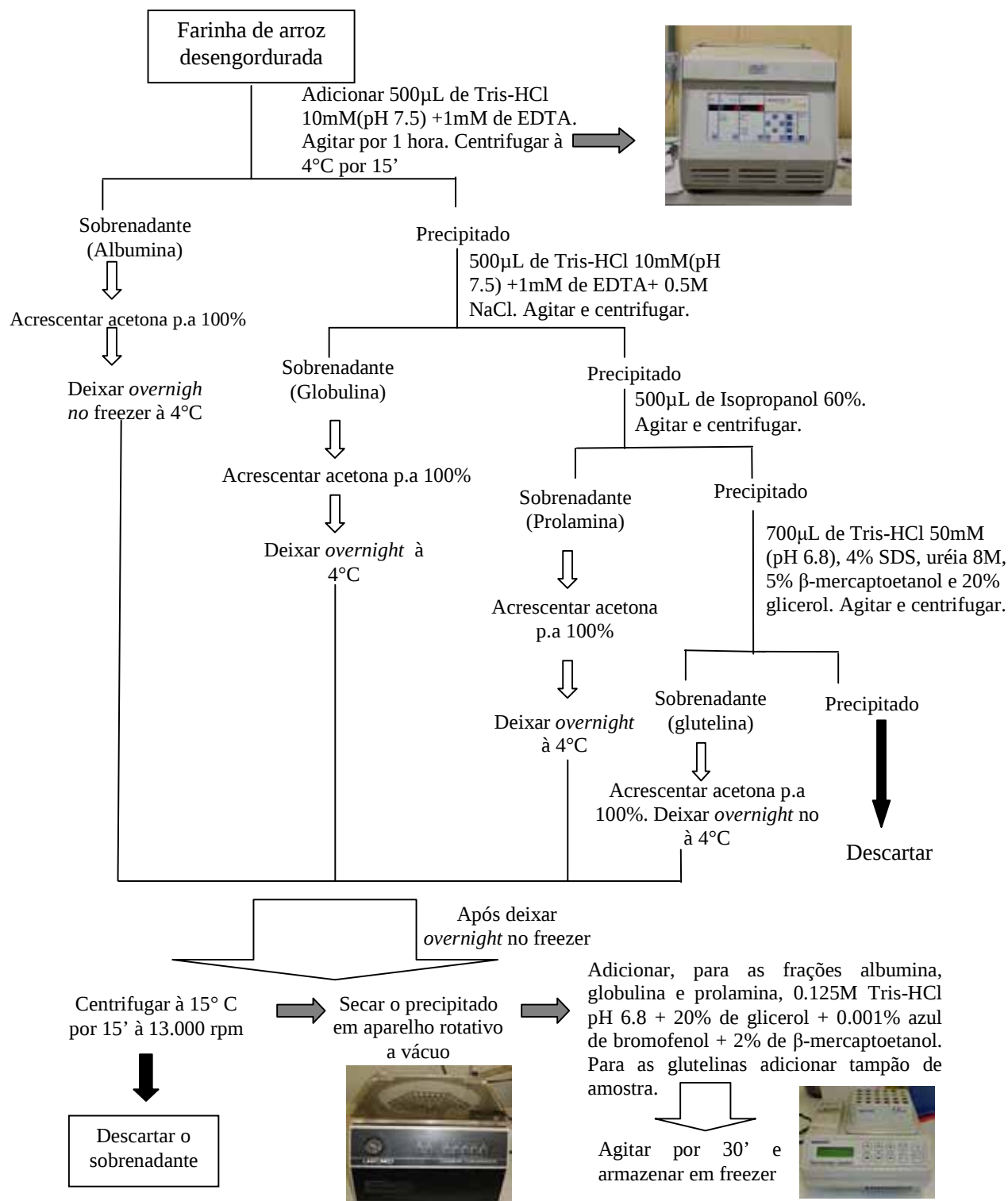


Figura 4. Fluxograma da extração das quatro frações protéicas presentes no endosperma do arroz, para posterior análise em eletroforese.

5.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE

A análise do perfil protéico total e das frações albumina, globulina e prolamina foi realizada em gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE em sistema de tampão descontínuo segundo Laemmli (1970), tendo o gel concentrador a 4,5% e o gel separador a 14%. Para a fração glutelina, o gel concentrador foi preparado a 4,5% e o gel separador foi preparado a 13%. Para a eletroforese foi utilizado o sistema Rubi SE 600 (Amersham Biosciences). Os géis foram submetidos à eletroforese a 80mA por cerca de 3 horas. Para a corrida foi utilizado o tampão Tris (0,125M), glicina (0,96M) e SDS (0,5%). Os géis após a corrida foram fixados em solução de metanol (50%), ácido acético (10%) e água (40%) por 10 minutos. Em seguida foram colocados em solução corante (0,05% *Coomassie Brilliant Blue* R250, 50% metanol, 10% ácido acético e 40% de água) e posteriormente descorados em metanol (5%), ácido acético (7%) e água (88%). Por último foram fotografados por câmera digital de 7,2 megapixels (Sony Cyber-shot DSC-P200) e as imagens obtidas foram padronizadas no Paint Shop Pro versão 7.01(Jasc® Software). A partir das imagens foi possível comparar o perfil protéico das amostras utilizando o programa DNA Simdex3 beta release (Scott Archer and GenetX). Esse programa determina a massa molecular de cada banda, a partir do posicionamento das bandas do marcador de baixa massa molecular padrão (Amershan LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis – GE Healthcare).

5.2.7 Análise estatística

Através das dosagens pelo método de Bradford foram calculados os valores médios de proteína total e das frações protéicas. Com o resultado das triplicatas das repetições de cada amostra, foi realizada a análise de variância utilizando o delineamento inteiramente casualizado, no programa estatístico Genes (CRUZ, 2001). O teste de comparação de médias entre os genótipos silvestres e os controles foi realizado pelo método de Scott-Knott a 5% de probabilidade, também utilizando o programa Genes (CRUZ, 2001). Este teste tem o objetivo de separar as médias em grupos distintos, através da minimização da variação dentro do grupo e maximização da variação entre os grupos. A partir das médias do conteúdo protéico (proteína total e frações protéicas) de cada genótipo, aplicou-se o método de Ward (WARD, 1963) no

programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 1995). Através deste método pode-se obter agrupamento dos dados similares, o que possibilita observar a existência de algum padrão ou grau de organização dentro do conjunto de dados.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Análise de variância e teste de médias para os teores protéicos dos genótipos de arroz *O. glumaepatula*

Este é o primeiro trabalho que descreve a determinação do conteúdo de proteína de reserva da espécie silvestre *O. glumaepatula*. Foi observada através da análise de variância entre os 29 genótipos silvestres de arroz *Oryza glumaepatula* uma diferença altamente significativa ($P < 0,01$) para os teores de proteína total e para as quatro frações protéicas. Através do teste de comparação de médias Scott-Knott, os teores de proteína total foram divididos em quatro grupos distintos, com amplitude de variação de 14,94% (genótipo silvestre BGA14280) a 9,06% (BGA14179), apresentando média geral de 12,17% (Tabela 2). Os controles BRS Bonança (8,65%) e Primavera (8,70%), juntamente com os genótipos silvestres BGA14210 (10,14%), BGA14232 (9,81%), BGA14233 (9,13%) e BGA14179 (9,06%), apresentaram os menores teores de proteína total (Tabelas 2 e 3).

Kennedy & Burlingame (2003), ao analisarem o teor de proteína total de 2.869 variedades de arroz (2.674 *Oryza sativa* e 195 *Oryza glaberrima*), encontraram para *O. sativa* uma média de 8,8% com amplitude de variação de 4,5 a 15,9%, e para *O. glaberrima* a média obtida foi de 13,6% com variação de 10,2 a 15,9%, neste caso, próximo aos valores encontrados para a espécie silvestre *O. glumaepatula*. Juliano et al., (1968), ao analisarem o teor de proteína total de coleções de germoplasma de arroz cultivado, também encontraram uma grande variação para o conteúdo protéico de 5 a 18%, com média de 9,5%. Cao et al., (2009) também encontraram em variedades chinesas de arroz (*O. sativa*) uma ampla variação no teor de proteína total de reserva (7,38 a 15,41%).

Silveira, (2009), encontrou uma amplitude de variação de 20,2 a 4,4% para o conteúdo de proteína total de 550 acessos da Coleção Nuclear Brasileira de Arroz, e propôs uma divisão do teor protéico do grão em: Alto (teores maiores ou iguais a 12%), médio (11,9 a 9%) e baixo (teores menores ou iguais a 8,9%). Considerando essa divisão, entre os 29 genótipos silvestres avaliados neste estudo, foram encontrados 16 genótipos com alto teor de proteína total e 13 genótipos com teor médio. Nenhum genótipo silvestre apresentou baixo conteúdo de proteína

total. Ao contrário do que foi observado nos controles, BRS Bonança e Primavera, que apresentaram baixo teor de proteína total (Tabela 2).

Tabela 2. Relação dos teores de proteína total e frações protéicas dos 29 genótipos de arroz silvestre *O. glumaepatula* e dos controles *O. sativa* Primavera e BRS Bonança.

Genótipos	Proteína total ¹ (%)	Albumina ¹ (%)	Globulina ¹ (%)	Prolamina ¹ (%)	Glutelina ¹ (%)
BGA14280	14,94 a	4,46 c	11,26 b	6,88 a	77,38 c
BGA14187	14,89 a	5,83 b	9,28 c	6,94 a	77,93 c
BGA14208	14,53 a	3,68 d	7,36 d	4,62 b	84,33 a
BGA14197	14,22 a	3,65 d	8,10 d	5,26 b	82,97 a
BGA14201	14,19 a	4,78 c	7,25 d	6,05 b	81,90 b
BGA14137	14,06 a	3,60 d	6,25 d	5,42 b	84,76 a
BGA14207	13,98 a	4,77 c	6,62 d	5,22 b	83,37 a
BGA14200	13,35 b	6,18 b	8,39 c	5,08 b	80,32 b
BGA14268	13,13 b	4,55 c	7,88 d	5,91 b	81,68 c
BGA14204	12,92 b	4,74 c	8,52 c	6,58 a	80,14 b
BGA14205	12,90 b	4,00 d	7,64 d	4,93 b	83,42 a
BGA14198	12,81 b	3,98 d	9,62 c	6,19 b	80,20 b
BGA14202	12,60 b	3,90 d	8,11 d	5,21 b	82,76 a
BGA14160	12,47 b	5,38 b	12,69 b	7,63 a	74,28 c
BGA14188	12,42 b	5,00 b	11,55 b	7,11 a	76,31 c
BGA14203	12,30 b	5,20 b	9,03 c	6,74 a	79,01 c
BGA14269	11,79 c	3,33 d	6,64 d	4,62 b	85,40 a
BGA14186	11,50 c	4,57 c	10,42 b	4,94 b	80,09 b
BGA14270	11,42 c	5,74 b	9,75 c	5,43 b	79,07 c
BGA14162	11,05 c	3,86 d	14,48 a	8,68 a	72,96 d
BGA14196	11,01 c	4,43 c	7,89 d	6,01 b	81,64 b
BGA14206	10,79 c	4,31 c	7,15 d	6,38 a	82,15 b
BGA14170	10,65 c	4,63 c	8,36 c	8,37 a	78,64 c
BGA14199	10,50 c	5,29 b	6,74 d	7,31 a	80,64 b
BGA14195	10,28 c	4,07 d	9,07 c	3,88 b	82,96 b
BGA14210	10,14 d	11,07 a	7,18 d	4,87 b	76,86 c
BGA14232	9,81 d	4,80 c	11,15 b	8,01 a	76,04 c
BGA14233	9,13 d	5,76 b	10,71 b	6,42 a	77,08 c
BGA14179	9,07 d	5,20 b	12,04 b	5,83 b	76,93 c
Primavera	8,70 d	4,42 c	9,27 c	6,23 a	80,07 b
BRS Bonança	8,65 d	5,98 b	14,42 a	6,13 b	73,46 c

¹ Conteúdo protéico em relação a % de proteína total por mg de farinha. As letras representam as diferenças significativas entre as médias obtidas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Análise descritiva e resumo da análise de variância dos 29 genótipos silvestres de arroz *O. glumaepatula*.

	Média (%)	Valor máximo (%)	Valor mínimo (%)	Desvio padrão (%)	C.V (%)	G.L	Q.M.R	**
Proteína total	12,17	14,94	9,07	1,75	4,20	30	0,247244	
Albumina	4,86	11,07	3,33	1,42	6,69	30	0,105021	
Globulina	9,01	14,49	6,25	2,15	8,86	30	0,659536	
Prolamina	6,09	8,68	3,89	1,31	10,66	30	0,419335	
Glutelina	80,04	85,40	72,96	3,33	1,53	30	1,502009	

**Significância para $P < 0,01$.

Através do teste de comparação de médias Scott-Knott, os teores de albumina foram divididos em quatro grupos estatisticamente distintos e apresentaram uma média de 4,86% (Tabela 2). O genótipo silvestre BGA14210 destacou-se por conter o maior teor de albumina (11,07%) enquanto o genótipo BGA14269 obteve o menor teor (3,33%). Os teores de globulina apresentaram uma média de 9,01%, e também foram divididos em quatro grupos distintos. O genótipo BGA14162 apresentou o maior teor de globulina (14,48%) enquanto o BGA14137 (ou RS-16) apresentou o menor (6,24%). Já os teores de prolamina foram divididos em dois grupos estatisticamente distintos e apresentaram média de 6,09%. A amplitude de variação para esta proteína foi de 8,68% (BGA14162) a 3,89% (BGA14195). A média geral de glutelina foi de 80,04%, apresentando variação de 85,40% (BGA14269) a 72,96% (BGA14162), e os valores foram divididos em quatro grupos estatisticamente distintos.

Já cultivares Primavera e BRS Bonança apresentaram os seguintes teores: albumina 4,42 e 5,98%; globulina 9,27 e 14,42%; prolamina 6,23 e 6,13%; e glutelina 80,07 e 73,46%, respectivamente. Os teores mais elevados de albumina, prolamina e glutelina foram encontrados para a espécie *O. glumaepatula*. Não houve diferença significativa entre os maiores teores de globulina presente no silvestre BGA14162 e na cultivar BRS Bonança (Tabelas 2 e 3).

Agboola et al., (2005), caracterizaram variedades australianas de arroz *O. sativa* e encontraram uma média de 15% de globulina, 6% de albumina, 3% de prolamina e 76% de glutelina. Esses autores também identificaram a glutelina como fração predominante no endosperma, seguida, na ordem, por globulina, albumina e prolamina. Cao et al., (2009) encontraram para fração albumina teores de 6,24 a 9,73%, globulina de 5,98 a 7,48%, prolamina de 5,53 a 6,91%, e para a glutelina teores de 74,95 a 78,76% para variedades chinesas de arroz *O.*

sativa. Chandi & Sogi (2006), também encontraram nas variedades de arroz *O. sativa* Basmati 386 e HBC 19, teores elevados de albumina a 11% e 16%, enquanto a globulina apresentou 10% e 13%, prolamina 4%, e para glutelina, 75% e 67%, respectivamente.

No presente trabalho os teores protéicos de *O. glumaepatula* ficaram dentro da variação observada para a espécie cultivada de arroz. No entanto, alguns genótipos apresentaram teores protéicos relativamente elevados, como para o genótipo BGA14280, que apresentou 14,94% de proteína total. Embora o genótipo BGA14210 tenha apresentado uns dos menores teores de proteína total, apresentou elevado teor de albumina (11,07%) (Tabela 2). Segundo Taira (1995) e Sgarbieri (1996), a albumina é a fração protéica do arroz que possui maior teor de lisina. Este aminoácido possui alta digestibilidade e como consequência alta qualidade nutricional (NALIVKO et al., 1975; HUEBNER et al., 1990; OGAWA et al., 1987; TANAKA et al., 1975; TANAKA et al., 1980). Deste modo, o genótipo BGA14210 pode ter um grande potencial para o aprimoramento nutricional do arroz cultivado, através de sua utilização como genitor em programas de melhoramento genético do arroz.

5.3.2 Análise de Ward

O método de Ward foi adotado neste trabalho para verificar se existe uma relação entre os teores protéicos (proteína total e frações protéicas) e a Unidade de Federação de origem. Através deste método pode-se obter agrupamento dos dados similares, o que possibilita observar a existência de algum padrão ou grau de organização dentro do conjunto de dados. Foi observada a formação de dois principais grupos A e B. O grupo A foi formado por sete genótipos oriundos dos Estados de Roraima, Goiás, Amazonas e Mato Grosso do Sul. O grupo B foi formado por 22 genótipos encontrados nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Amazonas e Roraima (Figura 5 e Tabela 1). O coeficiente de aglomeração do grupo A ficou entre 0,175 e 0,200, enquanto para o grupo B o coeficiente ficou entre 0,100 e 0,125.

Assim, pode-se inferir que entre os setes genótipos do grupo A houve maior distância de aglomeramento, devido a inclusão de genótipos com conteúdo protéico diferenciado, como o genótipo BGA14210, o qual possui elevado teor de albumina. Os demais genótipos foram agrupados em B, apresentando menor distância de aglomeramento e maior proximidade dos

conteúdos protéicos (Figura 5 e Tabela 1). Alguns genótipos de Roraima com teores protéicos similares, e com coeficiente de aglomeração igual a zero, ficaram dentro de um mesmo subgrupo, como o BGA14206 e o BGA14196 (Figura 5 e Tabela 1). Porém, essa tendência não se repetiu para todos os genótipos de Roraima, como para o genótipo BGA14207, que teve o conteúdo protéico mais próximo ao genótipo BGA14137, oriundo do Amazonas. De modo similar, os genótipos BGA14160 e o BGA14188 possuem teores protéicos bastante próximos e origens distintas (Amazonas e Mato Grosso do Sul, respectivamente) (Figura 5 e Tabela 1).

Deste modo, não houve uma tendência de agrupar os acessos de acordo como seus teores protéicos totais e frações por local de origem. Isso demonstra a grande variabilidade desta espécie de arroz silvestre nativa do Brasil.

Legenda:

- 1. BGA 14210
- 2. BGA 14280
- 3. BGA 14187
- 4. BGA 14186
- 5. BGA 14232
- 6. BGA 14233
- 7. BGA 14160
- 8. BGA 14162
- 9. BGA 14170
- 10. BGA 14179
- 11. BGA 14188
- 12. BGA 14268
- 13. BGA 14204
- 14. BGA 14270
- 15. BGA 14202
- 16. BGA 14203
- 17. BGA 14197
- 18. BGA 14195
- 19. BGA 14200
- 20. BGA 14198
- 21. BGA 14199
- 22. BGA 14206
- 23. BGA 14207
- 24. BGA 14201
- 25. BGA 14269
- 26. BGA 14196
- 27. BGA 14205
- 28. BGA 14208
- 29. BGA 14137

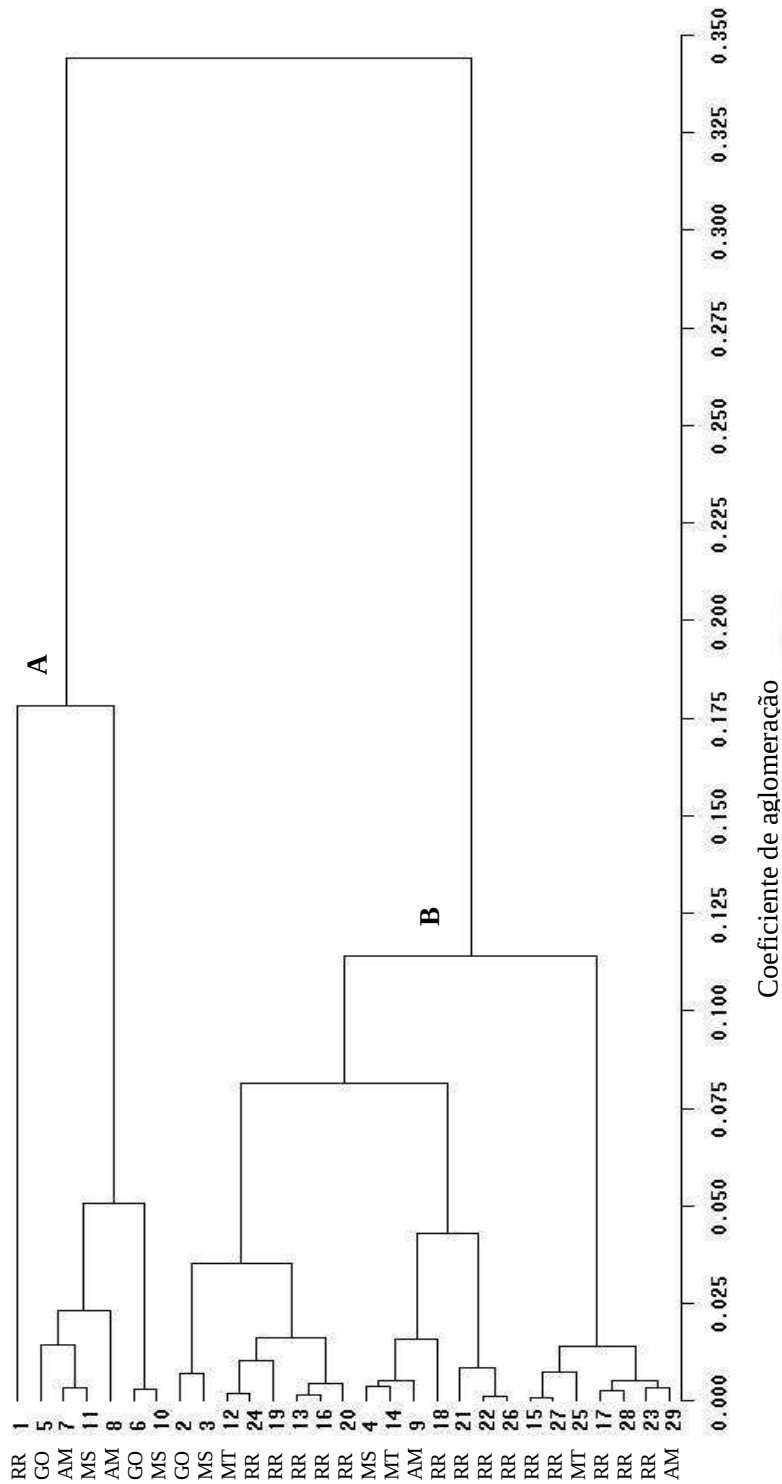


Figura 5. Dendrograma gerado pelo método de Ward. Os diferentes genótipos de arroz silvestre *O. glumaepatula* estão indicados por números e a Unidade de Federação por suas siglas. A legenda informa o número correspondente ao genótipo silvestre de arroz.

5.3.3 Análise qualitativa por eletroforese SDS-PAGE das proteínas totais dos 29 genótipos de arroz *O. glumaepatula*

A glutelina é a fração protéica predominante no endosperma do arroz (aproximadamente 80%) (TAKAIWA et al., 1991). As glutelinas são divididas em α -glutelinas ou glutelinas ácidas e β -glutelinas ou glutelinas básicas. As α -glutelinas possuem massa molecular em torno de 37 kDa, enquanto as β -glutelinas possuem massa molecular em torno de 20 kDa (YAMAGATA et al., 1982; FURUTA et al., 1986; KRISHNAN & OKITA, 1986; KATSUDE-TANAKA et al.; 2004). Jahan et al.,(2001) analisou através de SDS-PAGE as proteínas totais da espécie *O. sativa*, e dividiu as α -glutelinas de acordo com a massa molecular em: glutelinas α -1 (39 kDa), α -2 (38 kDa), α -3 (37,5 kDa a 37 kDa) e α -4 (34 - 33kDa). As β -glutelinas foram divididas em β -1 (23 kDa), β -2 (22.5 kDa) e β -3 (22 kDa). Segundo a divisão de Jahan et al., (2001), neste trabalho os genótipos silvestres apresentaram em SDS-PAGE diferentes α -glutelinas estando presente as glutelinas α -1, α -2, α -3 e α -glutelinas de 40, 36 e 35 kDa que não foram enquadradas na divisão destes autores.

As cultivares BRS Bonança e Primavera apresentaram glutelinas α -1, α -3 e α -glutelinas de 35 kDa (Figuras 6, 8, 9 e Tabela 4). Todos os genótipos silvestres apresentaram glutelinas α -2 e α -glutelinas de 40 kDa, excetuando o genótipo BGA14232 que não apresentou glutelinas α -2 e α -3, e por isso apresentou um perfil de α -polipeptídeos diferencial (Figuras 6, 7 e Tabela 4). Por outro lado, este genótipo apresentou glutelina α -1 presente também nos genótipos silvestres BGA14202, BGA14195 e BGA14201, e nas cultivares BRS Bonança e Primavera. As glutelinas α -3 estiveram presentes em dezessete genótipos *O. glumaepatula*, assim como nas 2 cultivares *O. sativa* (Figuras 6, 8, 9 e Tabela 4). Apenas sete genótipos apresentaram α -glutelinas de 36 kDa, enquanto os demais apresentaram α -glutelinas de 35 kDa, excetuando os genótipos BGA14137, BGA14208 e BGA14203, que não apresentaram essas α -glutelinas de 35 e 36 kDa (Figuras 6, 8, 9 e Tabela 4).

As cultivares BRS Bonança e Primavera, juntamente com doze genótipos silvestres, apresentaram três bandas α -glutelinas. Porém, oito desses doze genótipos silvestres apresentaram a terceira banda de α -glutelina com uma forte intensidade, o que pode ter dificultado a separação e visualização de uma provável quarta banda de α -glutelina. O preparo de tampão de amostra

com uma maior concentração de β -mercaptoetanol poderia promover uma quebra mais eficiente das pontes de dissulfeto entre os α -polipeptídeos, e assim permitir uma melhor resolução das bandas de α -glutelina. Os demais genótipos silvestres apresentaram nitidamente quatro α -glutelinas (Figuras 6, 8, 9 e Tabela 4).

A espécie *O. glumaepatula* apresentou um α -polipeptídeo diferencial de 40 kDa que não foi encontrado para as cultivares BRS Bonança e Primavera (Figura 6). As β -glutelinas apresentaram baixa resolução nos géis e não foi possível separá-las. No entanto, a sua massa molecular ficou em torno de 21 a 19 kDa, para os genótipos silvestres e as cultivares de arroz, sendo esses valores próximos, porém inferiores ao relatado por Jahan et al., (2001). Além da visualização das α -glutelinas e β -glutelinas, através dos géis de proteína total, foi possível observar proteínas com massa molecular em torno de 60 kDa, que provavelmente estão relacionadas à síntese de amido, e são denominadas de proteína WAXY (Figuras 6, 8 e 9) (KAWAKATSU et al., 2008).

Borghet et al., (2006) encontraram em variedades de arroz *O. sativa* α -glutelinas com massa molecular em torno de 32 kDa e β -glutelinas em torno de 25 kDa. Para a espécie *O. glumaepatula* as α -glutelinas com massa molecular em torno de 30 a 32 kDa estão ausentes ou apresentaram baixa concentração, e por isso não foi possível visualizá-las (Figuras 6, 8 e 9). Contudo, outros trabalhos relataram para o arroz *O. sativa* a presença de α -glutelinas com massa molecular de 30 a 39 kDa, e β -glutelinas com massa molecular de 19 a 25 kDa (JULIANO, 1985; KAGAWA et al., 1988; KISHIMOTO et al., 1999; SHIH, 2004). Para a *O. glumaepatula* foram encontradas α -glutelinas com massa molecular de 35 a 40 kDa estando próximo a amplitude de variação observada por estes autores para a espécie *O. sativa*. Ashida et al., (2006) analisou as cultivares *japonicas* Koshohikari e Nihonmasari por eletroforese SDS-PAGE, e também encontrou α -glutelinas com massa molecular de 39 e 37 kDa, e β -glutelinas com massa molecular de 23 e 22 kDa. A massa molecular destas β -glutelinas foram superiores, porém próximas a encontrada para a espécie *O. glumaepatula*.

As α -glutelinas e β -glutelinas para espécie *O. glumaepatula* apresentaram polipeptídeos com massa molecular próximas às encontradas para a espécie *O. sativa*. No entanto, as α -glutelinas de 40 kDa foram mais comumente expressas na espécie *O. glumaepatula*. Segundo Khan et al., (2008), essas diferenças nos perfis de glutelina podem estar associadas a diferentes

pressões evolutivas e diferentes funções citológicas, como a eficiência no armazenamento de nitrogênio e carbono.

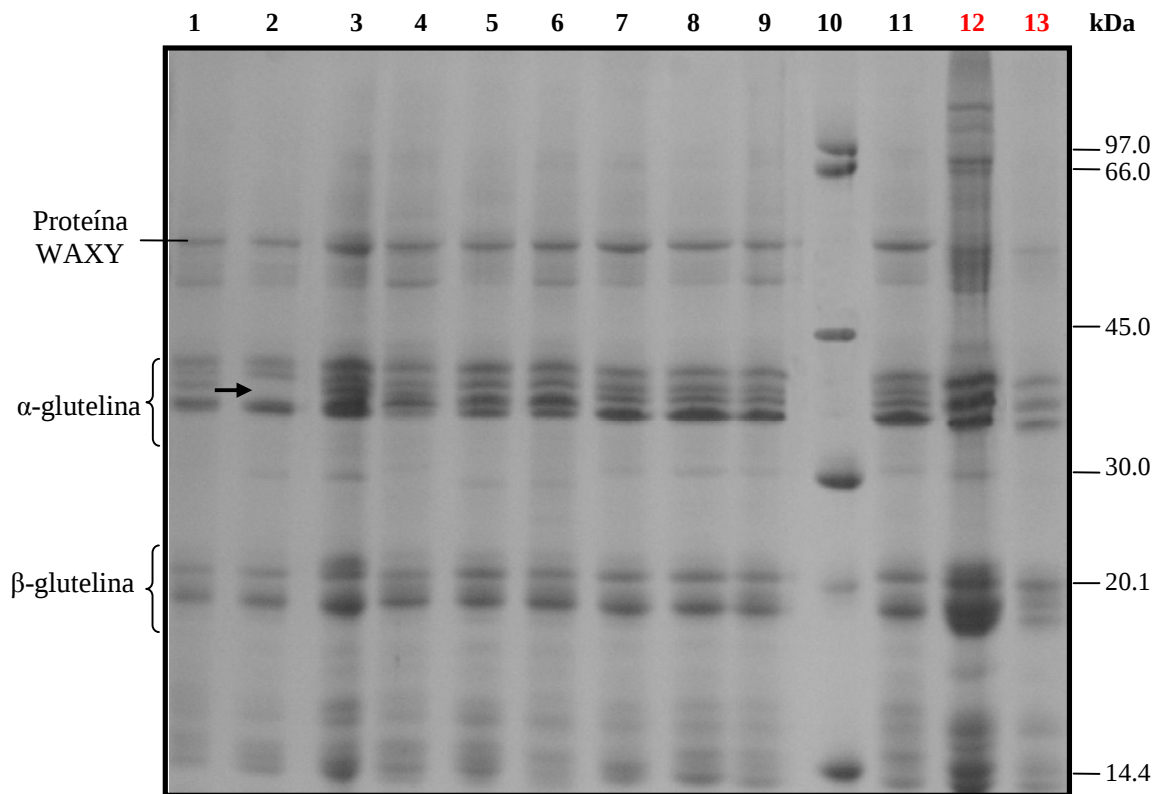


Figura 6. Eletroforese SDS-PAGE de proteína total extraído das sementes dos genótipos silvestres de arroz *O. glumaepatula* e das cultivares *O. sativa* BRS Bonança e Primavera. **Linha 1:** BGA14233, **linha 2:** BGA14232, **linha 3:** BGA14280, **linha 4:** BGA14160, **linha 5:** BGA14162, **linha 6:** BGA14170, **linha 7:** BGA14179, **linha 8:** BGA14186, **linha 9:** BGA14187, **linha 10:** Marcador de baixa massa molecular padrão (GE Healthcare), **linha 11:** BGA14188, **linha 12:** BRS Bonança e **linha 13:** Primavera. Os controles foram destacados em vermelho. A seta indica um perfil diferencial com a ausência das α -glutelina α -2 e α -3. A banda correspondente a proteína Waxy está indicada no gel. Gel de poliacrilamida desnaturante a 14%, corado com *Coomassie Blue* R250.

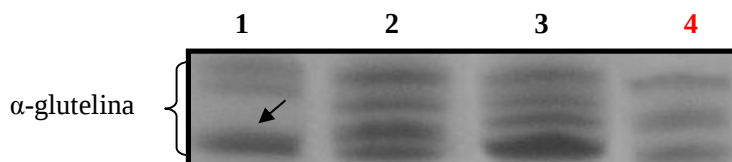


Figura 7. Imagem comparativa da análise eletroforética de proteína total entre três genótipos de *O. glumaepatula* e a espécie *O. sativa* (destacada em vermelho). A seta indica um perfil diferencial com a ausência das α -glutelinas α -2 e α -3. Região ampliada extraída da figura 6. **Linha 1:** BGA14232; **linha 2:** BGA14162, **linha 3:** BGA14170 e **linha 4:** Primavera. Gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE a 14%, corado com *Coomassie Blue* R250.

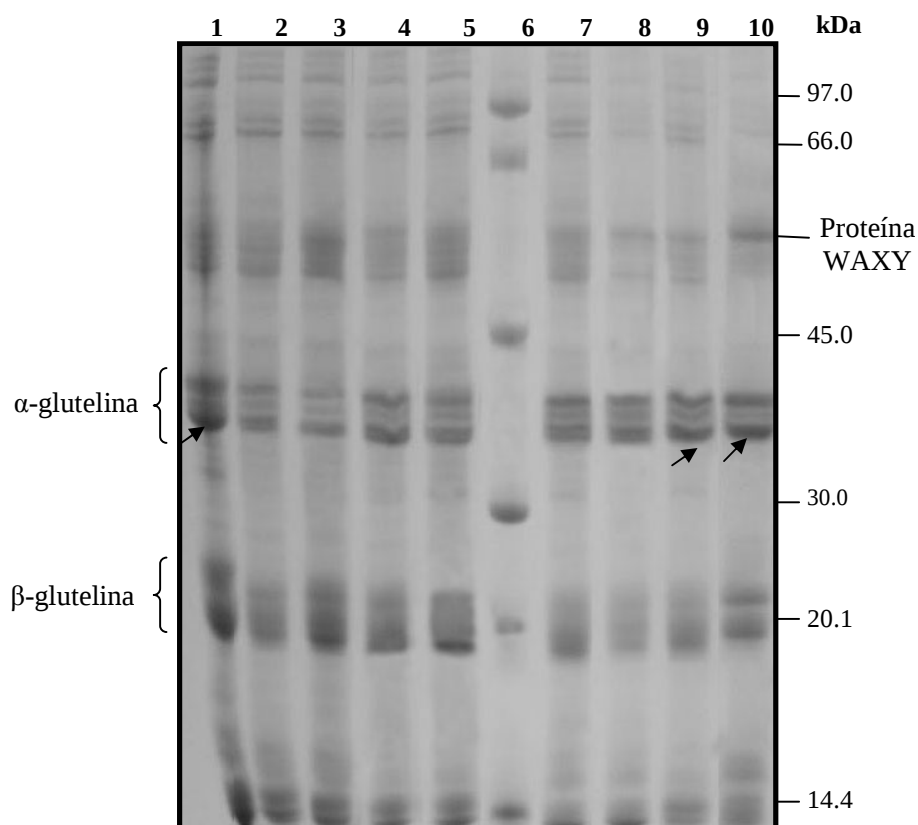


Figura 8. Eletroforese SDS-PAGE de proteína total extraída das sementes dos genótipos silvestres de arroz *O. glumaepatula*. **Linha 1:** BGA14268; **linha 2:** BGA14204; **linha 3:** BGA14203; **linha 4:** BGA14197; **linha 5:** BGA14200; **linha 6:** marcador de baixa massa molecular padrão (GE Healthcare); **linha 7:** BGA14210; **linha 8:** BGA14207; **linha 9:** BGA14208; **linha 10:** BGA14137. As setas indicam a intensa banda de α -polipeptídeos. A banda correspondente a proteína Waxy está indicada no gel. Gel de poliacrilamida desnaturante a 14%, corado com *Coomassie Blue* R250.

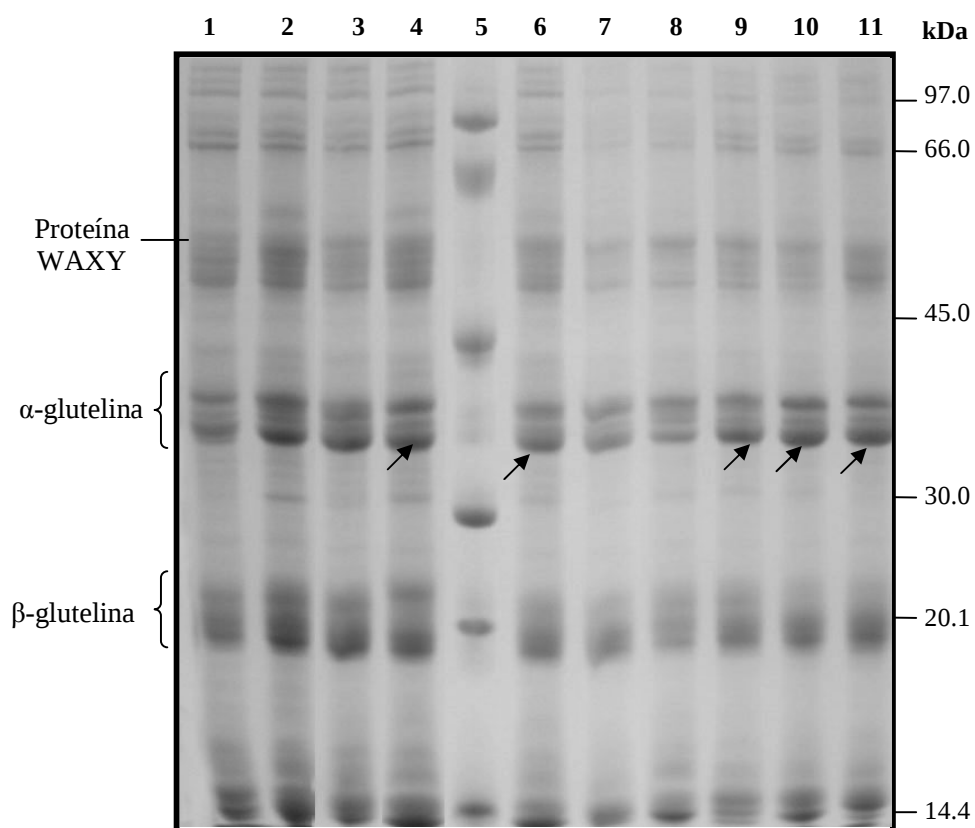


Figura 9. Eletroforese SDS-PAGE de proteína total extraída das sementes dos genótipos silvestres de arroz *O. glumaepatula*. **Linha 1:** BGA14270; **linha 2:** BGA14202; **linha 3:** BGA14195; **linha 4:** BGA 14198; **linha 5:** marcador de baixa massa molecular padrão (GE Healthcare); **linha 6:** BGA14199; **linha 7:** BGA14206; **linha 8:** BGA14201; **linha 9:** BGA14269; **linha 10:** BGA14196; **linha 11:** BGA14205. As setas indicam a intensa banda de α -polipeptídeos. A banda correspondente a proteína Waxy está indicada no gel. Gel de poliacrilamida desnaturante a 14%, corado com *Coomassie Blue* R250.

Tabela 4. Relação das α -glutelinas de diferentes massas moleculares de 29 genótipos silvestres de arroz *O. glumaepatula* e dos controles *O. sativa* Primavera e BRS Bonança.

Genótipos	40 kDa	39 kDa	38 kDa	37 kDa	36 kDa	35 kDa
BGA14233	+	-	+	+	-	+
BGA14232	+	+	-	-	-	+
BGA14280	+	-	+	+	-	+
BGA14160	+	-	+	+	-	+
BGA14162	+	-	+	+	-	+
BGA14170	+	-	+	+	-	+
BG114179	+	-	+	+	-	+
BG114186	+	-	+	+	-	+
BGA14187	+	-	+	+	-	+
BGA14188	+	-	+	+	-	+
BGA14268	+	-	+	-	+	-
BGA14204	+	-	+	+	+	-
BGA14203	+	-	+	+	-	-
BGA14197	+	-	+	+	+	-
BGA14200	+	-	+	+	+	-
BGA14210	+	-	+	+	+	-
BGA14207	+	-	+	+	+	-
BGA14208	+	-	+	+	-	-
BGA14137	+	-	+	+	-	-
BGA14270	+	-	+	-	+	-
BGA14202	+	+	+	-	-	+
BGA14195	+	+	+	-	-	+
BGA14198	+	-	+	-	-	+
BGA14199	+	-	+	-	-	+
BGA14206	+	-	+	-	-	+
BGA14201	+	+	+	-	-	+
BGA14269	+	-	+	-	-	+
BGA14196	+	-	+	-	-	+
BGA14205	+	-	+	-	-	+
Primavera	-	+	-	+	-	+
BRS Bonança	-	+	-	+	-	+

Bandas presentes: +

Bandas ausentes: -

5.3.4 Análise qualitativa por eletroforese SDS-PAGE das frações protéicas de 12 genótipos representativos de *O. glumaepatula*

A técnica de SDS-PAGE é um poderoso método analítico para estimar a massa molecular e avaliar a pureza da molécula de proteína (KHAN et al., 2008). Assim, através desta técnica a fração albumina dos genótipos de *O. glumaepatula* apresentaram proteínas de alta (97 a 52 kDa), média (41 a 30 kDa) e baixa (25 a 15 kDa) massa molecular (Figura 10). Entre esses genótipos o perfil da fração albumina foi bastante similar, apresentando diferenças quando comparado à espécie *O. sativa*. Os genótipos silvestres apresentaram uma banda intensa com massa molecular em torno de 18 kDa, enquanto as cultivares Primavera e BRS Bonança não apresentaram essas proteínas ou então, apresentaram baixa concentração e não foram visualizadas (Figura 10).

O perfil das globulinas foi similar entre os genótipos silvestres de arroz e as variedades cultivadas, havendo diferença apenas na intensidade das bandas entre os diferentes genótipos, o que pode indicar uma expressão diferencial para essas proteínas. As globulinas também apresentaram proteínas de alta (98 a 52 kDa), média (41 a 30 kDa) e baixa (25 a 15 kDa) massa molecular (Figura 11). Além disso, alguns genótipos apresentaram bandas bastante intensas na faixa de 25 kDa. Cagampang et al., (1976) encontraram para a fração globulina bandas mais intensas em torno de 20 kDa, e bandas com massa molecular variando de 110 kDa a 7,9 kDa para a *O. sativa*. Chandi & Sogi (2007) também encontraram para *O. sativa* uma grande variação de massa molecular para as frações albumina e globulina. Estes autores encontraram para albumina proteínas com massa molecular de 96 a 24 kDa, e para as globulinas a variação foi de 118 a 23 kDa.

A prolamina apresentou um padrão similar de bandas entre os genótipos silvestres e as cultivares de arroz, sendo caracterizada por proteínas de baixa massa molecular (18 a 15 kDa) (Figura 12). Porém, foram observadas diferenças na intensidade das bandas indicando diferenças na expressão destas proteínas (Figura 12). Borght et al., (2006) encontraram prolaminas com massa molecular entre 16 e 10 kDa, esses valores foram próximos aos observadas nos doze genótipos de *O. glumaepatula*. Já Chandi & Sogi (2007), encontraram prolaminas um pouco maiores, apresentando massa molecular de 28 a 24 kDa, que não foram observadas neste estudo.

As diferenças de massa molecular entre as frações protéicas encontradas neste trabalho e na literatura podem estar relacionadas com variações genótípicas, modificações pós-traducionais dessas proteínas de reserva, além de possíveis variações metodológicas e ambientais.

Através dos géis para a análise da fração glutelina foi possível identificar, para os genótipos BGA14268 e BGA14208, α -glutelinas com massa molecular em torno de 34 kDa que não foram separadas nos géis de proteína total (Figura 8 e 13). Os genótipos BGA14197 e BGA14207, no gel de proteína total, apresentaram quatro α -glutelinas sendo a última banda com massa molecular de 36 kDa. No entanto, a visualização desta quarta banda não foi nítida (Figura 8). Através dos géis da fração glutelina foi possível observar nitidamente a presença das quatro bandas de α -glutelina, sendo que a última banda, que antes havia apresentado massa molecular em torno de 36 kDa, no gel de glutelina apresentou massa molecular em torno de 35-34 kDa (Figura 13). Essa variação na massa molecular pode estar relacionada com a diferença de metodologia para extração da proteína total e da fração glutelina. O tampão para a extração da glutelina, por possuir maior concentração de β -mercaptoetanol, mostrou-se mais eficiente para a quebra das pontes dissulfeto e por isso separou melhor os α -polipeptídeos.

As cultivares também apresentaram uma quarta banda de α -glutelina, a qual não havia sido observada nos géis de proteína total, com massa molecular em torno de 34 kDa e denominada por Jahan et al., (2001) de glutelina α -4. Os demais genótipos silvestres apresentaram glutelinas com massa molecular próximas às encontradas nos géis de proteína total, com variação de 40 a 34 kDa para as α -glutelinas, e 21 a 19 kDa para as β -glutelinas (Figura 13).

Entre as espécies e entre os genótipos foram encontradas variações de α -glutelinas. Acessos de *O. glumaepatula* apresentaram α -glutelina de 40 kDa, a qual não foi encontrada para as duas cultivares de *O. sativa*. O genótipo BGA14232 não apresentou α -glutelinas de 38 e 37 kDa comuns aos demais genótipos, como já havia sido observado nos géis de proteína total (Figura 14).

As α -glutelinas são codificados por uma pequena família de multigenes, as quais podem ser classificadas em 2 subfamílias: Glutelina tipo A (GluA) e glutelina tipo B (GluB). Essas glutelinas são típicas da espécie *O. sativa japonica* e são compostas por seis subunidades maiores: GluA1, GluA2, GluA3, GluB1, GluB2 e GluB4; e três menores: GluB43, GluB22 e GluB42 (KATSUBE-TANAKA et al., 2004). A subfamília GluB possui melhor qualidade

nutricional (20% a mais de lisina) comparada à GluA (TAKAIWA et al., 1991). No trabalho de Khan et al., (2008) foram analisadas através de 2D-PAGE as glutelinas das espécies de arroz *O. sativa* (genoma AA), *O. nivara* (AA), *O. rufipogon* (AA), *O. glaberrima* (AA), *O. barthii* (AA), *O. meridionalis* (AA), *O. punctata* (BB), *O. punctata* (BBCC) *O. latifolia* (CCDD), *O. alta* (CCDD), *O. grandiglumis* (CCDD), *O. brachyantha* (FF) e *O. longiglumis* (HHJJ), e em geral, foram encontrados padrões diferenciais nos mapas constituídos pelo conjunto de *spots* de glutelinas de cada espécie. A maior variabilidade de α -glutelinas esteve presente em espécies silvestres de arroz, sobretudo aquelas que não possuíam o genoma AA.

Os resultados encontrados por estes autores demonstraram a grande diversidade de α -glutelinas para espécies silvestres do gênero *Oryza*, melhor qualidade nutricional por apresentarem maiores teores de lisina comparada à *O. sativa*, e a potencial contribuição desses genótipos silvestres para o melhoramento da qualidade nutricional do arroz cultivado. No presente trabalho também foi encontrada grande diversidade de α -glutelinas para espécie *O. glumaepatula*, e por isso foi proposta uma nova classificação para as α -glutelinas: glutelinas α -1 de 40 kDa, α -2 de 39 kDa, α -3 de 38 kDa, α -4 de 37 kDa, α -5 de 36 kDa e α -6 de 35 ou 34 kDa.

Essa grande diversidade de α -glutelinas sugere a importância da espécie silvestre *O. glumaepatula* como fonte de aminoácidos de maior valor nutricional que poderia ser transferido para o arroz cultivado, através de cruzamentos interespecíficos.

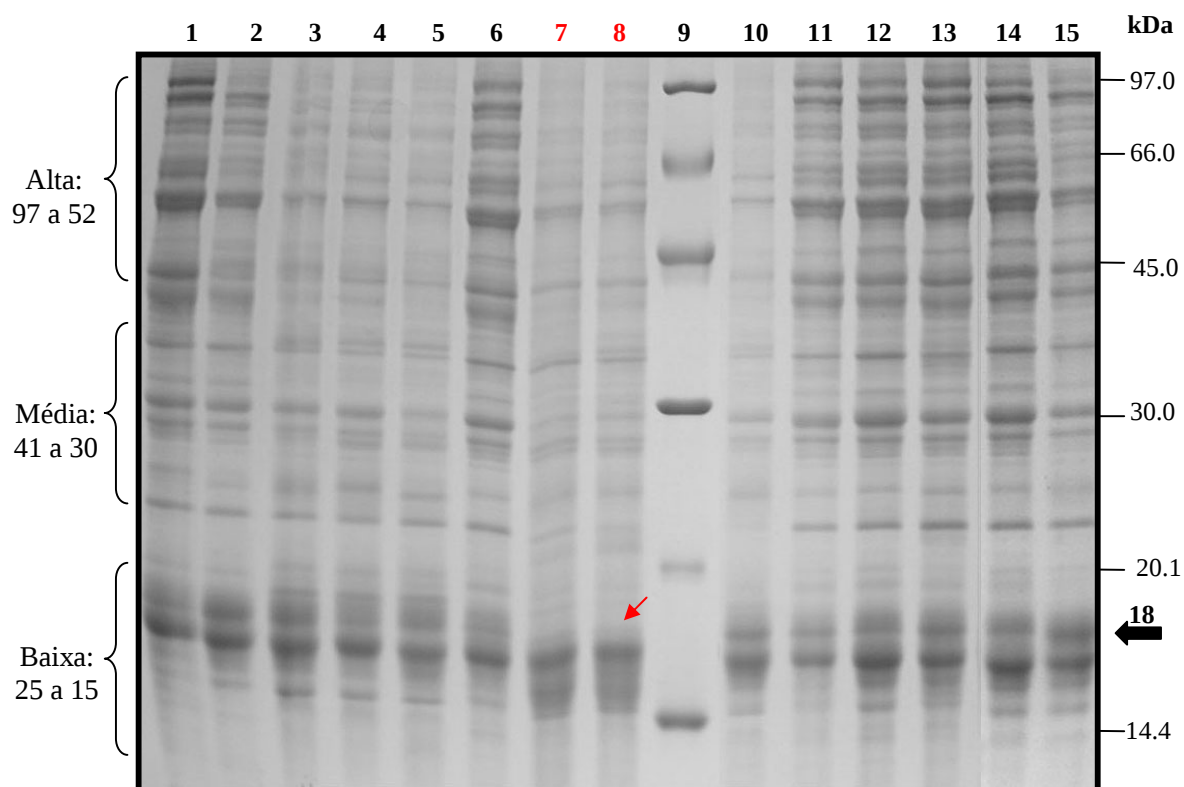


Figura 10. Eletroforese SDS-PAGE da fração albumina extraída da semente de arroz *O. glumaepatula* e *O. sativa*. **Linha 1:** BGA14280; **linha 2:** BGA14232; **linha 3:** BGA14233; **linha 4:** BGA14160; **linha 5:** BGA14197; **linha 6:** BGA14170, **linha 7:** BRS Bonança; **linha 8:** Primavera; **linha 9:** Marcador de baixa massa molecular padrão (GE Healthcare); **linha 10:** BGA14179; **linha 11:** BGA14268; **linha 12:** BGA14208; **linha 13:** BGA14207; **linha 14:** BGA14162; **linha 15:** BGA14187. A seta preta indica a forte intensidade das bandas protéicas com massa molecular em torno de 18 kDa. A seta vermelha indica a diferença entre as espécies, com a ausência ou baixa intensidade das proteínas de 18 kDa para a *O. sativa*. Os controles foram destacados em vermelho. Gel de poliacrilamida desnaturante a 14%, corado com *Coomassie Blue* R250.

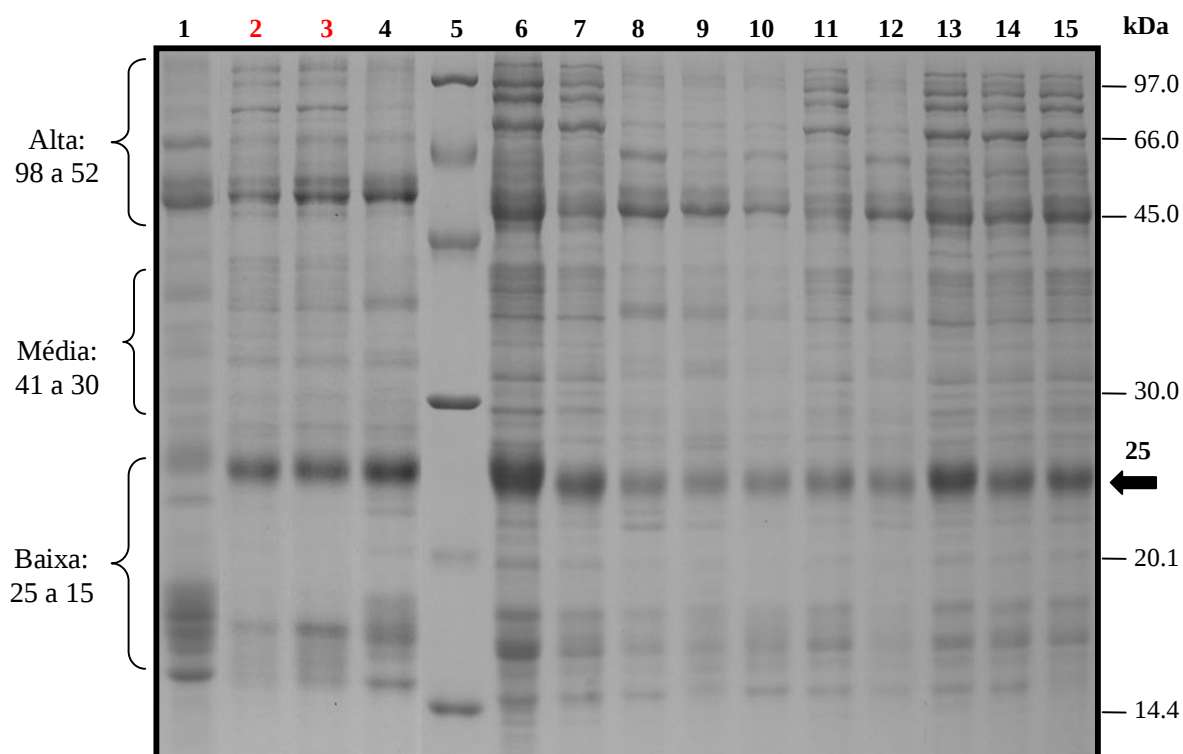


Figura 11. Eletroforese SDS-PAGE da fração globulina extraída da semente de arroz *O. glumaepatula* e *O. sativa*. **Linha 1:** BGA14233; **linha 2:** Primavera; **linha 3:** BRS Bonança; **linha 4:** BGA14162; **linha 5:** Marcador de baixa massa molecular padrão (GE Healthcare); **linha 6:** BGA14280; **linha 7:** BGA14232 **linha 8:** BGA14160; **linha 9:** BGA14170, **linha 10:** BGA14179; **linha 11:** BGA14268; **linha 12:** BGA14187; **linha 13:** BGA14208; **linha 14:** BGA14197; **linha 15:** BGA14207. A seta indica a forte intensidade das bandas protéicas com massa molecular de 25 kDa presentes em ambas as espécies. Os controles foram destacados em vermelho. Gel de poliacrilamida desnaturante a 14%, corado com *Coomassie Blue* R250.

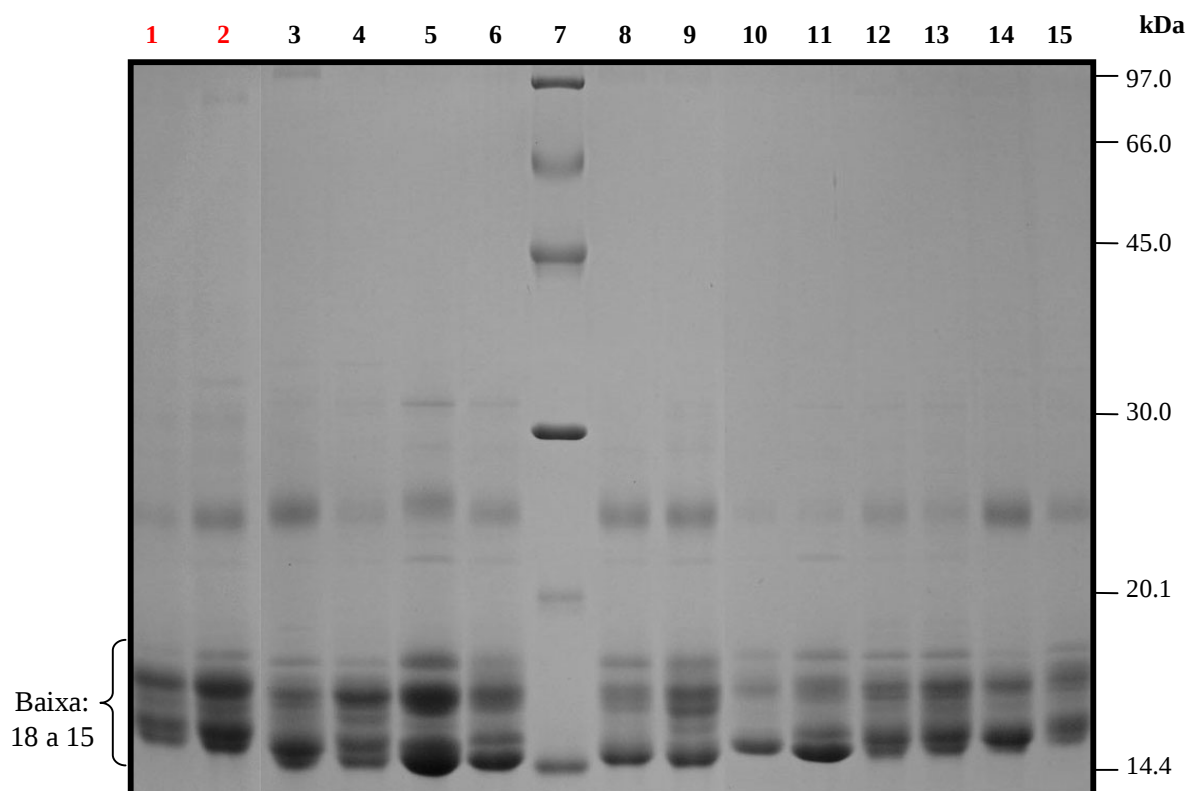


Figura 12. Eletroforese SDS-PAGE da fração prolamina extraída da semente de arroz *O. glumaepatula* e *O. sativa*. **Linha 1:** Primavera; **linha 2:** BRS Bonança; **linha 3:** BGA14170; **linha 4:** BGA14179; **linha 5:** BGA14280; **linha 6:** BGA14233; **linha 7:** marcador de baixa massa molecular padrão (GE Healthcare); **linha 8:** BGA14160; **linha 9:** BGA14162; **linha 10:** BGA14268; **linha 11:** BGA14207; **linha 12:** BGA14232; **linha 13:** BGA14208; **linha 14:** BGA14197; **linha 15:** BGA14187. Os controles foram destacados em vermelho. Gel de poliacrilamida desnaturante a 14%, corado com *Coomassie Blue* R250.

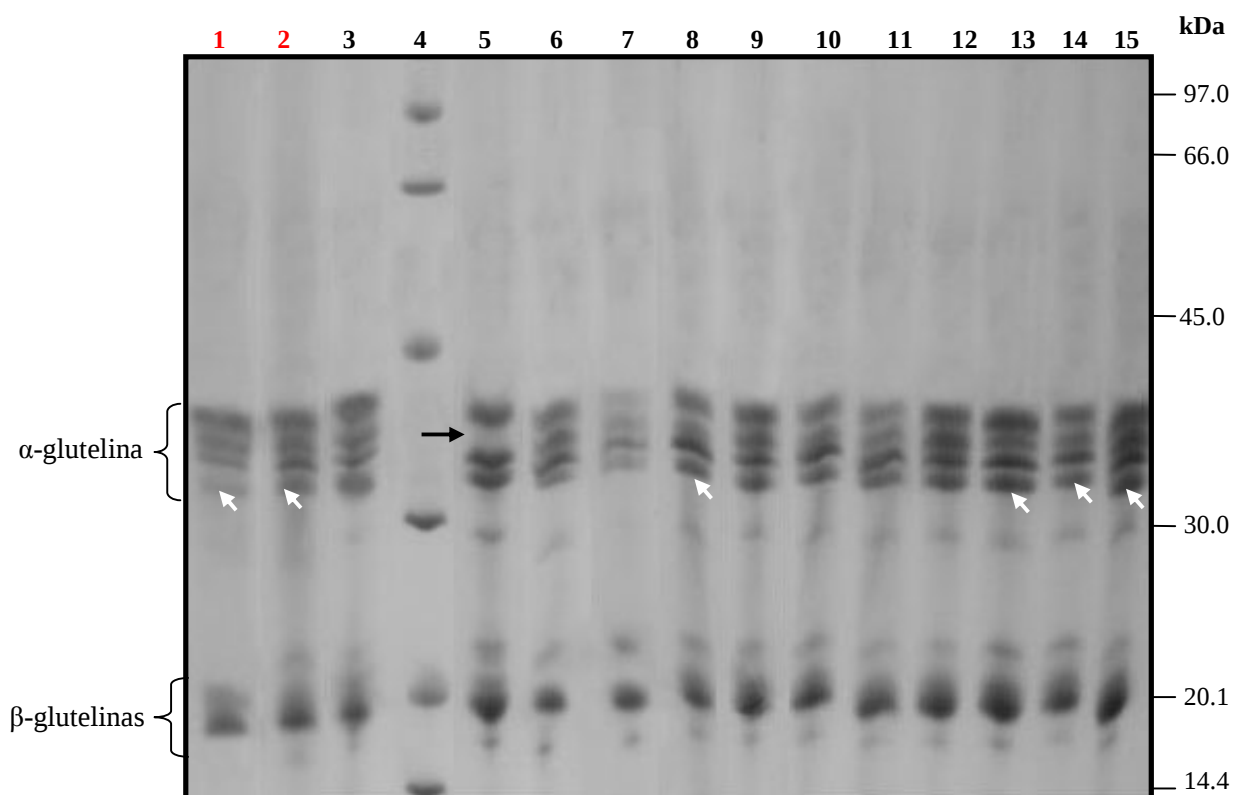


Figura 13. Eletroforese SDS-PAGE da fração glutelina extraída da semente de arroz *O. glumaepatula* e *O. sativa*. **Linha 1:** BRS Bonança; **linha 2:** Primavera; **linha 3:** BGA14280; **linha 4:** marcador de baixa massa molecular padrão (GE Healthcare); **linha 5:** BGA14232; **linha 6:** BGA14233; **linha 7:** BGA14160; **linha 8:** BGA14208; **linha 9:** BGA14162; **linha 10:** BGA14170; **linha 11:** BGA14179; **linha 12:** BGA14187; **linha 13:** BGA14268; **linha 14:** BGA14197; **linha 15:** BGA14207. A seta preta indica um perfil diferencial com a ausência de um α -polipetídeo. As setas brancas indicam a presença de α -glutelina com massa molecular em torno de 35 e 34 kDa que não foram visualizadas no gel de proteína total. Os controles foram destacados em vermelho. Gel de poliacrilamida desnaturante a 13%, corado com Coomassie Blue R250.

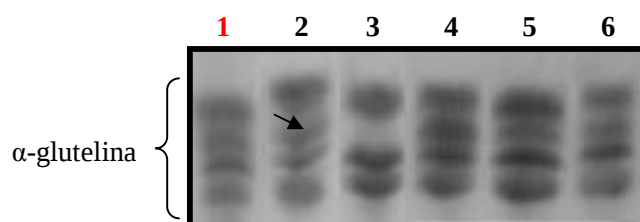


Figura 14. Imagem comparativa da análise eletroforética da fração glutelina entre cinco genótipos *O. glumaepatula* e a espécie *O. sativa* (destacada em vermelho). A seta preta indica a ausência de uma banda de proteína comum aos outros genótipos. Região ampliada extraída da figura 13. **Linha 1:** Primavera; **linha 2:** BGA14280; **linha 3:** BGA14232; **linha 4:** BGA14187; **linha 5:** BGA14268; **linha 6:** BGA14197. Gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE a 13%, corado com Coomassie Blue R250.

5.4 CONCLUSÕES

1. Os maiores teores de proteína total e frações protéicas foram encontrados em acessos da espécie silvestre de arroz *O. glumaepatula* em relação à espécie cultivada *O. sativa*.
2. As diferenças nos perfis protéicos encontrados entre as espécies *O. sativa* e *O. glumaepatula* podem estar relacionadas com variações genótípicas e modificações pós-traducionais.
3. Os maiores teores protéicos e as diferenças nos perfis protéicos encontrados na espécie *O. glumaepatula* reforçam a importância da utilização desta espécie como fonte de variabilidade genética em cruzamentos interespecíficos com a espécie *O. sativa* visando o aumento do conteúdo protéico do arroz.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOOLA, S; DARREN, N.G; MILLS, D. Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. **Journal of Cereal Science**, n°41, p.283-290, 2005.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248 -254, 1976.

BRESSANI, R. Protein quality of high lysine maize for humans. Am. Assoc. **Cereal Chem.**, v.36 n°9, p.806-811, 1991.

BRONDANI, C; BRONDANI R.P.V; RANGEL P.H.N; FERREIRA, M.E. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theor Appl Genet.** v.104, p.1192-1203, 2002.

BRONDANI, C; BRONDANI, R.P.V; RANGEL, P.H.N; FERREIRA, M. E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *O. glumaepatula* x *O. sativa*. **Hereditas.** n°134, p 59 - 71, 2001.

BRONDANI, R.P.V; ZUCCHI, M.I; BRONDANI, C; RANGEL, P.H.N; BORBA T.C.O; RANGEL P.N; MAGALHAES M.R; VENCOSKY, R. Genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. **Genetica**, v.125, p.115-123, 2005.

CAO, X; WEN, H; LI, C; GU, Z. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. **Journal of Cereal Science.** n°50, p.184-189, 2009.

CRUZ, C.D. **Programa Genes:** Aplicativo computacional em genética e estatística, Viçosa: UFV, p.648, 2001.

DANDLANI, M.V; VASHISHT; A. VARIER. Comparison of field grow out and electrophoresis methods for testing genetic purity of cotton hybrid seed. **Seed Res.** n° 2, p.160-162, 1994.

DEVOS, K. M; GALE, M. D. Genome Relationships: The Grass Model in Current Research. **Plant Cell.**v.12, p.637-646, 2000.

DOLL, H; ANDERSEN, B. Preparation of barley storage protein, hordein for analytical sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. **Analytical biochemistry.** v.115, p.61-66, 1981.

FAOSTAT. **FAO** statistical databases. Retrieved 2 May 2001 from the World Wide Web: <http://apps.fao.org/>, 2001.

FURUTA, M; YAMAGATA, H; TANAKA, K; KASAI, Z; FUJII, S. Cell-free synthesis of the Rice glutelin precursors. **Plant Cell Physiol.** v. 27, p.1201-1204, 1986.

HUEBNER, F. R; BIETZ, J. A; JULIANO, B. O. Rice cultivar identification by high-performance liquid chromatography of endosperm proteins. **Cereal Chem.** v. 67, p.129 - 135, 1990.

IRRI - INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Rice Knowledge Bank.** Disponível em <<http://www.knowledgebank.irri.org/wildricetaxonomy>>. Acesso em 21 mar. de 2008.

JAHAN, M.S; KUMMARU, T; SATOH, H; HAMID, A. Variation of glutelina seed storage in Bangladesh rice cultivars. **Rice Genetics Newsletter.** v.18, 2001.

JOSEPH, E; SWANSON, B. G. Growth and nitrogen retention of rats fed bean (*Phaseolus vulgaris*) and bean and rice diets. **Food Research International**, Ottawa, v.26, n°4, p.261-269, 1993.

JULIANO, B. O; IGNACIO, C. C; PANGANIBAN, V. M; PEREZ, C. M. Screening for high protein rice varieties. **Cereal Sci. Today**, n° 13, p.299, 1968.

KATSUDE-TANAKA, T; DULDULAO, J. B. A; KIMURA, Y; LIDA, S; YAMAGUCHI, T; NAKANO, J; UTSUMI, S. The two subfamilias of Rice glutelin differ in both primary and higher-order structures. **Biochem. Biophys. Acta** p.95-102, 2004.

KENNEDY, G; BURLINGAME, B. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. **Food Chemistry**, Barking, v. 80, n°4, p.589-596, 2003.

KIM, S.T; WANG, Y; KANG, S.Y; KIM, S. G; RAKWAL, R; KIM, Y.C; KANG, K.Y. Developing Rice Embryo Proteomics Reveals Essential Role for Embryonic Proteins in Regulation of Seed Germination. **Journal of Proteome Research.**v.8, p.3598 – 3605, 2009.

KOMATSU, S; KOJIMA, K; SUZUKI, K; OZAKI, K; HIGO, K. **Nucleic Acids Res.**v.32, p.388–392, 2004.

KRISHNAN, H. B; OKITA, T.W. Structural relationship among the rice glutelina polypeptides. **Plant Physiology.** v.81, p. 748-753, 1986.

LUMEN, B.O; CHOW, H. Nutritional quality of rice endosperm. In: LUH, B. S. (Ed.). **Rice utilization.** 2°ed. New York: Van Nostrand Reinhold. v.2, cap.15, p.363-395, 1995.

LUTHRA, P. Varietal identification of cotton. Msc Thesis, Chaudhary Charan Singh Haryana Agriculture University, **Hisar**, India, 1999.

MAHMOUD, A.A; SUKUMAR, S; KRISHNAN, H.B. Interspecific Rice Hybrid of *Oryza sativa* × *Oryza nivara* Reveals a Significant Increase in Seed Protein Content. **Journal Agric. Food Chem.**, v.56, p.476-482, 2008.

MAROCO, J. Análise estatística com utilização do SPSS. Lisboa: **Silabo**, 2ºed., p.293-328, 2003.

NALIVKO, G. Y; PETIOSKAYA, V.S; DZYUBA, O. Variability of protein and amino acid content in rice grain. **App. Biochem. Microbiol.** v.2, p.506 - 510, 1975.

NAVES, M.M.V; BASSINELLO, P.Z. Importância na nutrição humana. In: dos Santos, A.B; Stone L.F, Vieira N.R.A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2ºed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, Cap.1, p.17-30, 2006.

OGAWA, M; KUMAMARU, T; SATOH, H; IWATA, N; OMURS, T; KASAI, Z; TANAKA, K. Purification of protein body-I of rice seed and its polypeptide composition. **Plant Cell Physiol.** v.28 p.1517-1527, 1987.

OLIVEIRA, A. C; DERBYSHIRE, E; CARVALHO, M. T. V; ANDO; A. Perfis protéicos de variedades parentais e híbricos de arroz e sua correlação com heterose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.28, p.313-322, 1991.

OLIVEIRA, J.P; DEL PELOSO, M.J; MORAIS, O.P; MELO, L.C; SILVA, H.T; FONSECA, J.R; SILVA, S.C. Parecença entre acessos tradicionais de feijão carioca utilizando o método de ward. **IAC**, Campinas, v.85, 2008.

OSBORNE, T. B. The Vegetable Proteins. **Longmans**. London, 1924.

RAM, C. Identification of Barley varieties by phenol test. Growth chamber technique and electrophoresis. Presented in Symposium on plant science research: present status and future challenges held at CCSHAU, **Hisar**, 1996.

RANGEL, P.N; BRONDANI, R.P.V; RANGEL, P.H.N; BRONDANI, C. Agronomic and molecular characterization of introgression lines from the interspecific cross *Oryza sativa* (BG 90-2) × *Oryza glumaepatula* (RS-16). **Genetics and Molecular Research**. v.7, nº 1, p.184-195, 2007.

RANGEL, P.H.N; GUIMARÃES, E.P; NEVES, P.C.F. Base genética das cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.31, p.349-357, 1996.

RAO, T.N; NARKER, Y.S; PATIL,V.D. Identification of cultivars by SDS-PAGE of soluble proteins. **PI. Var. Seeds**, nº3, p.7-13, 1990.

SAS INSTITUTE. **SAS** language and procedures: usage. Version 6. Cary, p.373, 1995.

SILVEIRA, R. D. D. Análise quantitativa das proteínas de reserva da coleção nuclear de arroz da Embrapa e identificação de algumas proteínas de reserva em duas cultivares brasileiras. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades-degradações-modificações. São Paulo: **Varela**, p.139-257, 1996.

SHEWRY, P. R; HALFORD, N. G. Cereal seed storage protein: structures proprieties roli in grain utilization. **Journal Exp. Botany**. v.53, p.947-958, 2001.

SHOTWELL, M. A; LARKINS, B. A. The molecular biology and biochemistry of seed storage proteins. In: **The Biochemistry of Plants**. A Comprehensive Treatise, v.15 p.297-345, 1989.

STEENSON, D.F; SATHE, S.K. Characterization and digestibility of *Basmati* rice (*Oryza sativa* L. var. *Dehraduni*) storage protein. **Cereal Chemistry**, v.72, p.275-280, 1995.

TAIRA, H. Grain quality: physicochemical properties and quality of rice grains. In: MATSUO, T; KUMAZAWA, K; ISHII, R; ISHIHARA, K; HIRATA, H. (Ed.). **Science of the rice plant**. Tokyo: **Food and Agriculture Police Research Center**. v.2, cap. 6.1, p.1063-1089, 1995.

TAKAIWA, F; OONO, K. Genomic DNA sequence of two new genes for new storage protein glutelin in rice. **Japanese Journal of Genetics** 66, p.161-171, 1991.

TANAKA, K; SUGIMOTO, M; OGAWA, M; KASAI, Z. Isolation and characterization of two types of protein bodies in rice endosperm. **Agric. Biol**, 1980.

TANAKA, T; HAYASHIDA S; HONGO M. The relationship of the feces protein particles to rice protein bodies. **Agric. Biol. Chem**. v.39, p.515–518, 1975.

TURLEY, R.H; CHING, T.M. Storage protein accumulation in Scio Barley seedas asffected by late foliar application of nitrogen. **Crop Science**. v.26, p.987-993, 1986.

WARD, J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association**. Washington, n°58, p.236, 1963.

YAMAGATA, H; SUGIMOTO, T; TANAKA, K; KASAI, Z; Biosynthesis storage protein in developing rice seeds. **Plant Physiol**. v.70, p.1094 -1100, 1982.

YOUNG, V.R; PELLET, P.L. Plant proteins in relation to human protein and amino-acid nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**. New York, v.59, n°5, p.1203-1212, 1994.

6. ARTIGO 2: Análise quantitativa e de SDS-PAGE das proteínas de reserva de linhagens interespecíficas *Oryza sativa* x *Oryza glumaepatula*.

RESUMO

A espécie silvestre *Oryza glumaepatula* ocorre no Brasil, e desde 1995 vem sendo utilizada para transferir genes úteis para o arroz cultivado *O. sativa* por meio de cruzamentos interespecíficos. Este trabalho teve como objetivo quantificar e determinar os perfis protéicos totais e das frações protéicas presentes no endosperma do grão de 70 linhagens desenvolvidas a partir dos cruzamentos interespecíficos *Oryza sativa* BG90-2 x *O. glumaepatula* RS-16 e *O. sativa* CICA-8 x *O. glumaepatula* RS-16. Através da análise de variância para o teor de proteína total e frações protéicas foram encontradas diferenças altamente significativas ($P < 0,01$) entre os genótipos. Entre os cruzamentos foram encontradas cinco linhagens interespecíficas com maior conteúdo de proteína total, cujo teor médio foi de 10,95%, sendo significativamente superior aos parentais BG90-2 (10,0%) e CICA-8 (9,61%). O parental silvestre RS-16 destacou-se por apresentar o maior teor de proteína total (14,06%). Algumas linhagens interespecíficas apresentaram valores superiores das frações protéicas quando comparadas aos parentais, exceto para a fração glutelina, onde o parental silvestre RS-16 apresentou altos teores juntamente com seis linhagens interespecíficas. A fração prolamina foi a que apresentou maior aumento nas linhagens, cerca de 100%, em relação ao parental CICA-8, seguida da globulina, com aumento de 89% em relação ao RS-16, a albumina com aumento de 84% em relação aos parentais CICA-8 e RS-16, e a glutelina com aumento de 6% em relação ao BG90-2. Através da análise de SDS-PAGE foi encontrado um perfil de proteína total similar entre as linhagens interespecíficas e os parentais. A espécie silvestre apresentou um perfil protéico diferenciado para as frações albumina, globulina e prolamina. Para todos os genótipos, a fração glutelina apresentou os quatro principais α -polipeptídeos, com variação de massa molecular de 40 a 34 kDa. Apenas o RS-16 apresentou α -glutelinas de 40 kDa, enquanto os demais genótipos apresentaram α -glutelinas de 39 kDa. Estes resultados inéditos, juntamente com resultados anteriores que apontaram linhagens interespecíficas com maior potencial produtivo, indicam que cruzamentos *O. sativa* x *O. glumaepatula* poderão gerar cultivares de arroz com maior teor protéico e mais produtivas.

Palavras-Chave: *O. glumaepatula*, cruzamento interespecífico, proteína de reserva.

6.1 INTRODUÇÃO

O arroz é consumido por cerca de 60% da população mundial e em países em desenvolvimento é a principal fonte de proteínas e carboidratos (KAWAKATSU et al., 2008). Alguns cereais possuem proteínas com importantes propriedades funcionais e nutricionais (DHINGRA & JOOD, 2002). O arroz possui um perfil de aminoácidos essenciais mais adequado quando comparado a outros cereais, como o milho e o trigo, por possuir alto teor do aminoácido essencial lisina, alta digestibilidade e consequentemente alta qualidade nutricional (NALIVKO et al., 1975; HUEBNER et al., 1990).

O grão de arroz é composto basicamente por amido e proteína. Grande parte das proteínas do grão são proteínas de reserva (LASZTITY, 1996; CAGAMPANG et al., 1966). As plantas acumulam as proteínas de reserva como fonte de aminoácidos para possibilitar o desenvolvimento da semente e permitir a germinação (CHRISPEELS 1985, SHOTWELL & LARKINS 1988). As proteínas de reserva do arroz são divididas em quatro grupos principais de acordo com suas diferentes solubilidades: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em sais), prolamina (solúveis em álcool) e as glutelinas (solúveis em soluções ácidas ou básicas) (OSBORNE, 1924; SHOTWELL & LARKINS, 1989). Para proteger estas proteínas de serem degradadas existem estruturas especiais, denominadas de corpos protéicos I e II, onde as proteínas de reserva ficam armazenadas. No arroz, a glutelina e a globulina são sintetizadas no retículo endoplasmático e armazenadas nos corpos protéicos II (*protein body II*) (YAMAGATA & TANAKA, 1986; FUTURA et al., 1986). Já as prolaminas ficam armazenadas no retículo endoplasmático rugoso em estruturas especiais, denominadas de corpos protéicos I (*protein body I*) (TAKAIWA et al., 1999).

Em geral, o teor de proteína total do grão de arroz (*O. sativa*) é em torno de 7% (SHIH, 2004; VANNUCCHI et al., 1990). No entanto, existe uma grande variação deste conteúdo protéico entre as diferentes variedades de arroz. Lúmen & Chow (1995), por exemplo, encontraram teores protéicos com variação de 4,3 a 18,2% para a *O. sativa*. Essa grande variação é influenciada tanto pelas diferenças genótípicas quanto pelas variações ambientais como radiação solar e temperatura, que interferem no crescimento e no conteúdo protéico do endosperma (JULIANO & BECHTEL, 1985). Steenson & Sathe (1995) quantificaram as frações

protéicas é encontraram valores em torno de 5,9% de albumina, 13,8% de globulina, 5,8% de prolamina e 74,5% de glutelina. A maior fração do arroz é a glutelina, perfazendo cerca de 70 a 80% da proteína total do grão, e apresenta teores mais elevados de lisina em relação à globulina e a prolamina (TAIRA, 1995; SGARBIERI, 1996), o qual é o aminoácido mais limitante nos cereais.

Nos últimos anos grande ênfase tem sido dada à realização de cruzamentos entre o arroz cultivado e espécies silvestres, objetivando ampliar a base genética do arroz, e com isto desenvolver genótipos com maior desempenho agrônômico (BRAR et al., 1996; JENA et al., 1990; MULTANI et al., 1994; MAHMOUD et al., 2008). As espécies silvestres são importantes reservatórios gênicos e desempenham um papel fundamental na melhoria das espécies cultivadas, contribuindo com genes para resistência a estresses bióticos e abióticos (MORISHIMA et al., 2001; AMMIRAJU et al., 2006). Como exemplos incluem o gene de resistência ao vírus tungro da espécie *Oryza nivara* para o arroz cultivado, e genes de resistência a bacterioses a partir de *O. longistaminata* transferidos também para o arroz (BRAR & KHUSH, 1997). Resultados favoráveis em relação à qualidade nutricional do grão também foram observados a partir de linhagens interespecíficas de arroz, como relatado por Mahmoud et al., (2008), que obtiveram aumento do conteúdo protéico em linhagens desenvolvidas a partir do cruzamento *O. nivara* x *O. sativa*.

O Brasil é um dos poucos países que ainda dispõem de populações extensivas de germoplasma silvestre em condições naturais, como na Amazônia e no Pantanal Matogrossense, isoladas de cultivos comerciais, e sem a introgressão de alelos da espécie cultivada (RANGEL et al., 1996). Dentre as espécies silvestres, existem quatro americanas: *O. glumaepatula* (AA), *O. alta* (CCDD), *O. grandiglumis* (CCDD) e *O. latifolia* (CCDD), que estão distribuídas do México até o norte da Argentina. Todas existem no Brasil e são hidrófilas (OLIVEIRA et al., 1991). Destas espécies que ocorrem no continente Americano, *Oryza glumaepatula* tem despertado maior interesse, especialmente no que diz respeito à sua conservação e utilização como reservatório gênico, por possuir o genoma diplóide, o que torna viável seu cruzamento com a espécie cultivada *O. sativa*, resultando em descendentes férteis, além de estar adaptada a condições edafoclimáticas brasileiras (BRONDANI et al., 2001; BRONDANI et al., 2005). O desenvolvimento de linhagens interespecíficas *O. sativa* x *O. glumaepatula* iniciou em 1995 no

Brasil (BRONDANI et al., 2001). Nestas linhagens foram encontradas características de interesse agrônômico como rápido crescimento vegetativo e maior potencial produtivo (BRONDANI et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi analisar a proteína de reserva do grão de linhagens interespecíficas desenvolvidas através dos cruzamentos *O. sativa* BG90-2 x *O. glumaepatula* RS-16 e *O. sativa* CICA-8 x *O. glumaepatula* RS-16.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Material vegetal

As atividades de extração, isolamento, análises por eletroforese em gel e as dosagens das proteínas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão.

Foram analisadas linhagens interespecíficas derivadas de dois cruzamentos interespecíficos entre a espécie silvestre *Oryza glumaepatula* RS-16 e a espécie cultivada *Oryza sativa* (linhagem BG90-2 e cultivar CICA-8). Os parentais da espécie *O. sativa* pertencem à Coleção Nuclear Brasileira de Arroz e possuem características de interesse agrônomo. A cultivar BG90-2 tem origem no Sri Lanka, enquanto a cultivar CICA-8 é oriunda da Colômbia. O genitor silvestre RS-16 foi coletado no Estado do Amazonas na Ilha Trocarí, próximo ao Rio Solimões.

Para o cruzamento *O. glumaepatula* RS-16 x *O. sativa* BG 90-2 foram avaliadas 34 linhagens interespecíficas RC2F8 através da análise quantitativa de proteína total e frações protéicas do grão (Figura 1 e Tabela 1). Já para análise qualitativa de proteína total foram utilizadas 15 linhagens e para determinação do perfil protéico das frações albumina, globulina, prolamina e glutelina, foram utilizadas quatro linhagens distintas. Estas linhagens foram cultivadas na fazenda Palmital em Goianira (GO) no ano de 2002/2003 no sistema de cultivo irrigado.

Para o cruzamento *O. glumaepatula* RS-16 x *O. sativa* CICA-8 foram analisadas 36 linhagens interespecíficas RC2F10 (Figura 2 e Tabela 1). Essas linhagens foram utilizadas para a análise quantitativa de proteína total e frações protéicas. Para a determinação do perfil protéico (análise qualitativa) de proteína total também foram utilizadas quinze linhagens e para as frações foram utilizadas quatro linhagens. Estas linhagens foram cultivadas na fazenda Palmital em Santo Antônio de Goiás (GO) no ano de 2007/2008 no sistema de cultivo irrigado. Os parentais também foram analisados e serviram como controle.

Tabela 1. Relação das 34 Linhagens interespecíficas do cruzamento BG90-2 x RS-16 e relação das 36 Linhagens interespecíficas do cruzamento CICA-8 x RS-16 utilizadas para a análise quantitativa. As linhagens utilizadas para a análise qualitativa de proteína total e análise qualitativa das frações protéicas foram identificadas.

Linhagens do cruzamento BG90-2 x RS-16		Linhagens do cruzamento CICA-8 x RS-16	
CNA10851* ¹	CNA10855	CNA11032	CNA11083
CNA10867*	CNA10871	CNA11050* ¹	CNA11085
CNA10858*	CNA10879	CNA11028* ¹	CNA11049
CNA10859*	CNA10861	CNA11054*	CNA11039
CNA10870*	CNA10872	CNA11038*	CNA11099
CNA10880*	CNA10877	CNA11026*	CNA11089
CNA10884*	CNA10866	CNA11044*	CNA11095
CNA10868* ¹	CNA10882* ¹	CNA11091*	CNA11138
CNA10869	CNA10865*	CNA11116*	CNA11047
CNA10860	CNA10863*	CNA11034	CNA11086
CNA10881	CNA10857*	CNA11036	CNA11092* ¹
CNA10862	CNA10854*	CNA11041	CNA11084* ¹
CNA10852	CNA10876* ¹	CNA11025	CNA11053*
CNA10883	CNA10878*	CNA11134	CNA11069*
CNA10856	CNA10874	CNA11045	CNA11109*
CNA10864	CNA10873	CNA11119	CNA11051*
CNA10885	CNA10875	CNA11130	CNA11067*
-	-	CNA11029	CNA11074

*Análise qualitativa de proteína total

¹Análise qualitativa das frações protéicas

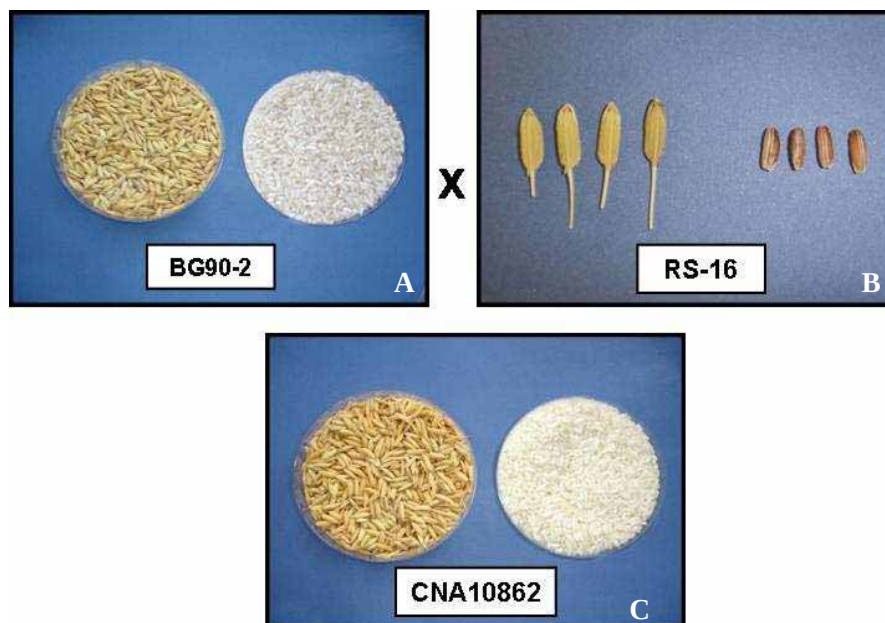


Figura 1: A) Sementes do arroz cultivado BG90-2 com casca e polido. B) Sementes de arroz silvestre com casca e sem casca. C) Sementes com casca e polida de linhagem interespecífica do cruzamento RS-16 x BG90-2

Foto: Karina Santos

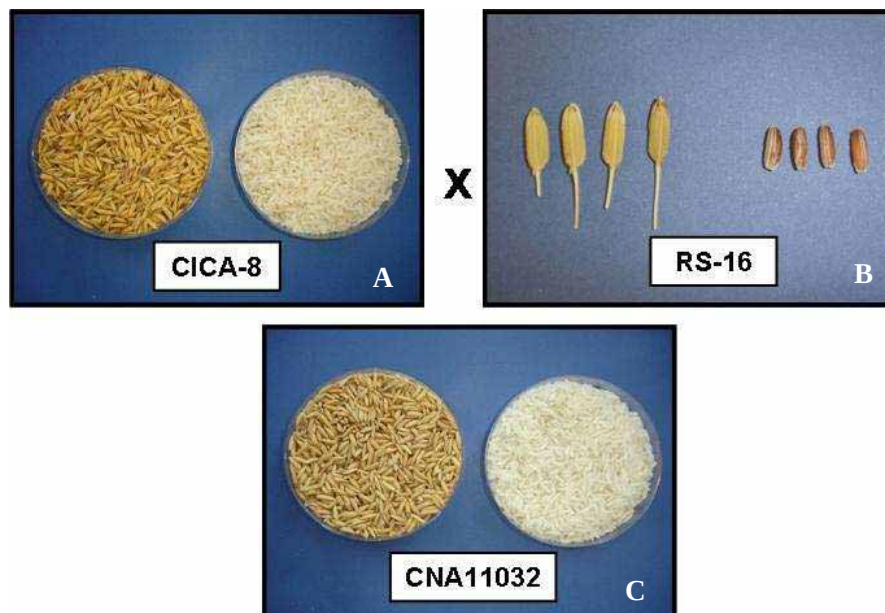


Figura 2: A) Sementes de arroz cultivado CICA-8 com casca e polido. B) Sementes de arroz silvestre com casca e sem casca. C) Sementes com casca e polida de linhagem interespecífica do cruzamento RS-16 x CICA-8.

Foto: Karina Santos

6.2.2 Extração das proteínas totais e das frações protéicas para análise quantitativa

O preparo das amostras protéicas foi realizado a partir dos grãos secos, polidos, moídos e desengordurados com acetona (P.A.), obtendo assim uma farinha seca e homogênea para o preparo dos extratos. A extração sequencial das proteínas totais e das frações protéicas foi realizada segundo Doll & Andersen (1981) e Turley & Ching (1986), com modificações, que exploram as características de solubilidade de cada fração protéica. A partir desta farinha foi possível fazer a extração de proteína total e a extração das quatro frações (albumina, globulina, prolamina e glutelina) de cada genótipo.

Para a extração de proteína total foram pesados 10mg de cada farinha em tubos de microcentrífuga e adicionado 250µL de NaOH 0,1M. Essa mistura foi agitada por 1 hora, centrifugada (13.000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante coletado.

A extração das frações foi realizada de modo sequencial de acordo com a característica de cada fração protéica. Para isto foram pesados 20mg de cada amostra em tubos de microcentrífuga e adicionados 500µL de água destilada para a extração da albumina. Em seguida foi agitada por 1 hora, centrifugada (13.000 rpm por 5 minutos) e coletado o sobrenadante. O precipitado resultante foi utilizado para a extração da fração em sequência. No mesmo tubo foi adicionado 500µL de Tris 10mM pH 7,4 contendo NaCl 0,5M para a extração da globulina. Esta mistura foi agitada por 1 hora, centrifugada (13.000 rpm por 5 minutos) e coletado o sobrenadante. Ainda sobre o mesmo precipitado, foi adicionado 500µL de isopropanol 60%, utilizado para a extração da fração prolamina. Esta mistura também foi agitada por 1 hora, centrifugada 13.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante coletado. Por último foi adicionado 500µL de NaOH 0,1M, sobre o precipitado, agitado por 1 hora, centrifugado (13.000 rpm por 5 minutos) e depois o sobrenadante coletado em novo tubo.

Tanto para a extração total quanto para a extração fracionada as amostras foram submetidas a agitação, centrifugação e coleta do sobrenadante por duas vezes a fim de extrair uma maior quantidade de proteína. Estes procedimentos foram realizados em três repetições independentes para cada genótipo, a fim de diminuir as variações prováveis (desvio-padrão) de cada amostra. Ao final das extrações as amostras foram mantidas a temperatura de -20°C (Figura 3).

6.2.3 Dosagens de proteínas

A partir das extrações das proteínas totais e das frações de cada genótipo, as amostras foram utilizadas para as dosagens de proteínas pelo método de Bradford (1976). As dosagens das proteínas totais e das frações foram realizadas em triplicatas a partir de cada uma das três repetições independentes de cada genótipo. Como padrão de comparação foi utilizado uma curva de calibração com BSA (soro albumina bovina) nas concentrações de 2,5 a 40 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

6.2.4 Preparo das amostras de proteína total para análise em eletroforese

O preparo das amostras de proteína total para a análise qualitativa em gel de poliacrilamida desnaturante foi realizado a partir de 20mg de farinha e 350 μL de tampão de amostra (Tris 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1% de β -mercaptoetanol, 2% de SDS, 3% de glicerol e azul de bromofenol). Em seguida as amostras foram fervidas por 10 minutos para a desnaturação e utilizadas para eletroforese SDS-PAGE.

6.2.5 Extração das quatro frações e preparo das amostras para análise em eletroforese

Para o preparo das amostras das frações, foi utilizada 100 mg de farinha e adicionado 500 μL de solução de Tris-HCl (pH 7.5) e 1mM EDTA para extrair a albumina. Essa solução foi agitada por 1 hora e centrifugada durante 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 1,5mL de acetona P.A, homogeneizado por inversão e armazenado *overnight* no freezer à -20°C. Em seguida foi utilizado 500 μL de solução de Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA e 0.5M NaCl para extrair a globulina. Essa solução foi agitada por 1 hora e centrifugada durante 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 1,5mL de acetona P.A, homogeneizado por inversão e armazenado *overnight* no freezer. Ainda utilizando a mesma farinha inicial foi acrescentado 500 μL de isopropanol 60% para extrair a prolamina. Essa solução foi agitada por 1 hora e centrifugada durante 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 1,5mL de acetona P.A, homogeneizado por inversão e armazenado *overnight* no freezer. Depois das frações serem precipitadas *overnight* no freezer, foram centrifugadas à 15°C

por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida os precipitados foram secos em aparelho rotativo a vácuo (*speedvac*), e posteriormente as frações protéicas albumina, globulina e prolamina foram ressuspensas em 80µL de Tris-HCl 0.125M pH 6.8, 20% de glicerol, 0.001% de azul de bromofenol e 2% de β-mercaptoetanol. Essas amostras foram agitadas por 30 minutos e armazenadas em freezer à -20°C.

Para a extração da glutelina foi utilizada 30mg de farinha desengordurada. Após extrair sequencialmente as demais frações, como citado acima, foi acrescentado 700µL de tampão de extração para glutelina (Tris-HCl 50mM pH 6.8, 4% de SDS, Uréia a 8M, 5% de β-mercaptoetanol e 20% de glicerol) (KAWAKATSU et al., 2008). Esta mistura foi agitada durante 2 horas e centrifugada durante 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 1,5mL acetona P.A, homogeneizado por inversão e armazenado *overnight* no freezer. Posteriormente a solução contendo a fração glutelina foi centrifugada à 15°C por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida os precipitados foram secos em aparelho rotativo a vácuo (*speedvac*), e posteriormente a glutelina foi ressuspensa em tampão de amostra (Tris 10mmol/L, 1% de β-mercaptoetanol, 2% de SDS, 3% de glicerol e azul de bromofenol). Essa fração protéica foi agitada durante 1 hora, fervida por 10 minutos e armazenadas em freezer à -20°C (Figura 4). Foram consideradas três repetições de cada amostra para a determinação do perfil protéico dos genótipos silvestres.

6.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE

A análise do perfil protéico total e das frações albumina, globulina e prolamina foram realizadas em gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE em sistema de tampão descontínuo segundo Laemmli (1970), sendo o gel concentrador a 4,5% e o gel separador a 14%. Para a fração glutelina o gel separador foi preparado a 13%, mantendo-se o gel concentrador a 4,5%. Os géis foram submetidos à eletroforese a 80mA no sistema Rubi SE 600 (Amersham Biosciences) por cerca de 3 horas. Para a corrida foi utilizado o tampão Tris 0,125M, glicina 0,96 M, SDS 0,5%. Após a corrida, os géis foram colocados em solução corante (0,05% *Coomassie Brilliant Blue* R250, 50% metanol, 10% ácido acético e 40% de água) e posteriormente descorados em metanol (5%), ácido acético (7%) e água (88%). Por último os géis foram fotografados por

câmera digital de 7,2 megapixels (Sony Cyber-shot DSC-P200) e as imagens obtidas foram padronizadas no Paint Shop Pro versão 7.01(Jasc® Software). A partir das imagens foi possível comparar o perfil protéico das amostras através do uso do programa DNA Simdex3 beta release (Scott Archer and GenetX). Esse programa determina a massa molecular de cada banda, a partir do posicionamento das bandas do marcador padrão de baixa massa molecular (Amershan LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis, GE Healthcare).

6.2.7 Análise estatística

Através das dosagens pelo método de Bradford foram calculados os valores médios de proteína total e das frações protéicas. A partir das triplicatas das repetições de cada amostra aplicou-se a análise de variância utilizando o delineamento inteiramente casualizado. Em seguida foi realizado o teste de comparação de médias entre as linhagens de cada cruzamento e seus parentais pelo método de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Este teste visa à separação das médias em grupos distintos, através da minimização da variação dentro do grupo e maximização da variação entre os grupos. As análises foram realizadas no programa estatístico Genes (CRUZ, 2001). Enquanto o gráfico de barras foi construído no programa GraphPad Prism versão 5.0 (Collection Software).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Análise de variância e teste de médias para as proteínas totais e frações protéicas das linhagens interespecíficas

Os valores de quantificação dos teores protéicos totais e das frações protéicas, das linhagens interespecíficas de ambos os cruzamentos, apresentaram na análise de variância uma diferença altamente significativa ($P < 0,01$). Através do teste de comparação de médias Scott-Knott, os teores de proteína total foram divididos em oito grupos distintos para as linhagens do cruzamento BG90-2 x RS-16. A média geral destas linhagens foi de 7,05%, com variação de 11,96% (linhagem interespecífica CNA10851) a 4,92% (CNA10875) por mg de farinha (Tabelas 2 e 3). Já para o cruzamento CICA-8 x RS-16, através do teste Scott-Knott, os teores de proteína total foram divididos em seis grupos distintos. A média geral para estas linhagens foi de 8,40%, com valores extremos de 10,71% (CNA11032) e 6,29% (CNA11074) (Tabelas 4 e 5).

A média dos teores de proteína total das linhagens do cruzamento CICA-8 x RS-16 foi 16,6% superior a média das linhagens do cruzamento BG90-2 x RS-16. Em relação aos parentais, o silvestre RS-16 destacou-se por apresentar o maior teor protéico (14,06%), enquanto o BG90-2 apresentou 10,0% e o CICA-8 9,61% (Tabelas 2 e 4). Apesar das médias dos teores de proteína total das duas linhagens interespecíficas terem sido inferiores aos seus parentais, as linhagens CNA10851, CNA11032, CNA11050, CNA11028 e CNA11054 apresentaram o maior conteúdo de proteína total, com média de 10,95%, e aumento de 8,4% e 13,9% em relação ao parental BG90-2 e CICA-8, respectivamente. O parental silvestre RS-16 apresentou o maior teor de proteína total, sendo 22% superior a média dessas linhagens interespecíficas (Tabelas 2 e 4). Este resultado pode indicar a contribuição favorável do parental silvestre RS-16 para o aumento do conteúdo protéico em algumas linhagens interespecíficas de ambos os cruzamentos.

As médias gerais encontradas para o teor de proteína total das linhagens interespecíficas foram próximas ao valor relatado por Liu et al., (2005a), que encontraram uma média de 7,6% para o teor de proteína total em linhagens chinesas de arroz *Oryza sativa*. Champagne et al., (2004) encontraram teores de proteína total para o grão de arroz (*O. sativa*) com variação de 5,8 a 7,7%. Já Lumen & Chow (1995), encontraram valores que variaram de 4,3 a 18,2%. Essa grande

variação já é esperada, pois além da diferença genotípica existem variações ambientais como radiação solar, temperatura e o tratamento com adubação nitrogenada, que interferem no crescimento da planta e no teor protéico do endosperma da semente (JULIANO & BECHTEL, 1985).

Tabela 2. Relação dos teores protéicos presentes nas linhagens interespecíficas *O. sativa* BG 90-2 x *O. glumaepatula* RS-16.

Linhagens	Proteína Total (%) ¹	Albumina (%) ¹	Globulina (%) ¹	Prolamina (%) ¹	Glutelina (%) ¹
RS-16	14,06 a	3,60 d	6,25 e	5,42 c	84,76 a
BG 90-2	10,00 c	4,72 c	7,59 d	6,93 b	80,76 a
CNA10851	11,96 b	4,59 c	13,3 a	7,42 b	74,68 c
CNA10867	9,16 d	1,96 e	7,84 d	7,21 b	82,99 a
CNA10858	8,41 e	4,42 c	9,22 c	6,96 b	79,4 b
CNA10859	8,08 e	4,48 c	9,13 c	6,38 c	80,01 b
CNA10870	8,08 e	1,61 e	9,08 c	5,99 c	83,32 a
CNA10880	7,71 f	6,76 a	10,82 b	6,28 c	76,14 c
CNA10884	7,67 f	5,31 b	7,67 d	5,99 c	81,02 a
CNA10868	7,35 f	1,87 e	8,14 d	5,80 c	84,18 a
CNA10869	7,27 f	2,08 e	8,46 d	6,52 c	82,93 a
CNA10860	7,23 f	4,21 c	8,2 d	6,31 c	81,27 a
CNA10881	7,2 f	6,39 a	8,57 d	6,02 c	79,01 b
CNA10862	7,16 f	4,79 c	8,94 c	6,97 b	79,29 b
CNA10852	7,16 f	6,3 a	9,13 c	9,22 a	75,36 c
CNA10883	7,09 f	5,32 b	6,44 e	5,76 c	82,47 a
CNA10856	6,98 f	5,44 b	10,82 b	8,24 a	75,50 c
CNA10864	6,98 f	6,05 a	8,05 d	6,08 c	79,81 b
CNA10885	6,97 f	5,45 b	7,76 d	6,32 c	80,47 b
CNA10855	6,95 f	3,7 d	11,16 b	8,38 a	76,73 c
CNA10871	6,94 f	1,87 e	9,05 c	5,84 c	83,23 a
CNA10879	6,72 g	5,01 b	9,77 c	6,09 c	79,12 b
CNA10861	6,69 g	4,41 c	8,93 c	7,05 b	79,61 b
CNA10872	6,68 g	6,88 a	9,26 c	5,87 c	77,97 b
CNA10877	6,66 g	5,03 b	9,32 c	5,55 c	80,09 b
CNA10866	6,59 g	2,21 e	8,11 d	7,26 b	82,42 a
CNA10882	6,49 g	4,76 c	6,65 e	5,76 c	82,83 a
CNA10865	6,42 g	5,32 b	9,22 c	5,69 c	79,76 b
CNA10863	6,40 g	5,47 b	8,50 d	7,02 b	79,00 b
CNA10857	6,38 g	4,88 b	9,70 c	7,00 b	78,41 b
CNA10854	6,24 g	5,84 a	10,32 c	7,76 b	76,08 c
CNA10876	6,13 g	5,00 b	9,54 c	5,23 c	80,22 b
CNA10878	6,08 g	4,21 c	10,06 c	6,05 c	79,66 b
CNA10874	5,44 h	4,33 c	10,26 c	5,62 c	79,79 b
CNA10873	5,37 h	5,58 b	9,85 c	6,13 c	78,44 b
CNA10875	4,92 h	6,22 a	9,39 c	5,43 c	78,95 b

¹ Conteúdo protéico em relação a % de proteína total por mg de farinha.

As letras representam as diferenças significativas entre as médias obtidas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Análise descritiva e resumo da análise de variância das linhagens interespecíficas do cruzamento *O. sativa* BG90-2 x *O. glumaepatula* RS-16.

	Média (%)	Valor máximo (%)	Valor mínimo (%)	Desvio padrão (%)	C.V (%)	G.L	Q.M.R	**
Proteína total	7,05	11,96	4,92	1,22	4,43	35	0,105447	
Albumina	4,64	6,89	1,61	1,48	5,40	35	0,113586	
Globulina	9,14	13,30	6,44	1,38	3,99	35	0,273760	
Prolamina	6,51	9,22	5,23	1,01	5,94	35	0,259428	
Glutelina	79,71	84,18	74,68	2,63	5,42	35	1,228463	

**Significância para $p < 0,01$.

Tabela 4. Relação dos teores protéicos presentes nas linhagens interespecíficas *O. sativa* CICA-8 x *O. glumaepatula* RS-16.

Linhagens	Proteína Total (%)¹	Albumina (%)¹	Globulina (%)¹	Prolamina (%)¹	Glutelina (%)¹
RS-16	14,06 a	3,60 d	6,25 d	5,42 d	84,76 a
CICA-8	9,61 c	3,60 d	9,66 b	4,41 e	82,28 b
CNA 11032	10,71 b	2,97 e	11,44 a	5,66 d	79,93 c
CNA 11050	10,70 b	4,42 c	10,11 b	6,32 c	79,16 c
CNA 11028	10,69 b	4,27 d	11,16 a	6,07 c	78,51 c
CNA 11054	10,67 b	3,86 d	11,12 a	5,78 d	79,24 c
CNA 11038	9,95 c	3,19 e	11,88 a	7,25 b	77,68 c
CNA 11026	9,90 c	2,94 e	6,05 d	4,10 e	86,91 a
CNA 11044	9,75 c	2,81 e	9,09 b	5,02 d	83,09 b
CNA 11091	9,64 c	4,79 c	11,55 a	6,49 c	77,17 d
CNA 11116	9,07 d	3,25 e	6,66 d	5,12 d	84,96 a
CNA 11034	9,05 d	3,88 d	9,35 b	5,38 d	81,39 b
CNA 11036	8,89 d	2,91 e	9,79 b	5,88 d	81,41 b
CNA 11041	8,79 d	3,69 d	10,82 a	6,37 c	79,12 c
CNA 11025	8,78 d	5,57 b	7,61 c	6,46 c	80,36 c
CNA 11134	8,59 d	3,02 e	9,29 b	5,64 d	82,05 b
CNA 11045	8,53 d	3,61 d	10,30 b	7,26 b	78,83 c
CNA 11119	8,52 d	3,16 e	7,54 c	4,67 e	84,62 a
CNA 11130	8,50 d	5,86 b	9,48 b	6,23 c	78,42 c
CNA 11029	8,48 d	4,54 c	9,09 b	6,00 c	80,37 c
CNA 11083	8,45 d	4,29 d	9,78 b	4,28 e	81,66 b
CNA 11085	8,45 d	3,26 e	8,26 c	4,35 e	84,13 a
CNA 11049	8,43 d	4,07 d	11,22 a	6,72 c	77,99 c
CNA 11039	8,35 d	3,61 d	11,36 a	6,70 c	78,34 c
CNA 11099	7,93 e	4,74 c	12,21 a	7,44 b	75,61 d
CNA 11089	7,87 e	5,48 b	10,21 b	5,11 d	79,20 c
CNA 11095	7,72 e	4,56 d	12,14 a	6,67 c	76,63 c
CNA 11138	7,71 e	7,06 a	7,42 c	4,54 e	80,98 b
CNA 11047	7,60 f	4,47 c	11,76 a	7,38 b	76,39 d
CNA 11086	7,31 f	4,93 c	6,68 d	4,36 e	84,04 a
CNA 11092	7,06 f	4,62 c	12,48 a	9,29 a	73,61 e
CNA 11084	6,89 f	5,78 b	9,98 b	5,35 d	78,89 c
CNA 11053	6,88 f	3,86 d	10,23 b	5,77 d	80,14 c
CNA 11069	6,84 f	5,10 c	8,73 c	5,48 d	80,69 c
CNA 11109	6,64 f	3,56 d	9,68 b	4,58 e	82,18 b
CNA 11051	6,47 f	5,93 b	10,40 b	6,51 c	77,16 d
CNA 11067	6,35 f	5,42 b	10,45 b	5,04 d	79,09 c
CNA 11074	6,29 f	3,52 d	8,76 c	5,41 d	82,31 b

¹ Conteúdo protéico em relação a % de proteína total por mg de farinha.

As letras representam as diferenças significativas entre as médias obtidas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Análise descritiva e resumo da análise de variância das linhagens interespecíficas do cruzamento: *O. sativa* CICA-8 x *O. glumaepatula* RS-16.

	Média (%)	Valor máximo (%)	Valor mínimo (%)	Desvio padrão (%)	CV (%)	G.L	Q.M.R	**
Proteína total	8,40	10,71	6,29	1,29	3,67	37	0,099182	
Albumina	4,25	7,06	2,81	1,04	5,38	37	0,099474	
Globulina	9,84	12,48	6,05	1,68	4,08	37	0,230267	
Prolamina	5,85	9,29	4,10	1,11	5,69	37	0,122107	
Glutelina	80,06	86,91	73,61	2,84	4,53	37	0,678730	

**Significância para $P < 0,01$.

Em relação às frações protéicas do cruzamento BG90-2 x RS-16, através do teste de médias Scott-Knott para teor protéico da fração albumina, foram obtidos cinco grupos, com média geral de 4,64%, e amplitude de variação de 6,89% (CNA10872) a 1,61% (CNA10870) (Tabelas 2 e 3). Os teores de globulina também foram divididos em cinco grupos distintos, com valores extremos de 13,30% (CNA10851) e 6,44% (CNA10883), sendo a média geral para esta fração de 9,14% (Tabelas 2 e 3). Já a prolamina foi dividida em três grupos estatisticamente distintos e apresentou valores entre 9,22% (CNA10852) a 5,23% (CNA10876), com média geral de 6,51% (Tabelas 2 e 3). Para a fração glutelina, maior fração protéica do arroz, a média geral obtida foi de 79,71%, com variação de 84,18% (CNA10868) a 74,68% (CNA10851), sendo agrupada em três grupos distintos (Tabelas 2 e 3).

O teste de Scott-Knott para as frações protéicas do cruzamento CICA-8 x RS-16, para o teor de albumina, apresentou cinco grupos distintos com média geral de 4,25%, e amplitude de variação de 7,06% (CNA11138) a 2,81% (CNA11044) (Tabelas 4 e 5). Os teores de globulina foram divididos em quatro grupos, com variação de 12,48% (CNA11092) a 6,05% (CNA11026), apresentando média geral de 9,84% (Tabelas 4 e 5). A média geral para os teores de prolamina foi de 5,85% e apresentou cinco grupos estaticamente distintos, com amplitude de variação de 9,29% (CNA11092) a 4,10% (CNA11026) (Tabelas 5 e 6). A glutelina também foi dividida em cinco grupos distintos, com média geral de 80,06%, e apresentou variação de 86,91% (CNA11026) a 73,61% (CNA11092) (Tabelas 4 e 5).

Entre os dois grupos de linhagens interespecíficas, as linhagens do cruzamento BG90-2 x RS-16 apresentaram as maiores médias de albumina e prolamina, sendo superiores 8,7% e 9,2%, respectivamente, às médias de albumina e prolamina das linhagens do cruzamento CICA-8 x RS-16 (Tabelas 3 e 5). No entanto, as linhagens do cruzamento CICA-8 x RS-16, apresentaram a

maior média de globulina, sendo superiores 7,1% à média de globulina do cruzamento BG90-2 x RS-16. Com relação à média de glutelina, as linhagens de CICA-8 x RS-16 foram 0,5% superiores em relação à média de glutelina das linhagens do cruzamento BG90-2 x RS-16 (Tabelas 3 e 5).

Entre os parentais, o BG90-2 apresentou os maiores teores de albumina (4,72%) e prolamina (6,93%), enquanto o CICA-8 e o RS-16 apresentaram 3,60% de albumina, e para o teor de prolamina, apresentaram 4,41% e 5,42%, respectivamente. O maior teor de globulina foi encontrado no parental CICA-8 (9,66%), superior ao BG90-2 (7,59%) e RS-16 (6,25%). O maior teor de glutelina foi encontrado no parental silvestre RS-16 (84,76%), enquanto o BG90-2 e o CICA-8 apresentaram 80,76% e 82,28%, respectivamente (Tabelas 3 e 5).

As médias das frações protéicas foram próximas aos valores relatados por Taira (1995) e Sgarbieri (1996) para a *Oryza sativa*, que encontraram uma média de 5% de albumina, 10% de globulina, prolamina variando entre 5 a 8%, e glutelina variando entre 70 e 80%. Takaiwa et al., (1991) também relataram um teor de 80% de glutelina para a espécie *O. sativa*. Steenson & Sathe (1995) também encontraram valores similares ao relatado neste trabalho em relação aos teores de albumina (5,9%), globulina (13,8%), prolamina (5,8%) e glutelina (74,5%) presentes na espécie *O. sativa*. Entretanto, Chandi & Sogi (2006) encontraram nas variedades de arroz *O. sativa* Basmati 386 e HBC 19, teores superiores de albumina 11% e 16%, enquanto para o teor de globulina foi 10% e 13%, prolamina 4% para ambas, e valores para a fração glutelina de 75% e 67%, respectivamente.

Já Mitra & Das (1975) reportaram teores de albumina que variaram de 5 a 17%, globulina 4 a 12%, prolamina 2 a 5% e glutelina de 73 a 86%. Mahmoud et al., (2008), analisaram o conteúdo protéico da linhagem interespecífica desenvolvidas entre a espécie silvestre *Oryza nivara* (teor protéico total de 8,89%) e *O. sativa* cultivar IR 64 (10,5%), e observaram para a linhagem interespecífica teor protéico de 12,4%, sendo 28% superior ao parental silvestre e 18,2% à cultivar IR 64. As quatro frações protéicas da linhagem interespecífica foram superiores aos parentais. A prolamina foi a fração que teve maior aumento, seguida da glutelina, globulina e albumina. Esses autores quantificaram também os aminoácidos presentes na proteína total da semente, e através desta quantificação, foi identificado um maior teor de lisina para a espécie silvestre *O. nivara*.

Assim como observado no trabalho de Mahmoud et al., (2008), no presente trabalho 40 linhagens interespecíficas, de ambos os cruzamentos, apresentaram valores significativamente mais elevados das frações protéicas em relação aos seus parentais, exceto para o parental silvestre RS-16 que apresentou altos teores de glutelina (Tabelas 2 e 4, e Figura 3). A prolamina foi a fração que apresentou maior aumento nas linhagens interespecíficas, com cerca de 100% de aumento em relação ao parental CICA-8, seguida da globulina, que apresentou um aumento na concentração de 89% em relação ao RS-16, da albumina, com aumento de 84% em relação aos parentais CICA-8 e RS-16, e por último, da glutelina, que apresentou aumento de 6% em relação ao parental cultivado BG90-2 (Figura 3).

Esses resultados indicam o potencial de aumento da quantidade de proteína e de suas frações no arroz através de cruzamentos interespecíficos com a espécie silvestre *O. glumaepatula*.

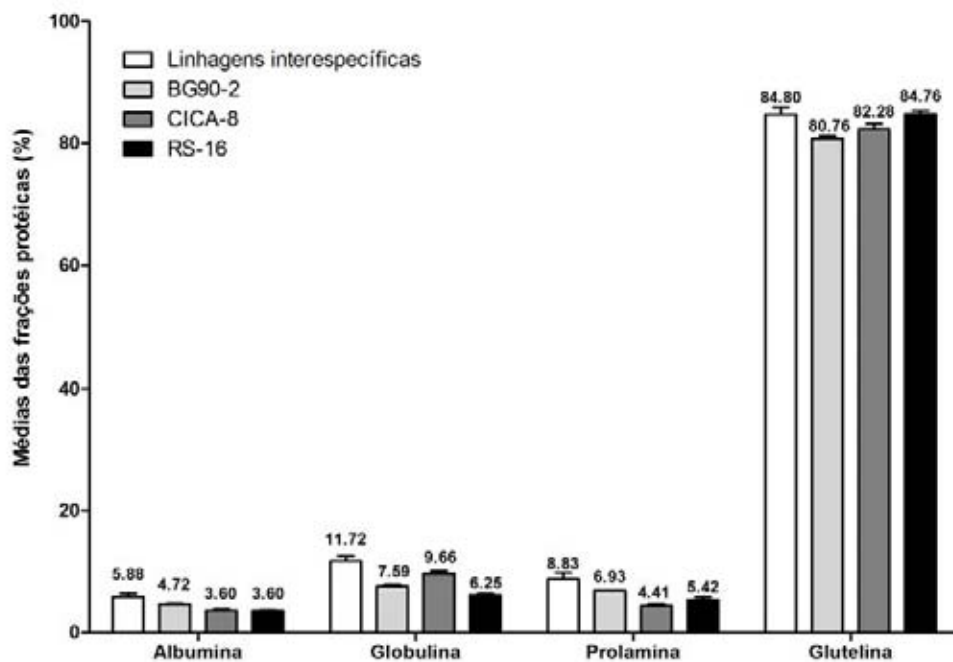


Figura 3. Comparação das médias dos maiores teores protéicos encontrados nos cruzamentos interespecíficos e nas frações protéicas de seus parentais. Os dados estão em relação a porcentagem de proteína total por mg de farinha.

6.3.2 Análise qualitativa por eletroforese SDS-PAGE das proteínas totais das linhagens interespecíficas

Para a análise qualitativa de proteína total em SDS-PAGE foram selecionadas 15 linhagens representativas de cada cruzamento interespecífico, das quais 8 apresentaram altos teores de proteína total de reserva e 7 baixos teores. Não houve diferença entre o perfil de polipeptídeos das linhagens com maior ou menor teor protéico, exceto para o polipeptídeo de 60 kDa da linhagem CNA10851 que apresentou baixa intensidade comparado aos demais genótipos, podendo estar relacionado com uma expressão diferencial desta proteína. (Figuras 4 e 5). Segundo Sano (1984), polipeptídeos de 60 kDa em arroz correspondem a enzima denominada de *granule-bound starch synthase* (GBSS) ou proteína WAXY, que faz parte da rota de biossíntese do amido. Altos níveis da expressão da WAXY são característicos das variedades da subespécie *indica* e são pouco expressas ou ausentes nas variedades da subespécie *japonica* (SANO, 1984; KAWAKATSU et al., 2008).

Jahan et al., (2001) dividiram as α -glutelinas de acordo com a massa molecular em glutelinas α -1 (39 kDa), α -2 (38 kDa), α -3 (37,5 kDa a 37 kDa) e α -4 (34 e 33kDa). As β -glutelinas foram divididas em β -1 (23 kDa), β -2 (22.5 kDa) e β -3 (22 kDa). No presente trabalho as β -glutelinas tiveram baixa visualização nos géis e não foi possível separá-las. Porém, o agrupamento destas proteínas básicas ficaram em torno de 21 a 19 kDa. Segundo a divisão de Jahan et al., (2001), todos os genótipos apresentaram glutelinas α -1, exceto o parental silvestre RS-16, que apresentou α -glutelina com massa molecular de 40kDa.

Dez linhagens do cruzamento BG90-2 x RS-16 apresentaram glutelinas α -2, assim como os seus parentais. As demais linhagens (CNA10865, CNA10863, CNA10857, CNA10854 e CNA10876) apresentaram glutelinas α -3 presentes no RS-16 e ausentes no BG90-2. As linhagens CNA10882, CNA10865, CNA10863, CNA10857, CNA10854, CNA10876 e CNA10878 apresentaram α -glutelinas de 35 kDa que não estiveram presentes nos parentais, enquanto outras linhagens apresentaram α -glutelinas de 36 kDa como o parental BG90-2 (Figura 4).

Entre o cruzamento CICA-8 x RS-16, doze linhagens apresentaram glutelinas α -2, presente no RS-16 e ausente no CICA-8. Por outro lado, as linhagens CNA11067, CNA1116 e CNA11050 apresentaram glutelinas α -3, como os parentais CICA-8 e RS-16. A maioria das

linhagens apresentaram α -glutelinas de 35 kDa, que também estiveram presentes no parental CICA-8. Apenas quatro linhagens (CNA11067, CNA11051, CNA11084 e CNA11028) apresentaram α -glutelinas de 36 kDa, as quais não foram observadas nos parentais (Figura 5).

Ashida et al., (2006) analisaram as variedades Koshohikari e Nihonmasari (ambas da subespécie *japonica*), através de SDS-PAGE, e também encontraram α -glutelinas de massa molecular de 39 e 37 kDa. As β -glutelinas apresentaram massa molecular de 23 e 22 kDa, sendo superior a massa molecular das β -glutelinas encontradas para as linhagens interespecíficas no presente trabalho. Estas diferenças podem estar relacionadas com variações genotípicas, modificações pós-traducionais, além de possíveis variações metodológicas e ambientais. Mahmoud et al., (2008) analisaram por SDS-PAGE as proteínas totais de linhagens interespecíficas obtidas entre o cruzamento *O. sativa* x *O. nivara*, e encontraram α -glutelinas com massa molecular de 39 a 34 kDa, sendo bastante similares as variações de massa molecular das linhagens interespecíficas *O. sativa* x *O. glumaepatula* (Figuras 4 e 5).

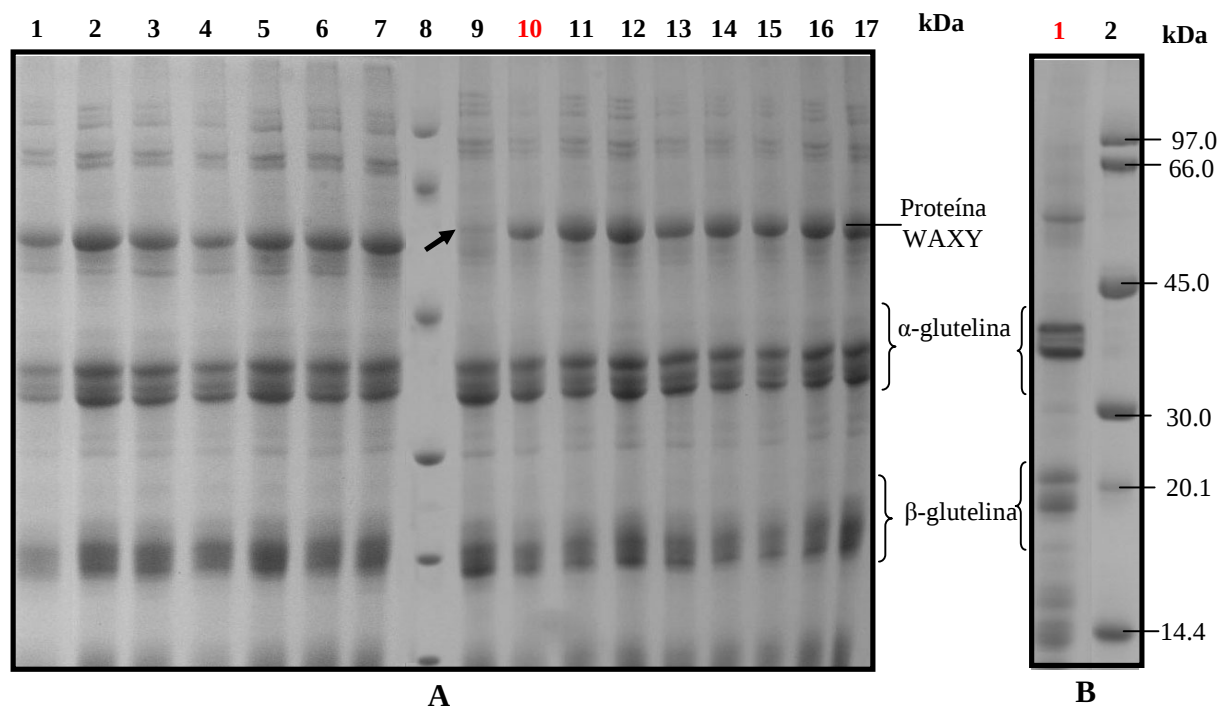


Figura 4. Eletroforese SDS-PAGE de proteína total extraída das sementes de linhagens interespecíficas e de seus parentais BG90-2 e RS-16. **A)** Linhagens do cruzamento BG90-2 x RS-16. **Linha 1:** CNA10882, **linha 2:** CNA10865; **linha 3:** CNA10863, **linha 4:** CNA10857, **linha 5:** CNA10854; **linha 6:** CNA10876; **linha 7:** CNA10878, **linha 8:** Marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare); **linha 9:** CNA10851; **linha 10:** Parental *O. sativa* BG90-2; **linha 11:** CNA10867; **linha 12:** CNA10858; **linha 13:** CNA10859; **linha 14:** CNA10870; **linha 15:** CNA10880, **linha 16:** CNA10884; **linha 17:** CNA10868. **B)** **Linha 1:** Parental silvestre *O. glumaepatula* RS-16 e **linha 2:** Marcador. Os parentais foram destacados em vermelho. A seta indica a baixa intensidade da banda de 60 kDa na linhagem CNA10851. Gel de poliacrilamida desnaturante a 14%, corado com *Coomassie Blue* R250.

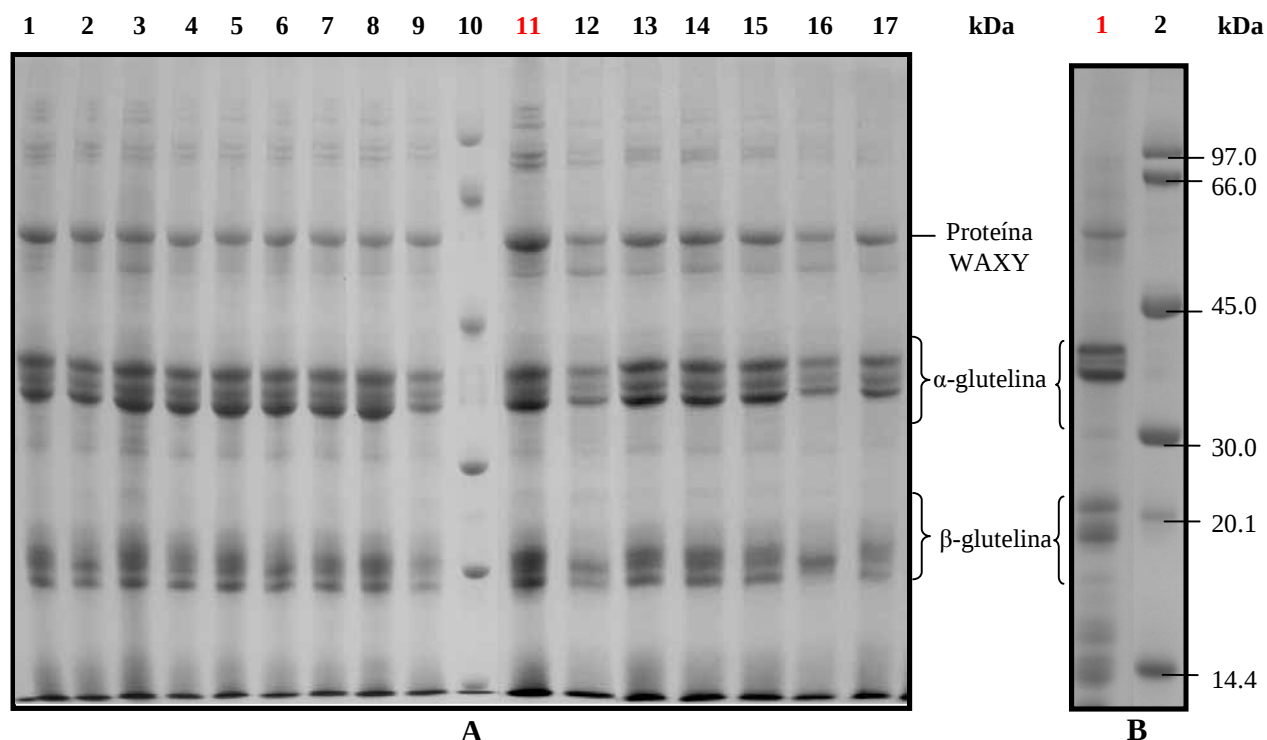


Figura 5. Eletroforese SDS-PAGE de proteína total extraída das sementes de linhagens interespecíficas e de seus parentais CICA-8 e RS-16. **A)** Linhagens do cruzamento CICA-8 x RS-16: **Linha 1:** CNA11050; **Linha 2:** CNA11028; **Linha 3:** CNA11054; **Linha 4:** CNA11038; **Linha 5:** CNA11026; **Linha 6:** CNA11044; **Linha 7:** CNA11091; **Linha 8:** CNA11116; **Linha 9:** CNA11067; **Linha 10:** Marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare); **Linha 11:** Parental *O. sativa* CICA-8; **Linha 12:** CNA11051; **Linha 13:** CNA 11109; **Linha 14:** CNA11069; **Linha 15:** CNA11053; **Linha 16:** CNA11084; **Linha 17:** CNA11092. **B)** **Linha 1:** Parental silvestre *O. glumaepatula* RS-16 e **linha 2:** Marcador. Os parentais foram destacados em vermelho. Gel de poliacrilamida desnaturante a 14%, corado com *Coomassie Blue* R250.

6.3.3 Análise qualitativa por SDS-PAGE das frações albumina, globulina, prolamina e glutelina das linhagens interespecíficas

Para a análise qualitativa das frações protéicas em SDS-PAGE foram utilizadas quatro linhagens representativas de cada cruzamento interespecífico. O perfil protéico da albumina foi bastante similar entre as linhagens dos cruzamentos interespecíficos e os parentais cultivados. Todas as amostras apresentaram proteínas com alta (97 a 52 kDa), média (41 a 30 kDa) e baixa massa molecular (25 a 15 kDa) (Figura 6). O genótipo silvestre RS-16 apresentou uma proteína diferencial em torno de 18 kDa que não foi identificada nas linhagens interespecíficas e nem nos parentais BG90-2 e CICA-8. Por outro lado, todas as amostras apresentaram uma banda bastante intensa em torno de 17 kDa (Figura 6).

A globulina também apresentou um perfil protéico semelhante entre os parentais e as linhagens interespecíficas, apresentando proteínas com alta (97 a 52 kDa), média (41 a 30 kDa) e baixa massa molecular (25 a 15 kDa) (Figura 7). Foi identificada também uma banda bastante intensa com massa molecular em torno de 25kDa comum a todas as amostras (Figura 7). Chandi & Sogi (2007) realizaram a caracterização das frações protéicas de variedades indianas de arroz (*O. sativa*), e também encontraram para a albumina bandas de alta (96 a 50 kDa), média (41 kDa) e baixa massa molecular (24 kDa). A globulina também foi caracterizada por proteínas de alta (118 a 53 kDa), média (41 kDa) e baixa massa molecular (23 kDa).

A fração prolamina apresentou somente bandas de baixa massa molecular (18 a 15 kDa) (Figura 8). O perfil de bandas desta proteína foi bastante semelhante entre as amostras, exceto para o RS-16, que apresentou proteínas mais intensos na faixa de 16 kDa (Figura 8). Chandi & Sogi (2007) também caracterizaram as prolaminas de reserva do arroz e observaram apenas bandas de baixa massa molecular (28 a 24 kDa). Resultado similar foi obtido por Mandac & Juliano (1978) que encontraram prolaminas com massa molecular de 23 a 17 kDa.

Neste trabalho as subunidades de α -glutelinas variaram de 40 a 35 kDa, e as β -glutelinas variaram em torno de 21 a 19 kDa (Figuras 4 e 5). No entanto, através da análise dos géis de glutelina foi possível identificar a presença de α -polipeptídeos com massa molecular em torno de 34 kDa, que não foram visíveis nos géis de proteína total (Figuras 4, 5 e 9). Esses polipeptídeos

estiveram presentes em todas as linhagens interespecíficas analisadas assim como nos parentais (Figura 9). Jahan et al., (2001), denominou essas α -glutelinas de 34 kDa de α -4.

Em geral, o perfil de proteína total e das glutelinas foi bastante similar entre as linhagens e os parentais, havendo diferença apenas para α -glutelina de 40 kDa, que ocorreu somente no parental RS-16. O perfil protéico das frações albumina, prolamina e globulina foram bastante similares entre as linhagens e os parentais cultivados, apresentando diferença apenas em relação ao parental silvestre (Figura 10).

Esses diferentes padrões protéicos encontrados entre as espécies podem estar relacionados com variações genótípicas, além de modificações pós-traducionais que podem ocorrer durante ou após a síntese das proteínas de reserva. Já a similaridade dos perfis protéicos observadas entre as linhagens interespecíficas e as cultivares BG90-2 e CICA-8, pode estar relacionada aos 2 retrocruzamentos realizados utilizando a espécie *O. sativa* como parental recorrente. Entre as linhagens interespecíficas foram observados perfis de bandas protéicas bastante similares, e pode ser consequência das 8 autofecundações das linhagens do cruzamento BG90-2 x RS-16 e das 10 autofecundações das linhagens do cruzamento CICA-8 x RS-16, diminuindo assim a probabilidade de existirem bandas protéicas diferenciais entre as linhagens.

O perfil protéico diferenciado apresentado para o RS-16, o alto teor de proteína total e alto teor de glutelina podem ter contribuído para aumento do conteúdo protéico das linhagens interespecíficas. Estes resultados inéditos indicam que em relação à variabilidade encontrada para as proteínas de reserva, é importante continuar a investir em cruzamentos interespecíficos entre o arroz cultivado e a espécie silvestre. Como já foram identificadas linhagens interespecíficas deste cruzamento que apresentaram maior potencial produtivo, em um futuro próximo será possível identificar materiais altamente produtivos e com maior qualidade nutricional, os quais serão utilizados no desenvolvimento de cultivares comerciais superiores.

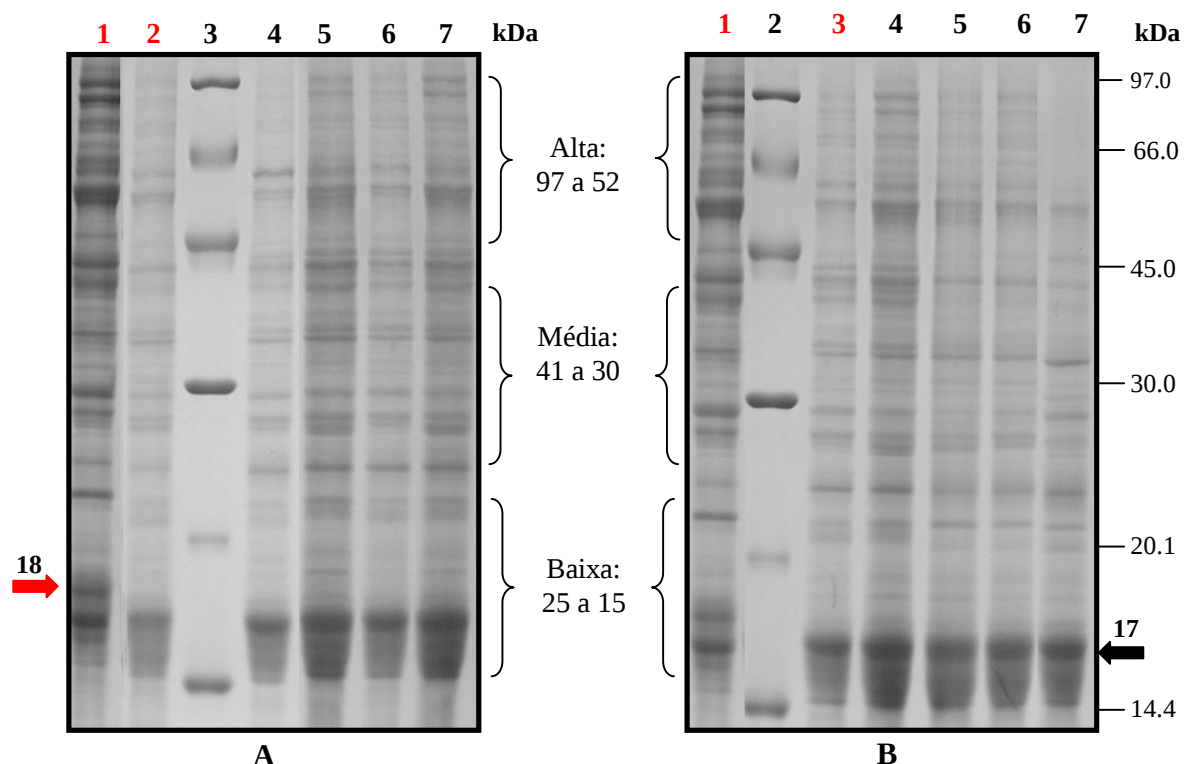


Figura 6. Eletroforese SDS-PAGE da fração albumina extraída das sementes de linhagens interespecíficas e de seus parentais. **A)** Linhagens do cruzamento CICA-8 x RS-16. **Linha 1:** RS-16; **linha 2:** CICA-8; **linha 3:** Marcador; **Linha 4:** CNA11084; **Linha 5:** CNA11050; **Linha 6:** CNA11028; **Linha 7:** CNA11092. **B)** Linhagens do cruzamento BG90-2 x RS-16. **Linha 1:** RS-16; **linha 2:** Marcador de baixa massa molecular padrão (GE Healthcare).; **linha 3:** BG90-2; **linha 4:** CNA10868; **linha 5:** CNA10876; **linha 6:** CNA10882 e **linha 7:** CNA10851. A seta vermelha indica a intensa expressão dos polipeptídeos de 18 kDa na espécie silvestre. A seta preta indica a intensa expressão dos polipeptídeos de 17 kDa comuns a todos os genótipos. Os parentais foram destacados em vermelho. Gel de poliacrilamida desnaturante a 14%, corado com *Coomassie Blue* R250.

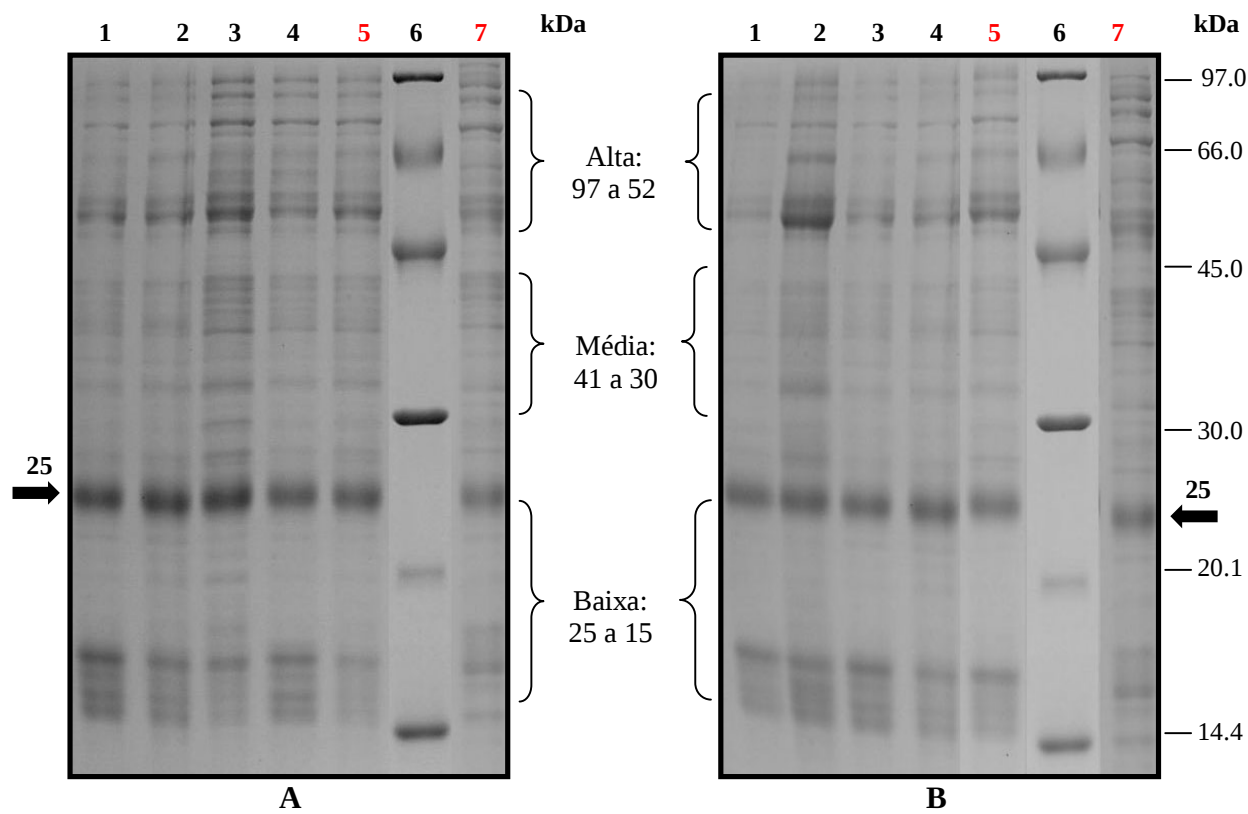


Figura 7. Eletroforese SDS-PAGE da fração globulina extraída das sementes de linhagens interespecíficas e de seus parentais. **A)** Linhagens do cruzamento CICA-8 x RS-16. **Linha 1:** CNA11092; **linha 2:** CNA11084; **linha 3:** CNA11050; **linha 4:** CNA11028; **linha 5:** CICA-8 e **linha 6:** Marcador; **linha 7:** RS-16. **B)** Linhagens do cruzamento BG90-2 x RS-16. **Linha 1:** CNA10851; **linha 2:** CNA10868; **linha 3:** CNA10876, **linha 4:** CNA10882; **linha 5:** BG90-2 e **linha 6:** Marcador de baixa massa molecular padrão (GE Healthcare); **linha 7:** RS-16. A seta preta indica a intensa expressão do polipeptídeo de 25 kDa comum a todos os genótipos. Os parentais foram destacados em vermelho. Gel de poliacrilamida desnaturante a 14%, corado com *Coomassie Blue* R250.

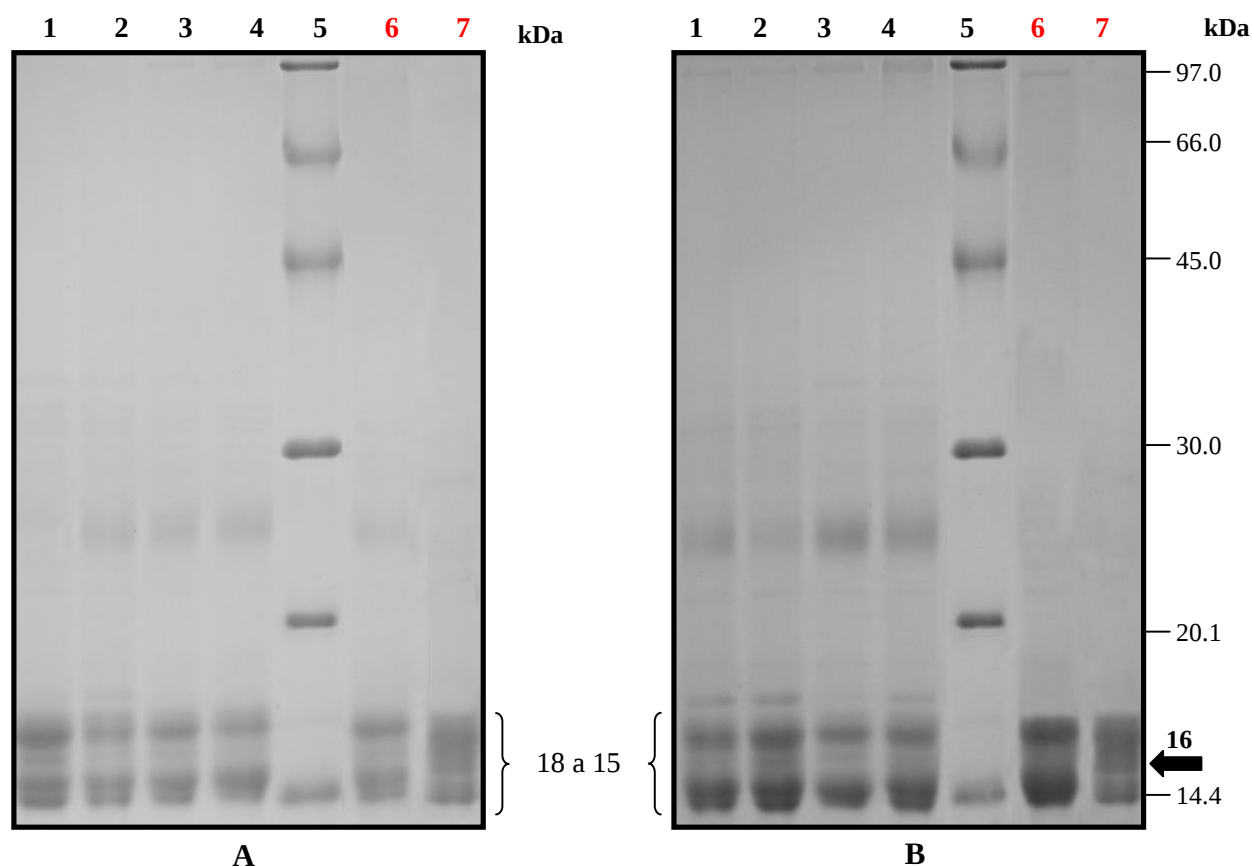


Figura 8. Eletroforese SDS-PAGE da fração prolamina extraída das sementes de linhagens interespecíficas e de seus parentais. **A)** Linhagens do cruzamento CICA-8 x RS-16. **Linha 1:** CNA11092; **linha 2:** CNA11084; **linha 3:** CNA11050; **linha 4:** CNA11028; **linha 5:** marcador; **linha 6:** CICA-8 e **linha 7:** RS-16. **B)** Linhagens do cruzamento BG90-2 x RS-16. **Linha 1:** CNA 10876; **Linha 2:** CNA10882; **Linha 3:** CNA10851; **Linha 4:** CNA10868; **Linha 5:** Marcador de baixa massa molecular padrão (GE Healthcare).; **Linha 6:** BG90-2 e **Linha 7:** RS-16. A seta preta indica a intensa expressão do polipeptídeo de 16 kDa presente no parental RS-16. Os parentais foram destacados em vermelho. Gel de poliacrilamida desnaturante a 14%, corado com *Coomassie Blue* R250.

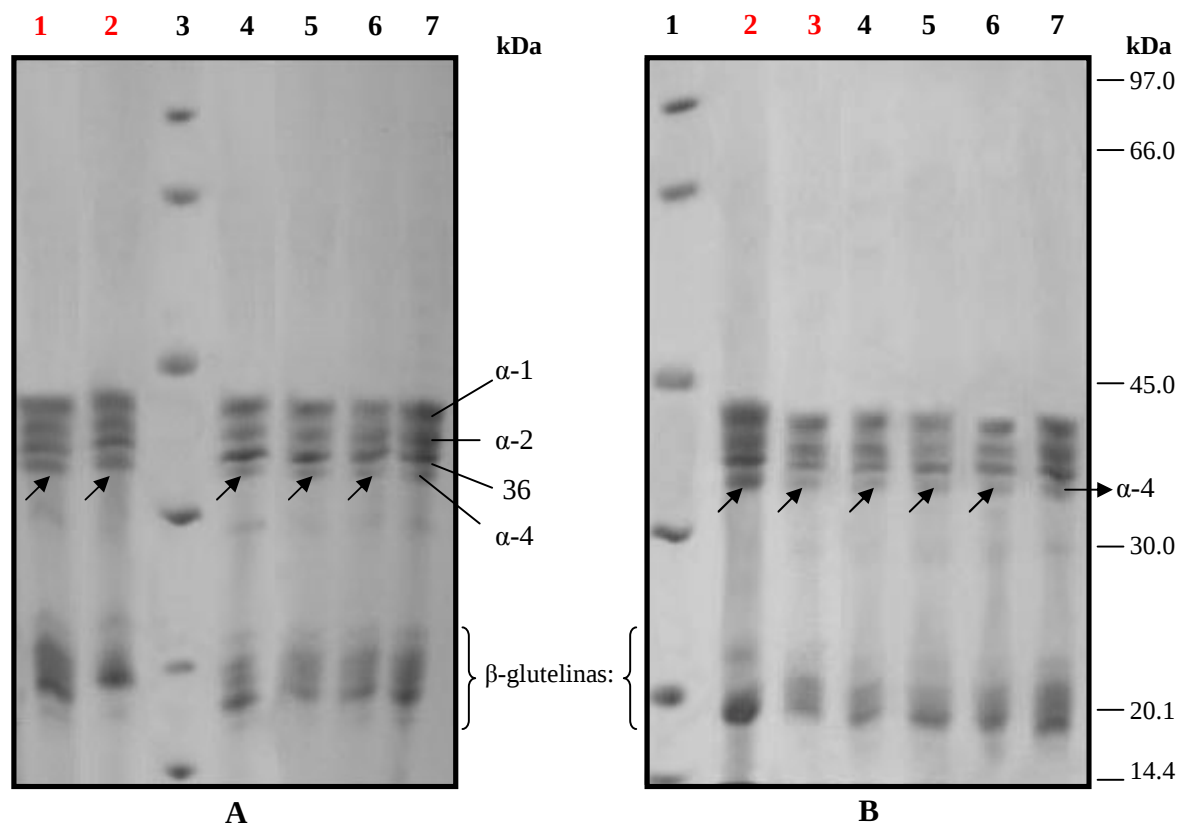


Figura 9. Eletroforese SDS-PAGE da fração glutelina extraída das sementes de linhagens interespecíficas e de seus parentais. **A)** Linhagens do cruzamento CICA-8 x RS-16. **Linha 1:** CICA-8, **linha 2:** RS-16, **linha 3:** Marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare), **linha 4:** CNA11092, **linha 5:** CNA11050; **linha 6:** CNA11028; **linha 7:** CNA11084. **B)** Linhagens do cruzamento BG90-2 x RS-16. **Linha 1:** marcador; **linha 2:** RS-16; **linha 3:** BG90-2; **linha 4:** CNA10851; **linha 5:** CNA10868; **linha 6:** CNA10876; **linha 7:** CNA10882. As setas pretas indicam as glutelinas α -4. Os parentais foram destacados em vermelho. Gel de poliacrilamida desnaturante a 13%, corado com *Coomassie Blue* R250.

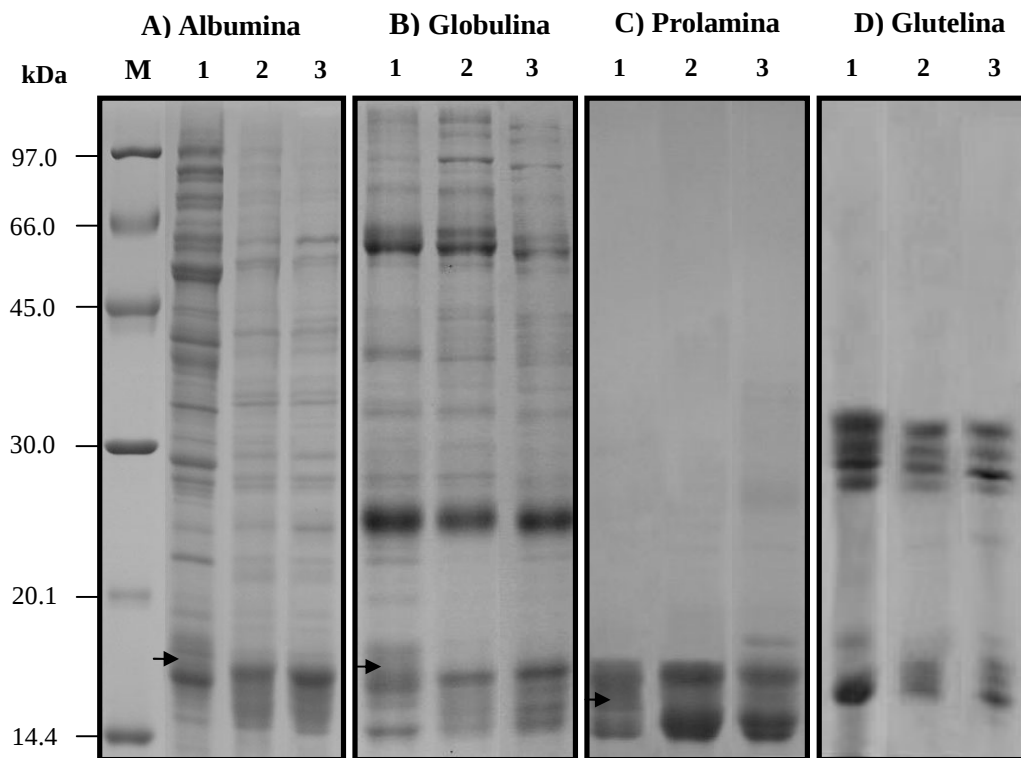


Figura 10. Eletroforese SDS-PAGE das frações protéicas extraídas do endosperma do arroz. **Linha 1:** *O. glumaepatula*; **linha 2:** *O. sativa* e **linha 3:** linhagem interespecífica *O. glumaepatula* x *O. sativa*. As setas ressaltam as diferenças da espécie *O. glumaepatula* em relação a *O. sativa* e a linhagem interespecífica. **M:** Marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare). Gel de poliacrilamida desnaturante corado com *Coomassie Blue* R-250. **A) Linha 1:** *O. glumaepatula* RS-16, **linha 2:** *O. sativa* CICA-8 e **linha 3:** CNA11084; **B) Linha 1:** *O. glumaepatula* RS-16, **linha 2:** *O. sativa* BG90-2 e **linha 3:** CNA11092; **C) Linha 1:** *O. glumaepatula* RS-16, **linha 2:** *O. sativa* BG90-2 e **linha 3:** CNA10882; **D) Linha 1:** *O. glumaepatula* RS-16, **linha 2:** *O. sativa* BG90-2 e **linha 3:** CNA11092.

6.4 CONCLUSÕES

- 1) O parental silvestre RS-16 destacou-se por apresentar o maior teor de proteína total e elevados teores de glutelina. Algumas linhagens interespecíficas, de ambos os cruzamentos, apresentaram maiores teores de proteína total e suas frações em relação aos parentais. Este resultado indica a contribuição favorável do parental silvestre RS-16 para o aumento do conteúdo protéico de linhagens interespecíficas de arroz desenvolvidas a partir do cruzamento *O. glumaepatula* x *O. sativa*.
- 2) Foram observados diferentes perfis protéicos obtidos por SDS-PAGE entre as espécies *O. sativa* e *O. glumaepatula*. Esta diferença pode estar relacionada com variações genotípicas e modificações pós-traducionais que podem ocorrer durante ou após a síntese das proteínas de reserva.
- 3) A espécie *O. glumaepatula* apresentou um padrão protéico diferenciado do que foi relatado na literatura até o momento, sendo uma nova fonte de variabilidade genética com implicações importantes para o aumento do conteúdo protéico do grão de cultivares de arroz.

6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta dissertação os protocolos para extração de proteína total e frações protéicas, utilizados para as análises quantitativas e qualitativas foram adaptados e modificados de acordo com os protocolos disponíveis na literatura. Através destas análises foram gerados dados inéditos em relação às proteínas de reserva do arroz silvestre *O. glumaepatula* e de linhagens interespecíficas *O. sativa* x *O. glumaepatula*. Os resultados indicaram os maiores teores de proteína total e frações protéicas em acessos de arroz silvestre *O. glumaepatula* e em linhagens interespecíficas, quando comparados à espécie cultivada de arroz (*O. sativa*), sugerindo a contribuição favorável da espécie silvestre para o aumento do conteúdo protéico da espécie cultivada. As análises qualitativas revelaram diversidade no perfil de bandas entre os acessos silvestres e entre as espécies *O. sativa* e *O. glumaepatula*, indicando a espécie silvestre como fonte potencial de variabilidade genética para a qualidade do grão do arroz cultivado. O próximo passo será analisar os aminoácidos presentes nos acessos avaliados nesta dissertação, e com base nos resultados, sugerir novas ações de pesquisa que objetivem o aumento do teor e da qualidade protéica do grão de cultivares comerciais de arroz do Brasil.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMIRAJU, J.S.S; LUO, M; GOICOECHEA, J.L; WANG, W. et al. **Genome Res**, n°16, p.140-147, 2006.

ASHIDA, K; SHUICHI, I; TAKESHI, Y. Lack of 26 kDa globulin accompanies increased free amino acid content in rice (*Oryza sativa* L.) grains. **Journal of Cereal science**. v.3, p.387-392, 2006.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. **Analytical Biochemistr.**, v.72, p.248–254, 1976.

BRAR, D.S; DALMACIO, R; ELLORAN, R; AGGARWAL, R; ANGELES, R.K, HUSH, G.S: Gene transfer and molecular characterization of introgression from wild *Oryza* species into rice. In G.S. Khush (ed). Rice Genetics III, **International Rice Research Institute**, P.O, p.477–486, n° 933, Manila, Philippines, 1996.

BRAR, D.S; KHUSH, G.S. Alien introgression in rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 1/2, p. 35-47, 1997.

BRONDANI, C; BRONDANI, R.P.V; RANGEL, P.H.N; FERREIRA, M.E. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theor Appl Genet**. v.104, p.1192-1203, 2002.

BRONDANI, C; BRONDANI, R.P.V; RANGEL, P.H.N; FERREIRA, M.E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *O. glumaepatula* x *O. sativa*. **Hereditas**. n°134, p.59-71, 2001.

BRONDANI, R.P.V; ZUCCHI, M.I; BRONDANI, C; RANGEL, P.H.N; BORBA T.C.O; RANGEL P.N; MAGALHAES M.R; VENCOSKY, R. Genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. **Genetica**. v. 125, p.115-123, 2005.

CAGAMPANG, G.B; CRUZ, L.J; ESPIRITU, S.G; SANTIAGO, R.G; JULIANO, B.O. Studies on the extraction and composition of rice proteins. **Cereal Chemistry**, v.43, p.145–155, 1966

CHAMPAGNE, E.T; WOOD, D.F; JULIANO, B.O; BECHTEL, D.B. **The rice grain and its gross composition**. In: Champagne, E.T. (Ed.), Rice: Chemistry and Technology, 3°ed. AACC, St. Paul, MN, p.77–107, 2004.

CHANDI, G.K; SOGI, D.S. Biochemical characterisation of rice protein fractions. **International Journal of Food Science and Technology**, v.42, p.1357-1362, 2007.

CHRISPEELS, M.J. The role of the Golgi apparatus in the transport and post-translational modification of vacuolar (protein body) proteins. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell. Biol.*, v.2, p.43-68, 1985.

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: Aplicativo computacional em genética e estatística, Viçosa: UFV, p.648, 2001.

DHINGRA, S; JOOD, S. Physico-chemical and nutritional properties of cereal-pulse blends for bread making, **Nutr. Health**. v.16, p.183–194, 2002.

FRANCES, H. et al. Use of alternative splice sites in granule-bound starch synthase mRNA from low-amylose rice varieties. **Plant Mol. Biol.**, n° 38, p.407-415, 1998.

FURUTA, M; YAMAGATA, H; TANAKA, K; KASAI, Z; FUJII, S. Cell-free synthesis of the Rice glutelin precursors. **Plant Cell Physiol.**, v.27, p.1201-1204, 1986.

HUEBNER, F.R; BIETZ, J.A; JULIANO, B.O. Rice cultivar identification by high-performance liquid chromatography of endosperm proteins. **Cereal Chem.** v.67, p.129 -135, 1990.

JAHAN, M.S; KUMMARU, T; SATOH, H; HAMID, A. Variation of glutelina seed storage in Bangladesh rice cultivars. **Rice Genetics Newsletter.**, v.18, 2001.

JENA, K.K; KHUSH, G.S. Introgression of genes from *Oryza officinalis* Well exWatt to cultivated rice, *O. sativa* L. **Theor Appl Genet**, n° 80, p.737–745, 1990.

JULIANO, B.O; BECHTEL, D.B. The rice grain and its gross composition. In: JULIANO, B.O. (Ed.). Rice: chemistry and technology. Minnesota, USA: **American Association of Cereal Chemists**. cap.2, p.17-57, 1985.

KATSUDE-TANAKA, T; DULDULAO, J.B.A; KIMURA, Y; LIDA, S; YAMAGUCHI, T; NAKANO, J; UTSUMI, S. The two subfamilias of Rice glutelin differ in both primary and higher-order structures. **Biochem. Biophys. Acta** p.95-102, 2004.

KAWAKATSU, T; YAMAMOTO, P.M; HIROSE, S; YANO, M; TAKAIWA, F. Characterization of a new rice glutelin gene *GluD-1* expressed in the starchy endosperm. **Journal of Experimental Botany**. v.59, n° 15, p.4233-4245, 2008.

KRISHNAN, H.B; OKITA, T.W. Structural relationship among the rice glutelina polypeptides. **Plant Physiology**. v.81, p.748-753, 1986.

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

LASZTITY, R. The Chemistry of Cereal Proteins, second ed. CRC Press, Boca Raton. Lasztity, R. **The Chemistry of Cereal Proteins**, 2° ed. CRC Press, Boca Raton, 1996.

LIU, B; WENDEL, J. F. Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants. **Genome**. n° 43, p.874–880, 2000.

LIU, Z.H. et al. Grain phytic acid content in japonica rice as affected by cultivar and environment and its relation to protein content. **Food Chemistry**, v.89, n.1, p.49-52, 2005a.

LUMEN, B.O; CHOW, H. Nutritional quality of rice endosperm. In: LUH, B. S. (Ed.). **Rice utilization**. 2.ed. New York: Van Nostrand Reinhold, v.2, cap.15, p.363-395, 1995.

MAHMOUD, A.A; SUKUMAR, S; KRISHNAN, H.B. Interspecific Rice Hybrid of *Oryza sativa* × *Oryza nivara* Reveals a Significant Increase in Seed Protein Content. **Journal Agric. Food Chem**, v.56, p.476-482, 2008.

MARTÍNEZ, C; CUEVAS-PEREZ, F. Evaluación de la calidad culinária y molinera del arroz. 3° ed. Cali: **CIAT** (Série 04SR-07.01), p.75, 1989.

MITRA, G.N; DAS, B. Nutritive value of some rice varieties grown in Orissa 1. Protein content and composition of proteins. **Journal of Research Orissa University of Agriculture and Technology**, v.5, p.51–57, 1975.

MORISHIMA, H; IN: KHUSH, G. S., BRAR, D. S., HARDY, B. (Eds.), **Rice Genetics IV**, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, p.63–77, 2001.

MULTANI, D.S; JENA, K.K; BRAR, D.S; DELOS-REYES, B.G, ANGELES, E.R; KHUSH G.S: Development of monosomic alien addition lines and introgression of genes from *Oryza australiensis* Domin to cultivated rice, *O. sativa* L. **Theor Appl Genet**, n° 88, p.102–109, 1994.

NALIVKO, G. Y; PETIOSKAYA, V.S; DZYUBA, O. Variability of protein and amino acid content in rice grain. **App. Biochem. Microbiol**. v. 2, p.506-510, 1975.

NAVES, M.M.V; BASSINELLO, P.Z. Importância na nutrição humana. In: dos Santos, A.B; Stone L.F, Vieira N.R.A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, cap.1, p.17-30, 2006.

O'NEILL, R. J. W; O'NEILL, M. J; GRAVES, J. A. M. Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid. **Nature**. n° 393, p. 68–72, **1998**.

OLIVEIRA, A. C; DERBYSHIRE, E; CARVALHO, M. T. V; ANDO; A. Perfis protéicos de variedades parentais e híbricos de arroz e sua correlação com heterose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.28, p.313-322, 1991.

OSBORNE, T. B. **The Vegetable Proteins**. Longmans. London, 1924.

RANGEL, P.H.N; GUIMARÃES, E.P; NEVES, P.C.F. Base genética das cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, p.349-357, 1996.

RAVEN, P.H; EVERT, R.F; EICHHORN, S.E. A composição molecular das células. **Biologia Vegetal**, 5ªed. New York, cap.3, p.47-61, 1992.

SANO Y. Differential regulation of waxy gene-expression in rice endosperm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 68, p.467-473, 1984.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades-degradações-modificações. São Paulo: Varela, p.139-257, 1996.

SHEWRY, P.R. Improving the protein content and composition of cereal grain. **Journal of Cereal Science** v.46, p.239-250, 2007.

SHIH, F.F. Rice proteins. In: Champagne, E.T. (Ed.), *Rice: Chemistry and Technology*, 3ªed. **American Association of Cereal Chemists, Inc.**, St Paul, MN, p.143-162, 2004.

SHOTWELL, M. A; LARKINS, B. A. The molecular biology and biochemistry of seed storage proteins. In: **The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise**. San Diego, v.15 p.297-345, 1989.

SHOTWELL, M.A; LARKINS, B.A. The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. In *The Biochemistry of Plants*. Edited by Mifflin, B.J. **Academic Press**, New York, p.297-345, 1988.

STEENSON, D.F; SATHE, S.K. Characterization and digestibility of *Basmati* rice (*Oryza sativa* L. var. *Dehraduni*) storage protein. **Cereal Chemistry**. v.72, p.275-280, 1995.

AIRA, H. Grain quality: physicochemical properties and quality of rice grains. In: MATSUO, T; KUMAZAWA, K; ISHII, R; ISHIHARA, K; HIRATA, H. (Ed.). **Science of the rice plant**. Tokyo: **Food and Agriculture Policy Research Center**, v.2 (Physiology). cap. 6.1, p.1063-1089, 1995.

TAKAIWA, F; OGAMA, M; OKITA, T.W. Rice glutelins. In: Shewry, P; Casey, R. *Seed proteins*. Dordrecht, FL: Kluwer **Academic Publishers**, p.401-426, 1999.

TAKAIWA, F; OONO, K. Genomic DNA sequence of two new genes for new storage protein glutelin in rice. **Japanese Journal of Genetics**, v. 66, p.161-171, 1991.

TURLEY, R.H; CHING, T.M. Storage protein accumulation in Scio Barley seed as affected by late foliar application of nitrogen. **Crop Science**, v.26, p.987-993, 1986.

VANNUCCHI, H; MENEZES, E.W; CAMPANA, A.O; LAJOLO, F.M. Aplicações das recomendações nutricionais adaptadas à população brasileira. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v.2 p.156, 1990.

VIEIRA, N. R de A; RABELO, R.R. Qualidade tecnológica. In: dos Santos, A.B; Stone L.F, Vieira N.R.A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2ªed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, cap.23, p.878-888, 2006.

WANG, X. et al. Coordinated studies on genetics resources of Rice in Yunnan. Glabrous hull Rice (guangkeda) in Yunnan. **Res. Bull Beijing Agric.**, v.10, p.333-344, 1995.

YAMAGATA, H; SUGIMOTO, T; TANAKA, K; KASAI, Z; Biosynthesis storage protein in developing rice seeds. **Plant Physiol.**, v. 70, p.1094 -1100, 1982.

YAMAGATA, H; TANAKA, K; KASAI, Z. Evidence for a precursor form of rice glutelin subunits. **Agricultural and Biological Chemistry.**, v. 46, p.321-322, 1982.

YAMAGATA, H; TANAKA, K; The site of synthesis and accumulation of storage proteins. **Plant Cell Physiol.**, v. 27, p.135-145, 1986.

YAMANAKA, S. et al. Identification of SNPs in the waxy gene among glutinous rice cultivars and their evolutionary significance during the domestication process of rice. **Theor. Appl. Genet.**, nº108, p.1200-1204, 2004.