

CONTROL GENETICO DE LAS PROTEINAS DE LA SEMILLA POR UN MUTANTE ESPONTANEO DE GRANO DEFECTIVO EN MAIZ *

J. L. Magoja (1)

Recibido: 24/3/83

Aceptado: 4/8/83

RESUMEN

Una mutación espontánea, que condiciona granos defectivos fué hallada en la línea colorada flint WK-01. Los granos mutantes son de pequeño tamaño (27% del peso de los normales), poseen endosperma harinoso, embrión y endosperma reducidos, coloración amarillo pálida y pericarpio, en algunas zonas del grano, separado de la capa aleuronífera. El carácter es controlado por un sólo gene recesivo de herencia sencilla designando como *de**-7601. El gene *de**-7601 es letal, ya que si bien un 50% de los granos defectivos germinan, producen plántulas que mueren tempranamente en su desarrollo. El patrón proteico de los granos defectivos difiere notablemente del de los normales y se caracteriza por la baja proporción de zeína. El mutante *de**-7601 actúa como otros genes reguladores conocidos que reprimen la síntesis de la zeína. Los patrones moleculares de las proteínas solubles del germen y el endosperma muestran que los granos defectivos no sintetizan algunos componentes pero nuevos polipéptidos son sintetizados en las lipoproteínas del germen. Los resultados obtenidos, permiten inferir que al menos para este caso particular, el locus *de**-7601 es un gene regulador que controla la síntesis de las proteínas del endosperma y germen, alterando intensamente el patrón proteico normal.

GENETIC CONTROL OF SEED PROTEINS BY A SPONTANEOUS DEFECTIVE KERNEL MUTANT OF MAIZE

SUMMARY

A spontaneous mutation, which conditions defective kernels was found in the WK - 01 red flint line. Mutant kernels are small (27% of normal kernel weight). The characteristic of these kernels is that they present a floury endosperm, a reduced embryo and endosperm, a pale yellow colours and the pericarp separated in some parts from the aleuroniferous layer.

The character is controlled by a single recessive gene which is referred to as *de**-7601. The gene *de**-7601 is lethal, because although 50% of the defective kernels germinate, the seedlings die in early development stages. The protein pattern of the defective kernels notably differs from that of the normal kernels and is characterized by a lower proportion of zein. The mutant *de**-7601 acts as other know regulatory gene which repress zein synthesis. The molecular patterns of germ and endosperm soluble proteins show that defective kernels do not synthesize some components but new polypeptides are synthesized in the germ lipoproteins.

The results obtained allow us to infer, that at least for this particular case, the locus *de**-7601 is a regulatory gene which control the synthesis of the endosperm and germ proteins, deeply altering the normal protein pattern.

* Presentado al XIII Congreso Argentino de Genética, La Plata, Argentina, 1982.
Realizado en el Instituto Fitotécnico de Santa Catalina.

(1) Dirección de Investigaciones, Universidad Nacional de Lomas de Zamora e Instituto Fitotécnico de Santa Catalina; Universidad Nacional de La Plata.

INTRODUCCION

En el maíz, uno de los organismos genéticamente mejor estudiados, se conoce un gran número de mutaciones espontáneas o inducidas, muchas de las cuales afectan el fenotipo del grano (Neuffer *et al.*, 1968). Una clase de ellas fue poco estudiada por muchos años debido a la dificultad en su manipulación, y agrupa a los mutantes de granos defectivos como es señalado por Neuffer y Sheridan (1980).

Jones (1920) y Mangelsdorf (1923) denominan a este tipo de mutantes "semilla defectiva" (*de*). Demerec (1923) designa a una clase especial de estos mutantes con germen no funcional como "germless" (*gm*).

En general estos mutantes condicionan en el grano de maíz alguna modificación con respecto al fenotipo normal que resulta perfectamente notable: generalmente el desarrollo del grano se ve reducido, resultando de menor tamaño y peso como consecuencia de una alteración en el endosperma o en el embrión, o en ambas partes a la vez. El resultado de estas modificaciones, es que, en una elevada proporción estas mutaciones son letales, especialmente cuando afectan al germen.

Lowe y Nelson (1946), dicen que los tipos de grano defectivo, que afectan el normal desarrollo del endosperma y embrión de maíz, pueden ser divididos superficialmente en dos grupos sobre la comparación de su crecimiento. El primer grupo puede comprender aquellos defectivos que en la planta que producen no afectan el vigor y tamaño con respecto a las normales, aunque pueden ser más pequeñas en los primeros estados de su desarrollo. El segundo grupo, para Lowe y Nelson (1946), puede agrupar todos los letales y semiletales en los que el factor en cuestión se expresa en la generación esporofítica y hace las plantas pequeñas, más claras en color y menos vigorosas.

En el primer grupo puede incluirse el gene *mm* (semilla miniatura), encontrado por Lowe y Nelson (1946), que es capaz de producir plantas de desarrollo normal a pesar de que los granos que llevan a ese gene en su medio

genético sólo pesan la quinta parte de sus equivalentes normales. Los granos "miniatura", sin embargo, tienen el germen y el endosperma en la misma proporción que en los normales, y germinan normalmente. Según Lowe y Nelson (1946), el carácter *mm* es único entre las semillas defectivas porque combinan un alto grado de defectividad con un crecimiento normal tanto en las generaciones gametofítica como esporofítica.

Neuffer y Sheridan (1980) estudian un gran número de mutantes que condicionan granos defectivos, obtenidos al tratar polen con etil metasulfonato (mutantes inducidos). Estos autores generalizan el término empleado por Jones (1920) y Mangelsdorf (1923), designando a este tipo de mutaciones como "defective kernel" (granos defectivos). Neuffer y Sheridan (1980) manifiestan que esos mutantes pueden ser agrupados en cuatro tipos: el primero, comprende a los que afectan el endosperma y el embrión, siendo éste último no viable o produciendo plántulas que mueren en su desarrollo, por lo tanto letales. El segundo tipo, afecta endosperma y embrión, siendo éste último viable y capaz de producir una plántula con un genotipo mutante distinguible. El tercer tipo, afecta sólo al endosperma y por lo tanto es capaz de producir plantas normales; mientras el cuarto tipo sólo afecta al germen y se expresa como "germless" (germen no funcional).

Sheridan y Neuffer (1980) dicen que estos mutantes son genes simples, recesivos, condicionando tanto endosperma como embrión defectivo y en su mayor parte letales. Si bien se conocen las bases hereditarias de estas mutaciones, habiéndose precisado la ubicación de muchos de estos genes en los cromosomas del maíz (Neuffer y Sheridan, 1980) existe una falta casi total de información en lo referente a los cambios a nivel molecular que pueden condicionar estos factores, que necesariamente deben ser la base para explicar las profundas modificaciones que ejercen a nivel del fenotipo observable.

Por ello, el propósito del presente trabajo es, el de conocer el control genético, que producen los mutantes que condicionan gra-

no defectivo en maíz, sobre las proteínas seminales, para iniciar con el mismo investigaciones tendientes a dilucidar las bases moleculares de tales cambios, que resultan en la mayoría de los casos letales.

Para ello será estudiado un gene recesivo que apareció espontáneamente en una línea de maíz (WK - 01) colorada flint y que condiciona grano defectivo siendo en este caso particular un carácter letal.

MATERIAL Y METODOS

En el año 1979, en la línea endocriada de maíz WK - 01, perteneciente al tipo colorado flint, se encontró una espiga autofecundada que segregaba aproximadamente 3 granos normales por uno defectivo. Al año siguiente se sembraron granos de fenotipo normal proveniente de esa espiga obteniéndose varias plantas; las 2/3 partes de las mismas aproximadamente, produjeron por autofecundación espigas segregantes para el carácter defectivo. Este material es el que se analiza en el presente trabajo. Sobre cinco espigas segregantes se determinó el peso individual de los granos normales y defectivos, como asimismo la proporción en que participaban los dos componentes fundamentales del grano: germen y endosperma. Estas determinaciones fueron realizadas por disección manual de los granos.

Para los análisis bioquímicos se trabajó sobre dos espigas de cada una de las cuales se tomaron dos muestras al azar de 50 granos normales y 50 defectivos. Los granos fueron diseccionados manualmente para separar el germen y el endosperma sobre los cuales se practicaron los análisis. Las muestras de endosperma fueron molidas hasta 100 mesh, desgrasadas en n-hexano por agitación a 4°C. Sobre la harina delipidada se fraccionaron las proteínas de reserva mediante la técnica de Landry y Moureaux (1970) empleando el sistema de extracción dado por Magoja *et al.*, (1978). Por este método se obtuvieron 5 fracciones: 1) salino soluble (albúminas y globulinas); 2) zeína; 3) glutelina-1; 4) glutelina-2; 5) glutelina-3. Proteína se determinó por el método de microkjeldahl (A.O.A.C.,

1965) y lisina por la técnica de Beckwith *et al.* (1975).

Para el análisis de los componentes moleculares de las proteínas de la semilla, mediante electroforesis, las muestras se prepararon de la siguiente manera: la zeína fué dializada contra agua destilada durante 72 horas, a 4°C con tres cambios de agua en dializador rotativo; recuperada por centrifugación y disuelta en solución saturada de urea. Las proteínas solubles del endosperma, y las proteínas solubles y lipoproteínas del germen, fueron extraídas por agitación de la harina molida hasta 60 mesh, con Buffer Tris Glicina, 5×10^{-3} M, pH 8,3 a temperatura ambiente.

La electroforesis de zeína se llevó a cabo mediante la técnica de Reisfeld *et al.* (1962), en las condiciones dadas por Sastry y Virupaksha (1967). Por este método se prepararon geles de poliacrilamida en tubos. Los geles fueron de pH 4, 7 y 8M en urea con una concentración de 7,5% en acrilamida. El Buffer de corrida empleado fué Lactato de aluminio-Acido láctico, $1,7 \times 10^{-3}$ M, pH 3, 1 y 1M en urea. La migración fué catódica, mediante la aplicación de una corriente constante de 5 mA/tubo, durante 4 horas a temperatura ambiente.

La electroforesis de las proteínas solubles y lipoproteínas se realizó según la técnica de Davis (1969). Para ello se confeccionaron geles de poliacrilamida en tubos, de 7% de concentración y pH 8,9. El Buffer de corrida empleado fué el mismo de extracción, es decir Tris-Glicina. La separación se logró mediante la aplicación de una corriente constante de 5 mA/tubo durante aproximadamente 2 horas, a temperatura ambiente (migración anódica).

La coloración de las fracciones separadas se realizó de la siguiente manera: para proteínas, se utilizó Amido Schwarz 10B al 0,5% en ácido acético al 7%, durante 10 minutos.

Para lipoproteínas, Sudan Black 0,1% en etanol 70% durante 12 horas. Las separaciones de proteínas se decoloraron por repetidos cambios de ácido acético al 7%, y las de lipoproteínas con etanol al 40 por ciento.

RESULTADOS

El mutante espontáneo encontrado en la línea WK-01, condiciona granos de pequeño tamaño, con un peso que en promedio representa solo el 27% aproximadamente del de los granos normales (Cuadro 1). Estos granos defectivos se caracterizan por presentar endosperma harinoso, coloración amarillo pálida y pericarpio en algunas zonas del grano separado de la capa aleuronífera (Figura 1).

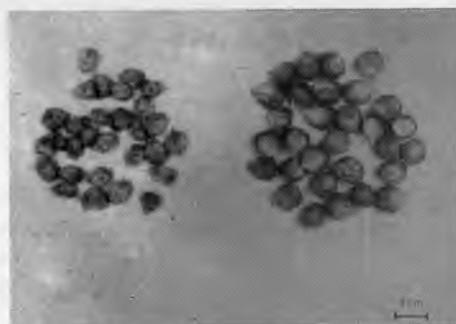


Figura 1: Fotografía mostrando los granos defectivos (izquierda) y sus equivalentes normales (derecha).

CUADRO 1: Peso de granos normales (+) y defectivos (de) en distintas espigas segregantes.

Espiga N°	Peso del grano (mg)		Defectivos % en peso de los normales
	+	de	
1	246,5	62,1	25,2
2	259,6	91,1	35,1
3	285,9	69,0	24,1
4	314,6	72,9	23,2
5	230,9	64,9	28,1
$\bar{x} \pm S$	$267,5 \pm 33,2$	$72,0 \pm 11,4$	$27,1 \pm 4,8$

CUADRO 2: Peso y relación porcentual de los principales componentes del grano entero (GE): endosperma (E) y germen (G), en distintas espigas segregantes.

Espiga N°		Fenotipos			
		+		de	
		Peso (mg)	%	Peso (mg)	%
1	GE	246,5	100	62,1	100
	E	206,3	83,7	48,9	78,7
	G	31,3	12,7	6,1	9,8
3	GE	285,9	100	69,0	100
	E	235,6	82,4	54,6	79,1
	G	32,9	11,5	6,6	9,6
4	GE	314,6	100	72,9	100
	E	265,7	84,5	59,3	81,3
	G	34,8	11,1	7,4	10,2
5	GE	230,9	100	64,9	100
	E	200,3	86,7	48,2	74,3
	G	24,3	10,5	6,2	9,6
$\bar{X} \pm S$	GE	$269,5 \pm 37,9$	100	$67,2 \pm 4,7$	100
	E	$226,9 \pm 30,1$	$84,3 \pm 1,8$	$52,8 \pm 5,2$	$78,4 \pm 2,9$
	G	$30,8 \pm 4,6$	$11,5 \pm 0,9$	$6,6 \pm 0,6$	$9,8 \pm 0,3$

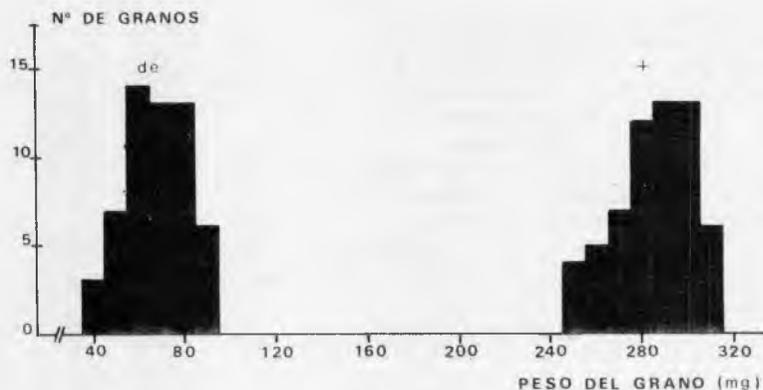


Figura 2: Distribución de frecuencias para peso del grano entre granos defectivos (de) y normales (+) de una misma espiga.

Tanto el endosperma como el embrión se encuentran en menor proporción que en los granos normales de la misma espiga (Cuadro 2). La distribución de frecuencias de peso individual para granos normales y defectivos de una misma espiga, representa una gráfica bimodal, en donde existe una clara diferenciación entre los dos fenotipos (Figura 2).

Cuando se analiza la segregación del carácter defectivo, en espigas obtenidas por autofecundación de plantas originadas de granos con genotipo heterocigota para la mutación, puede deducirse que no se aparta significativamente de la relación 3 normales: 1 defectivo (Cuadro 3). Este hecho permite deducir que el carácter en cuestión es condicionado por un sólo gene recesivo de herencia mendeliana sencilla que se designará en lo sucesivo como *de**-7601.



Figura 3: Patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida de los polipéptidos de la zeína (zp) en granos normales (+) y defectivos (de).

CUADRO 3: Segregación del carácter defectivo en espigas de la línea WK-01.

Espiga N ^o	Fenotipos		χ^2 para la relación 3:1	P
	Normal	Defectivo		
1	185	69	0,278	0,50-0,70
2	212	89	3,349	0,05-0,10
3	208	57	1,722	0,10-0,20
4	182	63	0,067	0,70-0,90
5	207	65	0,176	0,50-0,70
general	994	343	0,305	0,50-0,70

CUADRO 4: Patrones proteicos del endosperma de la línea normal WK-01 y su versión defectiva.

Fracción *	Nitrógeno soluble (% del total)	
	Normal	Defectivo
SS	5,6	15,0
Z	55,8	35,4
G ₁	13,9	17,4
G ₂	6,4	7,8
G ₃	16,9	22,1
Proteína %	9,8	8,8
Lisina (g/16gN)	2,5	3,2

* SS: proteínas salino solubles (albúminas y globulinas); Z: zeína; G₁: glutelina-1; G₂: glutelina-2; G₃: glutelina-3. Proteína y lisina expresadas sobre endosperma desengrasado.



Figura 4: Patrones electroforeticos en gel de poliacrilamida de las proteínas solubles del endosperma en granos normales (+) y defectivos (de).

Tanto la comparación de los patrones proteicos del endosperma (Cuadro 4), como la de los patrones polipeptídicos de las proteínas seminales estudiadas (Figura 3 a 6),

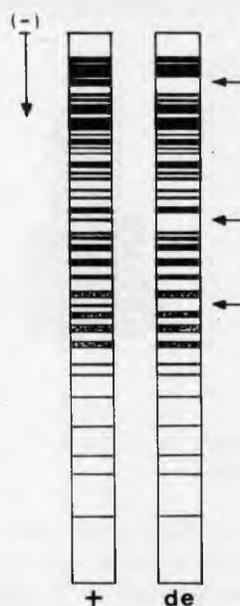


Figura 5: Patrones electroforeticos en gel de poliacrilamida de las proteínas solubles del germen en granos normales (+) y defectivos (de).



Figura 6: Patrones electroforeticos en gel de poliacrilamida de las lipoproteínas del germen en granos normales (+) y defectivos (de).

permiten distinguir claramente los fenotipos de los defectivos, habiendo entre ellos diferencias cuantitativas y cualitativas.

DISCUSION

El gene *de**-7601 puede ser clasificado dentro del segundo grupo de Lowe y Nelson (1946) para los tipos de grano defectivo en maíz, o según Neuffer y Sheridan (1980) en el primer tipo de su clasificación, ya que afecta tanto al endosperma como al embrión y éste no es viable o produce plántulas que mueren durante el desarrollo. En pruebas de germinación realizadas utilizando como control los granos de fenotipo normal de la misma espiga, se comprobó que sólo el 50% de los granos que llevan el gene *de**-7601 al estado de homocigota pueden germinar. Sin embargo las plántulas que originan mueren tempranamente en un estado de 2 a 4 hojas, son muy débiles y pequeñas, de color verde claro y de crecimiento muy lento. Es por ello que el mutante de grano defectivo en estudio puede ser considerado letal.

El efecto de la mutación sobre el peso del grano es muy marcado, los granos defectivos sólo pesan en promedio aproximadamente la cuarta parte de sus equivalentes normales (Cuadro 1). Si bien la proporción en que el germen y endosperma entran en la composición del grano defectivo está reducida con respecto a los normales (Cuadro 2), ésta no es de mayor importancia, especialmente de la del germen.

Los resultados obtenidos permiten, consecuentemente, deducir que la inviabilidad de los granos defectivos se debe fundamentalmente a un retardo en el grado de desarrollo del germen, por un bloqueo durante la embriogénesis, como manifiestan Sheridan y Neuffer (1980).

Efecto del locus *de**-7601 sobre el patrón proteico del endosperma

Como se manifiesta en la introducción de este trabajo, el mayor interés del presente estudio es determinar cual es el efecto del locus *de**-7601 sobre las proteínas del grano.

Para ello se realizó un análisis comparativo entre los granos defectivos por un lado y

sus normales equivalentes por el otro. Dado que la mutación defectiva apareció en una línea endocriada que se mantiene por autofecundación, resulta sumamente interesante y válida la comparación, ya que los granos defectivos tienen el mismo medio genético que los normales con la sólo diferencia de él o los genes que condicionan las modificaciones. Por lo tanto se trata de la comparación de dos líneas isogénicas.

Las proteínas de reserva del grano se fraccionaron según la técnica de Landry-Moureaux (1970). Los resultados obtenidos (Cuadro 4) demuestran las claras diferencias entre el patrón proteico de los granos normales y el de los defectivos. El patrón de los granos defectivos se caracteriza por la menor proporción de zeína y mayores cantidades de proteínas salino solubles y glutelina-3 que en los granos normales.

Este tipo de modificación en el patrón proteico del endosperma es producida por varios genes mutantes en maíz, que condicionan consecuentemente altos niveles de lisina y triptofano (Mistra *et al.*, 1972, 1975; Magoja *et al.*, 1978). El mutante *de**-7601 actúa como otros genes reguladores conocidos que reprimen la síntesis de zeína y condicionan consecuentemente, una mayor proporción de albúminas, globulinas y glutelina-3.

De los resultados obtenidos, en principio, puede manifestarse que el locus *de**-7601 pertenece a un gene regulador que tiene bajo su control la síntesis de las proteínas de reserva, produciendo una profunda modificación en la proporción en que estas se sintetizan en el endosperma (Cuadro 4).

Los granos defectivos, también como otros mutantes, tienen un mayor nivel de lisina que sus contra partes normales (Cuadro 4).

Efecto del locus *de**-7601 sobre el patrón polipeptídico de la zeína

Para establecer si existen diferencias en la composición molecular de la mayor prote-

ína de reserva del endosperma, la zeína, esta se fraccionó mediante electroforesis (Figura 3). El patrón en los granos defectivos es similar al de los granos normales, pero el polipéptido 5 (zp5) es completamente reprimido ya que no aparece.

Para este caso particular se da una situación que no puede considerarse similar a la que se produce sobre el patrón de zeína por la acción de otros genes reguladores conocidos.

En efecto, los estudios realizados hasta el presente acerca del control de los genes reguladores más estudiados como *opaco-2*, *floury-2* y *opaco-7* demuestran que estos genes tienen la particularidad de reprimir la síntesis de zeína sin modificar cualitativamente los componentes de la misma, por lo tanto la inhibición es general para todas las bandas proteicas que pueden resolverse electroforéticamente. Este control general de todos los componentes de la zeína, ejercida por esos reguladores, fué demostrada por varios autores, entre ellos Burr y Burr (1976), Gianazza *et al.* (1976), Soave *et al.* (1976), Lee, *et al.* (1976), Misra *et al.* (1976) y Di Fonzo *et al.* (1977). En maíces que llevan el gene *floury-a* también se produce el mismo fenómeno (Magoja *et al.*, 1981).

Sin embargo el patrón de zeína de los granos defectivos se caracteriza por la ausencia de un componente que se encuentra en sus equivalentes normales. Este hecho hace suponer que posiblemente el gene regulador *de* -7601* además de ejercer una acción represiva general hacia todos los componentes moleculares de la zeína, también actuando como regulador reprima específicamente el locus estructural zp5. También no puede desconocerse que existe la posibilidad de que el locus zp5 no sea reprimido específicamente, sino que halla mutado conjuntamente con el locus defectivo y ambos formen parte de una mutación que se produjo sobre 2 loci fuertemente ligados (un regulador y un estructural).

De los resultados obtenidos puede inferirse que el locus *de* -7601* simple o complejo produce cambios no sólo cuantitativos sino cualitativos sobre las proteínas del endosperma.

Efecto del locus *de* -7601* sobre el patrón polipeptídico de las proteínas solubles del endosperma y germen

Las proteínas solubles del endosperma se encuentran en mucha mayor proporción en los granos defectivos que en los normales (Cuadro 4), ya que éstas son casi totalmente albúminas y globulinas. Este hecho indica que en principio existe una alteración cuantitativa atribuible al locus *de* -7601*.

Cuando se comparan las proteínas solubles del endosperma separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida, dos componentes se encuentran ausentes en el patrón de los granos defectivos (Figura 4). Las proteínas solubles del germen muestran también en su patrón molecular, que los granos defectivos no sintetizan 3 de los componentes que se encuentran en sus equivalentes normales (Figura 5).

Muchas de las bandas que se resuelven por electroforesis de las proteínas solubles tanto del endosperma como del germen deben tener quizá actividad enzimática, ya que como es sabido en el "pool" de proteínas solubles se encuentran la mayor parte de las enzimas del grano. Posiblemente algunos de los polipéptidos faltantes en los patrones de los granos defectivos sean enzimas esenciales para el normal crecimiento y desarrollo del grano y puedan ser la causa de las modificaciones a nivel del fenotipo observable, como así también de la falta de viabilidad de los defectivos. La falta de viabilidad de la mayoría de los granos defectivos, y del mutante espontáneo *de* -7601* no implica que el carácter sea letal en forma estricta. En efecto, el bloqueo de alguna ruta metabólica en la producción de alguna sustancia esencial (un aminoácido), por la falta de síntesis de alguna o algunas enzimas hace que en definitiva la deficiencia sea condicional. Gavazzi *et al.* (1975) comunican el primer caso de estricto requerimiento genético de un aminoácido en maíz. Estos autores identificaron un mutante de endosperma monogénico recesivo, letal condicional, que cuando sus em-

briones son cultivados en un medio con prolina desarrollan normalmente. Es decir que el mutante simbolizado *pro* ejerce un bloqueo genético en la síntesis de una enzima que actúa en la ruta biosintética de la prolina.

También Sheridan y Neuffer (1980) manifiestan que si bien los mutantes de grano defectivo son letales en condiciones normales, el cultivo de embriones en medios artificiales, demuestra que la mayoría son capaces de crecer y desarrollar en plantas. Esto constituye una prueba más acerca de que los mutantes de grano defectivo tengan bloqueada la síntesis de una o varias enzimas.

Como para el caso de la zeína, también en las proteínas solubles tanto del endosperma como del germen el locus *de**-7601 condiciona cambios cuantitativos y cualitativos. La falta de síntesis de determinados componentes moleculares hace sospechar también que la mutación pueda involucrar genes estructurales ligados al regulador *de**-7601, o pueda ser consecuencia de un bloqueo ejercido por el gene regulador.

Efecto del locus *de-7601 sobre el patrón polipeptídico de las lipoproteínas del germen**

Las lipoproteínas constituyen un grupo especial de proteínas asociados con lípidos que son características del germen del grano de maíz, ya que si bien también existen en el endosperma se encuentran en muy baja proporción. En la Figura 6 pueden observarse los patrones de lipoproteínas de los granos defectivos y también de los normales. Contrariamente a lo ocurrido en los casos anteriores (zeína y proteínas solubles); en donde los patrones moleculares de los granos defectivos mostraban la falta de algunos polipéptidos, en las lipoproteínas de los gérmenes que llevan el gene *de**-7601 se sintetizan tres nuevos componentes no hallados en los gérmenes normales.

Este hecho sugiere que la ausencia de determinados componentes no se deba simplemente a la acción represiva específica del regulador *de**-7601 sino que pueda tratarse

de la expresión del alelo nulo para esos genes estructurales, y consecuentemente que la mutación los halla alcanzado también. Esto puede ser admitido como una generalización del fenómeno ya que en las lipoproteínas no sólo no hay ausencia de componentes moleculares sino que se sintetizan nuevos. Todo esto hace sospechar que además del gene regulador cuya identificación es evidente, puedan haber mutado algunos genes estructurales ligados al mismo.

En un trabajo realizado con posterioridad a la obtención de los resultados presentados aquí, se obtuvo nueva información experimental que permite reforzar la hipótesis de que el locus *de**-7601 es un gene regulador (Magoja y Nivio, 1982). En este trabajo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, se separaron las proteínas solubles de granos normales y defectivos. Durante diferentes estados del desarrollo de los mismos.

Coincidentemente con los resultados presentados anteriormente en granos maduros, los patrones polipeptídicos de los granos inmaduros mostraron que el gene *de**-7601 condiciona el bloqueo en la expresión de determinados componentes moleculares. Por el contrario para las lipoproteínas, el fenotipo defectivo se caracteriza en los granos inmaduros por la presencia de nuevos componentes.

En el trabajo de Magoja y Nivio (1982) se deduce que:

- 1) Existen algunos polipéptidos que cualquiera sea el estado de desarrollo, nunca aparecen en las proteínas solubles de los granos que llevan el gene *de**-7601. Este fenómeno puede interpretarse como el bloqueo de los genes estructurales que codifican esos componentes por uno o más genes reguladores, o bien como la expresión de los alelos nulos de los genes estructurales correspondientes afectados por la mutación.
- 2) Algunos componentes moleculares de las proteínas solubles tienen bloqueada su expresión en los primeros estados del desarrollo en los granos defectivos, pero

se manifiestan en estados más avanzados del desarrollo. En este caso resulta obvio que el o los genes estructurales responsables de la codificación de esos componentes están presentes con su alelo activo pero uno o más genes reguladores reprimen la expresión de los mismos con distinta intensidad según el estado de desarrollo. El gene regulador condiciona un retardo en la expresión de ciertos polipéptidos en los granos defectivos.

- 3) Los patrones polipeptídicos, tanto en los granos normales como en los defectivos varían a través del tiempo durante el desarrollo del grano. En general, el patrón se hace más complejo a medida que avanza la madurez.
- 4) Mientras que en las proteínas solubles las diferencias entre los patrones normales y los defectivos disminuyen hacia la madurez, con las lipoproteínas sucede lo contrario, es decir los patrones se diferencian más en los estados más avanzados del desarrollo del grano.

También es manifestado por Magoja y Nivio (1982) que el bloqueo temprano en la expresión de ciertos genes que codifican algunos componentes polipeptídicos de los granos defectivos, y el retardo en la expresión de otros, debe ser posiblemente la causa del atraso en el desarrollo de los granos defectivos que hace que el carácter sea letal.

Respecto de los nuevos componentes de las lipoproteínas que aparecen en los defectivos, Magoja y Nivio (1982) manifiestan que al hacerse corridas electroforéticas para lipoproteínas de los granos normales a muy alta concentración de muestra pudieron demostrar que las bandas rápidas (Ver Figura 6) también están presentes en los granos normales, pero en muy baja proporción, por lo cual no son distinguibles en una corrida electroforética con concentración normal de proteína.

Los resultados presentados por Magoja y Nivio (1982) han llevado a deducir que esos componentes de las lipoproteínas de los defectivos, también sean la causa de la condi-

ción defectiva, y que ese fenómeno podría ser interpretado como la síntesis descontrolada de esos componentes como consecuencia de la mutación del locus regulador que controla la cantidad sintetizada de esos componentes. Se manifiesta también que en los defectivos al no ejercerse control sobre los loci estructurales que codifican esas lipoproteínas, estos se transcriben descontroladamente.

Son varias las modificaciones que se ejercen en los granos defectivos en maíz.

La más evidente resulta de la dramática reducción del tamaño del grano. En este caso particular el desarrollo normal tanto del endosperma como de germen es bloqueado, resultado de lo cual la semilla pierde su viabilidad, o al menos es incapaz de originar una planta normal ya que éstas mueren tempranamente en su desarrollo.

Sumadas a estas modificaciones que ejercen los mutantes que condicionan granos defectivos, están las que se presentan en este trabajo y que se ejercen sobre las proteínas del grano.

Los resultados obtenidos permiten primariamente deducir que, al menos para este caso particular, el locus *de**-7601 es un gene regulador que controla la síntesis de las proteínas del endosperma, alterando profundamente el patrón proteico normal. En general el bloqueo en la síntesis de algunos componentes proteicos, que quizá sean enzimas indispensables para el normal desarrollo y viabilidad del grano, permite suponer que existe una alta probabilidad de que la mutación grano defectivo alcance a un elemento regulador.

También, aunque no existen suficientes evidencias al respecto, y resulta necesario hacer indagaciones a nivel molecular, las diferencias cualitativas y cuantitativas, deben ser la causa de la condición defectiva en los granos de maíz.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Association of official agricultural chemists,

1965. Methods of analysis (10 th ed.). The Association. Wash., D. C.
- 2) Beckwith, A. C.; J. W. Paulis; J. S. Wall, 1975. Direct estimation of lysine in corn (maize) meals by the ninhydrin color reaction. *J. Agric. Chem.* 23 (2): 194-196.
 - 3) Burr, B.; F. A. Burr, 1976. Zein synthesis in maize endosperm by polyribosomes attached to protein bodies. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73: 515-519.
 - 4) Davis, B. J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 12: 404-427.
 - 5) Demerec, M., 1923. Heritable characters of maize. XV Germless seed. *J. Heredity* 14:297-300.
 - 6- Di Fonzo, N., E. Fornasari; F. Salamini; C. Soave, 1977. SDS -protein subunits in normal, opaque-2 and floury-2 maize endosperms. *Maydica* 22: 77-88.
 - 7) Gavazzi, G. M.; M. Nava-Rachi; C. Tonell, 1975. A mutation causing proline requirement in *Zea mays*. *Theor. Appl. Genet.* 46: 339-346.
 - 8) Gianazza, E.; P. C. Righetti; F. Pioli; E. Galante; C. Soave, 1976. Size and charge heterogeneity of zein in normal and opaque-2 maize endosperm. *Maydica* 21: 1-17.
 - 9) Jones, D. C., 1920. Heritable characters of maize. IV. A lethal factor-defective seed. *J. Heredity* 11: 161-167.
 - 10) Landry, J; T. Moureaux, 1970. Hétérogénéité des glutelines du grain de maïs: Extraction sélective et composition en acides aminés des trois fractions isolées. *Bull Soc. Chim. Biol.* 52 (10): 1021-1031.
 - 11) Lee, K. H.; R. A. Johns; A. Dalby; C. Y. Tsai, 1976. Genetic regulation of storage protein content in maize endosperm. *Biochem. Genet.* 14: 641-650.
 - 12) Lowe, J.; O. E. Nelson, 1946. Miniature seed-a study in the development of a defective Caryopsis in maize. *Genetics* 31: 525-533.
 - 13) Magoja, J. L.; A. A. Nivio; M. A. Rapela, 1978. Regulación genética de la síntesis de las proteínas del endosperma de maíz por el sistema floury-a. Comunic. Direc. Inv. Univ. Nac. Lomas de Zamora. Año 1. N° 3.
 - 14) Magoja, J. L.; M. A. Rapela A. A. Nivio, 1981. Regulación genética del patrón proteico y componentes moleculares de la zeína del endosperma de maíz por el sistema floury-a. (enviado a la *Rev. Fac. Agr.* (UNLP).
 - 15) Magoja, J. L.; A. A. Nivio, 1982. Variación de los componentes polipeptídicos de las proteínas durante el desarrollo del grano, condicionada por un mutante de grano defectivo en maíz. XIII Congreso Argentino de Genética, La Plata, Argentina- Resúmenes: 49.
 - 16) Mangelsdorf, P. C., 1923. The inheritance of defective seed in maize. *J. Heredity* 14: 119-125.
 - 17) Misra, P. S.; E. T. Mertz; D. V. Glover; H. M. Barbosa; K. S. Mc Whirter, 1972. Endosperm proteins synthesis in maize mutants with increased lysine content. *Science* 176: 1425-1427.
 - 18) Misra, P. S.; E. T. Mertz; D. V. Glover, 1975. Studies on corn proteins. VI. Endosperm protein changes in single and double endosperm mutants of maize. *Cereal Chem.* 52 (2): 161-166.
 - 19) Misra, P. S.; E. T. Mertz; D. V. Glover, 1976. Studies on corn proteins. X. Polypeptide molecular-weight distribution in Landry-Moureaux fractions of normal and mutant endosperms. *Cereal Chem.* 53 (5): 705-711.
 - 20) Neuffer, M. G. L. Jones; M. S. Zuber, 1968. The mutants of maize. *Crop Sci. Soc. Amer., Madison, Wisc.*
 - 21) Neuffer, M. G.; W. F. Sheridan, 1980. Defective kernel mutants of maize. I. Genetic and lethality studies. *Genetics* 95 (4): 929-944.
 - 22) Reisfeld, R. A.; W. J. Lewis; D. E. Williams, 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* 195: 281-283.
 - 23) Sastry, L. V. S.; T. K. Virupaksha, 1967. Disc electrophoresis of sorghum seed protein in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 19: 505-513.
 - 24) Sheridan, W. F.; M. G. Neuffer, 1980. Defective kernel mutants of maize. II. Morphological and embryo cultures studies. *Genetics* 95 (4): 945-960.
 - 25) Soave, C.; P. G. Righetti; C. Lorenzoni; E. Gentinetta; F. Salamini, 1976. Expressivity of the opaque-2 gene at the level of zein molecular components. *Maydica* 21: 61-75.