

O Desenvolvimento do Milho Ceráteo para uso Industrial 1 (*)

G. F. SPRAGUE e MERLE T. JENKINS 2

O amido é o mais importante produto obtido do milho (*Zea mays L.*) pela indústria de moinhos de milho. Durante o quinquênio, 1936 a 1840, a produção média, por ano, nos Estados Unidos foi superior a 900 milhões de libras (mais de 400.000 toneladas) de amido de milho, fora a parte que é transformada em dextrose, xaropes e dextrinas. O amido para uso doméstico, produzido de outros materiais que não o milho, em média, era de 20 milhões de libras (90.000 toneladas) por ano. Ao lado desta fonte interna, os Estados Unidos importaram livre de direitos alfandegários durante o mesmo período, cerca de 350 milhões de libras (150.000 toneladas) de amido de tapioca e sagu. O consumo anual de 350 milhões de libras de tapioca no país maior produtor do mundo em amido de milho, pode ser atribuído a dois fatores: diferença de preços e propriedades do mesmo amido. (12) 3

Antes da segunda Guerra Mundial, a maioria da tapioca era importada das Índias Holandesas, onde a mão de obra é barata e a mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) produz grandes colheitas. O amido de mandioca tem sido importado como farinha de mandioca, comumente de qualidade inferior, e é retirado após sua chegada. De 1929 a 1939 o preço deste baixo tipo de mandioca, tem sido em média cerca de um cento menos por libra do que do amido de milho.

As quantidades de mandioca necessárias anualmente nos Estados Unidos, para usos especiais, para o que outros

1 — Contribuição da Farm Crops Subsection, Iowa Agricultural Experiment Station, Ames, Iowa, em cooperação com a Division of Cereal Crops and Diseases, Bureau of Plant Industry, Soils and Agricultural Engineering, Agricultural Research Administration, U. S. Dpt. of Agriculture Journal Paper, nº J 968 of Iowa Agricultural Experiment Station, Ames, Iowa, Project 616.

2 — Senior Agronomist and Principal Agronomist em tarefa de investigações de milho, respectivamente, Division of Cereal Crops and Diseases. Colaboradores da Agronomy Section, Farm Crops Subsection, Iowa Agricultural Experiment Station.

3 — Figuras em parentesis referem-se à literatura citada.

(*) Tradução do Eng. Agr. Américo Groszmann, Diretor do Instituto Agro-nômico do Estado de Minas Gerais.

amidos não são satisfatórios, têm sido calculadas de modo vário, de tão baixa quanto 15 milhões de libras, à tão elevada quanto 200 milhões de libras. Logo depois do início da segunda Guerra Mundial, a importação de mandioca caiu a praticamente nenhuma. Observando os sucedâneos da mandioca, chegou-se à conclusão de que o amido do milho ceráceo promete possibilidades. Com o progresso das pesquisas tornou-se aparente que o amido do milho ceráceo era inteiramente aceitável como substituto da mandioca, e tinha ainda propriedades que o habilitavam a introduzir novos produtos industriais e mesmo melhores, feitos do alto tipo do amido de mandioca. A pesquisa química e genética com o milho ceráceo e a história de sua expansão comercial durante os anos de guerra, estão revistas brevemente nas páginas que se seguem.

Um missionário presbiteriano na China, Rev. J. M. W. Farnham, observou um tipo raro de milho ainda antes de 1908. Este tipo foi conhecido pelos chineses como possuindo características extraordinárias e eles se esforçaram para o propagar como variedade pura. Certa amostra desse milho foi recebida do Rev. Farnham pelo Office of Foreign Plant Introduction, em março de 1908 e G. N. Collins fez cruzamentos para estudar sua hereditariedade. A primeira reportagem foi publicada em 1909 (9) e o nome "ceráceo" foi sugerido como indicação da extraordinária textura do endosperma. Esta e notícias posteriores (10,13) estabeleceram que o gene condicionando endosperma ceráceo tinha herança como um simples recessivo. Seguindo estas breves reportagens, o gene ceráceo *WX* foi utilizado largamente em estudos genéticos.

Sete mutações dos tipos de endosperma dentado ou duro, a endosperma ceráceo tem sido relatadas (1, 2, 4, 5 15). Só uma dessas mutações resultou na produção de um novo alelo (2). Os efeitos deste alelo nas propriedades do amido vão ser discutidos mais tarde.

Em 1922 Weatherwax (17) e novamente em 1924 Brink e McGillivray (8) e Demerec (11) relataram que o amido de ceráceo, tingia de vermelho ou trigueiro avermelhado com iodo, enquanto o amido comum tingia de preto azulado sob condições semelhantes. Por causa dessa propriedade de tingir o amido foi considerado por algum tempo ser uma eritrodextrina. Mais recentemente foi demonstrado não ser uma dextrina, mas amilopectina, um amido verdadeiro.

Longley (14) também relatou em 1924 que o gene ceráceo se exprime no pólen. Então, numa planta heterozigota

(WX wx) aproximadamente metade dos grãos do pólen se tinge de vermelho e metade de azul. A identificação das plantas heterozigotas na época da polinização por meio desta tintura diferente tem sido um fator importante em simplificar operações de produção. Em 1926, Brink (7) apresentou prova de que o amido do milho ceráceo, difere em composição do amido do milho comum. Naquele tempo a química do amido não tinha progredido suficientemente para indicar a real diferença entre amido de milho ceráceo e amido de milho comum. Em 1936, Dr. R. M. Hixon do Plant Chemistry Department, do Iowa State College, moeu experimentalmente a quantidade de um "bushel" (vinte e cinco quilos) de milho dentado, duro, pipoca, farináceo, doce e milho ceráceo. As quantidades de amido obtidas dos primeiros cinco tipos diferenciaram-se largamente, mas depois que o amido foi extraído, notou-se ter propriedades químicas semelhantes. O amido do milho ceráceo, contudo, exibia completa diferença das propriedades físicas e químicas. As pastas do amido de milho ceráceo têm maior viscosidade e menor rigidez que as pastas do amido de milho comum e a forma das curvas de gelatinização diferem dessas duas espécies de pastas. Estas propriedades das pastas do amido de milho ceráceo parecem com aquelas do amido de mandioca.

Quimicamente o amido de milho ceráceo difere do amido de milho comum na estrutura molecular. O amido do milho não ceráceo é produzido de uma mistura de duas formas moleculares, cadeias retas e cadeias ramificadas (2). As moléculas de cadeia reta representam a fracção amilose e as moléculas de cadeia com ramos a fracção amilopectina de amido de milho comum.

O componente da cadeia reta é que é o responsável pela reação de tinta azul com iodo. O amido do milho ceráceo chinês tem a forma molecular ramificada que tinge trigueiro avermelhado com iodo. O amido de milho não ceráceo contém cerca de 72 por cento de cadeia ramificada e 28 por cento de cadeia reta. O alelo ceráceo relatado por Andres (2) produz cerca de 97 por cento de cadeia ramificada e 3 por cento de moléculas de cadeia reta.

Experiências teem sido relatadas (16) sobre os efeitos de várias dosagens do gene ceráceo sobre as propriedades do amido. O material usado foi Iowa 939 e Iovax nº 1. Iowa 939 foi um dos primeiros híbridos comerciais do Iowa Experiment Station e é homozigoto para endosperma amidado — (WxWx). Iovax n. 1 foi produzido pela introdução do gene ceráceo dentro das quatro linhagens envolvidas no Iowa

939 pela técnica do retro-cruzamento. O retro-cruzamento foi continuado por várias gerações até que as linhagens I 205Wx, I 205wx etc. pudessem ser grandemente isogênicas. Os seguintes quatro genótipos de endospermas foram produzidos destes híbridos.

1. Iowa 939 sib-polinizado Wx Wx Wx
2. Iowa 939 x Iowax n. 1 Wx Wx wx
3. Iowax n. 1 x Iowa 939 wx wx Wx
4. Iowax n. 1 sib-polinizado wx wx wx

Precauções foram tomadas para assegurar que as quatro amostras fossem manejadas igualmente durante a moagem e os subsequentes testes de caracterização do amido. A relação entre genótipo de endosperma e propriedades de amido é ilustrada na tabela 1 e figura 1.

Tabela 1. Relação entre genótipo de endosperma e propriedades de rigidez e viscosidade do amido de endosperma.

Amido N.	Genótipo de Endosperma	Rigidez — 1 Dines/cm ² x 10 ³	Viscosidade em centipoises	
			13cm	23cm
1.	Wx Wx Wx	22,2	24,4	16,5
2.	Wx Wx wx	18,5	41,8	25,8
3.	wx wx Wx	6,1	66,6	33,4
4.	wx wx wx	0	49,0	23,0

Sprague e outros (16) declaram que "ainda que preliminar na natureza, os resultados precedentes indicam que o gene ceráceo não é completamente recessivo na sua influência como foi previamente acreditado. Isto é provado pelas propriedades intermediárias dos dois tipos de heterozigotos, Wx Wx wx e wx wx Wx. Ignorando o tipo completamente recessivo wx wx wx, as bases sobre rigidez e viscosidade indicam uma ação simplesmente aditiva do fator. As bases sobre a percentagem do amilose indicam um grau bastante elevado de dominância.

O fato de que é possível produzir amidos de tipos in-

termediários, não é de valor industrial imediato por causa da despesa adicional que devia ser envolvida. Por exemplo, se fosse desejável produzir um amido tendo propriedades de viscosidade e rigidez do tipo Wx Wx wx seria necessário produzir o grão para moagem num campo de cruzamento despendendo a mão e não num campo comercial regular.

Os resultados prometem ser de considerável interesse teórico principalmente, estudando o mecanismo da síntese do amido na semente. Eles podem oferecer um meio de aproximação para a solução da questão como o alelo ceráceo promove a síntese do amido feito inteiramente de moléculas ramificadas, enquanto o alelo amidoado promove a síntese do amido contendo mais mistura de moléculas retas e ramificadas.

Um estudo semelhante foi relatado (6) usando o mutante ceráceo argentino wx, relatado por Andres (2). Por meio de sib-polinização e cruzamentos foi possível produzir os seguintes tipos genéticos:

Série 1.	Iowax N. 1 sib-polinizado	wx	wx	wx
	Iowax N. 1 x ceráceo argentino	wx	wx	wx ^a
	Ceráceo argentino x Iowax N. 1	wx ^a	wx ^a	wx
Série 2.	Iowa 939 sib-polinizado	Wx	Wx	Wx
	Iowa 939 x ceráceo argentino	Wx	Wx	Wx ^a
	Ceráceo argentino x Iowa 939	wx ^a	wx ^a	wx
	Ceráceo argentino sib-polinizado	wx ^a	wx ^a	wx ^a

Os resultados analíticos obtidos estão apresentados na tabela 2 e figura 2.

Tabela 2. Relação entre o genotipo do endosperma para a percentagem de amilose, e viscosidade do amido do endosperma.

Genotipo do endosperma	Porcentagem de amilose	Segundos de viscosidades. (Pasta 2%)
wx wx wx	0,0	65
wx wx wx ^a	0,7	60
wx ^a wx ^a wx	1,3	42
wx ^a wx ^a wx ^a	2,4	31

Genótipo do endosperma	Porcentagem de amilose	Segundos de viscosidades. (Pasta 2%)
Wx Wx Wx	27,7	33
Wx Wx wx ^a	27,4	52
wx ^a wx ^a Wx	26,7	78
wx ^a wx ^a wx ^a	2,4	175

(As medidas de viscosidade nas duas metades desta tabela não são diretamente comparáveis, porque tubos capilares de tamanhos diferentes foram usados).

Brimhall e outros (6) relatam que na base de perda de capacidade para sintetizar amilose, esta série de alelos múltiplos pode ser arranjada na ordem Wx, wx^a, e wx. Sobre este aspecto Wx é dominante para wx^a e wx; na base das medidas de viscosidade não há indicação clara de dominância. Considerando somente os alelos wx^a e wx a variação na porcentagem de amilose sugere um modo de ação geométrica e viscosidade de um tipo aditivo de ação do gene. Os genes que condicionam vários efeitos, como avaliados pelo produto final, chamam-se pleiotrópicos. As relações de dominância podem variar entre as séries de alelos dependendo de como os efeitos múltiplos são escolhidos como base de classificação.

No caso presente, parece que a hipótese do pleiotropismo não pode ser aplicada. Os três alelos Wx wx^a e wx afetam o desenvolvimento da amilose e a quantidade da amilose presente no amido é refletida nas suas propriedades químicas e físicas. A reação da tintura de iodo, medidas de rigidez e viscosidade serão simplesmente produtos diferentes para caracterizar as propriedades do amido que podem ser diferentemente influenciadas pelo conteúdo de amilose. O pleiotropismo aparente pode ser devido inteiramente ao fato de que nenhum desses métodos de caracterização do amido fornece uma delinearção perfeita. A viscosidade é uma função logarítmica da concentração do amido, enquanto a titulação com iodo é uma função linear. Pequenas diferenças no conteúdo da amilose entre Wx Wx wx^a e wx^a wx^a Wx não podem ser acusadas pela titulação de iodo, mas salientadas nas determinações de viscosidade.

Os cereais ceráceos estudados caem em dois grupos gerais. O primeiro grupo é caracterizado pelo amido, faltando amilose, incluindo arroz, sorgo e milho ($wx\ wx\ wx$). O segundo grupo, caracterizado pelo amido, possuindo uma baixa porcentagem de amilose, incluindo cevada e milho ($wx^a\ wx^a\ wx^a$). A diferença na reação da tintura de iodo entre a cevada cerácea e outros cereais ceráceos tem sido observada (10) mas uma titulação potenciométrica com iodo feita naquele tempo falhou para acusar a presença da amilose. Isto foi sem dúvida devido à interferência dos ácidos gordurosos (0,33%) no amido da cevada. Quando esta determinação foi repetida, numa amostra desgordurada, 3,5% de amilose foram encontrados.

Em vista da diferença nas propriedades físicas e químicas do amido de milho ceráceo observado por Hixon, em 1936, sentiu-se que o amido ceráceo devia ter possibilidades comerciais. Linhagens existentes de milho ceráceo não foram adaptadas ao plantio comercial no Corn Belt. Por ser um bom híbrido comercial, Iowa 939 foi escolhido para converter se à condição cerácea. As quatro linhagens pais foram cruzadas com uma linhagem cerácea e depois cada uma delas foi periodicamente retrocruzada até completa recuperação de seus genótipos originais, exceto para a condição de caráter ceráceo. Mais tarde o processo de converter outras linhagens comerciais não ceráceas para a condição cerácea foi iniciado.

Os primeiros testes agronômicos de Iowa ceráceo 939, mais tarde conhecido por Iowax N. 1, foram iniciados em 1939. A produção deste híbrido foi pouco inferior à produção do híbrido amidoado correspondente. Esta pequena redução na produção pode ser característica do genótipo ceráceo. As espigas segregando para grãos amidoados ceráceos, os grãos amidoados regularmente pesam 3 a 5 por cento mais do que os grãos ceráceos. Isto é, aproximadamente, da mesma magnitude quanto às diferenças da produção observada.

No outono de 1941, quando os japoneses invadiram as Ilhas do Pacífico, menos de 2 bushels de sementes foram produzidos do híbrido de cruzamento duplo, Iowax N. 1. Aproximadamente, 3.800 grãos foram produzidos de um dos híbridos simples paternos e 335 grãos do outro híbrido simples. Havia também quantidades limitadas de semente das quatro linhagens pais. Em adição a esta semente, cerca de 50 bushels de semente F_2 foram plantadas, num campo isolado de Iowax N. 1, perto de Ames, Iowa.

No inverno de 1941-42, todo o espaço da estufa em Ames, Iowa, e Beltsville, Maryland, foi usado para a multiplicação dos dois pais de cruzamento simples para obter a

geração F² pela sib-polinização. Suficiente semente de F² foi obtida para plantar uma área de 20 acres (mais ou menos 8 Ha.) de híbrido duplo em 1942 (fig. 3) e uns 20 acres adicionais de campos isolados de multiplicação dos cruzamentos simples.

A maior porção das sementes autofecundadas foi usada para produzir cruzamentos simples. Os 50 bushels de sementes do F² do cruzamento duplo Iowax N. 1 foram usados para plantar 326 acres nos terrenos do College Farm. A colheita desse campo foi moída e produziu cerca de 500.000 libras de amido de milho ceráceo.

Aproximadamente 450 bushels de sementes de híbrido duplo foram obtidos em 1942. Uma parte foi de qualidade bastante inferior devido ao uso das sementes do F² e só 250 bushels, o bastante para plantar 1750 acres, foram usados em 1943. Bastante sementes de cruzamento simples F¹ foram obtidas em 1943 para plantar a área necessária em cruzamentos duplos. Em 1944 a área plantada de milho ceráceo tinha aumentado para 10.000 acres e em 1946 havia aproximadamente 20.000 acres plantados.

No período de 1941 a 1946 vários novos cruzamentos duplos de milho ceráceo foram produzidos e provados. Três dos novos híbridos eram plantados comercialmente em 1947. Iowax N. 1 foi substituído pelo Iowax N. 2 e quantidades limitadas de Iowax 5 e 6 vão ser também usadas. Cada um desses híbridos é superior ao Iowax N. 1 em habilidade de produção e outros caracteres agronômicos. O uso comercial dos híbridos de milho ceráceo obrigou modificar a política de distribuição das linhagens, previamente seguidas pela Iowa Agricultural Experiment Station. As diversas linhagens ceráceas são fenotipicamente indistintas das linhagens amidoadas correspondentes com a exceção da reação para iodo. Sentiu-se que a distribuição de tais linhagens devia resultar em confusão nas mãos de produtores de sementes para o detimento de ambos os híbridos amidoados e ceráceos. Consequentemente ficou decidido não distribuir as linhagens ceráceas. Esta política exigia que alguma provisão fosse feita para a produção das quantidades necessárias de sementes de híbrido simples e de híbrido duplo.

A Experiment Station, através de seu Committee para Agricultural Development, teve um contrato com a American Maize-Products Company para produzir qualquer quantidade de semente julgada necessária. Esta semente cerácea foi vendida para a American Maize-Products Company ao preço padrão prevalecido para os híbridos duplos.

A produção comercial do milho ceráceo requer muita e

cuidadosa inspecção. Tôda área é plantada sob contrato, e uma certa campanha é necessária para obter a área desejada. Cada campo deve ser inspeccionado antes da colheita para determinar se a contaminação por pólen estranho excede o limite de tolerância, (5%). No comêço sentiu-se que a contaminação do pólen devia ser uma dificuldade séria na produção de amido de boa qualidade, mas quatro anos de experiência têm indicado que tal contaminação não é um problema.

Em geral as companhias de moinho não são equipadas com espaço de armazenagem para grande quantidade de milho. Isto requer que haja orientação na remessa do milho ceráceo para assegurar um volume suficiente para uma moagem contínua.

A Iowa Agricultural Experiment Station percebeu que estas várias funções supervisórias não podiam ser tomadas como uma parte de seus afazeres regulares. Começando em 1943, então, o American Maize-Products Company contratou com o Doane Agricultural Service, uma organização especializada em terra, organização de fazendas, para agir como seu representante em supervisionando a produção e negoclando a colheita.

O milho ceráceo é um produto premiado. Fazendeiros que cultivam êste milho recebem um prêmio de 12 por cento sobre o preço de compra do milho comum. Em geral os fazendeiros ficam bem satisfeitos com a colheita e o preço recebido por ela. O amido do milho ceráceo tem encontrado pronta aceitação pelos industriais e o programa da produção está sendo continuado na certeza de que o milho ceráceo terá um lugar permanente na agricultura do "Corn Belt".

Literatura citada

1. Andres, J. M. e Bascialli, P. C. — "Caracteres hereditarias cislados en maicis cultivados en la Argentina" — Univ. B. Aires, Inst. Genetica 2:1-26, 1941.
2. "Notas sobre genetica del maiz I Endosperm ciroso en maicis Argentinos" Buenos Aires Inst. Genetica 2:115-121, 1944.
3. Bates, F. L., French, D. e Rundle, R. E. — "Amilose and amylopectin content of starches determined by their iodine complex formation". Jour. Amer. Chem. Soc. 65:142-148, 1943.

4. Bear, Robert P. — "Mutations for waxy and sugary endosperm in inbred lines of dent corn". *Jour. Amer. Soc. Agron.* 36: 89-91, 1944.
5. Bregger, T. — "Waxy endosperm in Argentine maize". *Jour. Hered.* 19:111, 1928.
6. Brinham, B., Sprague, G. F., e Sass, J. E. — "A new waxy allele in corn and its effect on properties of the endosperm starch". *Jour. Amer. Soc. Agron.*, 37: 937-944, 1945.
7. Brink, R. A. — "Dynamics of the waxy gene in maize". *Gen.* 11:163-169, 1926.
8. Brink, R. A. e MacGillivray, J. H. — "Segregation for the waxy character in maize pollen and differential development of the male gametophyte". *Amer. Jour. Bot.* 41: 465-469, 1924.
9. Collins, G. N. — "A new type of Indian corn from China". U.S. Depart. Agr. Bur. Plant Indus. Bul., 161, 30pp., 1909.
10. Collins, G. N. e Kempton, J. H. — "Inheritance of waxy endosperm in hybrids with sweet corn". U.S. Dept. Agr. Bur. Plant Ind., Circ. 120: 21-27, 1913.
11. Demerec, M. — "A case of pollen dimorphism in maize". *Amer. Jour. Bot.* 11:461-464, 1924.
12. Hixon, R. W. e Sprague, G. F. — "Waxy starch of maize and other cereals". *Jour. Indus. Engin. Chem.* 34: 959-962, 1942.
13. Kempton, J. H. — "Inheritance of waxy endosperm in maize". U. S. Dept. Agr. Bul. 754. 1919.
14. Longley, Albert E. — "Chromosomes in maize and maize relatives". *Jour. Agr. Res.* 28: 673-682, 1924.
15. Mangelsdorf, P. C. — "Waxy endosperm in New England maize". *Science* 60: 222-223, 1924.
16. Sprague, G. F., Brinham, B., e Hixon, R. M. — "Some effects of the waxy gene on properties of the endosperm starch". *Jour. Amer. Soc. Agron.* 35: 817-822 1943.
17. Weatherwax, Paul A. — "A rare carbohydrate in waxy maize". *Genetics* 7:568 572, 1922.