

TEORES DE AÇÚCARES E POLISSACARÍDEOS SOLÚVEIS EM ÁGUA EM MUTANTES E COMBINAÇÕES DE MUTANTES QUE AFETAM O ENDOSPERMA DO MILHO*

Hélio M. Barbosa
David V. Glover**

1. INTRODUÇÃO

A quantidade de açúcares e de polissacarídeos solúveis em água (PSA) no endosperma do milho é influenciada por diversos mutantes. *Sugary-1* (*su1*) causa grandes aumentos nos teores de açúcares redutores, sacarose e PSA (9, 10). *Amylose-extender* (*ae*) resulta em maiores teores de açúcares redutores e sacarose (8), porém não parece alterar a quantidade de PSA (18), quando comparado com *normal*. AYERS e CREECH (2) e CREECH (8) relataram que *ae* comportou-se como epistático sobre *su1*, em relação ao acúmulo de PSA. Segundo ANDREW *et alii* (1), *wx* (*waxy*) causa ligeiro acréscimo no teor de açúcares totais, quer isoladamente, quer em combinação com *su1*. Entretanto, CREECH (8) encontrou teores semelhantes de açúcares totais em *wx* (*wxwx*) e *normal* e obteve aproximadamente o mesmo teor de açúcares totais em *su1wx* (*su1su1; wxwx*) e *su1*. Os efeitos dos genes *bt1* (*brittle-1*) e *bt2* (*brittle-2*) foram relatados por CAMERON e TEAS (7) e TEAS e TEAS (17). Ambos os genes aumentam os teores de açúcares redutores e sacarose; todavia não parecem modificar substancialmente a produção de PSA, quando comparados com *normal*. O mesmo tipo de efeito foi observado em *du* (*dull*), por CREECH (8). O duplo-mutante *bt1su1* produziu muito açúcar, porém quase nenhum PSA (7). De acordo com CREECH (8), *su2* (*sugary-2*) não influencia substancialmente as porcentagens de açúcares redutores, sacarose e PSA, quando ocorre isoladamente. Todavia, *su2*, bem como os genes *du* e *wx*, quando combinado com *su1*, resulta em teores de PSA semelhantes ou superiores àquele encontrado no mutante simples *su1* (1, 5, 6, 8, 11, 12).

Alguns mutantes do endosperma, como *fl2* (*floury-2*) e *o2* (*opaque-2*), melhoraram a qualidade da proteína do milho mediante aumentos no teor de lisina (14, 15). WATSON e YAHL (19) relataram que *o2* resultou em maiores teores de açúcares redutores e sacarose e no mesmo teor de PSA, quando comparado com *normal*. As diferenças encontradas foram atribuídas à maior proporção germe/endos-

* Parte da tese apresentada, pelo primeiro autor, à Universidade Purdue, E.U.A., como um dos requisitos para a obtenção do grau de Ph.D.

Recebido para publicação em 10-04-1978.

** Respectivamente, Professor Titular da Universidade Federal de Viçosa e Professor da Universidade Purdue.

perma encontrada em *o2*.

Neste trabalho são relatados os efeitos de diversos mutantes do endosperma, isoladamente ou em combinações duplo-mutantes com *o2* ou *fl2*, sobre os teores de açúcares redutores, sacarose e PSA naquele tecido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material genético utilizado neste trabalho foi constituído da linhagem do milho *normal* Oh 43, treze versões mutantes simples e vinte três versões duplo-mutantes daquela linhagem. Cada versão mutante simples era homozigótica para um dos seguintes genes: *ae*, *bt1*, *bt2*, *bt4(brittle-4)* *du*, *fl1* (*floury-1*), *fl2*, *h* (*soft-starch*), *o2*, *sh1* (*shrunken-1*), *su1*, *su2* e *wx*. As versões duplo-mutantes continham o gene *o2* em combinação com cada um dos outros ou continham o gene *fl2* combinado com cada um dos outros.

Sementes da linhagem normal e de cada versão mutante simples e duplo-mutante foram plantadas numa única parcela. Cada parcela foi constituída por 4 fileiras, cada uma delas com 3 m de comprimento. O espaçamento entre fileiras foi de 1 m, e o espaçamento entre plantas na fileira foi de 33,3 cm.

Todas as plantas foram autopolinizadas. Após a colheita, as espigas foram secadas em secador sob ventilação forçada. De cada parcela foram selecionadas 4 espigas bem granadas e de cada uma dessas foram retirados 10 grãos da porção mediana. Dos 40 grãos assim obtidos retiraram-se os endospermas, que foram misturados. As amostras de endospermas foram moídas, inicialmente, num pequeno moedor Wiley e, em seguida, num amalgamador Wig-L-Bug (Crescent Dental Mfg. Co.). Parte de cada amostra foi secada em estufa, a 62°C, durante 14 horas, aproximadamente. Amostras de 0,2 a 0,3 g de cada genótipo foram retiradas, em duplicata, para análise de açúcares redutores, sacarose e PSA. Os métodos utilizados foram semelhantes aos de SHANNON (16). Açúcares redutores e sacarose foram extraídos 4 vezes com uma mistura de metanol: clorofórmio: água (13:4:3 v/v, MCA). Cada amostra foi suspensa em 10 ml MCA, em tubo de ensaio de 10 ml, e mantida sob agitação em banho de água, a 30°C, durante 1 h. Em seguida, foi centrifugada a 1.000 x g, durante 10 minutos, à temperatura de 0° a 2°C. O resíduo foi lavado mais três vezes com 10, 4 e 4 ml de MCA, respectivamente. Cada tubo era mantido em banho de água (30°C), durante 30 minutos, entre as lavagens. Aliquotas em duplicata foram retiradas do sobrenadante obtido nas lavagens e secadas sob ventilação, à temperatura de aproximadamente 45°C, em tubos de ensaio graduados de 10 ml. Açúcares redutores foram determinados pelo teste de Nelson (13). Duas aliquotas adicionais foram retiradas do sobrenadante e secadas como foi descrito anteriormente. Em cada tubo foi colocado 1 ml de solução de invertase (0, 1 mg/ml, Sigma). Os tubos foram colocados em banho de água (30°C), durante 40 minutos, para favorecer o desdobramento da sacarose. O teste de Nelson foi usado como antes, e o teor de sacarose foi determinado subtraindo-se os teores de açúcares redutores obtidos previamente.

Para a extração de PSA, o resíduo obtido da extração dos açúcares foi novamente suspenso em 10 ml de solução de etanol a 10% e mantido em câmara fria durante 14 horas, aproximadamente. O material foi centrifugado a 1.000 x g, durante 10 minutos, à temperatura de 0° a 2°C, e o sobrenadante foi filtrado em fibras e vidro. O sobrenadante combinado de seis extrações teve o volume completado para 100 ml, e o teor de carboidratos totais foi determinado pelo teste do ácido fenol-sulfúrico (13).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser visto no Quadro 1, nenhum mutante simples acumulou menos açúcares totais (soma de açúcares redutores e sacarose) que *normal*, embora a porcentagem de açúcares redutores tenha sido ligeiramente inferior em *fl1* e *h*. *Sugary-1* produziu acúmulos notáveis de açúcares redutores e sacarose, como observado por CULPEPPER e MAGOON (9, 10). Os genes *ae*, *bt1*, *bt2*, *bt4*, *fl2* e *sh1* produziram aproximadamente 2 a 2,7 vezes mais açúcares redutores que *normal*. Acúmulos de sacarose de 2 a 5,3 vezes superiores ao *normal* foram encontrados em *bt1*, *bt2*, *bt4* e *sh1*. Outros trabalhos (7, 17) relataram que *bt1* e *bt2* acumulam mais açúcares redutores e sacarose que *normal*. O gene *o2* resultou em ligeiro acúmulo de açúcares redutores e sacarose, quando comparado com *normal*. Resultados se-

QUADRO 1 - Porcentagem de açucares em endospermas de genótipos mutantes simples e duplo-mutantes^{1/}

Genótipo	Mutante simples			Duplo-mutante com Ω_2			Duplo-mutante com fL_2		
	Açucares redutores		Sacarose	Açucares redutores		Sacarose	Açucares totais		Sacarose
	Açucares redutores	Açucares totais		Açucares redutores		Açucares totais	Açucares redutores		Açucares totais
ae	0,29 ± 0,00	0,55 ± 0,01	0,84	0,15 ± 0,02	0,74 ± 0,03	0,89	1,13 ± 0,01	1,76 ± 0,01	2,89
bt ₁	0,25 ± 0,02	1,06 ± 0,01	1,31	0,36 ± 0,01	1,22 ± 0,02	1,58	1,58 ± 0,01	5,73 ± 0,13	7,31
bt ₂	0,28 ± 0,01	2,10 ± 0,02	2,38	0,34 ± 0,02	2,09 ± 0,02	2,43	1,19 ± 0,02	3,43 ± 0,09	4,62
bt ₄	0,33 ± 0,00	2,76 ± 0,05	3,09	0,34 ± 0,01	1,98 ± 0,02	2,32	1,34 ± 0,00	3,90 ± 0,06	5,24
du	0,17 ± 0,01	0,57 ± 0,01	0,74	0,13 ± 0,01	0,88 ± 0,04	1,01	0,31 ± 0,00	0,83 ± 0,02	1,14
f ₁ ₁	0,10 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,65	0,12 ± 0,00	0,74 ± 0,02	0,86	0,23 ± 0,01	0,78 ± 0,01	1,01
f ₁ ₂	0,23 ± 0,00	0,79 ± 0,00	1,02	0,34 ± 0,01	0,91 ± 0,01	1,25	-	-	-
h	0,09 ± 0,00	0,56 ± 0,00	0,65	0,14 ± 0,01	0,79 ± 0,02	0,93	0,39 ± 0,00	0,94 ± 0,02	1,33
Ω_2	0,19 ± 0,01	0,89 ± 0,02	1,08	-	-	-	0,34 ± 0,01	0,91 ± 0,01	1,25
sh ₁	0,33 ± 0,00	1,16 ± 0,01	1,49	0,57 ± 0,00	1,96 ± 0,03	2,53	1,16 ± 0,03	4,17 ± 0,05	5,33
su ₁	6,82 ± 0,01	5,10 ± 0,21	11,92	6,78 ± 0,07	7,24 ± 0,11	14,02	6,37 ± 0,01	5,89 ± 0,01	12,26
su ₂	0,19 ± 0,00	0,70 ± 0,02	0,89	0,25 ± 0,01	1,13 ± 0,01	1,38	0,33 ± 0,02	1,84 ± 0,07	2,77
wx	0,17 ± 0,00	0,62 ± 0,02	0,79	0,06 ± 0,01	0,98 ± 0,02	1,04	1,21 ± 0,05	2,08 ± 0,04	3,29
Normal	0,12 ± 0,02	0,52 ± 0,02	0,64	-	-	-	-	-	-

^{1/} Dados expressos em porcentagem do peso seco.

melhantes foram obtidos por WATSON e YAHL (19). Os genótipos *aeo₂* e *wxo₂* acumularam menos açúcares redutores e mais sacarose que *ae* e *wx*, respectivamente. Em geral, o efeito da combinação do gene *o₂* com os outros genes sobre o acúmulo de açúcares foi pequeno, havendo tendência para maior acúmulo no duplo-mutante. As diferenças, entretanto, não evidenciaram qualquer interação que resultasse em acúmulo substancial de açúcares totais nos duplo-mutantes com o gene *o₂*. Ao contrário de *o₂*, o gene *f_{l2}* interagiu com os outros (exceto *su₁* e *o₂*), resultando em grandes aumentos nos teores de açúcares redutores e de sacarose. A interação de *f_{l2}* com *bt₁* elevou o teor de sacarose ao nível encontrado em *su₁f_{l2}*.

Como se nota no Quadro 2, *su₁* determinou acúmulo de PSA de cerca de 31%.

QUADRO 2 - Porcentagem de polissacarídeos solúveis em água (PSA) em endospermas de genótipos mutantes simples e duplo-mutantes

Genótipo	PSA (% do peso seco)		
	Mutante simples	Duplo-mutante com <i>o₂</i>	Duplo-mutante com <i>f_{l2}</i>
<i>ae</i>	0,73 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,64 ± 0,00
<i>bt₁</i>	0,91 ± 0,02	0,60 ± 0,02	0,99 ± 0,01
<i>bt₂</i>	0,79 ± 0,02	0,90 ± 0,01	0,80 ± 0,01
<i>bt₄</i>	0,84 ± 0,04	0,86 ± 0,03	0,99 ± 0,01
<i>du</i>	0,74 ± 0,02	0,45 ± 0,03	0,75 ± 0,01
<i>f_{l1}</i>	0,97 ± 0,08	0,76 ± 0,00	0,67 ± 0,01
<i>f_{l2}</i>	1,09 ± 0,07	0,71 ± 0,02	—
<i>h</i>	0,97 ± 0,07	0,61 ± 0,01	0,59 ± 0,03
<i>o₂</i>	1,11 ± 0,07	—	0,71 ± 0,02
<i>sh₁</i>	0,78 ± 0,03	0,74 ± 0,04	0,67 ± 0,01
<i>su₁</i>	30,97 ± 0,47	30,71 ± 0,50	20,28 ± 0,33
<i>su₂</i>	0,98 ± 0,01	0,83 ± 0,03	0,87 ± 0,02
<i>wx</i>	1,27 ± 0,03	0,68 ± 0,03	1,13 ± 0,04
Normal	0,87 ± 0,01	—	—

Este efeito de *su₁* é conhecido há muito tempo (9, 10). Em geral, os efeitos dos genes *ae*, *bt₁*, *bt₂*, *du*, *o₂*, *su₁*, *su₂* e *wx* sobre o acúmulo de PSA são semelhantes aos relatados por outros autores (1, 5, 6, 8, 11, 12). Os genes *bt₄*, *f_{l1}*, *f_{l2}*, *h* e *sh₁* não parecem ter influenciado a produção de PSA. Os efeitos de *o₂* e *f_{l2}* em combinações duplo-mutantes com os outros genes foram variáveis. O gene *o₂* não influenciou o acúmulo de PSA quando combinado com *bt₄*, *sh₁* e *su₁*, mas causou ligeiro acréscimo de PSA quando combinado com *bt₂* e redução quando combinado com os outros genes. Os teores de PSA dos duplo-mutantes que envolviam *f_{l2}* com *bt₁*, *bt₂*, *bt₄* e *du* foram semelhantes aos dos respectivos mutantes simples. Quando combinado com os outros genes, *f_{l2}* tendeu a reduzir a porcentagem de PSA. Quantitativamente, essa redução foi grande em *su₁f_{l2}*.

Os dados apresentados neste trabalho e os resultados obtidos por BARBOZA e GLOVER (3, 4) indicam a possibilidade de se associarem, no endosperma do milho, teores elevados de açúcares e proteína de boa qualidade. Nesse sentido, os duplo-mutantes *bt₁f_{l2}*, *bt₂f_{l2}*, *bt₄f_{l2}*, *sh₁f_{l2}*, *su₁f_{l2}* e *su₁o₂*, entre outros, são potencialmente úteis para a obtenção de milho doce, rico em lisina. Milhos com es-

sas características podem ser de interesse na fabricação de certos tipos de alimentos ou para consumo no estágio de desenvolvimento que caracteriza o milho-verde. BARBOSA e GLOVER (dados não publicados) verificaram que, naquele estágio de desenvolvimento, *su1o2* tem elevados teores de açúcares e de lisina.

4. RESUMO

A linhagem de milho *normal* Oh 43, treze versões mutantes e vinte três duplo-mutantes daquela linhagem foram utilizadas neste trabalho. Cada versão mutante simples era homozigótica para apenas um dos seguintes genes: *ae*, *bt1*, *bt2*, *bt4*, *du*, *fl1*, *fl2*, *h*, *o2*, *sh1*, *su1*, *su2* e *wx*. Dos genótipos duplo-mutantes, doze tinham o gene *o2* combinado com cada um dos outros e onze tinham *fl2* combinado com cada um dos outros. O objetivo foi determinar o efeito dos mutantes simples e das combinações duplo-mutantes sobre o acúmulo de açúcares redutores, sacarose e polissacarídeos solúveis em água (PSA) no endosperma. Em geral, à exceção de *fl1* e *h*, os mutantes simples acumularam mais açúcares redutores, sacarose e, consequentemente, mais açúcares totais que *normal*. A combinação de *o2* com os outros genes tendeu a produzir ligeiros acréscimos nos teores de açúcares redutores e de sacarose, em comparação com os valores encontrados para os respectivos mutantes simples. Constituiram exceções os genótipos *aeo2* e *wxo2*, que reduziram os teores de açúcares redutores, e *bt2o2*, que reduziu o teor de sacarose. O gene *fl2* interagiu com os outros (exceto *o2* e *su1*), produzindo grandes acúmulos nos teores de açúcares redutores e sacarose.

O acúmulo de PSA não parece ter sido influenciado pelos genes *bt4*, *fl1*, *fl2*, *h* e *sh1*. Os efeitos dos outros mutantes simples foram semelhantes aos relatados na literatura. Os genes *o2* e *fl2* tenderam a manter ou reduzir o teor de PSA, quando combinados com os outros genes.

Genótipos como *bt1fl2*, *bt2fl2*, *bt4fl2*, *sh1fl2*, *su1fl2* e *su1o2*, entre outros, podem ser potencialmente úteis na obtenção de milho com elevados teores de açúcares e proteína de boa qualidade.

5. SUMMARY

The effects of the genes *ae*, *bt1*, *bt2*, *bt4*, *du*, *fl1*, *fl2*, *h*, *o2*, *sh1*, *su1*, *su2* and *wx*, and their double-mutant combinations with *o2* and *fl2* on the accumulation of reducing sugars, sucrose and water-soluble polysaccharides (WSP) in the endosperm of maize were investigated. With the exception of *fl1* and *h*, all single mutants accumulated more reducing sugars and sucrose than *normal*. *Opaque-2* tended to increase reducing sugars and sucrose when combined with the other genes. Exceptions were the genotypes *aeo2* and *wxo2*, which decreased reducing sugars, and *bt4o2*, which reduced sucrose content. The gene *fl2* interacted with the other genes (except *o2* and *su1*) causing drastic increases in reducing sugars and sucrose.

The genes *bt4*, *fl1*, *fl2*, *h*, and *sh1* did not seem to affect WSP accumulation. The effects of the other genes on WSP content were in general agreement with those previously reported in the literature. Water-soluble polysaccharide content was either reduced or not materially affected when *o2* or *fl2* were incorporated with the other genes.

Genotypes such as *bt1fl2*, *bt2fl2*, *bt4fl2*, *sh1fl2*, *su1fl2* and *su1o2*, among others, may be potentially useful for the development of sweet corn with high protein quality.

6. LITERATURA CITADA

- ANDREW, R.H., R.A. BRINK & N.P. NEAL. Some effects of the waxy and sugary genes on endosperm development in maize. *J. Agr. Res.* 69:355-371. 1944.
- AYERS, J.E. & R.G. CREECH. Genetic control of phytoglycogen accumulation in maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 6:739-741. 1969.
- BARBOSA, H.M. & D.V. GLOVER. Genes and gene interactions affecting protein and lysine content in the endosperm of maize. (Submetido para publicação)

ção).

4. BARBOSA, H.M. & D.V. GLOVER. Protein and lysine content in double mutant endosperm of maize involving the *floury-2* gene. (Em preparo).
5. CAMERON, J.W. Chemico-genetic basic for the reserve carbohydrates in maize endosperm. *Genetics* 32:459-485. 1947.
6. CAMERON, J.W. & D.A. COLE, JR. Effects of the genes *su1*, *su2*, and *du* on carbohydrates in developing maize kernels. *Agron. J.* 51:424-427. 1959.
7. CAMERON, J.W. & H.J. TEAS. Carbohydrate relationships in developing and mature endosperms of brittle and related maize genotypes. *Am. J. Botany* 41: 50-55. 1954.
8. CREECH, R.G. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. *Genetics* 52:1175-1186. 1965.
9. CULPEPPER, C.W. & C.A. MAGOON. Studies upon the relative merits of sweet corn varieties for canning purposes and the relation of maturity of corn to the quality of the canned product. *J. Agr. Res.* 28:403-443. 1924.
10. CULPEPPER, C.W. & C.A. MAGOON. A study of the factors determining quality in sweet corn. *J. Agr. Res.* 34:413-433. 1927.
11. DUNN, G.M., H.H. KRAMER & R.L. WHISTLER. Gene dosage effects on corn endosperm carbohydrates. *Agron. J.* 45:101-104. 1953.
12. DVONCH, W., H.H. KRAMER & R.L. WHISTLER. Polysaccharides of high amylose corn. *Cereal Chem.* 28:270-280. 1951.
13. HODGE, J.E. & B.T. HOFREITER. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In *Methods in carbohydrate chemistry* (R.L. WHISTLER & M.L. WOLFROM, Eds.). New York, N.Y., Acad. Press, Inc., 1962. Vol. I, p. 380-394.
14. MERTZ, E.T., L.S. BATES & O.E. NELSON. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145:279-280. 1964.
15. NELSON, O.E., E.T. MERTZ & L.S. BATES. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. *Science* 150:1469-1470. 1965.
16. SHANNON, J.C. *A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature Zea mays kernels*. Purdue Univ., 1968. 8 p. (AES Res. Bul. 842).
17. TEAS, H.J. & A.N. TEAS. Heritable characters in maize. Description and linkage of brittle endosperm-2. *J. Hered.* 44:156-158. 1953.
18. VINEYARD, M.L. & R.P. BEAR. Amylose content. *Maize Genetic Coop. News Letter* 26:5. 1952.
19. WATSON, S.A. & K.R. YAHL. Comparison of the wet-milling properties of opaque-2 high lysine corn and normal corn. *Cereal Chem.* 44:488-498. 1967.