

EFEITOS DE COMBINAÇÕES DE MUTANTES DO ENDOSPERMA DO MILHO (*Zea mays* L.) SOBRE OS TEORES DE AMIDO E DE AMILOSE NO AMIDO*

Hélio M. Barbosa
David V. Glover**

1. INTRODUÇÃO

De acordo com Whistler e Smart, citados por KRAMER *et alii* (12), o amido do milho *normal* contém aproximadamente 25% de amilose e 75% de amilopectina. A síntese de amido e a proporção amilose/amilopectina no endosperma do milho são influenciadas por diversos genes. O gene *ae* (*amylose-extender*) não reduz drasticamente a síntese de amido, mas o amido produzido contém cerca de 60% de amilose (24). Reduções na produção de amido são causadas pelos genes *bt*₁ (*brittle-1*) (6), *bt*₂ (*brittle-2*) (6, 23), *sh*₁ (*shrunk-1*) (22) e *su*₁ (*sugary-1*) (5). Aumentos no teor de amilose no amido para mais de 30% foram relatados para os genes *du* (*dull*) e *su*₁ (5, 10, 11). KRAMER e WHISTLER (13) e DVONCH *et alii* (11) encontraram cerca de 40% de amilose no amido de endospermas homozigóticos para *su*₂ (*sugary-2*). SPRAGUE *et alii* (21) relataram que o amido produzido por *wx* (*waxy*) é constituído apenas de amilopectina. Combinações entre mutantes do endosperma têm revelado interações interessantes. CAMERON (5), DUNN *et alii* (10) e DVONCH *et alii* (11) relataram que *du* interagiu com *su*₁, elevando o teor de amilose no amido para cerca de 60% e reduzindo a quantidade de amido. KRAMER *et alii* (12) determinaram os teores de amilose no amido em genótipos que continham *ae*, *du*, *su*₁, *su*₂ e *wx*, isoladamente ou em combinações duplo e triplo-mutantes. Exceto quando *ae* estava presente, todos os genótipos que incluíram *wx* produziram amido contendo apenas amilopectina. O amido de *ae wx* (*aeae;wxwx*) e *ae su*₁ *wx* tinha apenas cerca de 14% de amilose. CREECH (7) e CREECH e

* 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 17-08-1978.

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

McARDLE (8) encontraram maior teor de amido em *normal* que em qualquer combinação duplo ou triplo-mutante que envolvesse os genes *ae*, *du*, *su*₁, *su*₂ e *wx*.

Amidos produzidos por diferentes mutantes de milho apresentavam grande variação quanto à susceptibilidade à digestão por amilase (18, 19). Amidos resistentes à ação de amilase foram também resistentes à digestão quando fornecidos a ratos (4) e aves (1). SANDSTEDT *et alii* (18) sugeriram que a ampla variação nas propriedades do amido de milho poderia possibilitar o melhoramento de seu valor nutritivo e o desenvolvimento de amidos para aplicações industriais específicas. Grande passo no sentido de melhorar o valor nutritivo do milho foi dado com a descoberta de que os genes *o*₂ (*opaque-2*) (14) e *fl*₂ (*floury-2*) (17) causam um aumento de 70% no teor de lisina no endosperma. MISRA *et alii* (15) e BARBOSA e GLOVER (2) relataram que *bt*₂ também melhora a qualidade da proteína do milho, e que *bt*₂*o*₂ aumenta o teor de lisina a nível superior àquele encontrado em cada mutante isoladamente.

Neste trabalho são relatados os efeitos de diversos mutantes do endosperma, isoladamente ou em combinações duplo-mutantes com *o*₂ e *fl*₂, sobre a porcentagem de amido e de amilose no amido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material genético utilizado neste trabalho foi constituído de versões mutantes simples e duplo-mutantes da linhagem de milho 0h 43. Cada versão mutante simples era homozigótica para apenas um dos seguintes genes: *ae*, *bt*₁, *bt*₂, *du*, *fl*₁ (*floury-1*), *fl*₂, *h* (*soft-starch*), *o*₂, *sh*₁, *su*₁, *su*₂ e *wx*. Um grupo de versões duplo-mutantes tinha o gene *o*₂ em combinação com cada um dos outros genes, exceto *sh*₁. O outro grupo de duplo-mutantes tinha o gene *fl*₂ em combinação com cada um dos outros. A linhagem 0h 43 *normal* foi também incluída para comparação.

Sementes de cada genótipo foram plantadas em fileiras de 3m de comprimento. O espaçamento entre fileiras foi de 1m e o espaçamento entre plantas na fileira de 33,3 cm. Cada parcela era constituída de uma única fileira. Foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados, com duas repetições.

Todas as plantas obtidas foram autopolinizadas. Após a colheita, as espigas foram secadas em estufa, sob ventilação forçada. Foi retirada uma amostra de 30 sementes de uma espiga de cada parcela dos genótipos mutantes simples e duplo-mutantes com o gene *fl*₂. Uma amostra de 30 sementes foi retirada de cada parcela dos genótipos duplo-mutantes com o gene *o*₂, misturando dez sementes de cada uma de três espigas. Das sementes de cada amostra foram retirados os endospermas, para determinação do teor de amido e de amilose no amido. O método utilizado foi o de SHUMAN e PLUNKETT (20), e a curva de calibração para determinação de amilose foi % de amilose no amido = 320 *k* - 16, sendo *k* a absorvância por mg de amido.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de amido dos mutantes simples variou de 28,0%, em *su*₁, a 70,5%, em *o*₂ (Quadro 1). Os genes *ae*, *bt*₁, *bt*₂, *sh*₁ e *su*₁ resultaram em acúmulos de amido significativamente inferiores ao encontrado em *normal*. *Floury-2* e *o*₂ determinaram teores de amido muito semelhantes ao encontrado em *normal*. WATSON e YAHL (25) relataram redução no teor de amido em *o*₂, em comparação com *normal*. Esse resultado, entretanto, foi obtido com sementes integrais, em que a relação germe/endosperma é maior em *o*₂ (16). Os genes *o*₂ e *fl*₂ não modificaram significativamente o teor de amido quando combinados com os outros genes, à exceção das

QUADRO 1 - Porcentagem de amido e de amilose no amido em endospermas de genótipos mutantes simples e duplo-mutantes

Genó- tipo	Mutante simples		Duplo-mutante com o ₂		Duplo-mutante com f ₁ l ₂	
	Amido (% do PS) ^{1/}	Amilose (% do amido)	Amido (% do PS)	Amilose (% do amido)	Amido (% do PS)	Amilose (% do amido)
ae	64,4 cd ^{2/}	62,7 a	66,4 bc	58,2 a	65,1 cd	57,7 a
bt ₁	62,5 d	26,2 fg	60,6 d	27,7 de	64,4 cd	22,6 e
bt ₂	43,0 e	31,8 de	34,0 e	32,9 c	46,8 e	29,2 d
du	66,8 abc	37,2 c	69,1 ab	30,9 cd	65,4 cd	32,1 bc
fl ₁	69,2 ab	29,2 ef	66,5 bc	26,5 e	68,3 abc	24,6 e
fl ₂	69,1 ab	29,3 ef	71,7 a	28,1 d	-	-
h	67,6 abc	28,0 efg	70,3 a	26,1 e	71,4 ab	27,2 d
o ₂	70,5 a	30,2 ef	-	-	71,7 a	28,1 d
sh ₁	63,8 cd	24,0 g	-	-	62,6 d	24,5 e
su ₁	28,0 f	35,2 cd	21,3 f	23,5 f	39,5 f	29,7 cd
su ₂	66,1 bcd	43,3 b	65,4 c	44,9 b	63,8 cd	34,0 b
wx	69,2 ab	0 h	67,7 abc	0 g	66,3 bcd	0 f
Normal	69,4 ab	31,2 e	-	-	-	-
C.V. (%)	2,74	5,82	2,16	4,56	3,65	4,03
s ⁻ x	1,21	1,29	0,90	0,96	1,61	0,80

^{1/}PS = peso seco.^{2/} Em cada coluna, as médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

combinações *bt2o2*, *su1o2* e *su1fl2* (Quadros 2 e 3). Como se nota no Quadro 2, todos os duplo-mutantes apresentaram menor teor de amido que *o2*, sendo as diferenças significativas na maioria dos casos. Quando comparados com o mutante simples *fl2*, os duplo-mutantes *bt1fl2*, *bt2fl2*, *sh1fl2*, *su1fl2* e *su2fl2* apresentaram teores de amido significativamente inferiores (Quadro 3).

O teor de amilose no amido variou de 0%, em *wx* (ou duplo-mutantes com *wx*), a quase 63%, em *ae* (Quadro 1). Além de *ae*, os genes *du*, *su1* e *su2* aumentaram significativamente o teor de amilose, quando comparados com *normal*. Por outro lado, *bt1* e *sh1* reduziram o teor de amilose. Os genes *o2* e *fl2* resultaram em teores de amilose semelhantes ao de *normal*. Entre os duplo-mutantes, elevados teores de amilose foram encontrados em *aeo2*, *su2o2* e *ae fl2*. Tanto o gene *o2* (Quadro 2) quanto *fl2* (Quadro 3), especialmente este, tenderam a reduzir o teor de amilose quando combinados com os outros genes. Todos os genes que condicionaram altos teores de amilose tiveram seus efeitos reduzidos significativamente quando combinados com *fl2*. As reduções, nesses casos, entretanto, não atingiram níveis inferiores ao teor de amilose do mutante simples *fl2*. O efeito de *fl2*, de reduzir o teor de amilose, quando combinado com os outros genes, parece estar associado ao maior acúmulo de açúcares resultante da interação de *fl2* com os outros genes, como foi verificado por BARBOSA e GLOVER (3).

4. RESUMO

O material genético utilizado neste trabalho foi constituído de: (a) doze versões mutantes da linhagem 0h 43 de milho, cada uma delas homozigótica para apenas um dos seguintes genes: *ae*, *bt1*, *bt2*, *du*, *fl1*, *fl2*, *h*, *o2*, *sh1*, *su1*, *su2* e *wx*; (b) dez versões duplo-mutantes envolvendo cada um desses genes, exceto *sh1*, com *o2*; (c) onze versões duplo-mutantes envolvendo *fl2* com cada um dos outros genes. A linhagem 0h 43 *normal* foi também utilizada para comparação. O objetivo foi determinar o efeito dos genes *o2* e *fl2*, em combinações duplo-mutantes com os outros genes, sobre os teores de amido e de amilose no amido do endosperma.

Os genes *o2* e *fl2*, isoladamente, não influenciaram o acúmulo de amido nem a porcentagem de amilose no amido, quando comparados com *normal*. O teor de amido não foi significativamente alterado quando *o2* ou *fl2* foram combinados com os outros genes, à exceção das combinações *bt2o2*, *su1o2* e *su1fl2*. Entretanto, a porcentagem de amilose no amido tendeu a ser reduzida quando *o2* e, principalmente, *fl2* foram combinados com os outros genes. Os efeitos dos genes que condicionam elevados teores de amilose foram, com preferência, modificados pelo gene *fl2*.

5. SUMMARY

The genetic materials used in this study were derivatives of the maize inbred 0h 43, and consisted of: (a) single mutant versions, each homozygous for only one of the genes *ae*, *bt1*, *bt2*, *du*, *fl1*, *fl2*, *h*, *o2*, *sh1*, *su1*, *su2*, and *wx*; (b) 10 double mutant versions involving *o2* with each one of the other genes (except *sh1*); and, (c) 11 double mutant versions involving *fl2* with each one of the other genes. The *normal* 0h 43 inbred was also included for comparison. The objective was to determine the effects, if any, of the *o2* and *fl2* genes on starch percent and amylose percent of starch when each of these genes is combined with other endosperm mutants.

Occurring singly, neither *o2* nor *fl2* influenced starch percent or amylose percent of starch when compared to *normal*. Starch content also was not affected by *o2* or *fl2* when these genes were combined with the other mutants, with the

QUADRO 2 - Diferenças entre as porcentagens de amido e de amilose no amido em endospermas de mutantes simples e duplo-mutantes com o gene o_2

Mutante simples vs. duplo-mutante			o_2 vs. duplo-mutante		
Genótipos comparados	Diferença		Genótipos comparados	Diferença	
	% de amido	% de amilose no amido		% de amido	% de amilose no amido
ae - ae o_2	-2,0	4,5*	o_2 - ae o_2	4,1*	-28,0**
bt $_1$ - bt $_1o_2$	1,9	-1,5	o_2 - bt $_1o_2$	9,9**	2,5
bt $_2$ - bt $_2o_2$	9,0**	-1,1	o_2 - bt $_2o_2$	36,5**	-2,7
du - duo $_2$	-2,3	6,3**	o_2 - duo $_2$	1,4	-0,7
fl $_1$ - fl $_1o_2$	2,7	2,7	o_2 - fl $_1o_2$	4,0*	3,7*
h - ho $_2$	-2,7	1,9	o_2 - ho $_2$	0,2	4,1*
su $_1$ - su $_1o_2$	6,7**	11,7**	o_2 - su $_1o_2$	49,2**	6,7**
su $_2$ - su $_2o_2$	0,7	-1,6	o_2 - su $_2o_2$	5,1**	-14,7**
wx - wxo $_2$	1,5	0	o_2 - wxo $_2$	2,8	30,2**

* e ** indicam, respectivamente, diferenças significativas, aos níveis de 5% e 1%, pelo teste da diferença mínima significativa.

QUADRO 3 - Diferenças entre as porcentagens de amido e de amilose no amido em endospermas de mutantes simples e duplo-mutantes com o gene f^2_2

Mutante simples vs. duplo-mutante			f^2_2 vs. duplo-mutante		
Genótipos comparados	Diferença		Genótipos comparados	Diferença	
	% de amido	% de amilose no amido		% de amido	% de amilose no amido
ae - aefl ₂	- 0,7	5,0**	fl ₂ - aefl ₂	4,0	-28,4**
bt ₁ - bt ₁ fl ₂	- 1,9	3,6*	fl ₂ - bt ₁ fl ₂	4,7*	6,7**
bt ₂ - bt ₂ fl ₂	- 3,8	2,6	fl ₂ - bt ₂ fl ₂	22,3**	0,1
du - dufl ₂	1,4	5,1**	fl ₂ - dufl ₂	3,7	- 2,8
fl ₁ - fl ₁ fl ₂	0,9	4,6*	fl ₂ - fl ₁ fl ₂	0,8	4,7**
h - hfl ₂	- 3,8	0,8	fl ₂ - hfl ₂	- 2,3	2,1
o ₂ - o ₂ fl ₂	- 1,2	2,1	fl ₂ - o ₂ fl ₂	- 2,6	1,2
sh ₁ - sh ₁ fl ₂	1,2	-0,5	fl ₂ - sh ₁ fl ₂	7,5**	4,8**
su ₁ - su ₁ fl ₂	-11,5**	5,5**	fl ₂ - su ₁ fl ₂	29,6**	- 0,4
su ₂ - su ₂ fl ₂	2,2	9,3**	fl ₂ - su ₂ fl ₂	5,3*	- 4,7**
wx - wxfl ₂	2,9	0	fl ₂ - wxfl ₂	2,8	29,3**

* e ** indicam, respectivamente, diferenças significativas, aos níveis de 5% e 1%, pelo teste da diferença mínima significativa.

exceptions of the combinations *bt2o2*, *su1o2*, and *su1fl2*. However, amylose percent of starch tended to be reduced by the combination of *o2* or *fl2*, especially the latter, with the other genes. The effects of the genes *ae*, *du*, *su1*, and *su2*, which increase amylose percent of starch, were preferentially modified by *fl2*.

6. LITERATURA CITADA

1. ACKERSON, C.W. High-amylose corn in diets of day-old chicks. *Feed Age* 11: 25-27. 1961.
2. BARBOSA, H.M. & D.V. GLOVER. Genes and gene interactions affecting protein and lysine content in the endosperm of maize. *Rev. Bras. Genética* 1:29-39. 1978.
3. BARBOSA, H.M. & D.V. GLOVER. Teores de açúcares e polissacarídeos solúveis em água em mutantes e combinações de mutantes que afetam o endosperma do milho. *Rev. Ceres* 25:480-485. 1978.
4. BORCHERS, R. A note on the digestibility of the starch of high-amylose corn by rats. *Cereal Chem.* 39:145-146. 1962.
5. CAMERON, J.W. Chemico-genetic bases for the reserve carbohydrates in maize endosperm. *Genetics* 32:459-485. 1947.
6. 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.
7. CREECH, R.G. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. *Genetics* 52:1175-1186. 1965.
8. CREECH, R.G. & F.J. McARDLE. Gene interaction for quantitative changes in carbohydrates in maize kernels. *Crop Sci.* 6:192-194. 1966.
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. DUNN, G.M., H.H. KRAMER & R.L. WHISTLER. Gene dosage effects on corn endosperm carbohydrates. *Agron. J.* 45:101-104. 1953.
11. DVONCH, W., H.H. KRAMER & R.L. WHISTLER. Polysaccharides of high amylose corn. *Cereal Chem.* 28:270-280. 1951.
12. KRAMER, H.H., P.L. PFAHLER & R.L. WHISTLER. Gene interactions in maize affecting endosperm properties. *Agron. J.* 50:207-210. 1958.
13. KRAMER, H.H. & R.L. WHISTLER. Quantitative effects of certain genes on the amylose content of endosperm starch. *Agron. J.* 41:409-411. 1949.
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. MISRA, P.S., R. JAMBUNATHAN, E.T. MERTZ, D.V. GLOVER, H.M. BARBOSA & K.S. McWHIRTER. Endosperm protein synthesis in maize mutants with increased lysine content. *Science* 176:1425-1427. 1972.
16. NACIF, A.P., H.M. BARBOSA, J.C. ANDERSON & L.S. SARAIVA. Efeito da introdução do gene opaco-2 sobre características físicas e químicas de milho tropicais. *Experientiae* 17:45-61. 1974.
17. 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.
18. SANDSTEDT, R.M., B.D. HITES & SCHROEDER. Genetic variations in maize: Effects on the properties of the starches. *Cereal Sci. Today* 13:82-94. 1968.
19. SANDSTEDT, R.M., D. STRAHAN, S. UEDA & R.C. ABBOT. The digestibility of high amylose corn starches compared to that of other starches. The apparent effect of the *ae* gene on susceptibility to amylase action. *Cereal Chem.* 39:123-131. 1962.
20. SHUMAN, A.C. & R.A. PLUNKETT. Determination of amylose content of corn starch. In: Whistler, R.L. & M.L. Wolfrom, Eds. *Methods in carbohydrate chemistry*, Vol. IV, New York, Acad. Press, 1964. p. 714-178.
21. SPRAGUE, G.F., B. BRIMHALL & R.H. HIXON. Some effects of the waxy gene in corn on properties of the endosperm starch. *J. Am. Soc. Agron.* 35:817-822. 1943.
22. SPRAGUE, G.F., J.E. SASS & B. BRIMHALL. The genetic transfer of starch, protein and oil characters in the corn kernel. *Annual Rept. Iowa Agr. Expt. Sta.* 12:330-332. 1947.
23. TEAS, H.J. & A.N. TEAS. Heritable characters in maize. Description and linkage of brittle endosperm-2. *J. Hered.* 44:156-158. 1953.
24. VINEYARD, M.L. & R.P. BEAR. Amylose content. *Maize Genet. Coops News Letter* 26:5. 1952.
25. 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.