

ANÁLISE GENÉTICA DE ENDOSPERMAS TRANSLÚCIDOS ORIGINADOS DE PLANTAS HOMOZIGÓTICAS PARA O GENE *OPACO-2* EM MILHO (*Zea mays* L.)^{1/}

Alberto José Prioli^{2/}
Hélio M. Barbosa^{3/}
Renato Sant'Anna^{3/}

1. INTRODUÇÃO

O endosperma do milho opaco-2 contém teores mais elevados de lisina (10) e triptófano (13), em relação ao do milho normal, com superioridade nutritiva constatada em dieta de ratos (11), suínos (5) e pessoas (2, 4, 16). Apesar disso, o cultivo do milho opaco-2 tem sido limitado, pois a transferência do alelo recessivo opaco-2 (*o₂*) para variedades e híbridos comerciais acarreta o aparecimento de características indesejáveis. Por exemplo, o milho opaco-2 tem menor peso de 100 grãos e menor produção (8, 22), maior umidade por ocasião da colheita (8, 15), e é mais susceptível a certas doenças e praga comuns (14). Além disso, apresenta problemas de armazenamento (21) e maior porcentagem de quebra no beneficiamento (8). Em razão da textura farinhosa, que lhe dá um aspecto diferente do aspecto tradicional, sua aceitação comercial é também menor (21).

A recuperação da textura translúcida de endospermas homozigóticos para o

^{1/} Parte da tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, pelo primeiro autor, como uma das exigências para a obtenção do grau de «Magister Scientiae».

Recebido para publicação em 28-04-1980. Projeto n.º 4.1454 do Conselho de Pesquisa da U.F.V.

^{2/} Departamento de Biologia. Universidade Estadual de Maringá, 87100 Maringá, PR — Caixa Postal 331.

^{3/} Departamento de Biologia Geral. Universidade Federal de Viçosa. 36570 Viçosa, MG.

gene o_2 , sem alteração da composição aminoacídica, poderia ampliar significativamente seu cultivo, uma vez que ofereceria, para o produtor, os mesmos riscos do milho normal. Todavia, vários trabalhos (17, 19, 20, 24), que exploraram a variabilidade genética natural, não foram bem sucedidos nesse sentido. De modo geral, há uma tendência de diminuição dos teores de lisina e lisina na proteína à medida que aumenta a extensão dos teores translúcidos no endosperma. Por isso, seria justificável tentar induzir mutação para endosperma translúcido rico em lisina, expediente recomendado apenas nos casos em que a exploração da variabilidade genética natural não é eficiente (12). Em um relatório da PURDUE UNIVERSITY (18) há uma referência sobre experimentos em que foram utilizados os mutagênicos químicos alquilantes etil-metanossulfonato (EMS) e dietilsulfato (DES). Entretanto, nenhum dos mutantes para endosperma isolados se mostrou promissor.

LEITE (9) irradiou sementes de uma linhagem de milho opaco-2 com diferentes doses de radiação gama e tratou sementes de uma variedade opaco-2 com EMS em várias concentrações. Nas gerações de sementes R₃ e M₃ dos experimentos com radiação gama e EMS, respectivamente, foram produzidos endospermas translúcidos. Determinar o tipo de herança da translucidez nessas sementes e avaliar os teores de lisina e proteína na descendência dessas sementes constituíram os objetivos deste trabalho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

LEITE (9) irradiou sementes da linhagem de milho '183 opaco-2', de endosperma amarelo, com várias doses de radiação gama; na mesma época, tratou sementes da variedade 'Opaco-2 Colombiano', de endosperma branco, com o mutagênico alquilante EMS, em várias concentrações. As sementes R₁ e M₁ originaram plantas que foram autopolinizadas sucessivamente, até as gerações de sementes R₃ e M₃. Foram utilizadas 36 espigas R₂ da linhagem '183 opaco-2' obtidas por LEITE (9), as quais produziram de 1 a 25 grãos completamente translúcidos ou com poucas (uma a três) manchas opacas muito pequenas, totalizando 111 sementes. Da variedade 'Opaco-2 Colombiano' foram utilizadas 20 espigas M₂, que produziram, cada uma, de 1 a 39 grãos translúcidos com manchas opacas muito pequenas, num total de 119 sementes. As sementes translúcidas amarelas produzidas em espigas M₂ não foram utilizadas, por causa da possibilidade de contaminação com pólen estranho.

As plantas oriundas de sementes R₃ ou M₃ foram autopolinizadas e cruzadas, como macho, com plantas da linhagem 'L Cip 1196 opaco-2 branco', desenvolvida pela SEMENTES AGRO CERES S/A. O alto vigor apresentado por muitas plantas foi considerado como evidência de contaminação de espigas R₂ ou M₂ com pólen estranho; por isso, aquelas plantas não foram utilizadas. As proporções fenotípicas Translúcido: Opaco foram testadas pelo teste χ^2 (23).

Retiraram-se amostras de, no máximo, 30 sementes, com endosperma translúcido, de espigas de plantas não vigorosas, autopolinizadas, provenientes de sementes R₃. Como essas plantas segregaram quantidade insuficiente de sementes com endospermas uniformemente opacos, removeram-se amostras de endospermas parcialmente translúcidos (opacos modificados) para servirem de controle. As sementes foram dissecadas e, nos endospermas com pericarpo, foram determinados os teores de proteínas, pelo método semimicro Kjeldahl (1), e os teores de lisina, pelo método colorimétrico do TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico), descrito por ESTEVÃO *et alii* (6).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As segregações Translúcido: Opaco, obtidas da autopolinização de plantas provenientes de sementes R₃ completamente translúcidas e do cruzamento dessas plantas com opaco-2, não diferiram, respectivamente, das proporções esperadas, 3:1 e 1:1, à exceção do cruzamento da planta 151-4 (Quadro 1). Entretanto, o desvio significativo, nesse caso, pode ser explicado pelo pequeno número de sementes e pela eliminação das sementes podres, cuja maioria poderia ser opaco-2, em consequência de sua maior susceptibilidade a muitas doenças (14). Esses resultados são coerentes com a suposição de que o alelo normal O₂ é responsável pela translucidez nos endospermas R₃. CASPAR e SINGLETON (3) relatam a indução de mutação gênica por radiação gama, mas a possibilidade de reversão induzida (o₂ → O₂) nas sementes R₁ pode ser descartada, pois 9 das 15 plantas descendem do controle, isto é, semente R₁ não irradiada (Quadro 1). Além disso, não houve segregação 3:1 nas espigas R₂ obtidas por LEITE (9), nas quais as sementes R₃ translúcidas foram produzidas. A reversão espontânea em plantas R₂ também é improvável, pois a frequência de endospermas R₃ translúcidos é muito elevada em relação à taxa de uma mutação de *normal* para opaco-2 por 300.000 gametas femininos (7). Outra possibilidade seria a contaminação de espigas R₂ com pólen estranho. Entretanto, o pouco vigor das plantas originadas dessas sementes dificulta essa explicação, pois, no caso de contaminação, seria esperado vigor maior que o apresentado usualmente pela linhagem. Portanto, a origem do alelo normal O₂, nessas sementes, permanece sem explicação conclusiva. Para facilitar a interpretação dos resultados em experimentos dessa natureza, seria aconselhável a utilização de linhagem opaco-2 de endosperma branco (recessivo). Assim, as contaminações seriam identificadas pelo fenótipo amarelo (dominante) do endosperma ou, quando isso não fosse suficiente, pela produção de plantas fenotipicamente diferentes das da linhagem.

No Quadro 2 estão relacionados os teores de lisina, proteína e lisina na proteína em amostras de endospermas translúcidos produzidos pela autopolinização das plantas listadas no Quadro 1. Os dados mostram que os endospermas translúcidos não têm teores de lisina e lisina na proteína tão elevados quanto os verificados no controle, que foi constituído de endospermas opaco-2 modificados. De modo geral, a porcentagem de proteína na amostra foi superior nos endospermas translúcidos. A redução dos teores de lisina e de lisina na proteína com o aumento da vitreosidade do endosperma opaco-2 foi também constatada por outros autores (17, 19, 20, 24).

As sementes R₃ e M₃ translúcidas, mas com manchas opacas muito pequenas, originaram plantas que, quando autopolinizadas ou cruzadas com opaco-2, produziram apenas endospermas uniformemente opacos e/ou opacos modificados. Como parte dessas sementes R₃ ou M₃ são provenientes das sementes R₁ ou M₁ que serviram de controle, isto é, não foram irradiadas ou tratadas com EMS, pode-se concluir que sua translucidez quase completa não foi induzida. Além disso, LEITE (9) obteve endospermas da linhagem '183 opaco-2' quase completamente translúcidos, mas o alto grau de modificação do fenótipo opaco-2 não se manteve na descendência. Portanto, deve haver, na linhagem e variedade utilizadas, sistemas genéticos desconhecidos que modificam drasticamente a expressão do alelo o₂.

4. RESUMO

Sementes com endosperma completamente vítreo, translúcido ou com peque-

QUADRO 1 - Segregação para sementes com endospermas translúcidos ou opacos em plantas provenientes de sementes translúcidas produzidas em espigas R₂, autofecundadas e cruzadas com fêmeas da linhagem 'L Cip 1196 opaco-2 branco'

| Planta 1/ R ₁ | Dose de radiação cãõ gama (Krads) em R ₁ | Autofecundação | | Cruzamento com Opaco-2 | χ^2 (Esp. 3:1) $\frac{3}{2}$ | χ^2 (Esp. 1:1) $\frac{3}{2}$ |
|-----------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | | Transl. Opaco $\frac{2}{2}$ | Transl. Opaco $\frac{2}{2}$ | | | |
| (a)117-3 | 0 | 227 | 72 | 76 | 74 | 0,03n.s. |
| (b)121-2 | 5 | 116 | 29 | -- | -- | -- |
| (b)121-5 | 5 | 286 | 87 | 76 | 68 | 0,44n.s. |
| (b)121-6 | 5 | 209 | 65 | 83 | 61 | 3,36n.s. |
| (b)122-1 | 5 | 124 | 42 | 40 | 46 | 0,42n.s. |
| (c)138-1 | 0 | -- | -- | 28 | 21 | 1,00n.s. |
| (c)146-1 | 0 | 214 | 57 | 79 | 93 | 1,14n.s. |
| (c)146-2 | 0 | 186 | 60 | 66 | 53 | 1,42n.s. |
| (c)148-1 | 0 | 170 | 55 | 58 | 41 | 2,92n.s. |
| (c)148-2 | 0 | 203 | 64 | 85 | 85 | 0,00n.s. |
| (c)149-1 | 0 | 245 | 77 | 28 | 30 | 0,07n.s. |
| (c)151-4 | 0 | 174 | 52 | 39 | 23 | 4,84* |
| (c)151-5 | 0 | -- | -- | 85 | 95 | 0,56n.s. |
| (d)153-1 | 25 | 199 | 82 | 34 | 24 | 1,92n.s. |
| (d)154-2 | 25 | 32 | 14 | 70 | 76 | 0,25n.s. |

1/ As plantas precedidas da mesma letra são provenientes da mesma espiga R₂.

2/ Inclui os endospermas uniformemente opacos e os opacos modificados

3/ n.s.; * Indicam, respectivamente, diferença não significativa e diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste χ^2 .

QUADRO 2 - Médias dos teores de lisina (L), proteína (P) e lisina na proteína (L/P) em amostras de endospermas completamente translúcidos, obtidos da autofecundação de plantas provenientes de sementes translúcidas de espigas R₂

| Planta | %L | %P | %L/P |
|-------------|---------|--------|--------|
| 117-3 | 0,121 | 8,08 | 1,50 |
| 121-2 | 0,142 | 11,77 | 1,21 |
| 121-5 | 0,120 | 10,24 | 1,18 |
| 121-6 | 0,120 | 9,64 | 1,24 |
| 122-1 | 0,127 | 11,93 | 1,06 |
| 146-1 | 0,119 | 11,82 | 1,01 |
| 146-2 | 0,122 | 11,19 | 1,09 |
| 148-1 | 0,123 | 11,39 | 1,08 |
| 148-2 | 0,122 | 10,73 | 1,14 |
| 149-1 | 0,126 | 11,11 | 1,13 |
| 151-4 | 0,120 | 8,30 | 1,44 |
| 153-1 | 0,127 | 12,49 | 1,02 |
| 154-2 | 0,144 | 11,89 | 1,21 |
| Op. Mod. 1/ | 0,192 | 9,36 | 2,09 |
| | + 0,023 | + 1,52 | + 0,40 |

1/ Controle constituído pela média das médias de amostras de endospermas opacos modificados com até 30% de setores translúcidos, classificados visualmente, retiradas de plantas provenientes de sementes translúcidas de espigas R₂.

nas e poucas manchas opacas foram obtidas de plantas provenientes de sementes homozigóticas para o gene *opaco-2* tratadas ou não com radiação gama e etil metanossulfonato.

As segregações Translúcido: Opaco obtidas da autopolinização ou do cruzamento de plantas provenientes de sementes completamente translúcidas indicaram que o alelo normal O₂ foi responsável pela translucidez total das sementes. Os teores de lisina dos endospermas translúcidos foram semelhantes aos teores encontrados em endospermas de milho normal.

As plantas derivadas de sementes translúcidas, porém com pequenas e poucas manchas opacas no endosperma, produziram apenas sementes opacas ao serem autopolinizadas ou cruzadas com a linhagem opaco-2.

Os resultados deste trabalho permitem concluir que: (a) a mutação induzida não parece constituir um método promissor para a obtenção de milho opaco-2 de endosperma translúcido, com alto teor de lisina, e (b) há sistemas genéticos desconhecidos que modificam drasticamente a expressão do gene *opaco-2*.

5. SUMMARY

From experiments in which opaque-2 maize seeds were treated with gamma rays and ethil methanesulfonate, and their respective untreated controls, seeds with hard, vitreous endosperms were obtained. Some of these were completely vitreous, with no evidence of opaque endosperm tissue. Others had very small and few (one to three) areas of opaque tissue. Plants derived from completely vitreous endosperm seeds were self pollinated and crossed to an opaque-2 inbred. The segregation of vitreous to opaque seeds indicated that the normal allele at the *opaque-2* locus was responsible for the vitreousity of the endosperm. Lysine content of the vitreous endosperm was comparable to that of normal endosperms. Plants derived from vitreous seeds with few and tiny spots of opaque tissue produced, upon selfing or crossing to the *opaque-2* inbred, only *opaque-2* seeds.

It is concluded that: (a) induced mutation may not be an effective tool to obtain vitreous opaque-2 endosperm with high lysine content; and, (b) there are unknown genetic systems which severely modify the expression of the *opaque-2* gene.

6. LITERATURA CITADA

1. BREMER, J.M. Total nitrogen. In BLACK, C.A. ed. *Methods of soil analysis*. Madison, American Society of Agronomy, 1965. Part 2, p. 1149-1178.
2. BRESSANI, R. Protein quality of opaque-2 maize in children. In: *High lysine corn conference*, Washington, 1966. Proceedings, Washington, Corn Refiners Association, 1966, p. 34-39.
3. CASPAR, A.L. & SINGLETON, W.R. Induced «gene» mutation in maize. *Pl. Breed. Abstr.* 28:244-245. 1958.
4. CLARK, H.E. Opaque-2 corn as a source of protein for adult human subjects. In: *High lysine corn conference*, Washington, 1966. Proceedings, Washington, Corn Refiners Association, 1966, p. 40-44.
5. CROMWELL, G.L., PICKET, R.H. & BEESON, W.M. Nutritional value of opaque-2 corn for swine. *J. Animal Sci.* 26:1325-1331. 1967.
6. ESTEVÃO, M.M., SANT'ANNA, R., OLIVEIRA, L.M. & ALMEIDA F.º, J. Estabelecimento de um método colorimétrico rápido para avaliação de lisina em milho. *Experientiae* 8:195-213. 1976.
7. LAMBERT, R.J. & ALEXANDER, D.E. Spontaneous mutation rate at the opaque-2 locus in maize. *J. Hered.* 59:378-379. 1968.
9. LAMBERT, R.J., ALEXANDER, D.E. & DUDLEY, J.W. Relative performance of normal and modified protein (opaque-2) maize hybrids. *Crop Sci.* 9:242-243. 1969.
9. LEITE, A.C.S. *Indução de mutação em milho (Zea mays L.) opaco-2*. Viçosa, U.F.V., 1979. 44 p. (Tese Mestrado).
10. MERTZ, E.T., BATES, L.S. & NELSON, O.E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145:279-280. 1964.

11. MERTZ, E.T., VERON, O.A., BATES, L.S. & NELSON, O.E. Growth of rats fed on opaque-2 maize. *Science* 148:1741-1742. 1965.
12. MYERS, W.M. Some limitations of radiation genetics and plant breeding. *Indian J. Genet. Plant Breeding* 22:89-92. 1962.
13. NELSON, O.E., MERTZ, E.T. & BATES, L.S. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. *Science* 150:1469-1470. 1965.
14. ORTEGA, A., DE LEON, C., GRANADOS, G. & VASAL, S.K. Disease-insect interactions in quality protein maize. In: *High-quality protein maize*. Dowden, Hutchinson & Ross, 1975. p. 178-192.
15. PAEZ, A.V., HELM, J.L. & ZUBER, M.S. Kernel opacity development and moisture content within maize ears segregating for opaque-2 and floury-2. *Agron. J.* 61:443-445. 1965.
16. PRADILLA, A., LINARES, F., FRANCIS, C.A. & FAJARDO, L. El maíz de alta lisina en nutrición humana. In: *Simpósio sobre desarrollo y utilización de maíces de alto valor nutritivo*. Chapingo, México, Colegio de Postgraduados, ENA, 1973. p. 41-48.
17. PINTO, R.F.S. & BARBOSA, H.M. 1976. Seleção visual para endospermas de milho (*Zea mays* L.) opaco-2 de diferentes fenótipos. *Rev. Ceres* 23:281-287.
18. PURDUE UNIVERSITY. *Final report on inheritance and improvement of protein quality and content in maize, 1977-1978*. West Lafayette, Indiana, 1979. p. 6-14.
19. RIBEIRAL, U.C. 1974. Effects of modified opaque-2 kernels on yields and protein quality of maize (*Zea mays* L.). *Dissertation Abstract International* 35:20-21.
20. ROBUTTI, J.L., HOSENEY, R.C. & DEYOE, C.W. 1974. Modified opaque-2 corn endosperms. I. protein distribution and amino acid composition. *Cereal Chem.* 51:163-172.
21. SÃO JOSÉ, A.S. Production and acceptance of opaque-2 maize in Brasil. In: Purdue University — CIMMYT, Ed. *High-quality protein maize*. Dowden, Hutchinson & Ross, 1975. p. 268-273.
22. SREERAMULU, C. & BAUMAN, L.F. Yield components and protein quality of opaque-2 and normal diallels of maize. *Crop Sci.* 10:262-265. 1970.
23. STRICKBERGER, M.W. *Genetics*. 2.^a ed. New York, Macmillan Publishing Co., Inc., 1976. 914 p.
24. VASAL, S.K. Use of genetic modifiers to obtain normal-type kernels with the opaque-2 gene. In: Purdue University — CIMMYT, Ed. *High-quality protein maize*. Dowden, Hutchinson & Ross, 1975. p. 197-216.