

Caracterização de Grãos de Amido Durante o Enchimento de Grãos em Milho

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

PEREIRA R.C., MAKI C.S., OLIVEIRA E., SOUZA I.R.P., GUIMARÃES C.T., CARNEIRO N.P. e PAIVA E.

Embrapa Milho e Sorgo, CP 151 Sete Lagoas MG 35701-970 edilson@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: Amido, Milho, Endosperma, Opaco-2, QPM.

Introdução

A maioria da população nos países em desenvolvimento são altamente dependentes dos cereais como principal fonte de alimentação. O milho é o principal cereal cultivado nas regiões tropicais e é consumido basicamente como fonte energética. Apesar de possuir teores protéicos relativamente elevados, cerca 10% da matéria seca do grão, essa proteína é nutricionalmente inadequada para a alimentação de seres humanos e animais monogástricos, devido à sua deficiência em aminoácidos essenciais, especialmente lisina e triptofano (Nelson, 1969).

A descoberta do gene *opaco-2* (Mertz et al., 1964) e outros como *floury-2* (Nelson et al., 1965), capazes de modificar a qualidade protéica dos grãos de milho, aumentando o teor de lisina e triptofano, gerou um entusiasmo muito grande entre os melhoristas de milho em todo mundo. No entanto, logo se descobriu que esse alto valor nutricional estava associado a uma série de características agrônômicas indesejáveis tais como, redução do nível de proteínas de reserva no endosperma, resultando em menor densidade de grãos, maior susceptibilidade ao ataque de pragas e doenças e baixa produtividade (Ortega e Bates, 1983; Villegas et al., 1992), impedindo assim sua ampla utilização comercial.

Para solucionar esses problemas, melhoristas do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT), através de um longo processo de retrocruzamento e seleção recorrente, combinaram o gene *opaco-2* com modificadores genéticos que suprimiram o fenótipo opaco dos grãos, aumentando a dureza dos grãos, a produtividade e mantendo o alto teor de lisina e triptofano do mutante (Vasal et al., 1980). Esses genótipos *opaco-2 modificados* foram denominados "Quality Protein Maize" ou QPM. O caminho percorrido no desenvolvimento dos milhos QPM tem sido longo e difícil. Grupos de pesquisadores no CIMMYT (México), Pietermaritzburg (África do Sul), Embrapa Milho e Sorgo (Brasil), Beijing (China), Universidades de Purdue, Illinois, Arizona e Texas A&M (EUA), têm devotado grande esforço no estudo e melhoramento de milhos tipo QPM.

Mutações que causam modificações na síntese das proteínas de reserva, geralmente causam alterações na estrutura física do endosperma (Mertz et al., 1964; Nelson et al., 1965). Guimarães et al. (1995) caracterizou onze populações indígenas de milho, analisando densidade dos grãos, qualidade protéica, porcentagem de zeínas e não-zeínas e teor de açúcares solúveis no endosperma. Dos resultados obtidos, conclui-se que, algumas dessas populações indígenas não estão incluídas em nenhuma classe de mutantes até então descritos, principalmente relacionados aos teores de zeína, qualidade protéica e dureza de grãos.

A dureza do endosperma do milho é um aspecto de fundamental importância para os produtores e beneficiadores de grãos, pois é uma característica que está relacionada com densidade, suscetibilidade

ao ataque de pragas e doenças, e quebra durante os processos de beneficiamento e armazenamento (Pomeranz et al., 1984). A estrutura física do endosperma é a característica mais limitante na produção de milhos de alto valor nutricional (Lopes, 1989). A vitreosidade e a dureza são termos comumente utilizados para se referir à textura do grão, embora não designem a mesma propriedade (Shull, 1988). A vitreosidade está mais relacionada com a aparência do endosperma, enquanto a dureza se refere à sua textura ou propriedade física (Hoseney, 1986). Os grãos de milho freqüentemente apresentam porções vítreas e opacas, as células da porção opaca são tipicamente maiores e possuem parede celular mais espessa que as da porção vítrea, já os corpos protéicos nas partes mais densas do endosperma são maiores e mais numerosos que nas partes menos densas. Os grãos de amido são mais compactados, esféricos e com espaços vazios entre eles nos endospermas opacos (Wolf et al., 1952; Wolf et al., 1967).

O endosperma de grãos de milho contém uma complexa mistura de grãos de amido e corpos protéicos, e segundo Duvick (1961), a estrutura física do endosperma depende do tipo de interação entre estes componentes, sendo que as proteínas de armazenamento tem um papel importante na estrutura física do grão maduro. Assim, o objetivo do presente trabalho foi determinar o número, o tamanho e a distribuição dos grãos de amido em diferentes estágios de enchimento de grãos de milho de genótipos de endosperma normal, QPM e dos mutantes Opaco-2 e farináceo indígena, utilizando técnicas de microscopia ótica e eletrônica de varredura.

Material e Métodos

Os experimentos de campo e as análises de microscopia foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Núcleo de Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG.

Como materiais genéticos, foram utilizados os milhos de endosperma duro, a linhagem normal Cateto L_{237/67} e a variedade QPM BR-451, apresentando baixa e alta qualidade protéica, respectivamente. Como genótipos de endosperma farináceo foram utilizados o mutante Opaco-2, de alta qualidade protéica, e o genótipo indígena Bol-II, apresentando baixa qualidade protéica.

As autofecundações controladas foram realizadas para cada material, sendo uma espiga coletada por planta em cada um dos diferentes estágios de desenvolvimento do grão (10, 15, 20, 25 30 e 50 dias após a polinização - DAP). As espigas coletadas tiveram seus grãos fixados e armazenados em glutaraldeído 1%, formaldeído 4% preparados em tampão fosfato 50mM (KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,0). Para a avaliação do tamanho dos grânulos de amido, os grãos de milho foram seccionados longitudinalmente, pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% (v/v) e preparados em tampão fosfato 50mM por duas horas. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão fosfato por três vezes de 5 minutos cada, desidratadas em uma serie alcoólica gradativa (10, 30, 50, 70, 90 e 100%) por 10 minutos cada série, submetidas a secagem ao ponto crítico, fixadas e submetidas a uma cobertura com ouro coloidal para observação em microscópio eletrônico de varredura (ZEISS, DSM 940 A).

Para a análise estatística do tamanho dos grânulos de amido dos diferentes materiais avaliados nos diferentes estágios de desenvolvimento do endosperma, foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com três repetições.

O número de grânulos de amido por mL foi determinado por meio de contagem utilizando uma lâmina de Neubauer e um microscópio de luz (ZEISS, Axioplan). Os grãos foram extraídos das espigas nos diferentes estágios de desenvolvimento do endosperma, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C. Para a realização das contagens, foram preparadas suspensões contendo os grânulos de amido, utilizando o delineamento em blocos casualizados, com 4 repetições.

Resultados e Discussões

Os resultados mostraram que o tamanho dos grânulos de amido varia de acordo com estágio de desenvolvimento do endosperma e que existe variabilidade entre os diferentes materiais avaliados, sendo que cada material se comporta de maneira distinta em cada estágio desenvolvimento do endosperma. Observou-se um aumento gradativo do tamanho dos grãos de amido ao longo do desenvolvimento do endosperma, sendo que o aumento mais pronunciado foi na transição entre o estágio de 10 e de 15 DAP. A precisão experimental foi alta, uma vez que o coeficiente de variação foi reduzido baixo.

Houve diferença no tamanho dos grânulos de amido entre os diferentes materiais avaliados, onde a linhagem normal Cateto L_{237/67} e a variedade de alta qualidade protéica BR-451 apresentaram os menores grãos de amido, o genótipo indígena Bol-II apresentou valores intermediários e o mutante Opaco-2, os maiores grãos de amido. A diferença entre os menores grânulos de amido, observados na linhagem Cateto L_{237/67}, e os maiores, observados no mutante Opaco-2 foi de 20%.

Análises de variância mostraram que as diferenças para quantidade de amido nos grãos dos diferentes genótipos de milho e nos diferentes estágios de desenvolvimento do endosperma foram significativas. A menor quantidade de amido foi observada nos grãos com 10 dias após a polinização, havendo uma tendência a estabilizar após os 20 DAP. O genótipo normal Cateto L_{237/67} foi o material que apresentou maior quantidade de grânulos de amido e a variedade QPM BR-451 apresentou a menor quantidade, sendo que os mutantes Opaco-2 e Bol-II apresentaram valores intermediários para número de grânulos de amido. Aos 50 dias após a polinização, os grãos de amido do Cateto apresentaram-se empacotados de forma organizada e compacta, possuindo entre os mesmo uma substância branca na forma de uma membrana. No genótipo BR-451, a substância membranosa também estava presente, mas os grãos de amido apresentaram-se soltos e com formas variadas. Nos genótipos de endosperma farináceo a substância branca apresentou-se na forma de pequenos grânulos e os grãos de amido se assemelharam aos do genótipo BR-451.

Literatura Citada

- DUVICK, D.M. Protein granules of maize endosperm cells. **Cereal Chem.**, **38**: 374-384, 1961.
- GUIMARÃES, C.T.; BARROS, E.G.; VASCONCELOS, M.J.V.; PAIVA, E. Characterization of South American exotic maize (*Zea mays* L.) populations with opaque phenotype. **Rev. Bras. Genet.**, **18**: 259-264. 1995.
- HOSENEY, R.C. Principles of cereal science and technology. Am. Soc. Cereal Chem. St. Paul, MN. 1986.
- LOPES, M.A. Fractionation and characterization of storage proteins in hard-endosperm opaque-2 maize. West Lafayette, Purdue University. 1989. 115 p. (Master Thesis)
- MERTZ, E.T.; BATES, L.S.; NELSON, O.E. Mutant genes that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. **Science**, **145**: 279-280, 1964.
- NELSON, O.E. Genetic modification of protein quality in plants. **Adv. Agron.**, **21**: 171-194, 1969.
- 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.
- ORTEGA, E.I. & BATES, L.S. Biochemical and agronomic studies of two modified hard endosperm opaque-2 maize (*Zea mays*) populations. **Cereal Chem.**, **60**: 107-111, 1983.
- POMERANZ, Y.; MARTIN, C.R.; TRAYLOR, D.D.; LAI, F.S. Corn hardness determination. **Cereal Chem.**, **61**: 147-150, 1984.

- SHULL, J.M. Developmental study of a hard, intermediate and soft variety of sorghum. West Lafayette, Purdue University. 1988. 85 p. (Tese M.S.)
- VASAL, S.K.; VILLEGAS, E.; BJARNASON, M.; GELAW, B.; GOERTZ, P. Genetic modifiers and breeding strategies in developing hard endosperm opaque-2 materials. In: POLLMER, W.G. & PHILLIPS, R.H. eds. Improvement of quality traits of maize grain and silage use. London, Martinus Nijhoff. 1980. p.37-73.
- VILLEGAS, E.; VASAL, S.K.; BJARNASON, M. Quality protein maize: What is it and how was it developed. In: Quality Protein Maize. MERTZ, E.T. (ed.) Am. Assoc. Cereal Chem. p.27-48, 1992.
- WOLF, M.J.; BUZAN, C.L.; MAC MASTERS, M.M.; RIST, C.E. Structure of the mature corn kernel. I. Gross anatomy and structure relationship. **Cereal Chem.**, **29**: 321-333, 1952.
- WOLF, M.J.; KHOO, U.; SECKINGER, H.L. Subcellular structure of endosperm protein in high-lysine and normal corn. **Science**, **157**: 556-557, 1967.