

Milho Doce: Origem de Mutações Naturais



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Documentos 144

Milho Doce: Origem de Mutações Naturais

Sylvia Morais de Sousa
Maria Cristina Dias Paes
Flavia França Teixeira

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Flávia Cristina dos Santos Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: Flavia França Teixeira

1ª edição

1ª impressão (2012): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Sousa, Sylvia Morais de.

Milho doce : origem de mutações naturais / Sylvia Morais de Sousa, Maria Cristina Dias Paes, Flavia França Teixeira -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2012.

41 p.: il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 144).

1. Zea mays. 2. Genética vegetal. 3. Variação genética. I. Paes, Maria Cristina Dias. II. Teixeira, Flávia França. III. Título. IV. Série.

CDD 635.672 (21. ed.)

© Embrapa 2012

Autores

Sylvia Morais de Sousa

Bióloga, Ph.D., Pesquisadora em Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 425 km 65, Cx.Postal 151. 35701-970, Sete Lagoas, MG, smsousa@cnpms.embrapa.br

Maria Cristina Dias Paes

Nutricionista, Ph.D., Pesquisadora em Nutrição Humana e Ciência de Alimentos da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 425 km 65, Cx.Postal 151. 35701-970, Sete Lagoas, MG, mcdpaes@cnpms.embrapa.br

Flavia França Teixeira

Engenheira Agrônoma, Ph.D., Pesquisadora Recursos Genéticos e Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 425 km 65, Cx.Postal 151. 35701-970, Sete Lagoas, MG, flavia@cnpms.embrapa.br

Apresentação

Esta publicação tem como objetivo revisar as principais mutações espontâneas que provocam alterações no conteúdo de açúcares na semente do milho. Estas mutações dão origem ao que conhecemos hoje como milho-doce. Este tipo de milho vem ganhando espaço no Brasil e seu consumo tende a aumentar, à medida que um maior número de híbridos com diferentes combinações de mutações e dosagens alélicas apareçam no mercado, atendendo às diferentes necessidades do consumidor e das indústrias alimentícias.

Antonio Alvaro Corsetti Purcino
Chefe Geral
Embrapa Milho e Sorgo

Sumário

Introdução	9
O grão de milho	10
O metabolismo do amido no grão do milho doce	12
Tipos de mutações na via do amido	15
Conclusão	28
Referências	29

Milho Doce: Origem de Mutações Naturais

Sylvia Morais de Sousa

Maria Cristina Dias Paes

Flavia França Teixeira

Introdução

O milho doce é originário de mutações espontâneas que foram descobertas há cerca de 100 anos. Estas mutações bloqueiam a síntese de amido e levam ao acúmulo de açúcares, principalmente a sacarose. Este tipo de milho é muito comum nos Estados Unidos, entretanto mais recentemente vem ganhando espaço no Brasil, impulsionado pelas indústrias de conservas alimentícias. Variedades de polinização aberta se tornaram disponíveis nos Estados Unidos no século 19, no entanto, a maior parte das cultivares atualmente utilizadas são híbridos.

A mutação espontânea mais comum que leva o milho a acumular cerca de duas vezes mais açúcares se encontra no *locus sugary* (*su*). Hoje, porém, outros mutantes têm sido usados para melhorar a qualidade do milho doce, dentre elas as mutações mais comuns são as nos genes *sugary enhanced* (*se*) e *shrunkn-2* (*sh2*). Nessa revisão serão apresentados mais detalhes de como o grão do milho pode ser afetado, e quais são as mutações mais comuns e suas características.

O grão do milho

O principal produto resultante do cultivo de cereais é, sem dúvida, o grão, apesar de caules e folhas serem utilizados para silagem. Em termos botânicos, o grão é uma cariopse, tipo de fruto em que a parede da semente (testa) encontra-se fundida com a parede do fruto (pericarpo) (LAZZERI; SHEWRY, 1993). O milho é uma gramínea de origem centro e sul-americana, pertencente à tribo Andropogoneae, que engloba também o sorgo, o *Trypsacum* e o *Coix* (CLAYNTON, 1973, 1983). A semente do milho é composta basicamente de duas partes: o endosperma e o embrião (Figura 1). Eles são produzidos por meio de um processo de fertilização dupla, única em plantas superiores (revisado por RUSSELL, 1992). A fusão de um núcleo espermático com a célula-ovo origina o zigoto que resulta no embrião. Ao mesmo tempo, uma segunda célula espermática funde-se com uma célula binucleada central que resulta na origem do endosperma de natureza triploide (RUSSELL, 1992).

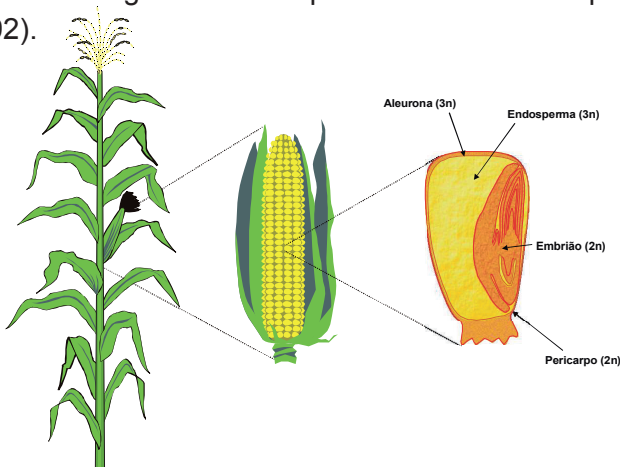


Figura 1. Representação esquemática das principais partes que compõem a semente madura de milho.

O endosperma apresenta funções diferenciadas em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. No primeiro grupo, o

endosperma possui função de armazenamento de nutrientes a serem utilizados durante a germinação da semente e no início do crescimento da nova planta. Na maioria das dicotiledôneas, o endosperma assiste a embriogênese nutrindo o embrião apenas nos estágios iniciais, sendo completamente assimilado durante o processo. Os cotilédones, folhas formadas durante a embriogênese, assumem a função de tecido de reserva de nutrientes a serem utilizados durante o processo de germinação (LOPES; LARKINS, 1993).

A embriogênese do milho resulta na formação do endosperma e do embrião. Este último é formado por uma estrutura cotiledonária, pelo escutelo e pelo eixo embrionário. A formação do embrião ocorre em duas fases, a primeira é o período de morfogênese inicial, quando todos os tipos de tecidos e estruturas do embrião maduro estão sendo formados, e a segunda é quando ocorre a elaboração e deposição de produtos de estoque (CLARK; SHERIDAN, 1988).

No milho, as paredes celulares do endosperma começam a formar-se no terceiro dia após polinização (DAP), completando-se no quinto DAP, quando o tecido torna-se completamente celularizado e uninucleado. O período de crescimento mais intenso do endosperma ocorre de 8 a 13 DAP, com a ocorrência simultânea de divisões celulares e aumento de volume das células. Com 12 DAP, o endosperma preenche a região central da semente e neste estágio a camada externa de células, a aleurona, encontra-se completamente diferenciada. As divisões celulares cessam na região central do endosperma, e os núcleos iniciam um processo de endoreduplicação (duplicação cromossômica sem mitose) que eleva substancialmente o conteúdo de DNA. No milho, de 10 a 20 dias após a polinização (DAP), o conteúdo de DNA aumenta de 3 vezes para até 600 vezes o conteúdo do genoma haploide (revisado por SABELLI; LARKINS, 2009).

A camada celular mais externa do endosperma, a aleurona, é

conservada durante os processos de maturação e secagem da semente. É um tecido formado por células morfológica e funcionalmente distintas das outras células do endosperma. Quando as sementes começam a germinar, estas células, estimuladas por ácido giberélico produzido pelo embrião, iniciam a produção de enzimas hidrolíticas. Estas enzimas catalisam a degradação das macromoléculas de reserva: amido, proteínas e DNA acumulados durante o desenvolvimento do endosperma.

O endosperma do milho constitui a principal fonte de nutrientes para a germinação do embrião. A maioria do carbono e do nitrogênio utilizados nos estágios iniciais do desenvolvimento deriva de amido e de proteínas de reserva que são conhecidas pelo nome de zeínas. O conjunto destes produtos de reserva compõe aproximadamente 90% do peso seco do endosperma maduro. A produção e o acúmulo de zeínas e de amido iniciam-se de 10 a 14 DAP nas células da camada sub-aleurônica. O acúmulo de proteínas e amido ocorre segundo gradiente crescente da região externa para o interior, coincidindo com diversos eventos de diferenciação celular, provavelmente disparado por um rápido decréscimo na razão entre os reguladores hormonais citocinina e auxina (LUR; SETTER, 1993). Na semente madura, o endosperma é diferenciado em duas partes principais: o endosperma amiláceo e a camada de aleurona. As células da região central do endosperma acumulam amido de forma abundante, e as regiões periféricas são mais ricas em proteínas de reserva. No final da maturação da semente, o endosperma amiláceo transforma-se num tecido mole e quebradiço, enquanto que a região proteica torna-se dura e translúcida (SHEWRY; CASEY, 1999).

O metabolismo do amido no grão do milho

O grão de milho doce usa a sacarose que vem translocada das

folhas para a biossíntese de amido. A sacarose translocada é clivada tanto pela sacarose sintase, que produz UDP-glicose e frutose, quanto pela invertase, que cliva a sacarose, de uma maneira irreversível, em glicose e frutose (WINTER; HUBER, 2000). Os produtos clivados pela sacarose sintase e invertase são convertidos em glicose-1-fosfato pela ação da hexoquinase, fosfoglucomutase, fosfoglucoisomerase e UDP-glicose priofosforilase (UGPase). A glicose-1-fosfato é utilizada pela ADP-glicose pirofosforilase (AGPase) para produzir ADP-glicose, o passo fundamental da síntese de amido (SPIELBAUER et al., 2006).

No endosperma, o amido é encontrado em duas formas: amilose e amilopectina. Na amilose predominam cadeias lineares de aproximadamente 1.000 resíduos de glicose unidos por ligações $\alpha(1-4)$, apresentando um baixo nível de ramificação $\alpha(1-6)$, de aproximadamente 1 a cada 1.000 resíduos. Já a amilopectina apresenta a mesma composição da amilose, porém apresenta um alto índice de ramificação. Cadeias de aproximadamente 20 resíduos de glicose ligados $\alpha(1-4)$ são unidas por ligações $\alpha(1-6)$ a outros ramos da molécula de amilopectina.

Tanto a amilose quanto a amilopectina são sintetizadas a partir de ADP-glicose, que por sua vez é sintetizada a partir de glicose-1-fosfato e ATP em reação catalisada pela enzima ADPGPPase (ADP-glicose pirofosforilase). Na próxima etapa de síntese do amido, a enzima SS (*starch synthase* – enzima sintetizadora de amido) catalisa a formação da ligação $\alpha(1-4)$ entre a extremidade não redutora da cadeia pré-existente e uma molécula de ADP-glicose. Finalmente, as ramificações $\alpha(1-6)$ são produzidas pela enzima SBE (*starch branching enzyme* – enzima ramificadora de amido) (revisado em MARTIN; SMITH, 1995).

No amiloplasto, o amido é sintetizado a partir de ADP-glicose pela ação concentrada de várias isoformas de amido sintases, enzimas ramificadoras de amido, e enzimas desramificadoras de amido. As

mutações que afetam as enzimas sintetizadoras de amido levam a fenótipos mais brandos da semente com alteração nas razões dos dois principais componentes do amido, amilose e amilopectina, enquanto a quantidade total de polissacarídeos não é modificada drasticamente.

As pequenas e grandes subunidades de AGPase são codificadas pelos genes *Brittle-2* (*Bt2*) e *Shrunken-2* (*Sh2*), respectivamente (BAE et al., 1990; BHAVE et al., 1990). No endosperma de milho selvagem, a principal atividade da AGPase está localizada no citosol, com uma menor atividade no amiloplasto (DENYER et al., 1996). A ADP-glicose citosólica é supostamente transportada para o amiloplasto pela proteína de membrana *Brittle1* (*BT1*) (SULLIVAN; KANEKO, 1995; SHANNON et al., 1998). Mutações que afetam a síntese ou transporte da ADP-glicose resultam em fenótipos severos do grão. A perda de função de *Bt1*, *Bt2*, ou *Sh2* levam a fenótipos semelhantes, marcados pelo baixo conteúdo de amido (70-80% menor) e um aumento da concentração dos açúcares solúveis (HANNAH et al., 1993). Mutações na *Sh1* e *Sus1*, que codificam as duas isoformas das isoenzimas da sacarose sintase em endosperma do grão (CHOUREY, 1981; ECHT; CHOUREY, 1985), levam a condições fenóticas suaves nele associadas com 22% e 47% na redução do teor de amido de um mutante único de *sh1* e os duplos mutantes *sh1sus1*, respectivamente (CHOUREY et al., 1998). No endosperma do mutante *amylose extender* (*ae*), a quantidade relativa de amilose é aumentada devido a ausência da enzima ramificadora de amido IIb (SBEIIb) (BOYER; PREISS, 1978). Em contraste, o mutante *waxy* (*wx*) não tem a enzima amido sintase granular (GBSSI) e tem o amido composto somente por amilopectina (NELSON; RINES, 1962). O gene *Sugary-1* (*Su1*) codifica uma enzima do tipo isoamilase desramificadora (JAMES et al., 1995), que está envolvida na síntese de amilopectina. Além do amido, as sementes *su1* acumulam um segundo tipo de poliglucano, que é um fitoglicogênio altamente ramificado e solúvel

em água, em detrimento a amilopectina (WANG et al., 1993a). O gene *se1* é um modificador recessivo do *su1* (FERGUSON et al., 1978). O gene *dull1* (*du1*) parece ser um determinante na estrutura do endosperma, sendo que as mutações *du1* afetam a atividade de duas enzimas envolvidas na síntese de amido, a amido sintase II (SSII) e a enzima ramificadora de amido (SBEIIa) (GAO et al., 1998). A Figura 2 mostra o esquema resumido da via do amido e os mutantes da via.

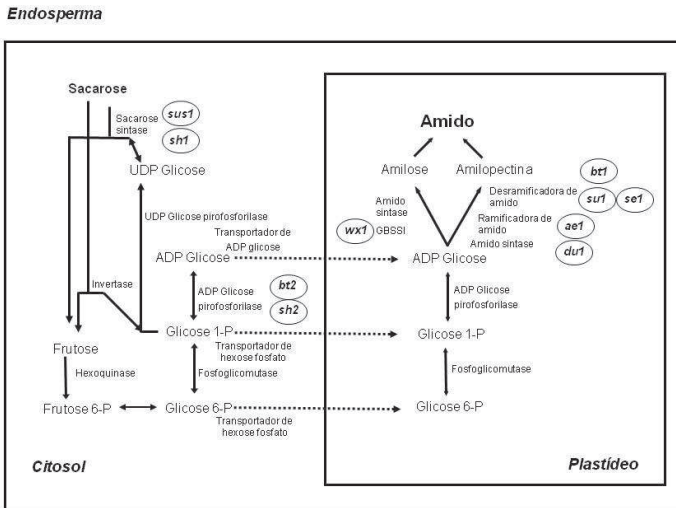


Figura. 2. Esquema resumido da via do amido em semente de milho. Os mutantes *sus1*, *sh1*, *bt2*, *sh2*, *wx1*, *du1*, *ae1*, *su1*, *se1* e *bt1* aparecem circulado em frente à região onde sofrem alteração.

Tipos de mutações na via de amido

Dentre os atributos essenciais de qualidade desejável para a produção comercial de milho doce fresco ou processado, o conteúdo de açúcar na semente é universalmente importante. Em genótipos de milho doce, o principal açúcar é a sacarose, que é elevada em detrimento do amido, especialmente a amilopectina.

Mutações de milho doce têm sido tradicionalmente divididas em duas classes. De modo geral, a classe I de mutações afeta as reações citosólicas no início do processo de síntese de amido, antes do amido ser sintetizado, e a classe II de mutações afeta as reações dentro do amiloplastos, que envolvem diretamente a montagem dos grânulos de amido (BOYER; SHANNON, 1983). Os detalhes de algumas das principais mutações responsáveis pela alteração da qualidade e/ou quantidade de amido em milho (NEUFFER et al., 1997) estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo dos principais mutantes da via do amido e os respectivos genes mutados.

Gene	Símbolo gene	Enzima	Cromossomo	Fenótipo
<i>Amylose-extender1</i>	<i>ae1</i>	SBEIIb	5	Vítreo, manchado, alto conteúdo de amilose
<i>Brittle1</i>	<i>bt1</i>	Translocador de adenilato	5	Semente madura colapsado, angular, translúcido e quebradiço
<i>Brittle2</i>	<i>bt2</i>	AGPase (subunidade pequena)	4	Similar ao <i>sh2</i>
<i>Dull1</i>	<i>du1</i>	SSS	10	Vítreo e manchado
<i>Shrunken2</i>	<i>sh2</i>	AGPase (subunidade grande)	3	Inflado, transparente, Sementes doces colapsam na secagem tornando angular e quebradiças
<i>Sucrose synthase</i>	<i>su1</i>	Sacarose sintase	9	Endosperma inflado que colapsa ao secar, formando sementes com endentações suaves

Continuação Tabela 1.

Gene	Símbolo gene	Enzima	Cromossomo	Fenótipo
<i>Sugary1</i>	<i>su1</i>	DBE	4	Enrugado e translúcido
<i>Sugary enhancer1</i>	<i>se1</i>	Desconhecida	2	Observado apenas em linhagens <i>su1</i> ; inflados, pálido, seca lentamente, a cor varia com o <i>background</i>
<i>Waxy1</i>	<i>wx1</i>	GBSSI	9	Opaco, endosperma cor vermelha com iodina

Fonte: Adaptada de Schultz e Juvik(2004).

ae1

Os alelos mutantes *ae1* conferem um fenótipo vítreo e manchado ao endosperma nos grãos secos e aumentam a proporção da amilose no endosperma de cerca de 25% (selvagem) a até 70% (mutantes homocigotos) (SHANNON; GARWOOD, 1984). Além disso, a amilopectina presente apresenta menos ramificações α -1,6 do que a amilopectina normal. Estas ligações são catalizadas pela enzima ramificadora de amido (SBE) e múltiplas isoformas já foram purificadas do endosperma de milho (GUAN; PREISS, 1993). Evidências genéticas e bioquímicas sugerem que *ae1* codifica SBEII. Essa relação foi confirmada por meio da comparação do clone *ae1* obtido pelo alelo induzido por transposon (*ae1-5180::Mu1*) (STINARD et al., 1993) com um clone de cDNA de milho SBEII usados para SBEII de ervilha (*Pisum sativum L.*) (FISHER et al., 1993). O transcrito *ae1* de 2,7 Kb está presente em endospermas selvagens após 20 dias da polinização, mas não é detectado em plântulas selvagens. Inúmeros alelos do *ae1* foram

isolados (revisado por STINARD et al., 1993), todos com exceção de um (*ae1-5180::Mu1*) são recessivos. Esses alelos interagem com *wx1* para produzir fenótipo de endosperma não ceroso do tipo *sh2* e produz uma plântula verde pálido. Já com *su1*, a interação resulta em semente não *sugary* quase normal na aparência. Um alelo dominante, *Ae1-5180* (STINARD et al., 1993), condiciona ao fenótipo e às interações genéticas tanto com uma dose de endosperma quanto com três doses de alelos de referência, *ae1* e *Ae1+*. A viabilidade é boa e a classificação é geralmente pobre, mas com boa *wx1* ou *su1*.

bt1

Os alelos mutantes *brittle1* (*bt1*) (MAGELSDORF, 1926; WENTZ, 1926) levam a um fenótipo murcho do grão de milho, resultante da redução do acúmulo de amido durante o desenvolvimento do endosperma. O alelo *dSpm, bt1-m::dSpm*, mostra instabilidade, tanto somática, quanto germinal, na presença de *Spm* (*Suppressor-mutator*). Usando sondas da sequência *Spm*, um fragmento de restrição deste alelo foi clonado e fragmentos não *Spm* foram usados para isolar os clones de cDNA selvagem *bt1* (SULLIVAN et al., 1991). A sequência deduzida de aminoácidos derivados do clone de cDNA contém 436 resíduos com um peptídeo de trânsito putativo de 75 aminoácidos. O polipeptídeo putativo maduro *BT1* tem similaridade de sequência com diversas proteínas envolvidas na translocação de solutos específicos através do envelope de membrana mitocondrial. Seguindo o transporte *in vivo* em cloroplastos isolados, o polipeptídeo maduro *BT1* se mostrou localizado na membrana do envelope do cloroplasto (LI et al., 1992). Imunolocalizações bioquímicas e de microscopia eletrônica indicaram que a proteína *BT1* é uma proteína de membrana do amiloplasto do endosperma (SULLIVAN; KANEKO, 1995; CAO et al., 1995). Estes achados sugerem um possível papel da proteína

BT1 como um translocador de metabólitos da membrana do amiloplasto. O mRNA *Bt1* é detectado no endosperma, mas não no embrião ou plântulas (SULLIVAN; NELSON, 1993). Um clone genômico do alelo selvagem *Bt1+W64a* foi isolado e sequenciado (T. Sullivan e S. Matino-Catt, não publicado).

A estrutura do elemento *bt1-m::dSpm* é composta por 219 pb de final 5' e 1392pb de final 3' do *Spm*, com um inserção de 1.7 Kb de sequência não *Spm* de origem desconhecida (SULLIVAN et al., 1991). Outros alelos de elementos transponíveis induzidos incluem *bt1-m2*, um alelo putativo *Spm* (R. Schmidt, não publicado); *bt1-m3::dSpm* (F. Burr, não publicado); *bt1-m4::Ds* (B. McClintock, não publicado); e *bt1-2054::um*, um alelo isolado da linhagem Robertson's *Mutator* (T. Sullivan, não publicado). Outras mutações espontâneas foram coletadas, incluindo *bt1-ON7605*, *bt1-ON7712*, *bt1-ON8123*, *bt1-ON8133* (O. Nelson, não publicado), assim como outros tantos alelos induzidos por EMS: *bt1-ON8114* (O. Nelson, não publicado); *bt1-N797*, *bt1-N2308*, *bt1-N2309* (M.G. Neuffer, não publicado); e *bt1-2903*, *bt1-2408* (T. Sullivan, não publicado). O alelo de referência *bt1-R* produz o RNA de abundância reduzida e tamanho maior do que o selvagem. *Bt1-av155*, aparentemente uma deleção derivativa espontânea (M. Alleman, não publicado), não tem nenhuma hibridação detectada com o DNA ou RNA de *bt1* (T. Sullivan, não publicado).

du1

As mutações *du1* definem um gene com uma função importante na síntese de amido, como indicado por extensas análises estruturais do amido do endosperma de mutantes *du1* e pelos efeitos dessas mutações quando combinada com outras deficiências genéticas em enzimas da via biossintética de amido (SHANNON; GARWOOD, 1984; NELSON; PAN, 1995). A mutação referência *du1-Ref* foi identificada pela primeira vez como um modificador recessivo de

su1-Ref e *su1-amyloseous (su1-am)* (MANGELSDORF, 1947). Mutações do *du1*, quando em homozigose em *backgrounds* não mutantes, resultam em grãos maduros, com uma aparência manchada, vítrea, e um pouco opaca, que é referência para o fenótipo *dull*. A expressão deste fenótipo, entretanto, depende do *background* genético (MANGELSDORF, 1947; DAVIS et al., 1955).

O teor de carboidratos totais em grãos maduros do mutante *du1* é ligeiramente inferior ao normal (CREECH, 1965; CREECH; McARDLE, 1966). O teor de amilose aparente de amido nos mutantes *du1* é um pouco ou muito elevado em comparação com o normal, dependendo do *background* genético (SHANNON; GARWOOD, 1984), embora as propriedades dos polissacarídeos da fração amilose aparente, essencialmente, não sejam alterados (DVONC Het al., 1951). Aproximadamente 15% do amido no endosperma de mutantes *du1* está na forma conhecida como “material intermediário”, que se distingue de amilose e amilopectina pelas propriedades de complexação amido-iodo (WANG et al., 1993a, 1993b). Análise das frações combinadas amilopectina/ material intermediário indicaram que o amido dos mutantes *du1* tem o maior grau de ramificação entre uma grande variedade de grãos normais e mutantes analisada (INOUCHI et al., 1987; WANG et al., 1993a, 1993b). Grânulos de amido de mutantes *du1* parecem ter propriedades estruturais e físicas normais, apesar de alguns grânulos de forma anormal serem encontrados no endosperma do mutante (SHANNON; GARWOOD, 1984).

Alelos mutantes *du1*, quando combinados com outras mutações que afetam a síntese de amido, resultam em uma ampla gama de alterações mais expressivas do que os mutantes únicos (revisto em SHANNON; GARWOOD, 1984; NELSON; PAN, 1995). Duplos mutantes contendo *du1*-conjuntamente com as mutações *wx-*, *ae-*, *su1-*, ou *su2-* aumentam o conteúdo de açúcares solúveis e reduzem o amido total em comparação com qualquer um dos

mutantes isolados. Os mutantes duplos, por vezes, produzem polissacarídeos distintos do amido encontrado em grãos dos mutantes isoladamente. Estes efeitos pleiotrópicos sugerem que o produto do *du1* pode ter efeitos amplos sobre a biossíntese de amido no endosperma de milho (GAO et al., 1998).

Coerente com seus efeitos pleiotrópicos, as mutações *du1* causam redução da atividade de duas enzimas de biossíntese de amido no endosperma aparentemente não relacionadas, SSII e SBEIIa (BOYER; PREISS, 1981). SSII é uma das duas amido-sintases identificadas na fração solúvel do endosperma de milho. A atividade de SSII *in vitro* requer um primer exógeno de glucano, e sua massa molecular nativa foi determinada em diferentes estudos como sendo de 95 ou 180 kD (BOYER; PREISS, 1981; MU et al., 1994). SBEIIa é uma das três isozimas SBE conhecidas no endosperma (BOYER; PREISS, 1978; FISHER et al., 1993, 1995; GAO et al., 1997). Assim, *du1* pode codificar para uma proteína de regulação da expressão ou atividade de SSII e SBEIIa. Outra possibilidade é que *du1* codificaria uma destas duas enzimas, e de algum modo, a deficiência primária desta enzima afetaria a atividade da segunda (GAO et al., 1998).

Seis novas mutações *du1* geradas pelo sistema *Mutator* foram identificadas. Uma parte do locus *du1* foi clonado por *transposon tagging*, e quase todo o comprimento da sequência do cDNA foi determinada. *Du1* codifica para uma proteína de 1674, que compreende uma porção que é semelhante ao SSIII de batata, bem como uma região única. Os transcritos *Du1* estão presentes no endosperma durante a biossíntese de amido, e o mRNA não foi detectado em folhas ou tecidos de raiz de milho. O tamanho predito para o produto do gene *Du1* e seu padrão de expressão são consistentes com os da SSII de milho. O produto do gene *Du1* contém duas regiões repetidas únicas no seu N-terminal. Uma delas contém uma sequência idêntica à de um segmento conservado das

SBEs (GAO et al., 1998).

sh1 e sus1

O gene *sh1* codifica a enzima sacarose sintase (SS1), que cataliza a quebra da sacarose e UDP em UDP-glicose e frutose. Os mutantes homocigotos deste gene acumulam apenas 40% do amido encontrado no endosperma de sementes selvagens (CHOUREY; NELSON, 1976). O gene foi clonado (GEISER et al., 1980, 1982; BURR; BURR, 1982; SHELDON et al., 1983), sequenciado e sua estrutura determinada por comparação do cDNA e clones genômicos (WERR et al., 1985). Estudos de hibridação *in situ* demonstraram que a expressão do *sh1* é restrita a células do endosperma que estão sintetizando amido ativamente (CHEN; CHOUREY, 1989; HEINLEIN; STARLINGER, 1989). *Sh1* é também expresso em outros tecidos, como raízes e brotos, além disso, sua expressão é induzida por anaerobiose (SPRINGER et al., 1986). O significativo aumento da expressão do gene na presença do intron 1 da *sh1* foi investigado por uma variedade de construções gênicas introduzidas em protoplastos de milho (VASIL et al., 1989; MAAS et al., 1991).

O *sus1* (antigo *ss2*, *ssB* ou *css*) é o gene estrutural para a sacarose sintase 2 (SS2), uma isoenzima da SS1. Ela está localizada a 32 unidades no mapa da *sh1* no cromossomo 9 (McCARTY et al., 1986). A linhagem contendo o alelo nulo da *sus1* é fenotipicamente selvagem (CHOUREY et al., 1988). Sondas *sh1* foram usadas para clonar o segundo gene (McCARTY et al., 1986; GUPTA et al., 1988). Ao contrário da *sh1*, *sus1* é expresso em diversos tecidos, incluindo o embrião e o pólen (McCARTY et al., 1986; CHOUREY et al., 1988; HANNAH; McCARTY, 1988). O gene *sus1* foi clonado e sua estrutura determinada pela comparação da sequência de clones genômicos com clones de cDNA isolados do endosperma e embrião (SHAW et al., 1994). A posição dos 14 primeiros introns da

sus1 e *sh1* é idêntica. O último intron da *sh1* não está presente na *sus1*. O último intron e o exon da *sh1* têm significativa similaridade de sequência, sugerindo que estes devem ter surgido de duplicação interna. As sequências dos exons de *sh1* e *sus1* são virtualmente idênticas; as sequências dos introns mostram considerável variabilidade (SHAW et al., 1994).

Os endospermas dos mutantes *shrunk* colapsam durante a secagem do grão, dando um aspecto endentado à coroa e/ou aos lados dele. O fenótipo colapsado do mutante é resultado da redução do nível de amido e a degeneração das células do endosperma em desenvolvimento. Mutantes EMS mostraram complementação interalélica (CHOUREY; NELSON, 1976). Subunidades da proteína *SH1* copolimerizam com a isoenzima *SUS1*, codificada pelo locus *sus1*, de uma maneira tecido-específica (CHOUREY et al., 1988). A germinação de grãos *shrunk* é baixa em condições de campo e as plântulas, apesar de poderem ter seu desenvolvimento retardado no início do desenvolvimento, são normais após o estabelecimento das plantas.

Os primeiros elementos *Ds* (elemento de transposição não autônomo) foram identificados por análise de *Southern blot* pelos alelos de McClintock *sh1*-m6233, *sh1*-m5933 e *sh1*-m6258 (BURR; BURR, 1981, 1982; FEDOROFF et al., 1983). Os primeiros elementos tipo *Ac/Ds* foram clonados do alelo *sh1*-m5933 (COURAGE-TEBBE et al., 1983). *Sh1*-m6933 carregam o complexo, inserção de 30 Kb no intron 7 que contém o elemento duplo *Ds* (COURAGE-TEBBE et al., 1983). *sh1*-m6795 (BURR; BURR, 1982) e *sh1*-m6258 (BURR; BURR, 1982; DORING et al., 1990) contêm inserções no intron 14. *Sh1*-m6233 (BURR; BURR, 1982; COURAGE-TEBBE et al., 1983; WECK et al., 1984; SPRINGER et al., 1986) contém o elemento duplo *Ds* no intron 1. *Sh1*-1746, *sh1*-4020, *sh1*-9026, e *sh1*-9626 foram isolados de linhagens *Mutator*. Todos têm inserções na região 5'UTR: *sh1*-

4020 e *sh1-9026* contêm elementos do tipo *Mu1*, *sh1-1746* contém uma inserção de 1.4 Kb que parece não relacionada com o *Mu1* ou *Mu1.7*, e *sh1-9626* contém uma inserção de 5.5 Kb (ANDERSON et al., 1991). *Sh1bz1-m4* é um duplo mutante, onde o alelo *bz1* é instável enquanto o gene *sh1* foi apagado (BURR; BURR, 1981). Além desses, vários outros mutantes foram descritos para o gene *Sh1* (CHOUREY; SCHWARTZ, 1971; MOTTINGER et al., 1984).

sh2 e bt2

Os genes *sh2* e *bt2* codificam as subunidades da ADP-glicose pirofosforilase no endosperma (TSAI; NELSON, 1966; HANNAH; NELSON, 1976). *sh2* (BHAVE et al., 1990) e *bt2* (BAE et al., 1990) foram clonadas e a estrutura gênica da *sh2* determinada (SHAW; HANNAH, 1992). Muitos tecidos contêm ADP-glicose pirofosforilase, porém apenas o endosperma é afetado nos mutantes *sh2* e *bt2*. Os equivalentes de *sh2* e *bt2* do embrião, *agp1* e *agp2*, respectivamente, também foram clonados (GIROUX; HANNAH, 1994).

Os grãos translúcidos dos mutantes *sh2* são grandes, estufados e muito doces na fase leitosa e colapsam durante a secagem, tornando-se angulares e quebradiços, assim como os do *bt2*. A falha da ADP-glicose pirofosforilase causa acúmulo de sacarose e lipídeos ao invés de polissacarídeos solúveis em água e amido (LAUGHNAN, 1953). Este mutante é conhecido como “superdoce” pela indústria de milho. A germinação é pobre e produz plantas menores, porém normais. Foi feita seleção para superar a má germinação e o crescimento pobre das plantas para a produção de milho doce. Os mutantes apresentam ausência do transcrito e do polipeptídeo imunorreativo (BARTON et al., 1986; PREISS et al., 1990).

O alelo *sh2* induzido Ds, *sh2-m1::Ds* foi isolado (HANNAH;

NELSON, 1976) e os revertidos apresentaram diferentes níveis de enzima e parâmetros cinéticos (TUSCHALL; HANNAH, 1982). Este mutante contém um elemento *Ds* de 1.68 Kb que pode fazer processamento perfeitamente, apesar de em baixa frequência (GIROUX et al., 1994).

Aproximadamente 30 mutantes espontâneos de *sh2* e *bt2* já foram descritos (HANNAH et al., 1980), mas a maioria não foi caracterizada ao nível molecular. O alelo de referência *sh2-R* contém uma inserção de pelo menos 7.8 Kb.

su1

su1 é expresso no grão de milho durante a biossíntese de amido. A proteína predita é um membro da família da alfa-amilase das enzimas hidrolíticas de amido e tem alta similaridade com as enzimas de bactérias que hidrolizam as ramificações α -(1,6) do amido. A proteína expressa da *su1*, *SU1*, funciona como uma isoamilase. A perda de função do gene *su1* resulta no acúmulo no endosperma de açúcares e do fitoglicogênio altamente ramificado e solúvel em água. Grãos maduros e secos portadores do genótipo *su1* têm aparência enrugada, vítrea e translúcida. O alelo mutante *su1-4582::Mu1* (*su1-m1*) foi usado para clonar uma porção do gene *su1* (JAMES et al., 1995). A estrutura do gene continua em investigação.

Os alelos *su1* incluem os seguintes mutantes espontâneos: o alelo de referência, *su1-R* (CORRENS, 1901); *su1-am* (amiláceo) (MANGELSDORF, 1947), *su1-Bn2* (Brawn, não publicado), *su1-66* (CREECH, 1968), *su1-st* (amiláceo) (DAHLSTROM; LONNQUIST, 1964), e *su1-P* (CREECH, 1968). Um mutante induzido por EMS, *su1-cr* (*crown*) foi identificado no campo por J.L. Kermicle (BRINK, 1984), e outros três mutantes foram identificados por T.D. Sullivan (*su1-2401*, *su1-2402* e *su1-2901*). Alelos mutantes de *su1* foram

identificados em elementos transponíveis, incluindo três alelos com o background *Mutator* (S.S. Robertson, M.G. James, não publicado). Estes foram designados *su1-m1* (*su1-4582::Mu1*), *su1-m2* (*su1-2412::Mu*), *su1-m3* (*sus1-3162::Mu*), *su1-m4* (*su1-7110::Mu*), *sus1-5* (*su1-8064::Mu*), *su1-m6* (*su1-489::Mu*), *su1-m7* (*su1-5051::Mu*), e *su1-m8* (*su1-3837::Mu*). Dois alelos foram identificados no background Ac/Ds: *su1-A1* e *su1-A3* (M.G. James, não publicado). Oito alelos foram identificados no background Em (*Spm*) (P.A. Peterson, não publicado): *su1-8101-3*, *su1-Ac30394*, *su1-Ac30396*, *su1-Ac30397*, *su1-Ac30398*, *su1-Ac30399*, *su1-30400*, e *su1-30401*. Cada uma destas mutações é recessiva.

Fenotipicamente, *su1-am*, *su1-66*, e *su1-P* são normais e apresentam o fenótipo *sugary* apenas como duplo mutantes com *du1* ou *su2*. O alelo *su1-st* é quase normal na sua aparência. Os alelos *su1-Bn2*, *su-cr*, e *su1-2412* mostram variações intermediárias do fenótipo em relação a *sus1-R*. Ambos *su1-Bn2* e *su1-st* são alelos recessivos de *su1-R*, onde *su1-am*, *ss1-66*, e *sus-P* são semidominantes.

wx1

wx1 codifica a enzima glucosil transferase amido sintase granular (GBSS) responsável pela biossíntese de amilose no endosperma, pólen e saco embrionário (NELSON; RINES, 1962). Nessa mutação o endosperma é opaco composto quase inteiramente de amilopectina (coloração vermelha em presença de iodo), que substitui a amilose (coloração azul) também no pólen e saco embrionário. A aparência opaca não é vista até a semente secar completamente. Este gene foi clonado por Shure et al. (1983) e sua sequência, determinada por Klosgen et al. (1986). A caracterização de diversos alelos não mutantes *Wx1* revelou significativo RFLP resultado de ambas as inserções na sequência 5' flanqueadoras (WESSLER; VARAGONA, 1985; SPELL et al., 1988) e uma

pequena deleção no intron 6 (WESSLER et al., 1990). A sequência transiente, responsável pela localização da proteína *waxy* para o amiloplasto já foi caracterizada (KLOSGEN et al., 1989; KLOSGEN; WEIL, 1991).

Os alelos *wx1* formam uma das melhores coleções de mutantes dentre as plantas superiores. Nelson (1968) gerou um mapa genético da maioria destas mutações e Wessler e Varagona (1985) revelaram uma excelente correlação entre os mapas físicos e genéticos.

Os alelos *wx1* foram a fonte do primeiro elemento *Ac* clonado do *wx1-m9* (FEDOROFF et al., 1983), elemento *dSpm* do *wx1-m8* (SCHWARZ-SOMMER, et al., 1985), e elemento *Em/Spm* do *wx1-844::Em* (PEREIRA et al., 1985, 1986). O elemento *Ac* do *wx1-m9* e *wx1-m7* foi sequenciado e foi descoberto que eram idênticos (MULLER-NEUMANN et al., 1984). Outro alelo *Ac*, *wx1-B3*, também foi clonado (BARAN et al., 1992). Os alelos *Ds* do *waxy* incluem *wx1-m1* (elemento *Ds1*) (WESSLER et al., 1986), *wx1-m5* (WEIL et al., 1992), *wx1-m6* (FEDOROFF et al., 1983), *wx1-m9* (deleção derivada do *Ac wx1-m9*) (FEDOROFF et al., 1983; POHLMAN et al., 1984) e *wx1-B4* (elemento *Ds2*) (WESSLER et al., 1987; VARAGONA; WESSLER, 1990). O alelo fenotipicamente selvagem *Wx1-m5* tem um elemento *Ds* na posição -470 na região flanqueadora 5'. A transposição deste *Ds* no gene *waxy* (resultando em derivados instáveis nulos) revelou uma transposição intragênica do *Ds* que ocorre em alta frequência (WEIL et al., 1992). Derivados do *Wx1-m5* contendo dois elementos *Ds* levaram a uma quebra do cromossomo 9. Análise destes derivados proporcionou evidência molecular que a quebra de cromossomos resultam de eventos de transposição aberrantes. Os elementos *Ds* do *wx1-m1*, *wx1-m9*, e *wx1-B4* são processados de um pré-mRNA (WESSLER et al., 1987; WESSLER, 1991a, b; PURUGGANAN; WESSLER, 1992). O alelo *wx1-Mu5* contém o elemento *Mu8* (FLEENOR et al., 1990).

Wx1-Stonor, *wx1*-G, *wx1*-I/K, *wx1*-M, e *wx1*-B5 contêm inserções de retrotransposon de 4.5-6.2 Kb (VARAGONA et al., 1992; PURUGGANAN; WESSLER, 1994; WHITE et al., 1994) A expressão remanescente *wx1* dos alelos *wx1*-stonor, *wx1*-G e *wx1*-B5 se deve à leitura direta seguida por processamento da sequência do retroelemento do pré-mRNA *wx1* (VARAGONA et al., 1992). A inserção de 5.7 Kb do alelo *wx1*-M (designada magellan) é um retrotransposon do tipo 'gypsy' que tem sido usado como ferramenta para endereçar questões sobre a evolução dos retrotransposons m milho e seus parentes selvagens (PURUGGANAN; WESSLER, 1994). Os alelos *wx1*-I e *wx1*-K são presumidamente idênticos, tendo eles insertos de 4.8 Kb do retrotransposon do tipo 'copia' (designado Hopscotch) (WHITE et al., 1994) no mesmo sítio no exon 12. *Wx1*-B1, *wx1*-B, *wx1*-B6, e *ex1*-C4 são deleções com estruturas incomuns (WESSLER et al., 1990). *wx1*-1240 foi induzido por EMS (etil metanosulfanato) e tem a mesma deleção de 30 pb que o alelo espontâneo de referência *wx1*-C (OKAGAKI et al., 1991). *wx1*-BI2 é provavelmente um contaminante de *wx1*-C (OKAGAKI et al., 1991).

Conclusão

Uma das razões pelas quais o milho doce não é muito difundido no Brasil é a falta de sementes, o que leva o consumidor ao desconhecimento deste tipo de milho. Este mercado, no entanto tende a crescer, uma vez que as características exigidas pelo consumidor são diferentes daquelas presentes no milho verde comum. O milho doce tende a ter uma maior concentração de açúcares e uma menor concentração de amido, resultando em produtos com características sensoriais melhoradas, incluindo atributos como a doçura e a maciez. A concentração de açúcares dos milhos doces mais comuns, *su* e *se*, variam de 9-16% e 14-35% e do milho superdoce, *sh2*, varia de 28-44%. Novos híbridos com

diferentes combinações de mutações e dosagens alélicas podem ainda surgir no mercado, atendendo às diferentes demandas do consumidor e das indústrias alimentícias nos aspectos grau de açúcar e qualidade.

Referências

- ANDERSON, J. M.; ROBERTSON, D. S.; MORRIS, D. W. Molecular characterization of four shrunken mutations induced in Mutator lines in *Zea Mays* L. **Plant Science**, Limerick, v. 77, p. 93-101, 1991.
- BAE, J. M.; GIROUX, M.; HANNAH, L. C. Cloning and characterization of the *brittle-2* gene of maize. **Maydica**, Bergamo, v. 35, p. 317-322, 1990.
- BARAN, G.; ECHT, C.; BUREAU, T.; WESSLER, S. Molecular analysis of the maize wx-B3 allele indicates that precise excision of the transposable Ac element is rare. **Genetics**, Maryland, v. 130, p. 377-384, 1992.
- BARTON, C.; YANG, L.; GALVIN, M.; SENGUPTA-GOPALAN, C.; BORELLI, T. Isolation of the Shrunken-2 and Brittle-2 genes from maize. In: SHANNON, J. C.; KNIEVEL, D. P.; BOYER, C. D. (Ed.). **Regulation of carbon and nitrogen reduction and utilization in maize**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1986. p. 363-365.
- BHAVE, M. R.; LAWRENCE, S.; BARTON, C.; HANNAH, L. C. Identification and molecular characterization of *shrunken-2* cDNA clones of maize. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 581-588, 1990.
- BOYER, C. D.; PREISS, J. Multiple forms of starch branching enzyme of maize: evidence for independent genetic control. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 80, p. 169-175, 1978.
- BOYER, C. D.; PREISS, J. Evidence for independent genetic control

of the multiple forms of maize endosperm branching enzymes and starch synthases. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 67, p. 1141-1145, 1981.

BOYER, C. D.; SHANNON, J. C. The use of endosperm genes for sweet corn improvement. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 1, p. 139-151, 1983.

BRINK, R. A. Maize endosperm mutants affecting soluble carbohydrate content as potential additives in preparing silage form high protein forages. **Maydica**, Bergamo, v. 29, p. 265-286, 1984.

BURR, B.; BURR, F. A. Controlling element events at the *Shrunken* locus in maize. **Genetics**, Austin, v. 98, p. 143-156, 1981.

BURR, B.; BURR, F. A. Three mutations in *Zea mays* affecting zein accumulation: a comparison of zein polypeptides, in vitro synthesis and processing, mRNA levels, and genomic organization. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 94, p. 201-206, 1982.

CAO, H. P.; DULLIVAN, T. D.; BOYER, C. D.; SHANNON, J. C. Bt1, a structural gene for the major 39-44 kDa amyloplast membrane polypeptides. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 95, p. 176-186, 1995.

CHEN, Y. C.; CHOUREY, P. S. Spatial and temporal expression of the two sucrose synthase genes in maize: imunohistological evidence. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 78, p. 553-559, 1989.

CHOUREY, P. S.; SCHWARTZ, D. Ethyl methansulfonate-induced mutations of the Sh1 protein in maize. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 12, p. 151-157, 1971.

CHOUREY, P. S.; NELSON, O. E. The enzymatic deficiency conditioned by *shrunken-1* mutations in maize. **Biochemical Genetics**, New York, v. 14, p. 1041-1055, 1976.

CHOUREY, P. S. Genetic control of sucrose synthase in maize

endosperm. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 184, p. 372-376, 1981.

CHOUREY, P. S.; DEROBERTIS, G. A.; STILL, P. E. Altered tissue specificity of the revertant shrunken allele upon dissociation (Ds) excision is associated with loss of expression and molecular rearrangement at the corresponding non-allelic isozyme locus in maize. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 214, p. 300-306, 1988.

CHOUREY, P. S.; TALIERCIO, E. W.; CARLSON, S. J.; RUAN, Y. L. Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 259, p. 88-96, 1998.

CLARK, J. K.; SHERIDAN, W. F. Characterization of the two embryo-lethal defective kernel mutants *rg^h*-1210* and *fl^{*}-1253B*: effects on embryo and gametophyte development. **Genetics**, Austin, v. 120, p. 279-290, 1988.

CLAYTON, W. D. The species of Andropogoneae. **Kew Bulletin**, London, v. 28, p. 49-58, 1973.

CLAYTON, W. D. Notes on tribe andropogoneae (Gramineae). **Kew Bulletin**, London, v. 35, p. 813-818, 1983.

COURAGE-TEBBE, U.; DORING, H. P.; FEDORROFF, N.; STARLINGER, P. The controlling element Ds at the *Shrunken* locus in *Zea mays*: Structure of the unstable *sh-m5933* allele and several revertants. **Cell**, Cambridge, v. 34, p. 383-393, 1983.

CORRENS, C. **Bastarde zwischen Maisrassen mit besonderer Berucksichtigung der Xenien**. Stuttgart: E. Nägele, 1901. 161 p. (Bibliotheca Botânica, 53).

CREECH, R. G. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. **Genetics**, Austin, v. 52, p. 1175-1186, 1965.

CREECH, R. G.; MCARDLE, F. J. Gene interaction for quantitative changes in carbohydrates in maize kernels. **Crop Science**, Madison, v. 6, p. 192-194, 1966. CREECH, R. G. Carbohydrate synthesis in maize. **Advances Agronomy**, New York, v. , 20, p. 275-322, 1968.

DAHLSTROM, D. E.; LONNQUIST, J. H. A new allele at the *Sugary1* locus in maize. **Journal of Heredity**, Washington, v. 55, p. 242-246, 1964.

DAVIS, J. H.; KRAMER, H. H.; WHISTLER, R. L. Expression of the gene *du* in the endosperm of maize. **Agronomy Journal**, Madison, v. 47, p. 232-235, 1955.

DENYER, K.; DUNLAP, F.; THORBJORNSEN, T.; KWWLING, P.; SMITH, A. M. The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra plastidial. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 112, p. 779-785, 1996.

DORING, H. P.; PAHL, I.; DURAMY, M. Chromosomal rearrangements caused by the aberrant transposition of double Ds elements are formed by Ds and adjacent non-Ds sequences. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 224, p. 40-48, 1990.

DVONCH, W.; KRAMER, H. H.; WHISTLER, R. L. Polysaccharides of high amylose corn. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 28, p. 270-280, 1951.

ECHT, C. S.; CHOUREY, P. S. A comparison of two sucrose synthatase isozymes from normal and *shrunk-1* maize. **Plant Physiology**, Washington, v. 79, p. 530-536, 1985.

FEDOROFF, N. V. Controlling elements in maize. In: SHAPIRO, J. A. (Ed.). **Mobile genetic elements**. New York: Academic Press, 1983. p. 1-63.

- FEDOROFF, N.; WESSLER, S.; SHURE, M. Isolation of the transposable maize controlling elements *Ac* and *Ds*. **Cell**, Cambridge, v. 35, p. 235-242, 1983.
- FERGUSON, J. E.; RHODES, A. M.; DICKINSON, D. N. The genetics of *sugary enhancer (se)*, an independent modifier of sweet corn (*su*). **Hereditas**, Lund, v. 69, p. 377-380, 1978.
- FISHER, D. K.; BOYER, C. D.; HANNAH, C. L. Starch branching enzyme II from maize endosperm. **Plant Physiology**, Washington, v. 102, p. 1045-1046, 1993.
- FISHER, D. K.; KIM, K.-N.; GAO, M.; BOYER, C. D.; GUILTINAN, M. J. A cDNA encoding starch branching enzyme I from maize endosperm. **Plant Physiology**, Washington, v. 108, p. 1313-1314, 1995.
- FLEENOR, D.; SPELL, M.; ROBERTSON, D.; WESSLER, S. Nucleotide sequence of the maize *Mutator* element, *Mu8*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6725, 1990.
- GAO, M.; WANAT, J.; STINARD, P. S.; JAMES, M. G.; MYERS, A. M. Characterization of *dull1*, a maize gene coding for a novel starch synthase. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 399-412, 1998.
- GAO, M.; FISHER, D. K.; KIM, K.-N.; SHANNON, J. C.; GUILTINAN, M. J. Independent genetic control of maize starch-branching enzymes IIa and IIb. **Plant Physiology**, Washington, v. 114, p. 69-78, 1997.
- GEISER, M.; DORING, H. P.; WOSTEMEYER, J.; BEHRENS, U.; TILLMAN, E.; STARLINGER, P. A cDNA clone from *Zea mays* endosperm for sucrose synthase mRNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 8, p. 6175-6188, 1980.
- GEISER, M.; WECK, E.; DORING, H. P.; WERR, W. U.; COURAGE-TEBBE, U.; TILLMAN, E.; STARLINGER, P. Genomic clones of a wild-type allele and a transposable element-induced

mutant allele of the sucrose synthase gene of *Zea mays* L. **EMBO Journal**, Oxford, v. 1, p. 1455-1460, 1982.

GIROUX, M. J.; HANNAH, L. C. ADP-glucose pyrophosphorylase in *shrunk-2* and *brittle-2* mutants of maize. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 243, p. 400-408, 1994.

GIROUX, M. J.; CLANCY, M.; BAIER, J.; INGHAM, L.; McCARTY, D.; HANNAH, L. C. De novo synthesis of an intron by the maize transposable element dissociation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 12150-12154, 1994.

GUAN, H. P.; PREISS, J. Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). **Plant Physiology**, Washington, v. 102, p. 1269-1273, 1993.

GUPTA, M.; CHOUREY, P. S.; BURR, B.; STILL, P. E. cDNA of two non-allelic sucrose synthase genes in maize: cloning, expression, characterization and molecular mapping of the *sucrose synthase-2* gene. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 10, p. 215-224, 1988.

HANNAH, L. C.; NELSON, O. E. Characterization of ADP-glucose pyrophosphorylase from *shrunk-2* and *brittle-2* mutants of maize. **Biochemical Genetics**, New York, v. 14, p. 547-560, 1976.

HANNAH, L. C.; TUSCHALL, D. M.; MANS, R. J. Multiple forms of maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase and their control in *shrunk-2* and *brittle-2*. **Genetics**, Austin, v. 95, p. 961-970, 1980.

HANNAH, L. C.; McCARTY, D. R. Mature pollen contains transcripts of the constitutive sucrose synthase (*Css*) gene. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v. 62, p. 59-60, 1988.

HANNAH, L. C.; GIROUX, M.; BOYER, C. Biotechnological modification of carbohydrates for sweet corn and maize improvement. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 55, p. 177-

197, 1993.

HEINLEIN, M.; STARLINGER, P. Tissue and cell-specific expression of the two sucrose synthase isoenzymes in developing maize kernels. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 215, p. 441-446, 1989.

INOUCHI, N.; GLOVER, D. V.; FUWA, H. Chain length distribution of amylopectins of several single mutants and the normal counterpart, and *sugary-1* phytoglycogen in maize. **Starch Staerke**, Weinheim, v. 39, p. 259-265, 1987.

JAMES, M. G.; ROBERTSON, D. S.; MYERS, A. M. Characterization of the maize gene *Sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 417-428, 1995.

KLOSGEN, R. B.; GIERL, A.; SCHWARZ-SOMMER, Z.; SAEDLER, H. Molecular analysis of the *waxy* locus of *Zea mays*. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 203, p. 237-244, 1986.

KLOSGEN, R. B.; SAEDLER, H.; WEIL, J. H. The amyloplast-targeting transit peptide of the *waxy* protein of maize also mediates protein transport in vitro into chloroplasts. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 217, p. 155-161, 1989.

KLOSGEN, R. B.; WEIL, J. H. Subcellular location and expression level of a chimeric protein consisting of the maize *waxy* transit peptide and the B-glucuronidase of *Escherichia coli* transgenic potato plants. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 225, p. 297-304, 1991.

LAUGHNAN, J. R. The effect of *sh2* factor on carbohydrate reserves in the mature endosperm of maize. **Genetics**, Austin, v. 38, p. 485-499, 1953.

LAZZERI, E. L.; SHEWRY, P. R. Biotechnology of cereals. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Pontland, v. 11, p. 79-146, 1993.

LI, H. M.; SULLIVAN, T. D.; KEEGSRA, K. Information for targeting to the chloroplastic inner envelope membrane is contained in the mature region of the maize *Bt1*-encoded protein. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, p. 18999-19004, 1992.

LOPES, M. A.; LARKINS, B. A. Endosperm origin, development and function. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1383-1389, 1993.

LUR, H. S.; SETTER, T. L. Role of auxin in maize endosperm development (timing of nuclear DNA endoreduplication, zein expression, and cytokinin). **Plant Physiology**, Bethesda, v. 103, p. 273-280, 1993.

MAAS, C.; LAUFS, J.; GRANT, S.; KORFHAGE, C.; WERR, W. The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize *Shrunken-1* gene with the following intron-1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 16, p. 199-207, 1991.

MANGELSDORF, P. C. The inheritance of amylaceous sugary endosperm and its derivatives in maize. **Genetics**, Austin, v. 32, p. 448-458, 1947.

MARTIN, C.; SMITH, A. M. Starch biosynthesis. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 971-98, 1995.

McCARTY, D.R.; SHAW, J. R.; HANNAH, L. C. The cloning, genetic mapping, and expression of the constitutive sucrose synthase locus of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America**, Washington, v. 83, p. 9099-9103, 1986.

MOTTINGER, J. P.; DELLAPORTA, S. L.; KELLER, P. B. Stable and unstable mutations in aberrant ration stocks of maize. **Genetics**, Austin, v. 106, p. 751-767, 1984.

MU, C.; HARN, C.; KO, Y.-T.; SINGLETARY, G. W.; KEELING, P. L.; WASSERMAN, B. P. Association of a 76 kDa polypeptide with

soluble starch synthase I activity in maize (cv B73) endosperm. **The Plant Journal**, v. 6, p. 151-159, 1994.

MULLER-NEUMANN, M.; YODER, J. I.; STARLINGER, P. The DNA sequence of the transposable element *Ac* of *Zea mays* L. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 198, p. 18-24, 1984.

NELSON, O. E.; RINES, H. W. The enzymatic deficiency in the *waxy* mutant of maize. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, New York, v. 131, p. 297-300, 1962.

NELSON, O. E.; PAN, D. Starch synthesis in maize endosperms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 475-496, 1995.

NELSON, O. E. The *waxy* locus in maize. II. The location of the controlling alleles. **Genetics**, Austin, v. 60, p. 507-524, 1968.

NEUFFER, M. G.; COE, E. H.; WESSLER, S. R. **Mutants of maize**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

OKAGAKI, R. J.; NEUFFER, M. G.; WESSLER, S. R. A deletion common to two independently derived *waxy* mutations of maize. **Genetics**, Austin, v. 128, p. 425-431, 1991.

PEREIRA, A.; SCHWARZ-SOMMER, Z.; GIERL, A.; BERTRAM, I.; PETERSON, P. A.; SAEDLER, H. Genetic and molecular analysis of the Enhancer (En) transposable element system of *Zea mays*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 4, p. 17-23, 1985.

PEREIRA, A.; CUYPERS, H.; GIERLS, A.; SCHWARZ-SOMMER, Z.; SAEDLER, H. Molecular analysis of the En/Spm transposable element system of *Zea mays*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 5, p. 835-841, 1986.

POHLMAN, R. F.; FEDOROFF, N. V.; MESSING, J. The nucleotide sequence of the maize controlling element *Activator*. **Cell**, Cambridge, v. 37, p. 635-643, 1984.

PREISS, J.; DANNER, S.; SUMMERS, P. S.; MORELL, M.; BARTON, C.R.; YANG, L.; NIEDER, M. Molecular characterization of the *brittle-2* gene effect on maize endosperm ADP glucose pyrophosphorylase subunits. **Plant Physiology**, Washington, v. 92, p. 881-885, 1990.

PURUGGANAN, M.; WESSLER, S. The splicing of transposable elements and its role in intron evolution. **Genética**, Dordrecht, v. 86, p. 295-303, 1992.

PURUGGANAN, M.; WESSLER, S. Molecular evolution of Magellan, a maize *Ty3/gypsy*-like retrotransposon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 11674-11678, 1994.

RUSSELL, S. D. Double fertilization. **International Review of Cytology**, New York, v. 140, p. 357-388, 1992.

SABELLI, P. A.; LARKINS, B. A. The development of endosperm in grasses. **Plant Physiology**, Washington, v. 149, p. 14-26, 2009.

SCHULTZ, J. A.; JUVIK, J. A. Current models for starch synthesis and the *sugary enhancer1* (*se1*) mutation in *Zea mays*). **Plant Physiology and Biochemistry**, Kalyani, v. 42, p. 457-464, 2004.

SCHWARZ-SOMMER, Z.; GIERL, A.; BERNDTGEN, R.; SAEDLER, H. Sequence comparison of 'states' of *a1-m1* suggests a model *Spm* (En) action. **EMBO Journal**, Oxford, v. 4, p. 2439-2443, 1985.

SHANNON, J. C.; GARWOOD, D. L. Genetics and physiology of starch development. In: WHISTLER, R. L. (Ed.). **Starch chemistry and technology**. Orlando: Academic Press, 1984. p. 25-86.

SHANNON, J. C.; PIEN, F. M.; CAO, H.; LIU, K. C. *Brittle-1*, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplasmidial synthesized ADP-glucose into amyloplasts of maize endosperm. **Plant Physiology**, Washington, v. 117, p. 1235-1252, 1998.

SHAW, J. R.; HANNAH, L. C. Genomic nucleotide sequence of

a wild-type shrunken-2 allele of *Zea mays*. **Plant Physiology**, Washington, v. 98, p. 1214-1216, 1992.

SHAW, J. R.; FERL, R. J.; BAIER, J.; ST.CLAIR, D.; CARSON, C.; MCCARTY, D. R.; HANNAH, L. C. Structural features of the maize *sus1* gene and protein. **Plant Physiology**, Washington, v. 106, p. 1659-1665, 1994.

SHELDON, E.; FERL, R.; FEDOROFF, N.; HANNAH, L. C. Isolation and analysis of a genomic clone encoding sucrose synthetase in maize: evidence for two introns in *Sh*. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 190, p. 421-426, 1983.

SHEWRY, P. R.; CASEY, R. **Seed proteins**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999.

SHURE, M. S.; WESSLER, S.; FEDOROFF, N. Molecular identification and isolation of the *waxy* locus in maize. **Cell**, Cambridge, v. 35, p. 225-233, 1983.

SPELL, M. L.; BARAN, G.; WESSLER, S. R. An RFLP adjacent of the maize *waxy* gene has the structure of a transposable element. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 211, p. 364-366, 1988.

SPIELBAUER, G.; MARGL, L.; HANNAH, L. C.; ROMISCH, W.; ETTENHUBER, C.; BACHER, A.; GIERL, A.; EISENREICH, W.; GENSCHEL, U. Robustness of central carbohydrate metabolism in developing maize kernels. **Phytochemistry**, Pergamon, v. 67, p. 1460-1475, 2006.

SPRINGER, B.; WERR, W.; STARLINGER, D. C.; BENNETT, D. C.; ZOKOLICA, M.; FREELING, M. The Shrunken gene on chromosome 9 of *Zea mays* L. is expressed in various plant tissues and encodes an anaerobic protein. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 205, p. 461-468, 1986.

STINARD, P. S.; ROBERTSON, D. S.; SCHNABLE, P. S. Genetic

isolation, cloning, and analysis of a *Mutator*-induced, dominant antimorph of the maize *amylose extender1* locus. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1555-1566, 1993.

SULLIVAN, T. D.; STRELOW, C. A.; ILLIGWORTH, R. L.; PHILLIPS, R. L.; NELSON, O. E. Analysis of maize *brittle-1* alleles and a defective Suppressor-mutator-induced mutable allele. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, p. 1337-1348, 1991.

SULLIVAN, T. D.; NELSON, O. E. The *brittle1* locus encodes an amyloplast membrane protein. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, p. 676-677, 1993.

SULLIVAN, T. D.; KANEKO, Y. The maize *brittle 1* gene encodes amyloplast membrane polypeptides. **Planta**, Berlin, v. 196, p. 477-484, 1995.

TSAI, C. Y.; NELSON, O. E. Starch deficient maize mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. **Science**, Washington, v. 151, p. 341-343, 1966.

TUSCHALL, D. M.; HANNAH, L. C. Altered maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylases from revertants of a *shrunken-2 dissociation* allele. **Genetics**, Austin, v. 100, p. 105-111, 1982.

VARAGONA, M. J.; WESSLER, S. R. Implications for the cis-requirements for *Ds* transposition based on the sequence of *wxB4 Ds* element. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 220, p. 414-418, 1990.

VARAGONA, M. J.; PURUGGANAN, M.; WESSLER, S. R. Alternative splicing induced by insertion of retrotransposons into the maize *waxy* gene. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 811-820, 1992.

VASIL, V.; CLANCY, M.; FERL, R. J.; VASIL, I. K.; HANNAH, L. C. Increased gene expression by the first intron of maize *Shrunken-1* locus in grass species. **Plant Physiology**, Washington, v. 91, p. 1575-1579, 1989.

- WANG, Y.-J.; WHITE, P.; POLLAK, L.; JANE, J.-L. Amylopectin and intermediate materials in starches from mutant genotypes of the Oh43 inbred line. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. **70**, p. 521-525, 1993a. WANG, Y. J.; WHITE, P.; POLLACK, L.; JANE, J. L. Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with Oh43 inbred line background. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 70, p. 171-179, 1993b.
- WECK, E.; COURAGE, U.; DORING, H. P.; FEDEROFF, N.; STARLINGER, P. Analysis of sh-m6233, a mutation induced by the transposable element Ds in the sucrose synthase gene of *Zea mays*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 3, p. 1713-1716, 1984.
- WEIL, C. F.; MARILLONNET, S.; BURR, B.; WESSLER, S. R. Changes in state of the Wx-m5 allele of maize are due to intragenic transposition of Ds. **Genetics**, Austin, v. 130, p. 175-185, 1992.
- WENTZ, J. B. Heritable characters of maize. **Journal of Heredity**, Washington, v. 17, p. 327-329, 1926.
- WERR, W.; FROMMER, W. B.; MAAS, C.; STARLINGER, P. Structure of the sucrose synthase gene on chromosome 9 of *Zea mays* L. **EMBO Journal**, Oxford, v. 4, p. 1373-1380, 1985.
- WESSLER, S. R.; VARAGONA, M. J. Molecular basis of mutations at the waxy locus of maize: correlation with the fine structure genetic map. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America**, Washington, v. 82, p. 4177-4181, 1985.
- WESSLER, S. R.; BARAN, G.; VARAGONA, M.; DELLAPORTA, S. L. Excision of Ds produces waxy proteins with a range of enzymatic activities. **EMBO Journal**, Oxford, v. 5, p. 2427-2432, 1986.
- WESSLER, S. R.; BARAN, G.; VARAGONA, M. The maize transposable element Ds is spliced from RNA. **Science**, Washington, v. 237, p. 916-918, 1987.

WESSLER, S. R.; TARPLEY, M.; PURUGGANAN, M.; SPELL, M.; OKAGAKI, R. Filler DNA is associated with spontaneous deletions in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 8731-8735, 1990.

WESSLER, S. R. Alternative splicing of a Ds element from exon sequences may account for two forms of Wx protein encoded by wx-m9 allele. **Maydica**, Bergamo, v. 36, p. 317-322, 1991a.

WESSLER, S. R. The maize transposable *Ds1* element is alternatively spliced from exon sequences. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 11, p. 6192-6196, 1991b.

WHITE, S. E.; HABERA, L. F.; WESSLER, S. R. Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a role for *copia*-like elements in the evolution of gene structure and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 11792-11796, 1994.

WINTER, H.; HUBER, S. C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 19, p. 31-67, 2000.

Embrapa

Milho e Sorgo



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

