

ESTUDO SOBRE A VIABILIDADE DA PRODUÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO POR MEIO DE CULTURA DE ANTERAS¹

Carlos Henrique S. Carvalho²
Paula Cristina da S. Angelo³
Ricardo Magnavaca²
Elto Eugênio Gomes e Gama²

1. INTRODUÇÃO

No melhoramento de cereais, a obtenção de linhagens mediante autofecundações no campo, normalmente, consome de dois a três anos. Como alternativa para esse processo, a cultura de anteras *in vitro* possibilita a obtenção de haplóides em apenas alguns meses. Após serem diploidizadas, estas plantas podem originar linhagens homozigotas, proporcionando economia de tempo e espaço.

Para alguns cereais, como o arroz e o trigo, a cultura de anteras tem sido de grande auxílio na produção de linhagens, em programas de melhoramento. O arroz se destaca, com mais de 100.000 ha plantados, com variedades obtidas via cultura de anteras, principalmente na China (6, 11).

No entanto, no caso do milho, a cultura de anteras para a produção de linhagens ainda precisa de adaptações, para que se torne técnica rotineira. A produção de plantas de milho a partir de pólen tem sido mencionada na literatura desde 1974, mas apenas os chineses eram capazes de utilizar esta metodologia para o desenvolvimento de linhagens (18, 27).

¹ Projeto financiado pela FAPEMIG.

² Aceito para publicação em 04.11.1994.

CNPMS/EMBRAPA. Rod. MG 242, Km 65, Cx. Postal 151. 35600-970 Sete Lagoas, MG.

³ BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa. 36571-000 Viçosa, MG.

A maioria das pesquisas com sucesso, fora da China, envolveram germoplasma de pouca importância comercial (28). Apenas em 1986 material de valor comercial, com boa capacidade de regeneração, foi encontrado nos Estados Unidos (7, 22, 23).

Os maiores empecilhos para a utilização em larga escala da cultura de anteras, no caso do milho, são a responsividade baixa do material quanto à formação de calos, característica que está sob controle genético e, portanto, é dependente do genótipo utilizado; as dificuldades associadas à regeneração de plantas e à duplicação de cromossomas (13); e a produção de plantas estéreis e albinas (24).

Vários fatores, como a alteração das concentrações e dos tipos de reguladores de crescimento usados (2, 3, 4, 10, 12), o pré-tratamento dos pendões (12) e o estágio de desenvolvimento do pólen que vai ser cultivado (15, 16, 19), têm sido estudados, procurando-se solucionar estes problemas. Todavia, a capacidade androgenética de cada genótipo parece ser o fator decisivo para a regeneração *in vitro* (3, 23).

Os objetivos deste trabalho foram estabelecer protocolos para o cultivo de anteras de milho *in vitro*, visando à produção de linhagens, e avaliar a possibilidade da incorporação dessa técnica em um programa de melhoramento, para condições tropicais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram testados 37 materiais de origem tropical e subtropical (Quadro 1), sendo utilizadas, no mínimo, duas plantas de cada genótipo. As plantas doadoras de pendões foram cultivadas nos campos experimentais do CNPMS/EMBRAPA, irrigadas regularmente, não sendo submetidas a tratamento especial. Os pendões foram coletados no estágio de cartucho fechado e estocados a 8° C, no escuro, em sacos plásticos, por um ou dois dias, até a esterilização. As coletas foram realizadas em agosto, outubro, novembro e dezembro de 1991, no Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo/EMBRAPA, Sete Lagoas, MG.

Para a determinação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos foram retiradas espiguetas de quatro segmentos diferentes do pendão. O corante usado foi o carmim propiônico, a 2% (29), que ficou em contato com os micrósporos por cerca de cinco minutos, seguindo-se a colocação das lamínulas, aquecimento suave e lutagem. Em alguns casos, a observação das lâminas foi melhor no dia seguinte ao do preparo. Foram selecionados os segmentos do pendão que continham micrósporos uninucleados, precoces a intermediários (5).

A viabilidade dos micrósporos foi estimada, verificando-se a integridade da membrana citoplasmática. Para isso, utilizou-se a técnica de

QUADRO 1 - Base genética e número de genótipos de milho testados em cultura de anteras

Germoplasma de origem	Nº de genótipos testados
BR 105 - Suwan (8)*	5
BR 112 - Pool 22 CIMMYT (8)*	3
BR 111 - Pool 21 CIMMYT (8)*	2
CMS 01 - Mezcla Amarilla - CNPMS	1
BR 106 - Variedade Tuxpeño - CNPMS	1
CMS 17 - Pool 34 CIMMYT (5)*	1
CMS 03 - Amarillo Cristalino	2
CMS 15 - Pool 26 CIMMYT (2)*	2
CMS 24 - Amarillo Subtropical	1
Progênies obtidas de materiais comerciais (baixa endogamia)	19

* - Número de ciclos de seleção realizados no CNPMS.

fluorescência enzimaticamente induzida, com o emprego de diacetato de fluoresceína a 2% em acetona, diluído em solução de sacarose, fazendo-se observação a fresco em microscópio de fluorescência (14). A percentagem de células viáveis representou o número de micrósporos fluorescentes observados, em relação ao total contado, nunca menor que 500, retirados de, em média, nove anteras por pendão. O teste foi aplicado no dia da coleta ou no dia seguinte e, em alguns casos, depois da esterilização.

Para a esterilização dos pendões, o material, ainda envolvido no cartucho, foi lavado em água de torneira, com a retirada dos resíduos de terra trazidos do campo. Após a abertura dos cartuchos, os pendões foram lavados em água destilada corrente e banhados rapidamente em álcool, a 70%. Os segmentos úteis das inflorescências (segmentos contendo micrósporos uninucleados) foram excisados e passaram para a fase seguinte de esterilização, sob fluxo laminar. Foram testadas duas soluções para esterilização: a) água sanitária comercial, a 30% + Tween20, a 0,02%; e b) hipoclorito de sódio, a 3% + Tween 20, a 0,02%. Os pendões permaneciam imersos na solução de esterilização por 15 minutos e, a seguir, recebiam três banhos de água autoclavada, sempre com agitação manual.

Depois da esterilização, os pendões foram colocados em pré-

tratamento, a 8° C, por quatro a 15 dias, até o plaqueamento. Testou-se também o pré-tratamento de plantas inteiras antes da coleta das inflorescências. Nesse caso, plantas de milho com o cartucho em formação e cultivadas a 26° C foram submetidas a uma queda de cerca de 1,4° C/dia até atingir 15° C e, em seguida, a uma elevação de temperatura, também gradual, até a retomada dos 26° C, quando os pendões foram coletados, avaliados, esterilizados e mantidos a 8° C, por mais sete dias, até o plaqueamento das anteras.

Para a indução e manutenção dos calos, foram testados os meios de SUN *et alii* (26), GENOVESI e COLLINS (12), substituindo-se o TIBA por 30 µM de Dicamba, e PESCIPELLI *et alii* (21). Para a regeneração de plantas foram usados os mesmos meios de indução e manutenção de calos, mas sem a presença de reguladores de crescimento. Os meios foram autoclavados a 120° C, por 20 minutos, e em seguida vertidos em placas de Petri, de 100 x 15 mm, na proporção de aproximadamente 25 ml/placa.

Foram colocadas 72 anteras por placa, com a face lateral tocando o meio nutritivo (30). As placas foram vedadas com filme de PVC e transferidas para uma sala de crescimento, onde foram mantidas no escuro, ou sob fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de 65 µE.m⁻².s⁻¹, fornecidos por lâmpadas fluorescentes e sob temperatura de 26±1° C. Os calos foram subcultivados a cada 21 dias.

Após dois meses de cultivo, os calos foram transferidos para o meio de regeneração, ainda em placas de Petri, e postos sob luz fluorescente. Os calos que produziram folhas foram transferidos para frascos de 200 ml, com meio de GENOVESI e COLLINS (12), sem reguladores de crescimento, para permitir o desenvolvimento das plantas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Viabilidade dos Micrósporos

A metodologia da reação de fluorescência enzimaticamente induzida foi adaptada à aplicação em micrósporos jovens, uma vez que a concentração de sacarose de 0,5 M, usada no trabalho original para pólen maduro (14), não produziu o efeito esperado, talvez por ser hipertônica com relação ao citoplasma da célula jovem, menos rico em amido. A concentração de sacarose usada neste trabalho foi de 0,35 M.

Foi feita uma classificação dos micrósporos em três níveis, de acordo com a sensação visual provocada pela luz ultravioleta: célula não-fluorescente, muito pouco fluorescente e claramente fluorescente. Micrósporos claramente fluorescentes foram considerados viáveis. A taxa de viabilidade, antes da esterilização, variou de 12,7 a 89,8%, com média de

51,0 ± 23,5%, e, depois da esterilização, variou de 12,4 a 72,6%, tendo média de 39,9 ± 25,0%, o que indica grande variabilidade entre genótipos. Na maioria dos casos, a perda de viabilidade após a esterilização foi de aproximadamente 10%, indicando que o método de esterilização utilizado não prejudicou a continuação do experimento. O alto desvio-padrão encontrado foi, provavelmente, resultado da manipulação dos micrósporos durante a preparação das lâminas, pois micrósporos jovens não possuem parede celular reforçada por intina e exina, como o grão de pólen maduro. Da mesma forma, é possível que a viabilidade dos micrósporos, dentro das anteras plaqueadas, tenha sido um pouco mais alta, já que foram menos manipulados.

A solução de hipoclorito de sódio + ácido propiônico proporcionou menor percentagem de contaminação e foi a preferida para a continuação do experimento. O alto grau de contaminação verificado no tratamento com água sanitária deveu-se, possivelmente, à má qualidade do produto utilizado (Quadro 2). Outra condição considerada para a escolha da solução de hipoclorito com ácido propiônico foi que os micrósporos não fossem danificados, a ponto de influir nos resultados. Por meio da análise do grau de viabilidade pós-esterilização, para alguns genótipos, considerou-se que a influência do produto estava dentro de um nível aceitável.

QUADRO 2 - Efeito de duas soluções de esterilização testadas em pendões quanto à ocorrência de contaminação em cultura de anteras de milho

Número de placas	Solução usada	Placas contaminadas (%)
19	água sanitária 30% + Tween20 0,02%	61,1
19	hipoclorito de sódio 3% + ácido propiônico 0,03% + Tween20 0,02%	8,3

3.2. Produção de Calos e Regeneração de Plantas

Dos 37 materiais testados, apenas os genótipos 677 e 696, da população CMS 03, e o genótipo 712, da população CMS 04, formaram calos, usando-se o meio GENOVESI e COLLINS (12). Este fato demonstra que a população CMS 03 pode ser uma boa fonte de linhagens para uso em estudos de regeneração de plantas, utilizando germoplasma tropical. O genótipo 677 foi o que apresentou melhor rendimento, mas, ainda assim, a percentagem de calos formados, em relação ao número de anteras plaqueadas, foi menor que 1%. Dos calos formados, só foi possível a regeneração de algumas plantas deste mesmo genótipo. Já que este material

apresentou-se como o mais responsivo à cultura de anteras, ele foi utilizado em mais três ensaios, na tentativa de aumentar o número de calos formados. Ainda assim houve formação de calos a partir de 1% das anteras e regeneração de plantas a partir de 5% dos calos formados, apenas.

Esses resultados indicam que, com a metodologia empregada, a capacidade androgenética dos materiais utilizados foi muito baixa. Esta tem sido uma característica do milho e, de modo geral, a percentagem de anteras que produzem calos é menor que 5%, sendo comuns valores inferiores a 1% (9, 20, 27). Somente alguns poucos genótipos, de clima temperado, apresentam boa resposta, com valores entre 20 e 40% (1, 25).

Considerando que a capacidade androgenética do milho tem forte componente genético (8, 17, 24, 25), pode-se supor que os materiais testados não continham os genes responsáveis pela androgênese *in vitro* ou que esses genes, por algum motivo, não tenham se expressado.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho foi conduzido com os objetivos de estabelecer protocolos para o cultivo de anteras de milho, *in vitro*, visando à produção de linhagens; e avaliar a possibilidade da incorporação dessa técnica em um programa de melhoramento. Foram testados 37 genótipos de milho. A metodologia utilizada incluiu a determinação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos, mediante coloração com carmim propiônico; um teste de viabilidade de micrósporos, pela reação da fluorescência enzimaticamente induzida; o pré-tratamento de pendões a 8,0° C; o plaqueamento das anteras, em posição lateral, sobre três tipos de meio; e a incubação das placas no escuro ou sob fotoperíodo de 16 horas, a 26±1° C. Para a regeneração de plantas, os calos foram transferidos para um meio sem reguladores de crescimento. Embora os micrósporos apresentassem boa taxa de viabilidade quando plaqueados, os materiais testados mostraram-se pouco responsivos, havendo formação de calos a partir de três genótipos apenas e regeneração de plantas a partir de apenas uma linhagem.

Diante do pequeno sucesso obtido com os materiais testados e considerando que, em um programa de melhoramento de milho, há necessidade da produção de grande número de linhagens, conclui-se que a cultura de anteras ainda não pode ser vista como técnica auxiliar rotineira, pelo menos com a metodologia de cultivo e de regeneração de plantas, atualmente disponível, para o germoplasma amostrado.

5. SUMMARY

(A STUDY ON THE VIABILITY OF MAIZE LINES PRODUCTION BY USING ANTHER CULTURE)

The development of maize lines by traditional means normally takes two to three years. The use of anther culture is a faster alternative for this procedure. Haploid plants are obtained within a few months, and after diploidization, several homozygote lines can be developed. This would save a great deal of space and time. The main goal of this work was to establish adequate procedures for culturing maize anthers "in vitro", and to evaluate the practical use of this technique in a breeding program. We tested 37 genotypes from the CNPMS germplasm. The procedure included determination of the developing phase of microspores, with propionic-carmin, treatment of spikelets at 8° C, planting the anthers on the edges, on three different media, and incubation at 26 ± 1° C, in the dark or with a 16 h-photoperiod. Although most of the microspores were viable, only three genotypes produced *calli*, and only one regenerated plants. It would be of great interest to test other genotypes because it is known that the androgenetic ability is not widespread in maize.

6. LITERATURA CITADA

1. BARLOY, D., DENIS, L. & BECKERT, M. Comparison of the aptitude for anther culture in some androgenetic doubled haploid maize lines. *Maydica*, 34: 303-308. 1989.
2. BOMMINENI, V.R. & GREYSON, R.J. Regulation of flower development in cultured ear of maize (*Zea mays*, L.). *Sex. Plant Repr.*, 3:109-115. 1989.
3. BRETTELL, R.I.S.; THOMAS, E. & WERNICK, W. Production of haploid maize plants by anther culture. *Maydica*, 26:101-111. 1981.
4. CALDAS, M.T.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (ed.). *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília, ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 1990. p.37-70.
5. CHANG, M.T. & NEUFFER, M.G. Maize microsporogenesis. *Genome*, 32: 232-244. 1989.
6. CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.C.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y. & BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.*, 18: 659-668. 1975.
7. COUMANS, M.P.; SOHOTA, S. & SWANSOM, E.B. Plant development from isolated microspore of *Zea mays*, L. *Plant Cell Rep.*, 7: 618-621. 1989.
8. COWEN, N.M.; JOHNSON, C.D.; ARMSTRONG, K.; MILLER, M.; WOOLEY, S.; PESCIPELLI, S.; SKOKUT, M.; BELMAR, S. & PETOLINO, J.F. Mapping genes conditioning in vitro androgenesis in maize using RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 84:720-724. 1992.
9. DIEU, P. & BECKERT, M. Further studies of androgenetic embryo production and

- plant regeneration from *in vitro* cultured anthers in maize (*Zea mays* L.). *Maydica*, 31:245-259. 1986.
10. EVANS, M.L. Functions of hormones at the cellular level of organization. In: SCOTT, T.K. (ed.). *Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin, Springer Verlag, 1984, v. 10. p.22-63.
 11. FERNANDES, M.I.B.M. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (ed.). *Técnicas e Aplicações de Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília, ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 1990. p.311-332.
 12. GENOVESI, A.D. & COLLINS, G.B. In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci.*, 22:1137-1144. 1982.
 13. GU, M. & DING, Y. Variations of ploidy and constitutional heterochromatin on the chromosomes of maize pollen embryonic cell clones in subculture. *Acta Genet. Sin.*:16:178-183. 1989.
 14. HESLOP-HERRISON, J. & HESLOP-HERRISON, Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.*, 45:115-120. 1958.
 15. HSU, S-Y.; HUANG, Y.C. & PETERSON, P.A. Development pattern of microspores in *Zea mays* L. The maturation of upper and lower florets of spikelets among an assortment of genotypes. *Maydica*, 33:77-98. 1988.
 16. KU, M.K.; CHENG, W.C.; KUAN, Y.L.; AN, H.P. & HUANG, C.H. Induction factors and morphocytological characteristics of pollen-derived plants in maize (*Zea mays*). In: SYMPOSIUM ON PLANT CULTURE, Pequim, 1978. Proceedings, Pequim, Science Press, 1978. p. 35-42.
 17. LASHERMES, P. & BECKERT, M. Genetic control of maternal haploidy (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. *Theor. Appl. Genet.*, 76:405-410. 1988.
 18. MAHESHWARI, S.C.; TYAGI, A.K. & MALHOTA, K. Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms - the current status. *Theor. Appl. Genet.*, 58:193-206. 1980.
 19. MASCARENHAS, J. Gene activity during pollen development. *Ann.Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41:317-338. 1990.
 20. PAUK, J. Production of haploid plants of maize (*Zea mays* L.) through androgenesis. *Cereal Res. Comm.*, 13:47-53. 1985.
 21. PESCIPELLI, S.M., MITCHELL, J.C., JONES, A.M., PAREDY, D.R. & PETOLINO, J.F. High frequency androgenesis from isolated microspores of maize. *Plant Cell Rep.*, 7:673-676. 1989.
 22. PESCIPELLI, S.M.; JOHNSON, C.D. & PETOLINO, J.F. Isolated microspore culture of maize: effects of isolation technique, reduced temperature and sucrose level. *Plant Cell Rep.* 8:628-631. 1990.
 23. PETOLINO, J.F. & JONES, A.M. Anther culture of elite genotypes of maize. *Crop Sci.*, 26:1072-1074. 1986.
 24. PETOLINO, J.F. & THOMPSON, S.A. Genetic analysis of anther culture response in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 74:284-286. 1987.
 25. PETOLINO, J.K.; JONES, A.M. & THOMPSON, S.A. Selection for increased anther culture response in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 76:157-159. 1988.
 26. SUN, J.S. & PRIOLI, L.M. Plant regeneration of haploid and dihaploid plants from protoplasts of supersweet (sh2sh2) corn. *Plant Cell Rep.* 8:313-316. 1989.
 27. TING, Y.C. & GU, M.G. Genetic ability of anther callus lines and progeny plants of maize. *Am. J. Bot.*, 7:867-873. 1990.
 28. TING, Y.C., YU, M. & ZHENG, W.H. Improved anther culture of maize (*Zea mays*). *Plant Sci. Let.*, 23: 139-145. 1981.

29. WALKER, S. Cytogenetics. In: SHEPPARD, P.M. (ed.). *Practical Genetics*. N. York, John Willey & Sons, 1974. p.130-172.
30. TSAY, H.S. Factors affecting haploid plant regeneration from maize anther culture. *Acad. Sin. Inst. Bot. Monograf. Ser.*, 9:157-166. 1989.