

Comparação de protocolos de duplicação cromossômica para a obtenção de duplo-haploides em milho¹

Tácila Cristina de Azevedo²; Roberto dos Santos Trindade³; Flávia Ferreira Mendes Guimarães⁶; Ubiraci Gomes de Paula Lana⁴; Silvimar Alves Guimarães⁵; Isabel Regina Prazeres de Souza³

¹ Trabalho financiado pelo CNPq e Fapemig

² Estudante do Curso de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa

³ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

⁴ Analista da Embrapa Milho e Sorgo

⁵ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade São João del-Rei

⁶ Professora Faculdade Ciências da Vida

Introdução

A tecnologia de duplo-haploides (DH) representa uma alternativa para reduzir o tempo de obtenção de linhagens homozigotas em milho (Chase, 1952). Dentre as técnicas de obtenção de haploides estudadas, a técnica *in vivo* é a mais utilizada para a cultura, consistindo no cruzamento de um genótipo indutor de haploidia e um genótipo-fonte, obtendo, sementes de milho haploides com a metade do número de cromossomos para o milho. Em seguida é feita a seleção destas sementes com base na presença de antocianina no endosperma e ausência de antocianina no embrião. Por fim, as plântulas derivadas destas sementes haploides devem passar por um processo de duplicação cromossômica, no qual normalmente é utilizada a colchicina (Geiger; Gordillo, 2009).

Vários protocolos foram desenvolvidos para a utilização da colchicina visando à duplicação cromossômica em milho, sendo necessária a avaliação criteriosa de cada protocolo e de sua adequação dentro de um programa de melhoramento. O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência de três protocolos de duplicação cromossômica na obtenção de haploides em milho.

Material e Métodos

Foram utilizadas 270 sementes de milho haploides obtidas por meio do cruzamento do genótipo-fonte 91500212 com o híbrido indutor de haploidia Tail P1 x Tail P2. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com três repetições, sendo

avaliados três protocolos distintos de duplicação cromossômica via colchicina: injeção, tratamento de raízes e tratamento de plântulas recém-germinadas. Para avaliação de cada protocolo, as 270 sementes foram divididas em 3 grupos de 90 sementes, e por sua vez, cada grupo foi separado em três repetições de 30 sementes. Os protocolos de duplicação cromossômica são descritos a seguir:

1) Tratamento via injeção (Vanous et al., 2017): sementes haploides foram semeadas em bandejas com substrato comercial. No estágio V3 (três folhas expandidas), realizou-se aplicação de 100 µl de solução de colchicina a 0,125% e 0,5% de DMSO em plântulas com seringa e agulha hipodérmica. Posteriormente, as plântulas foram mantidas no escuro e sem irrigação por 8 horas.

2) Tratamento via imersão de raízes (Couto et al., 2015): plântulas no estágio V3 foram inseridas em béqueres, contendo solução 1:1:1 de colchicina, dimetil sulfoxido e Tween 20 (1g, 1ml e 1ml, de cada reagente, respectivamente). As plântulas foram mantidas por seis horas na solução, seguindo-se lavagem por 40 minutos para remoção de resíduos, seguindo-se o transplântio para bandejas com substrato comercial.

3) Tratamento de plântulas recém-germinadas (Prigge; Melchinger, 2012): sementes haploides foram semeadas em rolos de papel germiteste umedecido com água destilada, que foram levados para germinador por 36 horas, permitindo assim o início da germinação e a emergência do coleóptilo. Após este período, as plântulas receberam um corte a 2 mm do ápice do coleóptilo com bisturi e foram inseridas em béqueres identificados com solução de colchicina 0,06% e DMSO 0,5%, em um volume que permitisse cobrir todas as plântulas, sendo mantidas em solução, no escuro por 12 horas. Após este período, as plântulas passaram por lavagem de 30 minutos em água corrente e foram transplantadas para bandejas com substrato comercial.

Após a realização de cada protocolo, aguardou-se 20 dias após tratamento para transplântio definitivo em vasos de 20 litros com solo adubado, e mantidas em casa de vegetação, com temperatura e umidade controladas, sendo mantida a distribuição dos tratamentos em blocos casualizados, visando manter o delineamento proposto.

Para a avaliação da eficiência de cada protocolo na obtenção de duplo-haploides viáveis, foram tomados dados do número de plantas sobreviventes após o procedimento, abertura de pendão, número de espigas com e sem sementes e o percentual de haploides e falso-positivos. Tais dados foram tabulados em planilha Excel e comparados via teste t para duas médias. Todas as análises foram efetuadas com o auxílio do programa SAS (SAS Institute, 2000).

Resultados e discussão

Em valores absolutos, foi possível observar diferenças para a sobrevivência de plântulas entre os tratamentos avaliados (Figura 1). Para o tratamento de injeção com colchicina, 89 das 90 plântulas sobreviveram (98,99%). No tratamento de raiz sobreviveram 73 plantas (81,10%), enquanto que para o tratamento de plântula recém-germinada sobreviveram 57 plantas (63,33%). Entretanto, o teste t não indicou diferenças significativas entre o tratamento de injeção de colchicina e o de imersão de raízes, e entre o tratamento de imersão de raízes e em plântulas recém-germinadas (Figura 1).

Os melhores resultados de sobrevivência para o tratamento de injeção podem ser explicados por se tratar de um método menos agressivo para a plântula, que requer menos transplante e é realizado com a plântula em estágio mais avançado de desenvolvimento. Da mesma forma, o tratamento de raízes, que é efetuado no estágio V3, também apresentou maior sobrevivência, demonstrando que o estágio fisiológico mais avançado da plântula é fator importante para reduzir as perdas no processo de duplicação cromossômica.

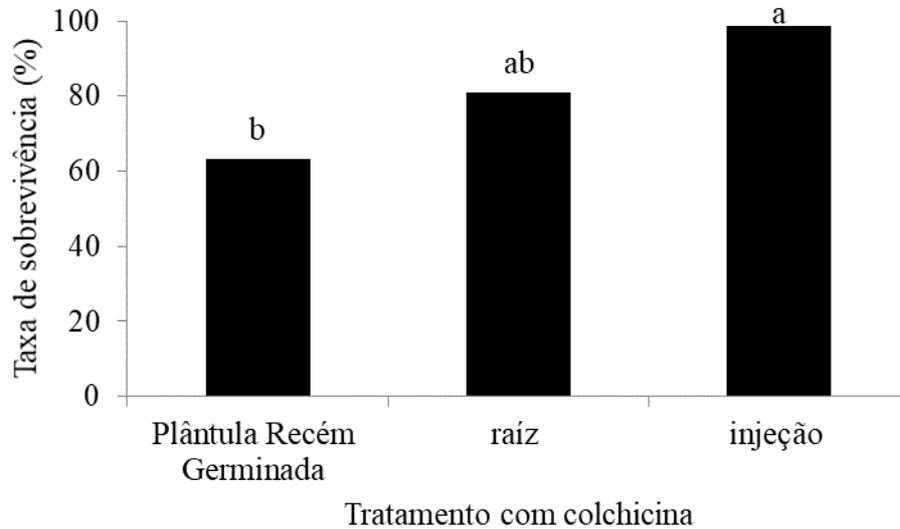


Figura 1. Taxa de sobrevivência de plântulas duplo-haploides de milho após tratamento com colchicina por três diferentes protocolos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

Após analisar a sobrevivência, realizou-se a avaliação da frequência de duplo-haploides verdadeiros e de falso-positivos dentre as plântulas sobreviventes. As características marcantes em duplo-haploides putativos são o porte reduzido da planta; a baixa produção de pólen, mesmo após o tratamento com colchicina, e a baixa quantidade de sementes nas espigas, além da ausência de pigmentação com antocianina nas sementes.

Tabela 1. Número de plantas duplo-haploides e falso positivas identificadas com base em características morfoagronômicas.

Treatmento	Duplo-haploide	Falso positivo
Plântula Recém-germinada	13 (22,81%) *a	21 a
Raiz	15 (20,54%) a	31 a
Injeção	17 (19,10%) a	42 a
Média	15 (20,54%)	31,33

* número entre parênteses representa a taxa de sucesso na obtenção do duplo-haploide. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

O número de duplo-haploides obtidos após o tratamento com colchicina foi de 13 plantas para o tratamento em plântulas recém-germinadas, 15 plantas no tratamento de raiz e 17 plantas no tratamento de injeção, sem diferença significativa entre tratamentos para número de haploides obtidos. Entretanto, do total de plântulas sobreviventes, foi identificado

um maior percentual de duplo-haploides no tratamento com plântulas recém-germinadas do que nos demais tratamentos (Tabela 1).

Para determinar o potencial das linhagens duplo-haploides em cada método de duplicação para a geração de novas linhagens, foram avaliadas a abertura do pendão e a produtividade de sementes. Estas características são importantes indicadores da eficiência do processo de duplicação cromossômica, porque demonstram o efeito deste procedimento na restauração da fertilidade da planta, já que haploides de milho são naturalmente estéreis, pela impossibilidade de pareamento de cromossomos quando da divisão celular (Prigge; Melchinger, 2012). Desta forma, plantas com pólen viável para o cruzamento resultam em espigas com sementes, enquanto plantas macho-estéreis ou com problemas na formação da espiga não produzem sementes.

A viabilidade do pendão foi determinada pelo grau de abertura dele e pela emissão de pólen das anteras, sendo classificados em pendões com abertura total e boa emissão de pólen, pendões com abertura intermediária e pouca emissão de pólen e pendões com macho-esterilidade, com anteras totalmente fechadas. Não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos quanto a abertura de anteras, mas verificou-se um maior número de pendões com abertura total no tratamento de injeção, o que também pode estar relacionado à sobrevivência de plântulas, o que ocasiona, conseqüentemente, uma menor perda de possíveis duplo-haploides. Foi verificada também boa eficiência dos três protocolos aplicados para reverter a macho esterilidade no pendão nas plantas sobreviventes (Tabela 2), sendo identificado apenas um pendão macho-estéril no tratamento de raízes.

Tabela 2. Abertura de pendões em cada tratamento de duplicação cromossômica

Tratamento	Abertura total	Abertura parcial	Com macho-esterilidade
Plântula recém-germinada	5 a	8 a	0 a
Raiz	5 a	9 a	1 a
Injeção	7 a	10 a	0 a
Média	5,7	8,7	0,3

Com relação à produção de espigas com sementes, os dados da Tabela 3 demonstram que, entre os duplo-haploides obtidos no tratamento de plântula recém-germinada, cinco espigas apresentaram sementes enquanto oito espigas não apresentaram formação de sementes. No tratamento de raiz, sete espigas apresentaram sementes e oito espigas não

apresentaram sementes. No tratamento de injeção, 11 espigas apresentaram sementes e quatro espigas permaneceram sem sementes. Com isso é possível observar que o tratamento de injeção foi o que resultou em maior quantidade de plantas com pólen viável para o cruzamento, o que se refletiu diretamente no número de espigas com semente. Comparado aos outros dois protocolos, o tratamento via injeção ainda apresenta as vantagens de ser mais econômico, em termo de gasto de substrato, de reagentes e de número de operações de transplante e de não gerar resíduo adicional após aplicação, o que resulta em menor impacto ambiental.

Tabela 3. Número de espigas com e sem sementes para cada um dos três tratamentos

Tratamento	Com semente	Sem semente
Plântula recém-germinada	5 a	8 a
Raiz	7 a	8 a
Injeção	11 a	6 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

Conclusões

O protocolo de injeção foi o mais eficiente dos três protocolos de duplicação cromossômica, pois resultou em maior sobrevivência, maior produção de duplo-haploides com pólen e espigas viáveis e maior produção de sementes.

Referências

CHASE, S. S. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, v. 44, p. 263-267, 1952.

COUTO, E. G. de O.; VON PINHO, E. V. de R.; VON PINHO, R. G.; VEIGA, A. D.; BUSTAMANTE, F. de O.; DIAS, K. O. das G. In vivo haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 5, p. 435-442, 2015.

GEIGER, H. H.; GORDILLO, G. A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. **Maydica**, v. 54, n. 4, p. 485-499, 2009.

PRIGGE, V.; MELCHINGER, A. E. Production of haploids and doubled haploids in maize. **Methods in Molecular Biology**, v. 877, p. 161-172, 2012.

SAS INSTITUTE. **SAS OnlineDoc**: version 8. Cary, 2000.

VANOUS, K.; VANOUS, A.; FREI, U. K.; LUBBERSTEDT, T. Generation of maize (*Zea mays*) doubled haploids via traditional methods. **Current Protocols in Plant Biology**, v. 2, n. 2, p. 147-157, 2017.