



PEDRO R. BELICUAS¹, LUCIANO V. PAIVA¹, CLAUDIA T. GUIMARÃES² e
EDILSON PAIVA²

¹Universidade Federal de Lavras, CP 37 37200-000 Lavras, MG

²Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, 35701-970 Sete Lagoas, MG
edilson@cnpms.embrapa.br

INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos dos melhoristas de plantas é o aumento de produtividade das culturas e, nessa busca, uma das metodologias mais utilizadas é o emprego da superioridade dos genótipos heterozigóticos em relação aos demais, ou seja, o aproveitamento do vigor híbrido. Algumas etapas no processo de obtenção de híbridos são bastante trabalhosas. O processo tradicional de produção de híbridos de milho envolve a geração de linhagens endogâmicas onde são realizadas autofecundações sucessivas. Uma alternativa disponível na cultura do milho é a técnica de obtenção de linhagens homozigóticas instantâneas pelo uso de haplóides duplicados (di-haploides). Kermicle (1969) relatou a ocorrência de uma mutação espontânea que ele chamou de gametófito indeterminado (*ig*) na linhagem Wisconsin-23 (W23). Os haplóides gerados por influência deste alelo *ig* são de origem paterna, ou seja, são androgenéticos. No processo de fecundação ocorre uma degeneração do núcleo do óvulo e o núcleo espermático inicia o processo de divisão celular no citoplasma da célula ovo, formando um embrião haplóide.

A identificação destes haplóides é realizada por meio de marcadores morfológicos de coloração que são expressos nas sementes, contudo a expressão desse marcador é fortemente influenciada pelo ambiente. Para a exata confirmação da geração destes haplóides foram utilizadas técnicas de marcadores moleculares, contagem cromossômica e citometria de fluxo.

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer as bases para um método alternativo de obtenção rápida de linhagens endogâmicas de milho que permitam a produção de híbridos superiores utilizando a metodologia de produção de haplóides através de uma linhagem indutora.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados cruzamentos entre a linhagem indutora de haploidia Wisconsin-23 (W23) (Universidade de Wisconsin, Madison) e o híbrido simples BRS1010 desenvolvido pelo programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. Os cruzamentos foram realizados nos canteiros experimentais do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, Minas Gerais.

As sementes obtidas nesses cruzamentos foram colhidas, secadas e separadas conforme o marcador morfológico indicador de haploidia (sistema *R-navajo*) (Nanda & Chase, 1966). De cada espiga, foram separadas as sementes que apresentavam coloração arroxeada no endosperma e não apresentavam pigmentação roxa no embrião. Estas sementes foram identificadas e fotografadas com câmera digital. Para a realização da contagem cromossômica, as sementes foram germinadas em papel "germtest" com temperatura e luminosidade controlada (30°C por oito horas com luz e 20°C por 16 horas sem luz, umidade relativa 94%). Quando as radículas apresentavam de três a quatro centímetros de comprimento, as pontas das raízes foram coletadas a um centímetro do ápice e colocadas em solução de colchicina 0,02% por duas horas e trinta minutos a 29°C. Em seguida as pontas das raízes foram armazenadas em solução fixadora metanol-ácido acético (3:1) a 4°C por no mínimo 4 horas. As lâminas de mitose foram preparadas de acordo com (Carvalho, 1995) e observada ao microscópio ótico Axioplan (Zeiss®) com aumento total de 1000 vezes. A imagem foi capturada com a câmara Hyper HAD (Sony®), auxiliada pelo software KS300 (Kontron Elektronik®).

As plântulas que tiveram as pontas de raízes removidas para o preparo de lâminas de mitose foram transferidas para bandejas com substrato constituído de terra vegetal adubada e mantidas em casa de vegetação por cinco dias, depois foram plantadas nos canteiros experimentais em definitivo. A extração de DNA foi realizada, a partir de folhas jovens segundo o método descrito por Saghai-Marooof et al. (1984). O DNA dos parentais foi extraído de uma amostra de 10 plantas diferentes de cada um dos pais realizada em larga-escala.

Foram testados 122 marcadores SSR entre a linhagem W23 e o híbrido BRS1010, com o objetivo de identificar aqueles que apresentavam polimorfismo satisfatório entre os parentais. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador modelo 9600 (Applied Biosystems®), em volume final de 10 µL, contendo 30 ng de DNA, solução tampão (10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM KCl, 0,01% gelatina; 2,0 mM MgCl₂) 125 µM de cada um dos dNTPs; 0,6 µM de cada um dos iniciadores e 1 U da enzima Taq polimerase. Os fragmentos amplificados foram resolvidos em géis de agarose 4% tratados com brometo de etídio e visualizado em UV. Os géis foram avaliados considerando o grau de polimorfismo dos alelos amplificados, a qualidade da amplificação e, no caso de heterozigotos, a não coincidência de bandas com o mesmo peso molecular entre os parentais.

Para as análises no citômetro de fluxo, foram utilizadas folhas jovens dos parentais (híbrido BRS1010 e a linhagem W23) e dos indivíduos F1 provenientes do cruzamento entre eles. A metodologia de extração e coloração da suspensão nuclear foi realizada conforme as recomendações do fabricante no uso do tampão DNA Staining Solution Partec®. A quantificação da ploidia das amostras realizada comparando-se as posições dos respectivos picos na fase G₁ do ciclo celular. As preparações foram analisadas em um citômetro de fluxo modelo PAS III Partec®, equipado com três parâmetros e lâmpada HBO de arco de mercúrio 100 W para excitação em UV. Os histogramas obtidos foram analisados estatisticamente com ferramentas do programa FlowMax Partec® para a determinação da ploidia, descartando as amostras cujo coeficiente de variação foi superior a 3%. Nos histogramas, os picos G₁ dos núcleos das plantas parentais, utilizadas como padrão diplóide (2x), foram calibrados para leitura no canal 100. Todo o procedimento de análise de ploidia com citômetro de fluxo foi realizado no laboratório de citogenética da Universidade Federal de Viçosa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos cruzamentos realizados entre a linhagem indutora de haploidia W23? e o híbrido simples BRS1010?, foram obtidas 87 espigas. A linhagem apresentou-se muito frágil sob as condições tropicais sendo muito susceptível ao ataque de fungos e ao calor. As sementes das 87 espigas foram selecionadas visualmente e separadas conforme o marcador fenotípico de coloração, onde as porcentagens dos possíveis haplóides variaram de 0 a 51%. Esta ampla variação deve-se, em parte, a difícil visualização da expressão de antocianina tanto no embrião quanto no endosperma. Acredita-se que o marcador morfológico sofra grande influência do ambiente e da base genética ao qual ele é submetido. Dentre as 87 espigas foram escolhidas 50 que apresentaram porcentagem menor do que 25% de sementes com coloração arroxeadada no endosperma e sem coloração no embrião, sendo escolhidas, aleatoriamente, até 10 sementes de cada umas dessas espigas.

Dos 122 marcadores SSR testados, foram escolhidos o mmc 0022 (bin 3,05) e o mmc 0081 (bin 5,05) que apresentaram bandas polimórficas entre os parentais com tamanhos e definição suficientemente boas para a análise em gel de agarose. Quatro indivíduos foram identificados como haplóide entre os 462 analisados, sendo eles 216, 494, 660 e 664 (Figura 1). As demais plantas apresentavam duas bandas no gel, uma correspondendo à linhagem indutora W23 e outra do híbrido BRS1010, mostrando que elas vieram de um cruzamento entre os parentais.

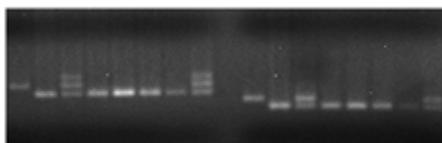


FIGURA 1. Teste de haploidia realizado com os marcadores mmc0022 (bin 3,05) e mmc0081 (bin 5,05) em gel de agarose 4%. W23: linhagem indutora; HIB: BRS1010, 801 e 804A. Doplóides: 216, 494, 660 e 664. Haplóides.

Para a confirmação e validação dos resultados obtidos com os marcadores moleculares SSR, foram utilizadas as técnicas de contagem cromossômica e citometria de fluxo. As quatro plantas identificadas como haplóides apresentaram 10 cromossomos nas suas células confirmando seu estado haplóide. Duas destas estão representadas na Figura 2.

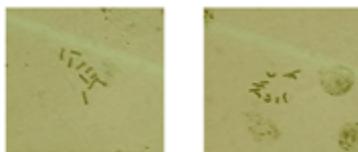


FIGURA 2. Fotomicrografia das lâminas de mitose mostrando os 10 cromossomos das plantas haplóides de milho 216 (A) e 494 (B). Aumento total 1000 X.

Para a análise no citômetro de fluxo foram coletadas amostras de 95 plantas para a quantificação do nível de ploidia, cujos resultados corroboraram com os dados de marcadores SSR. As plantas confirmadas como haplóides apresentavam uma única banda para os marcadores SSR e a metade da quantidade do material genético dos indivíduos parentais, utilizados como padrão diplóide (Figura 3).

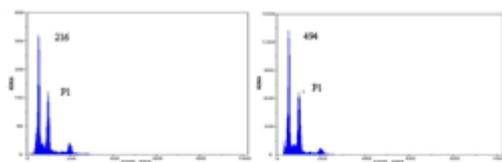


FIGURA 3. Histogramas obtidos por citometria de fluxo de suspensões nucleares de tecidos foliares de plantas parentais diplóide P1 e plantas haplóides 216 e 494. Observar que o pico G1 das plantas diplóide P1, no canal 100, e o pico G1 das amostras 216 e 494 no canal 50,6 e 50,7, respectivamente.

A seleção das sementes com base no marcador morfológico demonstrou uma baixa eficiência na identificação dos haplóides. Todas as sementes que foram germinadas apresentavam coloração arroxeadada no endosperma e embrião descolorido, contudo somente quatro destas sementes eram realmente haplóides. Talvez por influência do fator ambiental e pelo background genético, a seleção por meio do marcador morfológico foi totalmente ao acaso, o que corrobora com a frequência de haplóides obtidos, considerando essa casualidade, que é de 0,87%. As quatro sementes que deram origem aos haplóides eram normais na forma e no tamanho, sendo que duas delas (660 e 664) vieram da mesma espiga e as outras duas (216 e 494) (Figura 4), de espigas diferentes. As plantas originadas destas sementes apresentam-se como uma miniatura das plantas diplóides normais, contudo foi observada a existência de plantas diplóides com tamanho reduzido, a semelhança dos haplóides. Tais confundimentos advindos das avaliações fenotípicas das sementes e das plantas mostram que é necessário fazer uma identificação precisa desses haplóides para não ocorrer erros no diagnóstico.



FIGURA 4. Fotos dos marcadores morfológicos de coloração (sistema R-navajo) de duas das sementes que deram origem às plantas haplóides.

CONCLUSÕES

A linhagem W23 é efetiva na geração de haplóides androgenéticos, induzindo a uma taxa de 0,87% neste background genético utilizado como parental masculino.

Todas as plantas identificadas como haplóides apresentavam porte reduzido, sendo que algumas plantas diplóides também apresentaram esta mesma característica.

O sistema de identificação de haplóides por meio de marcadores morfológicos de coloração da semente (R-navajo) não foi capaz de discriminar os haplóides, ao contrário dos outros três métodos utilizados neste trabalho, que foram eficientes na identificação dos haplóides. Contudo para um grande número de amostras, a contagem cromossômica torna-se impraticável, e a escolha entre marcadores SSR e citometria de fluxo depende da disponibilidade de equipamentos e de recursos financeiros.

AGRADECIMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Embrapa Milho e Sorgo, PRONEX/CNPq, FAPEMIG e CNPq.

LITERATURA CITADA

CARVALHO, C. R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho**. Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 127p. 1995.

KERMICLE, J. L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science**, Washington, v.166, p.1422-1424, 1969

NANDA, D. K.; CHASE, S. S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v.6, p.213-215, 1966.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceeding of national Academic Science of the United Sates of America Biological Science**, New York, v.81, n.24, p.8014-8018, 1984.

