

OBTENÇÃO DE UMA LINHAGEM DE MILHO TOLERANTE AO ESTRESSE SALINO MEDIANTE A CULTURA DE ANTERAS¹

LILIA WILLADINO², TEREZINHA R. CAMARA³, MARIA ASUMPCIÓN SANTOS e JOSÉ MARIA TORNE⁴

RESUMO - Foi realizada uma cultura de anteras a partir de panículas procedentes do cruzamento dos híbridos Arizona 8601, genótipo reconhecido como altamente tolerante ao estresse salino, e o híbrido M11M14, genótipo com resposta androgenética positiva. O meio de cultura utilizado foi o Yu-Pei modificado com adição de 60 g/l de sacarose. Foram obtidas duas plantas a partir da cultura das anteras. Uma delas, com deficiência de clorofila nas folhas, e a outra, com características fenotípicas normais de uma planta de milho. Esta última apresentou um total de 20 cromossomos como consequência de diploidização espontânea, resultando na produção de uma linha pura denominada LW1. Testou-se a tolerância à salinidade desta linha em casa de vegetação, e observou-se um comportamento similar ao híbrido tolerante Arizona 8601 quando submetido a diversos níveis de NaCl (0,0; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,2%).

Termos para indexação: androgênese, duplo haplóide, regeneração de plantas, melhoramento vegetal, cultura de tecidos de plantas, *Zea mays*.

SALT STRESS-TOLERANT MAIZE PRODUCTION BY ANTHHER CULTURE

ABSTRACT - An anther culture was initiated from the crossing of the Arizona 8601 hybrid of maize, highly tolerant to salt stress, and the M11M14 hybrid, a genotype with positive androgenetic response. The basic medium used was Yu-Pei modified with 60 g/l of sucrose. Two anther-derived plants were obtained: one with chlorophyll-deficient leaves, and the other a normal green plant. The latter showed a total of 20 chromosomes, as a consequence of spontaneous diploidyzytion resulting in the production of a pure line called LW1. This line was multiplied and tested in a greenhouse for salinity tolerance, and a behaviour similar to that of the tolerant hybrid Arizona 8601 was observed when submitted to different levels of NaCl (0.0, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.2%).

Index terms: androgenesis, doubled haploid, plant regeneration, plant breeding, plant tissue culture, *Zea mays*.

INTRODUÇÃO

A salinidade e a sodicidade do solo são fatores limitantes na produção agrícola em muitas áreas do planeta. As regiões áridas e semi-áridas representam, aproximadamente, 40% da superfície da terra, e caracterizam-se por elevada salinização do solo e

da água (Fisher & Turner, 1978). O processo de salinização do solo se estende por um terço das áreas irrigadas (Tal, 1984) e vem ocorrendo também em outras áreas além das regiões áridas e semi-áridas. Estima-se que existam mais de 900 milhões de hectares de áreas salinizadas no planeta (Kuoda & Szabolcs, 1979).

Para a utilização dos solos salinizados são necessários tratamento do solo e/ou melhoras das características fisiológicas das plantas, adaptando-as às condições ambientais para evitar um decréscimo da produtividade. As duas alternativas podem, evidentemente, ser complementares (Tal, 1985). A adaptação da planta ao solo, ou seu melhoramento, é uma solução bastante viável, tendo em vista o mais baixo

¹ Aceito para publicação em 19 de setembro de 1995.

² Dr.^a, Prof.^a, UFRPE. Dep. de Biol. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, CEP 52171-030 Recife, PE.

³ Dr.^a, Prof.^a, UFRPE. Dep. de Química.

⁴ Dr., C.I.D., C.S.I.C. Barcelona, Espanha.

custo quando comparado às onerosas técnicas de tratamento de solo. A ampla variabilidade genética permite a seleção de genótipos adequados às condições adversas do meio ambiente (Epstein et al., 1979).

As técnicas de cultura de tecidos são reconhecidas atualmente como um instrumento útil nos trabalhos de melhoramento genético. A utilização de técnicas de cultivo de anteras em programas de melhoramento genético é uma realidade em diversos países. Na China, cultivares de arroz de elevada produtividade, obtidas por cultivo de anteras, ocupam uma área considerável daquele país (Yin et al., 1976). Na Alemanha, avanços significativos foram alcançados no melhoramento genético da cevada com respeito à tolerância ao vírus-do-mosaico (Foroughi-Wehr & Friedt, 1984), assim como também foi possível aumentar a resistência da batata a nematóides e ao vírus X (Wenzel & Uhrig, 1981).

No Brasil, avanços significativos foram obtidos no melhoramento de trigo através de trabalhos desenvolvidos pela EMBRAPA-CNPT/UFRRGS/UPF, e no melhoramento de arroz e aspargo, desenvolvidos pela EMBRAPA-CPACT/UFPEL. Em relação à cultura do milho, recentemente foi obtida uma linha pura, resistente ao tombamento quando submetida a ventos de até 40 milhas por hora (Ting, 1993).

A cultura do milho, que é a base da alimentação em vários países da América Latina, ocupa posição destacada em relação à área cultivada na zona, semi-árida do Estado de Pernambuco. Ao longo dos últimos trinta anos, sua produtividade vem decrescendo, chegando ao patamar dos 700 kg/ha na Região Nordeste, em contraste com níveis de produtividade que alcançam valores de 11.000 kg/ha na Região Sudeste. É portanto evidente a necessidade de obtenção de cultivares de milho adaptadas às difíceis condições ambientais do Semi-Árido nordestino visando o aumento da produtividade desta cultura.

O presente trabalho objetivou a obtenção de uma linhagem de milho tolerante à salinidade do solo, a partir do cultivo de anteras.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado para a cultura de anteras foi procedente do cruzamento entre os híbridos Arizona 8601 e M11M14. O propósito deste cruzamento foi a ob-

tenção de um híbrido com componentes genéticos que associassem a tolerância à salinidade do Arizona 8601 (Day, 1987), com a capacidade androgenética do M11M14 (Boget, 1992). A partir de 50 dias após a semeadura, o híbrido foi avaliado diariamente para a determinação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos ao microscópio óptico, utilizando-se como corante carmim acético (0,5 g de carmim em 100 ml de ácido acético a 45%). As panículas com micrósporos mononucleados foram cortadas e envolvidas com papel de celulose umedecido e depois com papel-alumínio. Nestas condições as panículas foram mantidas durante 14 dias a 8 °C. Após este tratamento de choque frio, as panículas foram esterilizadas durante três minutos em agitação, com hipoclorito de sódio a 7% e lavadas três vezes com água bidestilada estéril, em câmara de fluxo laminar. Com auxílio de pinças e bisturi estéreis, as anteras foram separadas das flores e inoculadas em meio de cultivo Yu-Pei (Wan et al., 1989), modificado o conteúdo original de sacarose para 60 g/l. O cultivo foi feito em placas de polietileno (6,0 x 1,5 cm) nas quais foram inoculadas aproximadamente 60 anteras/placa, totalizando aproximadamente 3.720 anteras procedentes de seis plantas. As placas foram seladas com "Parafilm", cobertas com papel-alumínio, e mantidas durante uma semana no escuro, a 25 °C. Depois, as placas foram colocadas em luz tênue ($5 \text{ a } 10 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante quatro a cinco semanas, até o desenvolvimento dos embriões. Uma vez obtidos os embriões, estes foram transferidos para três meios de cultivo, a fim de se obter a regeneração das plantas. Os meios utilizados foram: (1) 1/2 MS (meio de Murashige & Skoog, 1962, diluído à metade); (2) meio Yu-Pei modificado com 60 g/l de sacarose e (3) meio CN (Willadino, 1993). Determinou-se o nível de ploidia mediante o método descrito por Wan et al. (1989).

Realizou-se também um ensaio para testar a tolerância, ao NaCl, da descendência (F1) da linha LW1, obtida através do cultivo de anteras, comparando-se esta linha com os parentais M11M14 e Arizona 8601. O experimento foi realizado em casa de vegetação, semeando-se individualmente em vermiculita seis sementes por tratamento. A irrigação foi feita com solução nutritiva de Hoagland diluída em 50%, à qual foram adicionadas diferentes quantidades de NaCl para se obter as concentrações de 0,0; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,2% desse sal. Para evitar modificações na concentração das soluções, a condutividade elétrica da solução drenada foi medida diariamente e, quando necessário, as plantas foram irrigadas com solução nutritiva sem adição de NaCl. Determinou-se o crescimento das plantas com base no peso da matéria fresca e seca de plântulas, 20 dias após o plantio. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento. O efeito dos tratamentos foi

avaliado estatisticamente, através da análise de variância, e a correlação entre as variáveis, mediante análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das seis plantas utilizadas para o cultivo de anteras, somente uma apresentou resposta androgenética positiva. Observou-se a presença de embriões a partir de 22 dias de inoculação das anteras, obtendo-se um total de 59 embriões. Aproximadamente 15 dias depois de obtidos, os embriões foram transferidos para um meio de cultura fresco. No meio 1/2 MS foram inoculados 22 embriões, enquanto que nos meios CN e Yu-Pei foram inoculados 26 e 11 embriões, respectivamente. Os embriões apresentavam, no momento da transferência, 2 a 5 mm de comprimento. Apenas dois embriões se desenvolveram totalmente, alcançando o estágio de planta adulta, no cultivo em meio 1/2 MS. Uma vez transferidos para este meio (1/2 MS), observou-se um rápido crescimento e diferenciação destes dois embriões a plântulas que aos três dias de cultivo apresentavam a parte aérea com aproximadamente, 1,0 cm, e a raiz, com mais de 2,0 cm. Depois de dez dias de cultivo em meio 1/2 MS, as duas plantas foram transferidas para um béquer com solução nutritiva de Hoagland diluída em 25% e cobertas com saco de plástico para evitar a dessecação. Destas plantas foram retiradas pontas de raiz para a determinação do nível de ploidia. Feita a análise citogenética, uma das plantas, denominada de LW1, apresentou 20 cromossomos, indicando a ocorrência de diploidização espontânea do haplóide. A segunda planta analisada não apresentou número regular de cromossomos. Depois de mantidas quatro dias no béquer, as plantas foram transferidas para vasos com capacidade para 15 litros, e mantidas em casa de vegetação. O substrato utilizado foi uma mistura de argila, areia, turfa e vermiculita, numa proporção de 4:3:3:2.

A planta duplo-haplóide foi autopolinizada manualmente, e 62 dias após a transferência para o vaso, obteve-se uma espiga com um total de 79 sementes. Destas sementes, dez foram semeadas, e as plantas, cultivadas em casa de vegetação. A F1 obtida caracterizou-se por uma estrita uniformidade e

ausência de segregação. A homogeneidade no aspecto e cor das sementes produzidas (amarelo-claro), em contraste com os híbridos parentais que apresentavam, ambos, sementes de coloração variada, reforça a hipótese da diploidização espontânea. A segunda planta obtida apresentava folhas com deficiência em clorofila, e não produziu pólen fértil.

No ensaio realizado para testar a tolerância da descendência (F1) ao NaCl, o aumento dos níveis de sal no meio provocou, de maneira geral, diminuição do crescimento das plantas. O peso da matéria fresca e o da matéria seca apresentaram correlação negativa altamente significativa, com coeficientes de correlação de -0,96; -0,92 e -0,94 com relação à matéria fresca (Figs. 1, 2 e 3), e de -0,97; -0,92 e -0,95 com relação à matéria seca (Figs. 4, 5 e 6) correspondentes às cultivares Arizona 8601, LW1 e M11M14, respectivamente. Segundo as equações ajustadas para cada cultivar, o peso da matéria fresca do híbrido M11M14 foi inferior ao das demais cultivares, tanto em ausência como em presença de NaCl (Figs. 1, 2 e 3). Por outro lado, com relação ao peso da matéria seca, os valores estimados para cada cultivar em ausência de sal são bastante semelhantes entre si, destacando-se que as pendentes das curvas de re-

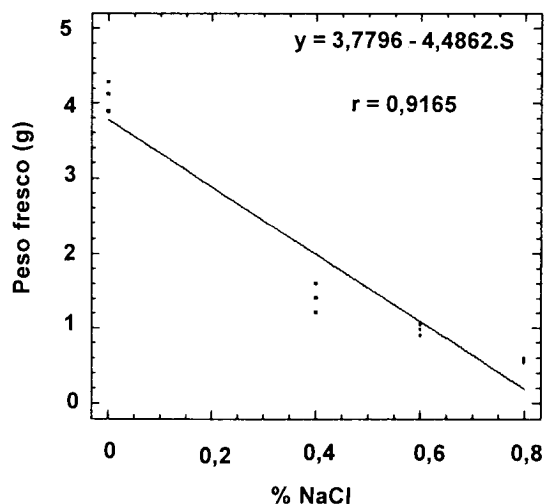


FIG. 1. Regressão linear do peso fresco em relação aos níveis de NaCl (Arizona).

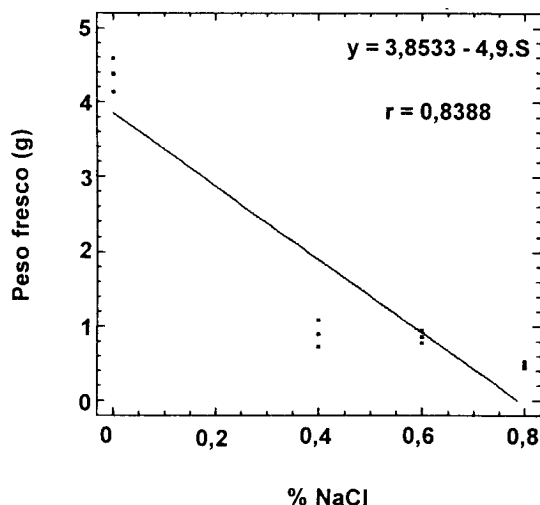


FIG. 2. Regressão linear do peso fresco em relação aos níveis de NaCl (LW).

gressão da linha pura LW1 e do híbrido Arizona 8601 são menos acentuadas, resultando em valores estimados de matéria seca superiores aos do híbrido M11M14, em presença de NaCl (Figs. 4, 5 e 6). No nível de 1,2% de NaCl, somente as sementes do híbrido Arizona 8601 germinaram, e as plântulas apresentaram um desenvolvimento mínimo.

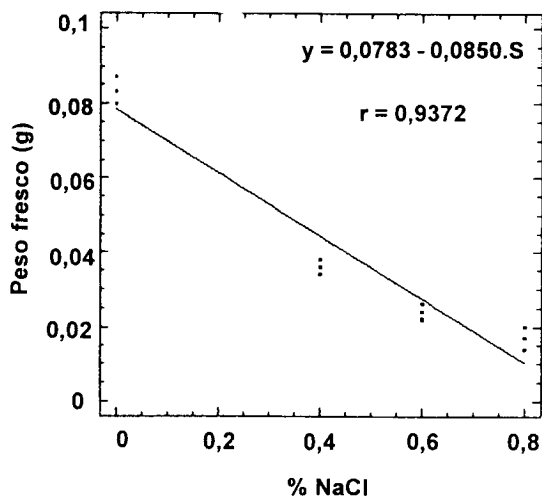


FIG. 4. Regressão linear do peso seco em relação aos níveis de NaCl (Arizona).

O nível de androgênese, expresso como porcentagem de embriões formados em relação ao número de anteras inoculadas, é muito variável, e depende sobretudo do genótipo utilizado. No presente trabalho obteve-se para o híbrido M11M14 x Arizona 8601 um nível de androgênese da ordem de 1,6%. Em milho, estes valores oscilam desde 1,0%, na cultivar

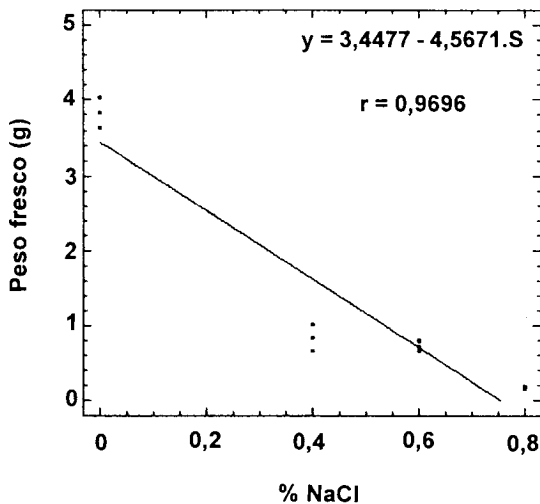


FIG. 3. Regressão linear do peso fresco em relação aos níveis de NaCl (M11M14).

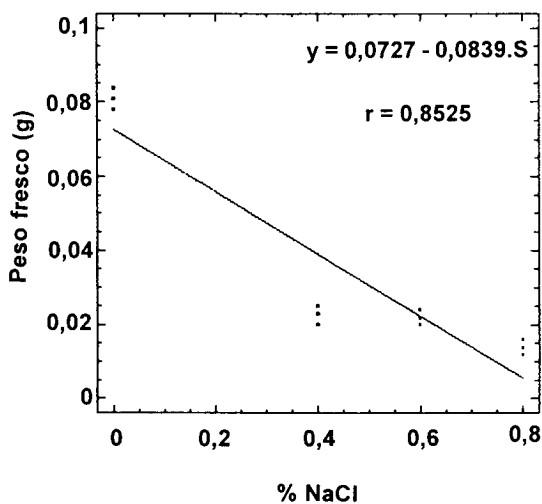


FIG. 5. Regressão linear do peso seco em relação aos níveis de NaCl (LW).

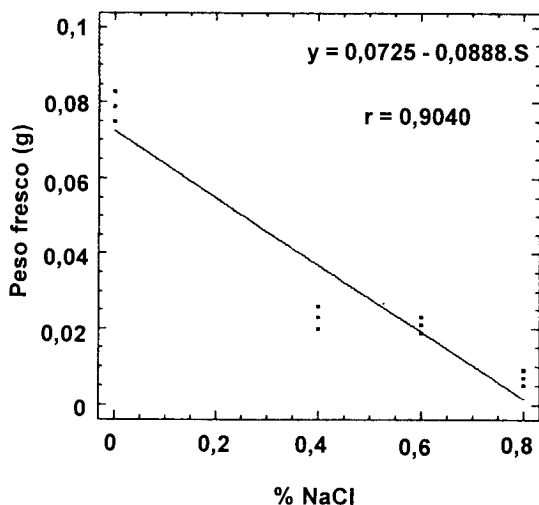


FIG. 6. Regressão linear do peso seco em relação aos níveis de NaCl (M11M14).

King Hwang 13 (Ku et al., 1978), até 41% em híbridos produzidos a partir de plantas obtidas por cultura de anteras (Petolino et al., 1988).

Dos meios de cultura utilizados para regeneração de plantas, o único efetivo foi o 1/2 MS, o qual destaca-se dos demais pela ausência de reguladores de crescimento.

Foram detectados, em uma das duas plantas obtidas por cultura de anteras, 20 cromossomos, o que indica que nesta planta ocorreu uma diploidização espontânea, com a conseqüente formação de uma nova linha pura de milho. A freqüência de diploidização espontânea em milho varia entre 4,5 (Nitsh et al., 1982) e 6,3% (Ku et al., 1978) das plantas regeneradas. A diploidização espontânea ocorre, provavelmente, como conseqüência de fusão de dois núcleos similares resultantes da primeira mitose do micrósporo (Sunderland et al., 1979).

A outra planta apresentou folhas com zonas deficientes em clorofila. É freqüente a obtenção de plantas albinas através de cultura de anteras, devendo-se este fato, provavelmente, à expressão de genes recessivos ou mutações (Wang et al., 1974). Ao microscópio eletrônico, tecidos de plantas de arroz albinas, procedentes de cultura de anteras, revelaram a presença de cloroplastos com estroma disperso e sem grana, além da ausência de RNA ribossomal

e da fração protéica I, o que sugere que a transcrição do DNA do cloroplasto ao RNA estava bloqueada, impedindo a síntese de proteínas necessárias para o desenvolvimento e funcionamento normal dos cloroplastos (Wang et al., 1974).

No ensaio de comparação das cultivares em resposta à salinidade, observou-se uma diminuição generalizada na produção de matéria fresca e seca das três cultivares com o aumento dos níveis de sal. Quanto ao peso da matéria seca, obtida em ausência de NaCl, observaram-se valores similares entre as três cultivares, e, por outro lado, verificou-se uma tendência à tolerância à salinidade na linha pura LW1, refletida pela pendente pouco acentuada da curva de regressão desta linhagem (Fig. 5), semelhante à apresentada pelo híbrido tolerante Arizona 8601 (Fig. 4). Quanto ao peso da matéria fresca, observaram-se diferenças entre os valores apresentados pelas três cultivares, mesmo em ausência de NaCl. Estas diferenças, que não foram observadas no peso da matéria seca, ou seja, na produção de biomassa, indicam que as curvas ajustadas para produção de matéria fresca refletem, além do efeito dos níveis de sal, o efeito do conteúdo de água de cada cultivar.

CONCLUSÃO

É possível a obtenção de uma linhagem de milho com tolerância ao estresse salino mediante a utilização de cultura de anteras.

REFERÊNCIAS

- BOGET, N.L. **Variació morfològica del contingut de poliamines en Zea mays durant la gametogènesis androgènesis i callogènesis**. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona, 1992. 87p.
- DAY, A.D. Registration of Arizona 8601 maize germplasm for saline environments. **Crop Science**, v.27, p.1096, 1987.
- EPSTEIN, E.; KINGSBUR, R.W.; NORLYN, J.D.; RUSH, D.W. **Production of food crops and other biomass by seawater culture**. The Biosaline Concept: An approach to the utilization of under-exploited resources. New York: Plenum Press, 1979. 431p.

- FISHER, R.A.; TURNER, N.C. Plant productivity in the semiarid zone. **Annual Review of Plant Physiology**, v.29, p.277-279, 1978.
- FOROUGH-WEHR, B.; FRIEDT, W. Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. **Theoretical Applied Genetic**, v.67, p.377-382, 1984.
- KOUDA, A.A.; SZABOLCS, I. Modelling of soil salinization and alkalization. **Agrokemia es Talajtan**, v.28, p.280, 1979. Suppl.
- KU, M.K.; CHENG, W.C.; KUO, L.C.; KUAN, Y.L.; HUANG, C.H. Inductions factors and morpho-cytological characteristics of pollen-derived plants in maize. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE. **Proceedings...** Pekin: Science Press, 1978. p.35-42.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NITSCH, C.; ANDERSEN, J.; GODARD, A.; SHERIDAN, H.F. Production of haploid plants of: *Zea mays* and *Pennisetum* through androgenesis. In: EARLE, E.D.; DEMARLY, Y. (Eds.). **Variability in plant regenerated from tissue culture**. New York: Preager Press, 1982. p.69-91.
- PETOLINO, J.F.; JONES, A.M.; THOMPSON, S.A. Selection for increased anther culture response in maize. **Theoretical Applied Genetic**, v.76, p.157-159, 1988.
- SUNDERLAND, N.; ROBERTS, M.; EVANS, L.J.; WILDHOM, D.C. Multicellular pollen formation in culture barley anthers. **Journal of Experimental Botany**, v.30, p.1133-1144, 1979.
- TAL, M. Genetics of salt tolerance in higher plants: theoretical and practical considerations. **Plant and Soil**, v.89, p.199-226, 1985.
- TAL, M. Physiological genetics of salt resistance in higher plants: Studies on the level of the whole plant and isolated organs, tissue and cells. In: STAPLES, R.C.; TONNIESEN, H.E. (Eds.). **Tolerance in Plants**. New York: John Wiley and Sons, 1984. p.301-320.
- TING, Y.C. Mutagenic effect of anther culture per se. **Maize Genetic Newsletter**, v.26, p.26, 1993.
- WAN, Y.; PETOLINO, J.F.; WIDHOLM, J.M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize. **Theoretical Applied Genetic**, v.77, p.889-892, 1989.
- WANG, C.C.; SUN, C.S.; CHU, Z.C. On the conditions for the inductions of rice pollen plantlets and certain factors affecting the frequency of inductions. **Acta Botanica Sinica**, v.16, p.43-54, 1974.
- WENZEL, G.; UHRIG, H. Breeding for nematode and virus resistance in potato via anther culture. **Theoretical Applied Genetic**, v.59, p.333-340, 1981.
- WILLADINO, L. **Estudios sobre el estrés salino mediante cultivo *in vitro* de maíz**. Barcelona: Universidade de Barcelona, 1993. 222p. Tese de Doutorado.
- YIN, K.C.; HSU, C.; CHU, C.Y.; PI, F.Y.; WANG, S.T.; LIU, T.Y.; CHU, C.C.; SUN, C. A study of the new cultivar of rice by haploid breeding method. **Scientia Sinica**, v.19, p.227-242, 1976.