

dos experimentos. Os resultados de análise das bandas de RFLP que discriminaram indivíduos tolerantes e suscetíveis ao Al quando utilizaram-se as enzimas EcoR I e EcoR V são apresentados nas Tabelas 42 e 43, respectivamente.

Os resultados obtidos com o CRRS indicaram que o caráter tolerância à toxidez de alumínio é de natureza quantitativa e que há ocorrência de interação alélica de dominância. O sistema de marcação e detecção não-radiativa das sondas com digoxigenina mostrou-se uma metodologia perfeitamente viável para ser utilizada na análise de RFLP e, por sua vez, mostrou que na análise de RFLP pode haver regiões no cromossomo 2 relacionadas com locos do caráter tolerância à toxidez de Al. - *Cláudio Brondani, Edilson Paiva.*

**TABELA 41.** Média do comprimento relativo da raiz seminal (CRRS) das linhagens e híbridos F1 crescidos em solução nutritiva com Al tóxico. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1993.

Materiais Genéticos	CRRS <sup>1</sup>
19 x 1327	1,01 a
57 x 1327	0,86 ab
1327	0,75 bc
57 x 699	0,66 cd
53 x 15	0,60 cd
57	0,55 de
15	0,50 def
699	0,49 def
53 x 16	0,40 ef
19	0,33 fg
16	0,33 fg
53	0,20 g

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**TABELA 42.** Bandas que discriminaram indivíduos tolerantes e suscetíveis ao Al quando utilizou-se a enzima EcoR I. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1993.

Sonda	57x1327	57x699	53x16	53x15	19x1327
UMC 6	6(1:5)T <sup>1</sup>	9(1:6)T 10(4:5)S	1(2:5)S 5(4:5)S	2(1:3)T 3(4:4)S <sup>2</sup>	9(3:4)T
UMC 36	1(1:2)S	2(2:6)T 10(1:6)T	2(1:5)S 5(2:5)S 6(1:5)S 7(5:5)S <sup>1</sup>	2(1:3)T	1(1:4)T
UMC 49	4(2:5)S <sup>2</sup> 11(1:2)S 12(1:5)T	4(2:6)T 10(3:6)T	1(4:5)T 3(5:5)S <sup>1</sup> 6(3:5)S 8(2:5)S	2(1:3)T 9(1:3)T	2(2:6)S 4(2:6)S
UMC 122	-	3(1:6)T 4(1:6)T 9(4:5)S	3(3:5)S 5(5:5)S <sup>1</sup> 7(2:5)S 9(3:5)S	1(4:4)S <sup>2</sup> 2(1:4)S	1(1:5)S 3(2:4)T 10(4:4)T <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Corresponde ao número da banda. Número de vezes que a banda está presente: número de indivíduos testados, e a letra T ou S, se a banda representa plantas F2 tolerantes ou suscetíveis.

<sup>2</sup>Bandas que estiveram presentes em todos os indivíduos testados do grupo.

**TABELA 43.** Bandas que discriminaram indivíduos tolerantes e suscetíveis ao Al quando utilizou-se a enzima EcoR V. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1993.

Sonda	57x1327	57x699	53x16	53x15	19x1327
UMC 6	5(2:2)S <sup>1</sup> 7(2:2)S	1(1:6)T 2(2:6)T 4(1:6)T 8(1:6)T	9(1:4)S	4(2:2)T 5(1:4)S 8(2:2)T	3(3:4)S 5(2:4)S 6(1:4)T 8(4:4)S <sup>2</sup> 10(3:4)T
UMC 34	1(2:2)S 8(1:2)S	3(5:6)T 4(2:6)T	-	2(1:2)T	6(1:4)T 10(3:4)T
UMC 36	1(1:2)S	2(4:6)T 3(1:6)T	4(3:4)S	5(1:2)T	6(1:4)T 6(3:4)T
UMC 49	1(2:2)S 2(1:2)S 12(1:2)S	6(3:6)T	4(1:2)S 10(1:4)S 13(3:4)S	4(1:2)S 5(2:2)T 6(1:4)S	3(1:4)T 16(2:4)T 7(4:4)S <sup>2</sup> 13(2:2)T 14(1:2)T 16(1:2)T
UMC 122	1(1:2)S	1(2:6)T	-	2(1:2)T 3(1:3)S	3(1:4)T 7(1:4)T 9(2:5)S

<sup>1</sup>O primeiro valor corresponde ao número da banda. O segundo, o número de vezes em que a banda está presente, número de indivíduos testados, a letra T ou S, se a banda representa indivíduos tolerantes ou suscetíveis.

<sup>2</sup>Bandas que estiveram presentes em todos os indivíduos testados do grupo (grupos com mais de quatro indivíduos).

## VIABILIDADE DA PRODUÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO VIA CULTURA DE ANTERAS

No melhoramento de milho, a obtenção de linhagens mediante autofecundações no campo normalmente consome de dois a três anos. Alternativamente a esse processo, a cultura de anteras in vitro possibilita a obtenção de haplóides em apenas alguns meses, que, após diploidizados, se desenvolvem em linhagens homocigotas, proporcionando substancial economia de tempo e espaço.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de selecionar genótipos tropicais de milho mais responsivos à cultura de anteras in vitro, visando a produção de linhagens, e de avaliar a possibilidade da incorporação dessa técnica ao programa de melhoramento de milho do CNPMS.

Foram testados 47 genótipos de milho. A metodologia utilizada incluiu a determinação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos, através de coloração com carmim propiônico; o teste de viabilidade dos micrósporos, pela reação da fluorescência enzimaticamente induzida; o pré-tratamento dos pendões a  $\pm 8,0$  °C, com duração de 6 a 25 dias; o plaqueamento das anteras em

posição lateral sobre três tipos de meio sólido e um de meio líquido e a incubação das placas no escuro ou sob fotoperíodo de 16 horas, a  $26 \pm 1,0$  C. Para a regeneração de plantas, os calos foram transferidos para um meio sem reguladores de crescimento. Embora os micrósoros apresentassem alta taxa de viabilidade quando plaqueados, os materiais testados mostraram-se pouco responsivos, havendo formação de calos em apenas três genótipos e regeneração de plantas em apenas uma linhagem, indicando que a metodologia utilizada não permitiu a incorporação da cultura de anteras como método rotineiro para a produção de linhagens de milho. - *Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, Paula Cristina Silva Angelo, Ricardo Magnavaca, Elto Eugenio Gomes e Gama.*

### PRODUÇÃO DE CALOS DE MILHO DO TIPO II EM CULTURAS DE LONGA DURAÇÃO

Os calos embriogênicos de milho cultivados in vitro têm sido classificados em dois tipos: Tipo I (calo duro e compacto) e Tipo II (calo macio, friável e de rápido crescimento). Os calos do Tipo II podem ser cultivados por um longo tempo "in vitro" e permitem o estabelecimento de culturas de células em suspensão e de protoplastos, sendo mais adequados para os trabalhos de transformação de plantas, em que é necessária a manipulação de células em suspensão. Todavia, para a maioria dos genótipos, esses calos são relativamente difíceis de serem obtidos.

Visando identificar genótipos de milho de origem tropical capazes de formar calos do Tipo II, 106 genótipos do programa de melhoramento de milho do CNPMS foram estudados para essa característica.

Para a indução dos calos, usaram-se embriões imaturos como explantes (1,0 a 2,0 mm) e meio contendo sais minerais N6, sacarose (30 g/l), casaminoácidos (100 mg/l), glicina (30 mM), tiamina (15 uM), ácido nicotínico (7,5 uM), piridoxina (7,5 uM), mioinositol (550 uM), Dicamba (30 uM) e gelrite (2,3 g/l). Os calos foram mantidos no escuro, a  $26 \pm 1$  C, em placas de Petri e subcultivados a cada 21 dias.

Durante os primeiros meses de cultivo, todos os genótipos produziram apenas calos duros do Tipo I. Calos friáveis só foram identificados onze meses após o plaqueamento dos embriões. Foram selecionados oito genótipos com calos do Tipo II. Em três genótipos os calos eram macios, mucilaginosos e com um grande número de embriões somáticos nas superfícies, nos outros cinco, os calos eram friáveis, não mucilaginosos e com um menor número de embriões somáticos. Durante a manutenção dos calos, a adição de prolina a 6 mM aumentou a formação de setores do Tipo II.

Os 20 genótipos mais adaptados ao cultivo in vitro foram novamente plantados e plaqueados no mesmo meio anteriormente usado, mas com a adição de 6 mM de prolina. Nesse caso, foi possível o isolamento de calos friáveis em sete genótipos, apenas três a oito semanas após o plaqueamento. Os calos selecionados apresentaram alta capacidade de regeneração de plantas a partir de pedaços de calos ou embriões somáticos isolados. - *Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, Patricia Nascimento Bordallo, Edilson Paiva, Fernando Hercos Valicente, Manoel Xavier dos Santos.*

### EFEITO DE DICAMBA E $\text{AgNO}_3$ NA PRODUÇÃO DE CALOS DO TIPO II EM MILHO

Vários trabalhos têm relatado o efeito do  $\text{AgNO}_3$  sobre a produção de calos do Tipo II em milho. O  $\text{AgNO}_3$  controla a ação do etileno competindo por seu sítio de ligação e aumentando a embriogênese somática e a regeneração de plantas, em várias espécies de monocotiledóneas. Esse resultado já foi observado em algumas linhagens de milho adaptadas a clima temperado. Por outro lado, o uso de Dicamba, uma auxina sintética, tem também aumentado a embriogênese somática e a iniciação de calos em vários genótipos de trigo e de milho.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de Dicamba, de  $\text{AgNO}_3$  e da interação Dicamba e de  $\text{AgNO}_3$  na produção de calos do Tipo II em genótipos tropicais de milho. Foram usados 45 genótipos de milho do programa de melhoramento de milho do CNPMS (Tabela 44). Para a produção de calos, foram usados 8.000 embriões imaturos, com 13 a 20 dias de idade e 1,0 a 2,0 mm de comprimento. Os meios para a produção de calos embriogênicos do Tipo II eram compostos de sais minerais N6, sacarose (30 g/l), casaminoácidos (100mg/l), glicina (30 mM), tiamina (15 uM), ácido nicotínico (7,5 uM), piridoxina (7,5 uM), mioinositol (550 uM), prolina (25 mM), e suplementados com 15 uM (CM-15) ou 30 uM (CM-30) de Dicamba, na presença ou ausência de 15 mg/l de  $\text{AgNO}_3$  (meios CM-15Ag e CM-30Ag, respectivamente). O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Todas as culturas foram mantidas no escuro a  $26 \pm 1$  C. Aos 21 dias de idade, foi avaliada a percentagem de calos embriogênicos do Tipo II em cada genótipo. Foi feita análise de variância após a transformação dos dados em arco seno e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan (0,05).