

ciado à redução na densidade do grão, que conduz a uma série de características agrônômicas indesejáveis, impedindo, assim, sua ampla utilização comercial. Para aliar as características de dureza do endosperma do milho normal à qualidade protéica do mutante Opaco-2, um intenso trabalho de melhoramento genético foi desenvolvido pelo CIMMYT - Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo, situado no México, culminando com a obtenção dos milhos de alta qualidade protéica (QPMs).

Vários estudos genéticos, bioquímicos e moleculares vêm sendo realizados visando identificar o mecanismo de atuação dessas mutações na expressão gênica. O fenótipo Opaco tem sua provável consequência na redução da síntese de proteínas de reserva, mais especificamente de zeínas. As zeínas são prolaminas, solúveis em soluções alcoólicas, que perfazem aproximadamente 50% da proteína total do endosperma.

Resultados de vários trabalhos têm demonstrado que um alto teor de lisina e triptofano associado à característica de endosperma duro está relacionado com alto teor de gama-zeína no grão. Na tentativa de se obterem informações adicionais sobre essa relação, foram utilizadas técnicas eletroforéticas e análises quantitativas de densidade, teor de lisina e triptofano do grão.

A Figura 30 apresenta o padrão eletroforético das proteínas totais, onde os materiais Opaco-2 e QPM apresentam menores quantidades de alfa-zeína (22 KD) e de beta-zeína (14 KD), sendo maior o teor do polipeptídeo de 12 KD, com relação aos normais e indígenas. O QPM também apresentou um teor mais elevado de gama-zeína (27 KD), assim como o PE 1 e o BR 106.

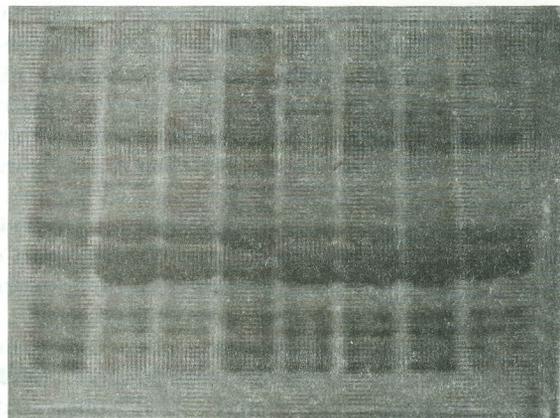
Na Tabela 48, observa-se que os genótipos indígenas possuem densidades semelhantes ao Opaco-2, exceto o PE 1, cujo valor se assemelha aos normais e QPM. Já os teores de triptofano e lisina dos genótipos indígenas se aproximam dos normais, ficando muito aquém dos do Opaco-2 e QPM.

Analisando conjuntamente os resultados, pode-se associar o alto teor de gama-zeína com a dureza do grão, uma vez que sua presença é marcante nos materiais com densidade elevada. Já o alto teor de alfa-zeína parece estar relacionado com a baixa qualidade protéica dos genótipos indígenas e normais, uma vez que a ausência dessa é observada nos genótipos Opaco-2 e QPM.

Portanto, os milhos indígenas possuem um grande potencial para serem utilizados como fonte adicional de variabilidade no estudo do efeito dos genes das zeínas na dureza dos grãos. - *Cláudia Teixeira Guimarães, Maria José Vilça de Vasconcelos, Edilson Paiva.*

**TABELA 48.** Resultados das análises quantitativas de densidade, lisina e triptofano dos vários genótipos de milho. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1992.

Genótipos	% na proteína		
	Densidade	Triptofano	Lisina
UFV 02 (Opaco-2)	1,17	0,88	3,95
BR 106 (Normal)	1,33	0,28	1,50
BR 451 (QPM)	1,30	0,80	3,62
Nodzob A (Indígena)	1,07	0,31	1,62
N. Ronse Torre (Indígena)	1,13	0,26	1,42
Nodzob Udza (Indígena)	1,10	0,31	1,62
PE 1 (Indígena)	1,34	0,28	1,50



**FIGURA 30.** Análise em SDS-PAGE das proteínas totais de diferentes genótipos de milho, da esquerda para direita: UFV-02, BR 106, BR 201, BR 451, NODZOB A, NODZOB RONSE TORRE, NODZOB UDZA, PE 1. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1992.

#### SELEÇÃO DE GERMOPLASMA DE MILHO PARA A PRODUÇÃO DE HAPLÓIDES VIA CULTURA DE ANTERAS

Em um programa de melhoramento de milho utilizando-se o método clássico, a obtenção de linhagens homocigotas no campo consome normalmente de dois a três anos, mesmo para as condições brasileiras, onde é possível a produção de duas gerações por ano. 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. Um dos pontos de estrangulamento desse processo é a baixa recuperação de plantas adultas, a qual é bastante dependente do genótipo utilizado. Assim, este trabalho visa a identificação de genótipos mais responsivos à cultura de anteras para a produção de linhagens e uma avaliação da possibilidade de incorporação dessa técnica ao programa de melhoramento do CNPMS/EMBRAPA.

Foram usados os meios de Genovesi & Collins (1982) e Sun et al. (1989) e testadas preliminarmente 20 linhagens e oito progênes do grupo elite do programa de melhoramento do CNPMS, plantadas no campo, sob regime de irrigação por aspersão, em março/91.

A principal dificuldade encontrada foi a contaminação das anteras por bactérias. Provavelmente, os pendões trazidos do campo apresentavam contaminação no interior de anteras semi-abertas, dificultando a esterilização. Foram testados vários tratamentos, com hipoclorito de sódio, variando-se o tempo de esterilização (15, 20 e 30 min.), a concentração do hipoclorito de sódio (0,5, 1,0, 2,0 e 5,0%) e a concentração de tween 20 (0,1 e 0,5%). No entanto, nenhum

desses tratamentos resolveu completamente o problema. Vários outros tratamentos estão sendo testados, incluindo-se o uso de outros agentes esterilizantes e de antibióticos. Estão também sendo feitas observações sobre o efeito da esterilização na viabilidade dos micrósoros, usando-se a técnica de fluorescência descrita por Heslop-Harrison & Heslop-Harrison (1970).

Apesar dos problemas de contaminação, foi possível a obtenção de alguns calos no meio de Genovesi & Collins (1982) e a regeneração de uma planta no meio de regeneração descrito por Petolino & Jones (1986). Essa linhagem, identificada como responsiva à cultura de anteras, está sendo utilizada em alguns ensaios, visando a otimização da produção de calos e a regeneração de plantas e na identificação de fatores ou processos envolvidos na capacidade androgenética do milho. - *Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, Paula Cristina Ângelo, Manoel Xavier dos Santos, Ricardo Magnavaca, Elto Eugenio Gomes e Gama, Álvaro Elcutério da Silva.*

### EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE GENÓTIPOS TROPICAIS DE MILHO

O estabelecimento de sistemas para a produção de calos embriogênicos friáveis e regeneração de plantas a partir de células somáticas constituiu um pré-requisito de fundamental importância para os programas de melhoramento de milho que visam a obtenção de plantas transgênicas.

No entanto, apesar de ser grande o número de genótipos de milho capazes de formar calos e regenerar plantas, a maioria dos genótipos produz apenas calos duros e compactos do tipo I. Ainda são raros os genótipos que produzem calos friáveis e altamente embriogênicos do tipo II, mais adequados a culturas de células em suspensão e de protoplastos utilizados na transformação de plantas.

Com o objetivo de aumentar o número de genótipos de milho capazes de formar calos do tipo II e com alta capacidade de regeneração de plantas, iniciou-se um trabalho de identificação e seleção de novos genótipos de origem tropical. Complementarmente, fez-se um estudo para a otimização dos meios de cultura.

O trabalho teve início em julho/90 e, até o momento, já foram testados 115 genótipos, sendo 110 linhagens, três variedades e dois híbridos, usados no programa de melhoramento do CNPMS/EMBRAPA. Usaram-se como explantes embriões imaturos com 12 a 15 dias de idade e meio de manutenção contendo sais N6, sacarose, aminoácidos, vitaminas, mio-inositol e as doses de 8,8  $\mu$ M de 2,4-D e 15, 30 e 60  $\mu$ M de dicamba. Testou-se também o uso de nitrato de prata a 5mg/l, objetivando aumentar a formação de calos friáveis. Para a regeneração, colocaram-se os calos em um meio com sais MS, sacarose, mio-inositol, vitaminas e 13,3  $\mu$ M de benzilaminopurina (BAP) por três dias. Em alguns genótipos, para acelerar o enraizamento, os calos eram transferidos pa-

ra outro meio contendo carvão ativado a 5g/l, durante cinco dias. Durante a manutenção, os calos permaneciam a 26°C, em condição de penumbra. Após a regeneração, as plântulas com 10 a 15 cm de altura eram transferidas para vasos em casa de vegetação, com nebulização intermitente durante os dez primeiros dias.

Foram selecionados cinco genótipos superiores aos demais, capazes de serem mantidos por longo tempo em cultura (os genótipos mais antigos têm 21 meses de cultivo) e com alta capacidade de regeneração de plantas. A maioria dos genótipos formou calos predominantemente compactos, cinco apresentaram calos mucilaginosos e apenas três genótipos apresentaram calos com setores friáveis. Observou-se, no entanto, que a formação de setores friáveis, além de depender do genótipo utilizado, dependia também do tempo em que os calos permaneciam no mesmo meio. O subcultivo por períodos inferiores a 15 dias aumentava a formação de setores do tipo II, o inverso acontecia quando os calos eram mantidos no mesmo meio por períodos superiores a 21 dias. Verificou-se, também, que, embora o 2,4-D tenha promovido bons resultados, o dicamba a 30  $\mu$ M foi menos específico e proporcionou melhor desenvolvimento para um maior número de genótipos. Não se observou indução de calos do tipo II pela adição de nitrato de prata ao meio. O uso do nitrato de prata, além de reduzir o crescimento de 17 dos 27 genótipos testados, não apresentou efeito aparente em nove genótipos e em apenas um houve aumento na velocidade de crescimento dos calos. - *Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, Manoel Xavier dos Santos, Ricardo Magnavaca, Elto Eugenio Gomes e Gama, Maria José Vilaça de Vasconcelos.*

### ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBONO E NITROGÊNIO EM MILHO

É geralmente aceito que a assimilação de amônia pelas plantas acontece pela rota enzimática glutamina sintetase (GS)/ glutamato sintase (GOGAT) e que a enzima glutamato desidrogenase (GDH) tem importância secundária nesse processo. Por outro lado, em plantas C4, como o milho, a assimilação fotossintética de carbono acontece com a participação das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), piruvato-ortofofato dikinase (PPDK) e ribulose-1, 5-bisfosfato carboxilase (Rubisco). Como essas enzimas aparentemente controlam mecanismos chaves no processo de produção de biomassa, tem sido sugerido que suas atividades e/ou conteúdos possam ser utilizados como critérios bioquímicos para a seleção de plantas mais produtivas ou mais eficientes no uso desses dois nutrientes.

O objetivo principal deste experimento foi, portanto, averiguar a existência de possíveis correlações entre essas enzimas e a produção de biomassa em sete cultivares de milho. Na seleção desses materiais, procurou-se utilizar genó-