

Formação de Calos Embrionários em Genótipos de Milho Tropical

Fernanda Ferreira Salgado⁽¹⁾; Andréa Almeida Carneiro⁽²⁾; Meire de Cassia Alves⁽³⁾.

⁽¹⁾ Graduando em Biotecnologia, Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas; Minas Gerais; E-mail: fernanda-salgado@outlook.com; ⁽²⁾ Pesquisadora, Embrapa Milho e Sorgo; ⁽³⁾ Analista, Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: O milho é uma das maiores culturas de cereal do mundo. É empregado principalmente como ração animal, mas a indústria vem aumentando a sua utilização como insumo na fabricação de mais de uma centena de produtos. Assim, é de grande relevância para o desenvolvimento de novas linhagens mais produtivas estudos relacionados com a sua transformação genética. Para a produção de um evento transgênico de milho via *Agrobacterium tumefaciens* é essencial o estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração das células transgênicas. A embriogênese somática é o procedimento mais utilizado para regeneração de plantas de milho. O objetivo desse trabalho é selecionar linhagens tropicais capazes de formar embriões somáticos de maneira eficiente em Cultura de Tecidos utilizando como fonte de explante embriões zigóticos imaturos de 20 linhagens distintas de milho tropical fornecidas pelo Banco de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo. Os embriões imaturos foram cultivados em meio de indução de calos, suplementados com diferentes concentrações de 2,4-D (1,5; 5,0; 10,0 mg L⁻¹) sendo avaliados a porcentagem de calos embriogênicos formados. As linhagens L2, L12, L16 e L19 apresentaram alta capacidade de produção de calos embriogênicos. Estas linhagens poderão ser testadas na produção de plantas transgênicas de milho.

Termos de indexação: embriogênese somática, genótipos tropicais, concentração de 2,4-D.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) pertence à família das gramíneas; é uma planta anual, monóica, de fecundação cruzada. Seu grão é uma cariopse contendo somente um embrião (Gonçalves, 2013).

Segundo dados de 2016 da FAO – *Food and Agriculture Organization*, este cereal ocupa a terceira posição como cultivar de maior produção mundial, apresentando grande importância na economia brasileira devido à ocupação de destaque na produção agrícola do país, podendo ser utilizado na alimentação do gado, produção de etanol, produção de alimentos como amido, xarope de glicose, óleo, adoçante, entre outros (Cho, 2014). É produzido principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste.

O milho é a terceira maior cultura de cereal no Brasil com uma produção total de 84.7 milhões de toneladas, no ano 2015 (Conab 2016). Atualmente, a transformação genética de plantas está sendo utilizada como estratégia para obtenção de materiais com resistência a pragas e doenças, tolerância a herbicida e melhoria na qualidade nutricional. Devido a essa importância, é de grande relevância a seleção de genótipos tropicais com boa eficiência de regeneração em cultura de tecidos para o desenvolvimento de novas linhagens mais produtivas e adaptadas a diferentes estresses bióticos e abióticos utilizando a transgenia (Cho, 2014).

A cultura de tecidos vegetal é uma técnica utilizada para manipular plantas a nível celular em ambiente asséptico, sob condições controladas, sendo o melhoramento genético uma de suas principais aplicabilidades (Bevitori, 2013; Dagla, 2012).

A regeneração celular pode ocorrer através de duas vias a organogênese e a embriogênese somática (Gorji et al., 2011). A embriogênese somática é a técnica mais utilizada para a regeneração de milho *in vitro*. Calos embriogênicos de milho podem apresentar duas formas, calo do Tipo I e calo do Tipo II, sendo que os calos do Tipo II apresentam maior eficiência para regeneração de plantas (Armstrong e Green, 1985).

A regeneração é influenciada pelo tipo de explante e pela composição do meio de cultura

(Armstrong e Green, 1985; Songstad et al, 1991; Bohorova et al. 1995). Até o momento o escutelo de embriões imaturos e o meio de cultivo N6(Chu et al. 1975) suplementado com diferentes auxinas e citocininas tem sido a combinação de explante e meio de cultivo com os melhores resultados de regeneração para diferentes cultivares de milho.

Neste trabalho são apresentados os resultados da eficiência de formação de calos embriogênicos para 20 genótipos tropicais de milho cultivados em meio basal N6 suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas vinte linhagens distintas de milho tropical (**Tabela 1**), pertencente ao Banco de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas / MG. Embriões imaturos com 1,5 e 2,0 mm isolados entre dez a 15 dias após a polinização foram utilizados como explantes. .

Para a coleta dos embriões as espigas foram despalhadas, enxaguadas com álcool 70% e esterilizadas em solução de 1:1 de hipoclorito de sódio comercial a 50% e água destilada, com duas gotas de detergente comercial, por 20 minutos sobre agitação. Após este processo, dentro da câmara de fluxo laminar, as espigas passaram por tríplex lavagem com água destilada autoclavada. Posteriormente ao processo de esterilização, ocorreu a extração dos embriões imaturos.

Tabela 1 - Linhagens de Milho Tropical

Linhagem	Sigla do Melhoramento de Milho/CNPMS
L1	L-228-3
L2	L-262841-1-4-1
L3	521274
L4	531542
L5	521236
L6	L-521283
L7	371087-3
L8	371049-1
L9	541145
L10	371066-6
L11	521343
L12	371066-7
L13	3810227-1
L14	3820987-1
L15	482011-43
L16	590435-1
L17	3810067-7
L18	L-590027-7

L19	552220F
L20	3821095-5

Foram utilizados 360 embriões zigóticos imaturos de cada linhagem. Eles foram posicionados com o eixo embrionário em contato com o meio de indução de calos MICT (4,3 g de N6 sais; 30 g de sacarose; 100 mg de myo-inositol; 2,9 g de prolina; 3,0 g de phytigel; 15 mg de nitrato de prata; 1,0 ml de N6 vitaminas; PH 5,8) suplementado com diferentes concentrações de 2,4 D (1,5; 5,0 e 10,0 mg/L). As placas vedadas com filme PVC foram incubadas no escuro a temperatura de 28°C por 45 dias, sendo subcultivados a cada 15 dias.

Foram realizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta de uma placa contendo 30 embriões imaturos, totalizando 120 embriões por tratamento.

A formação de calos embriogênicos foi observada com o auxílio de um estereoscópio Zeiss.

A variável analisada foi a porcentagem de calos embriogênicos formados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo quatro linhagens de milho de origem tropical apresentaram capacidade de formação eficiente de calos embriogênicos em meio MICT suplementados com 2,4-D. As demais apresentaram baixa ou nenhuma formação de calos embriogênicos.

As linhagens utilizadas apresentaram resultados diferentes de acordo com a concentração de 2,4-D presente no meio basal. As linhagens L12 e L16 apresentaram melhor desenvolvimento no meio de indução de calos em concentração de 1,5 mg de 2,4-D e a L19 apresentou resultados satisfatórios em concentração de 5,0 mg de 2,4-D, enquanto que a linhagem L2 formou calos embriogênicos de maneira semelhante em todas as concentrações utilizadas (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Formação de calos embriogênicos de milho em meio N9 suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D.

Linhagem	Concentração de 2,4 D		
	1,5 mg	5,0 mg	10,0 mg
L1	5,55%	0%	2,22%
L2	31,67%	35,83%	45%
L3	11,67%	14,16%	8,33%
L4	3,33%	0%	12,5%
L5	13,33%	19,17%	8,89%

L6	20%	26,67%	1,67%
L7	18,33%	15,83%	4,17%
L8	0%	16,67%	0%
L9	3,33%	14,44%	18,33%
L10	21,67%	21,67%	0%
L11	5%	6,67%	5%
L12	68,89%	53,33%	14,17%
L13	26,67%	0%	1,67%
L14	5%	0%	0%
L15	0%	1,67%	1,67%
L16	54,17%	37,5%	12,5%
L17	10%	5%	3,33%
L18	0%	0%	0%
L19	26,67%	81,11%	85,83%
L20	24,17%	5%	7,5%

Figura 1: Tipos de calos mais comumente encontrados para as diferentes linhagens de milho cultivadas em meio N6 suplementado com 2,4-D.

CONCLUSÕES

O meio de cultura MICT suplementado com 2,4-D apresentou capacidade de indução de calos embriogênicos para quatro linhagens de milho tropical.

Experimentos futuros serão direcionados para a regeneração dos calos embriogênicos. Também será testada a capacidade da *Agrobacterium tumefaciens* em infectar estes genótipos tropicais de milho.

AGRADECIMENTOS

A EMBRAPA Milho e Sorgo e a Fapemig pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, C.L.; GREEN, C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* v. 164, p.207-214, 1985.

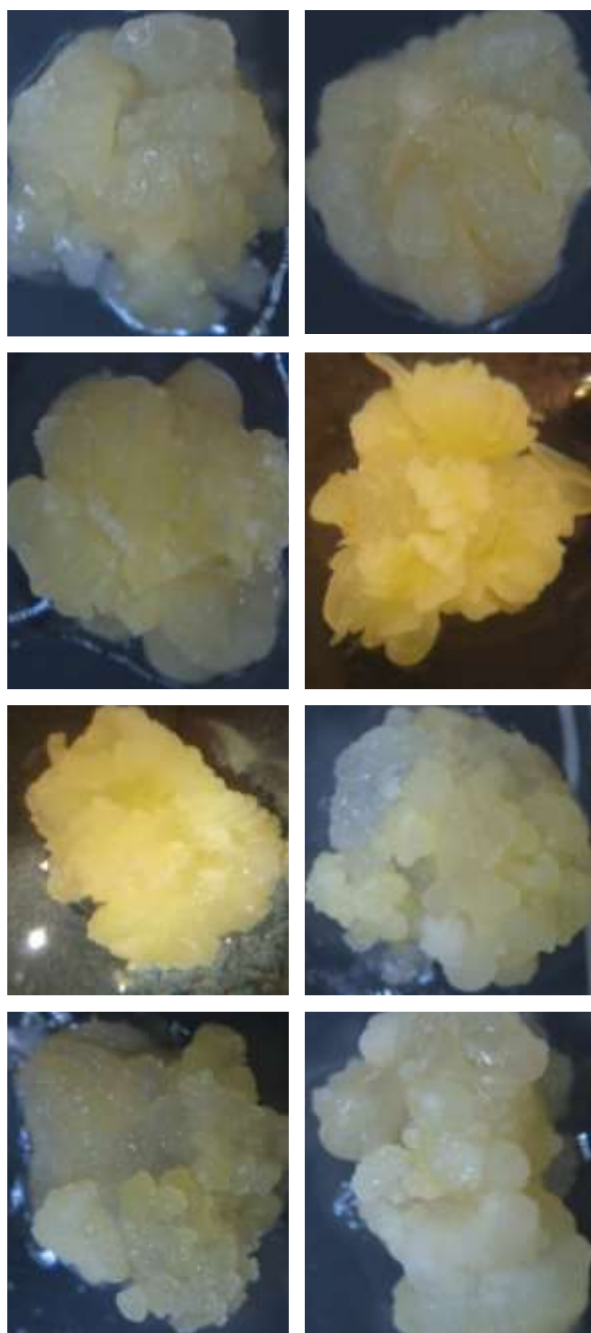
BEVITORE, R. Cultivo in vitro do arroz (*Oryza sativa* L.): Conceitos básicos e protocolos. v. 21, p.16-22, 2013.

BOHOROVA, N. E.; LUNA, B.; BRITO, R. M.; HUERTA, L. D.; HOISINGTON, D.A. Regeneration potential of tropical, subtropical, mid altitude, and highland maize inbreds. *Maydica*, v. 40, p. 275-281, 1995.

CHO M-J.; WU, E.; KWAN, J.; YU, M.; BANH, J.; LINN, W.; ANAND, A.; LI, Z.; TERONDE, S.; REGISTER III, J.C.; JONES T.J.; ZHAO Z-Y. *Agrobacterium*-mediated high-frequency transformation of an elite commercial maize (*Zea mays* L.) inbred line. *Plant Cell Rep*, v.33, p.1767-1777, 2014.

Conab Companhia Nacional de Abastecimento (2016) Acompanhamento da Safra Brasileira / grãos. Versão3 – Safra 2015/16 – N.8. Available at http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_10_09_03_26_boletim_graos_maio_2016.pdf. Accessed on May12, 2016.

DAGLA, H R. Plant Tissue Culture: Historical Developments and Applied Aspects. *RESONANCE*, p.759-767, 2012.



FAO - Food and Agriculture Organization. Disponível em:
<http://www.fao.org/home/en/>. Acesso em 19 abril 2016.

GARROCHO-VILLEGAS, V; JESÚS-OLIVEIRA, M, T;
QUINTANAR, E,SI; Maize SomaticEmbryogenesis:
Recent Features to Improve Plant Regeneration. Víctor M.
Loyola-Vargas and Neftalí Ochoa-Alejo (eds.), Plant Cell
Culture Protocols, Methods in Molecular Biology, v. 877,
p.173-182, 2012.

GONÇALVES, G. M. B.; Desempenho Agrônômico e
Adaptativo e Divergência Genética de População de Milho
Local Derivadas de MPA1 em Processo de Melhoramento
Genético. 2013. f.48.Monografia na área de Agronomia -
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GORJI, A. Y.; In vitro plant generation of tropical maize
genotypes. 2011 International Conference on
Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE
v.16, p.52-59, 2011.

RODRIGUEZ, J, P; MANZANO, C; MORENO-RISUENO,
M, A;; Post-embryonic organogenesis and plant
regeneratio from tissues: two sides of the same coin ?.
Review Article, v.5, article 219, 2014.

SONGSTAD, D.D.; ARMSTRONG, C.L.; PETERSEN,
W.L. Silver nitrate increase type II callus production from
immature embryos of maize inbred B73 and its
derivatives. Plant Cell Reports, v.9, p.699-702, 1991.

SOUZA, R. A. V.; Transformação Genética e Avaliação de
Promotores Heterólogos para o Controle de Expressão
Gênica em Milho. 2015. f 103. Dissertação (Doutorado em
Fitotecnia) - Curso de Pós-graduação em Fitotecnia - UFV
- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.