

Influência do tipo e da concentração de auxina na formação de calos embriogênicos de linhagem de milho tropical

Rafaeli Aparecida Vieira De Souza (1); Kamila Ellen Souza de Oliveira (2); Meire de Cássia Alves (3); Newton Portilho Carneiro (4); Aluizio Borém (5); Andréa Almeida Carneiro (6).

(1) Professora e pesquisadora; Universidade Estado da Bahia; Paulo Afonso, BA; rafaeli.vieira@hotmail.com; (2) Estudante graduação; Universidade Federal de São João Del Rei; (3) Analista; Meire de Cássia Alves; Embrapa Milho e Sorgo; (4) Pesquisador; Newton Portilho Carneiro; Embrapa Milho e Sorgo; (5) Professor e pesquisador; Universidade Federal de Viçosa; (6) Pesquisadora; Andréa Almeida Carneiro; Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: Protocolos de regeneração *in vitro* de milho tropical são essenciais para a produção de plantas transgênicas. A metodologia mais estudada para a regeneração de milho *in vitro* é a embriogênese somática. O objetivo deste trabalho foi avaliar três meios de cultivo para a indução de calos embriogênicos, baseados em N6 ou MS sais contendo diferentes concentrações das auxinas 2,4-D ou Dicamba, para a produção de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos imaturos da linhagem de milho tropical elite L3. Após desenvolvimento dos calos, eles foram transferidos para meio de maturação MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP, ANA e CuSO₄. A linhagem testada apresentou excelente formação de calos embriogênicos dos tipos I e II. A formação de calos tipo I foi favorecida em meio basal N6 contendo baixas concentrações de 2,4-D, enquanto que a de calos tipo II foi maior em concentração acima de 5 mg L⁻¹ de 2,4-D. Alta eficiência de formação de calos do tipo I também foi obtida em meio basal N6 suplementado com concentrações entre 1 e 4 mg L⁻¹ de Dicamba. A maturação e regeneração dos calos foi favorecida pela adição de CuSO₄ no meio de cultura. Os testes e tratamentos adotados mostraram que é possível estabelecer protocolos eficientes de regeneração de diferentes genótipos de milho tropical.

Termos de indexação: embriões imaturos, cultivo *in vitro*, hormônios vegetais.

INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no cenário mundial como o terceiro maior produtor de milho, com uma produção média esperada de 81,2 milhões de toneladas para a safra 2016, segundo informativo do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Sua importância econômica varia entre fonte de alimentação humana e animal e, fonte de matéria prima para produtos industrializados (Gorji et al., 2011). Tal importância reforça a necessidade de pesquisas cada vez mais avançadas, em áreas tais

como melhoramento genético e biotecnológico visando maior produtividade e tolerância a estresses bióticos e abióticos.

A transformação genética e a regeneração de plantas *in vitro* são essenciais para a aplicação das modernas técnicas de biologia molecular no melhoramento de genótipos tropicais de milho. O estabelecimento de um sistema de regeneração eficiente é um dos fatores limitantes para a aplicação da técnica na maioria dos genótipos de milho (Ombori et al., 2008). As metodologias utilizadas para regenerar uma planta são a organogênese e a embriogênese somática, sendo que a última é a mais utilizada para genótipos de milho.

O tipo de explante utilizado influencia a eficiência da regeneração *in vitro*. Os principais estudos na área utilizam embriões zigóticos imaturos. Eles são capazes de gerar calos embriogênicos dos tipos I e II (Gorji et al., 2011). Ambos os calos são capazes de regenerar plantas, mas o tipo II, mais friável e altamente embriogênico, apresenta crescimento mais rápido e é capaz de formar um maior número de embriões e pode ser mantido por um tempo maior em cultivo.

Os calos tipo II são mais difíceis de serem obtidos, uma vez que poucos genótipos de milho expressam esta característica em meio de cultura. Para a indução de calos embriogênicos é mais comum a utilização de linhagens e híbridos adaptados à regiões de clima temperado (Santos-Serejo & Aguiar-Perecin, 2000), porém alguns trabalhos já apresentam resultados positivos para a regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de linhagens tropicais. A possibilidade de manipular tais genótipos acelera o melhoramento de linhagens de milho tropical. Faz-se necessário então, obter um genótipo tropical com alta resposta à embriogênese e ao cultivo *in vitro* e que apresente desempenho similar aos genótipos comerciais.

A composição dos meios de cultura utilizados influencia no sucesso da regeneração de plantas.

Para o cultivo *in vitro* de milho é mais comum utilizar formulações com base em Murashige & Skoog (1962) ou Chu et al. (1975). Para a formação dos calos embriogênicos estes meios basais são suplementados normalmente com auxinas tais como, 2,4-D ou dicamba. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de indução e regeneração de calos embriogênicos para a linhagem elite de milho tropical L3, testando a capacidade dos embriões zigóticos imaturos em formar calos em três meios de indução diferentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Os embriões imaturos utilizados durante o experimento foram obtidos de plantas de milho da linhagem elite L3, cultivados em canteiros na Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). Eles foram isolados das espigas com aproximadamente 1,5 e 2,0 mm de comprimento, 10 a 15 dias após a polinização.

Para esterilização superficial das espigas, estas foram imersas em uma solução de 50% água sanitária comercial acrescida de duas gotas de Tween 20, por 40 min, sob agitação. Em seguida, dentro de fluxo laminar elas foram enxaguadas três vezes com água destilada estéril e os embriões foram isolados com o auxílio de uma espátula estéril.

Cultivo dos embriões em meios de cultura

Os embriões imaturos foram cultivados em três diferentes meios de cultura, com o eixo embrionário em contato com o meio de cultivo (**Tabela 1**). Os meios testados foram M1, M2 e M3, sendo que M1 e M2 continham N6 sais e foram baseados em trabalhos de Chu et al. (1975), e M3 continha MS sais e foi baseado em Carvalho et al. (1997). Os tratamentos foram suplementados com diferentes concentrações de auxina: para o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) testou-se as concentrações de 0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 30,0 mg L⁻¹, e para o ácido 3,6-dicloro-o-anísico (Dicamba) as concentrações de 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹, totalizando 36 tratamentos. A composição dos meios de culturas está detalhada na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultura utilizados para a indução de embriões somáticos.

Meio	Composição
M1	N6 Sais e vitaminas (Chu et al., 1975); 30 g L ⁻¹ de sacarose; 100 mg L ⁻¹ de caseína hidrolisada; 100 mg L ⁻¹ de myo-inositol; 2,9 g L ⁻¹ de L-prolina; 15 mg

L⁻¹ de nitrato de prata; 3 g L⁻¹ de Phytigel; pH 5,8.

M2 N6 Sais e vitaminas (Chu et al., 1975); 30 g L⁻¹ de sacarose; 100 mg L⁻¹ de hidrolisado de caseína; 2,9 g L⁻¹ de L-prolina; 0,01 g L⁻¹ de MES; 5,5 mg L⁻¹ de glicina; 0,85 mg L⁻¹ de nitrato de prata; 3 g L⁻¹ de Phytigel; pH 5,8.

M3 MS Sais e vitaminas (Murashige & Skoog, 1962); 30 g L⁻¹ de sacarose; 0,7 g L⁻¹ de L-prolina; 0,5 g L⁻¹ de MES; 0,85 mg L⁻¹ de nitrato de prata; 3 g L⁻¹ Phytigel; pH 5,8.

A cada 14 dias os calos formados foram transferidos para novo meio de cultura. Após três transferências, ou seja, ao final de 42 dias, os calos foram avaliados e a formação de calos Tipo I ou Tipo II foi quantificada. O trabalho foi avaliado usando um fatorial triplo 3x2x6, onde os fatores avaliados foram: (i) Fator 1: Meios de cultura; (ii) Fator 2: Tipo de auxina; (iii) Fator 3: Concentração de auxina. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Para cada repetição utilizou-se 24 embriões imaturos, totalizando 96 embriões por tratamento. A variável analisada foi percentagem de calos Tipo I e Tipo II e o software utilizado foi o programa R (R Core Team, 2015).

Maturação e regeneração dos calos

Apenas os calos obtidos a partir do meio que apresentou melhor resultado para indução de calos embriogênicos foram utilizados para testes de maturação. Os calos selecionados foram divididos em 16 novos tratamentos, em meio que favorece a maturação: MS sais e vitaminas (60 g L⁻¹ de sacarose; 100 mg L⁻¹ de myo-inositol; 6 g L⁻¹ Phytigel) ou 1,25 mg L⁻¹ de CuSO₄ (Cho et al., 2014); combinações de 6-benzil-amino-purina (6-BAP), nas concentrações de 0; 0,1; 0,5; 1,0 mg L⁻¹; e ácido naftaleno acético (ANA) nas concentrações de 0; 1,0 mg L⁻¹. Os calos foram mantidos nos meios durante 42 dias, a 27 °C, no escuro.

Os embriões maduros que apresentaram coloração branca opaca foram transferidos para frascos Magenta (Sigma/Brasil) contendo meio MS sem regulador de crescimento e foram incubadas a 27 °C, sob fotoperíodo de 16 horas, até germinação, cerca de duas semanas.

Para avaliação destes resultados foi utilizado um duplo fatorial 8x2, onde os fatores eram: (i) Fator 1: regulador de crescimento; (ii) Fator 2: CuSO₄. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Cada repetição consistiu em quatro embriões somáticos, num total de 20 calos por tratamento. As variáveis analisadas foram:

porcentagem de maturação dos calos e número de plantas germinadas. O software utilizado foi o programa R (R Testemunho Team, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já descrito por Feher (2015), a composição do meio afeta o desempenho do explante utilizado e a embriogênese só é iniciada após uma combinação de condições. A influência da auxina na capacidade dos embriões imaturos L3 em formar calos embriogênicos foi claramente observada nesse trabalho, com variações nos resultados devido ao tipo e à concentração utilizada. Para o fator formação de calos, a análise estatística apontou que a formação de calos Tipo I reduz conforme aumenta a concentração de 2,4-D. Comparativamente, os meios com Dicamba formam mais calos Tipo I, que foram favorecidos nos meios M2 e M3, onde a formação aumentou com a concentração de Dicamba até 1 mg L⁻¹, estabilizando-se depois. Ao contrário do comportamento observado para M2 e M3, em M1 a elevação da concentração de Dicamba foi acompanhada por um aumento das porcentagens de formação de calo do Tipo I (Figura 1).

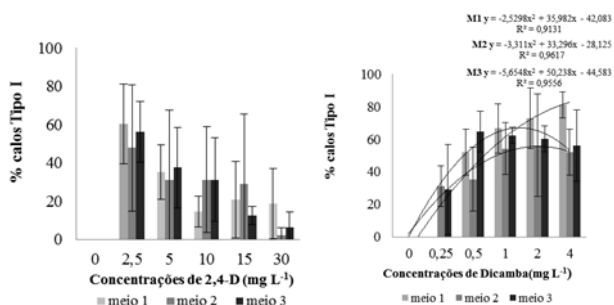


Figura 1. Porcentagem de calos Tipo I obtidos com os meios M1, M2 e M3 e os reguladores 2,4-D (0; 2,5; 5; 10; 15 e 30 mg L⁻¹) ou dicamba (0, 0,25; 0,50; 1; 2; 4 mg L⁻¹).

A análise estatística revelou ainda uma interação entre os fatores meios de cultura, tipo e concentração de auxinas, utilizados para induzir calos Tipo II. No meio M1 suplementado com 10 a 30 mg L⁻¹ de 2,4-D, houve maior porcentagem de calos Tipo II, com elevado número de embriões na fase global, sendo que a maior produção ocorreu em concentrações maiores ou iguais a 10 mg L⁻¹ de 2,4-D. Para Dicamba, independentemente do meio, a quantidade mínima requerida para a formação de calos Tipo II foi 2 mg L⁻¹. No entanto, a geração de calo Tipo II na presença de 10 mg L⁻¹ de 2,4-D foi mais expressiva do que em presença de 2 mg L⁻¹ de Dicamba (Figura 2).

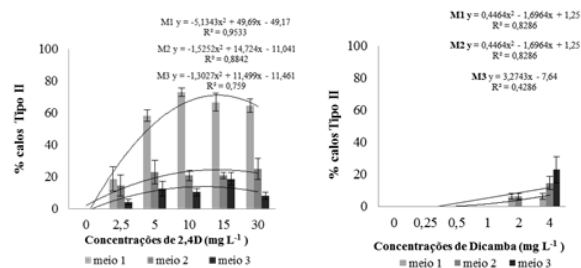


Figura 2. Porcentagem de calos Tipo II obtidos com os meios M1, M2 e M3 e os reguladores 2,4-D (0; 2,5; 5; 10; 15 e 30 mg L⁻¹) ou dicamba (0, 0,25; 0,50; 1; 2; 4 mg L⁻¹).

Há trabalhos que recomendam tanto 2,4-D quanto Dicamba para formação de calos Tipo II a partir de embriões zigóticos de milho. Neste estudo, constatou-se que as concentrações testadas de Dicamba não foram adequadas para alcançar altos níveis de formação de calos Tipo II para a linhagem elite L3. Entretanto, a combinação do meio M1 com 4 mg L⁻¹ de Dicamba resultou em mais de 80% de formação do calo Tipo I. Este calo também pode ser usado para regenerar plantas transgênicas de milho, embora com eficiência mais baixa. Nas menores concentrações de 2,4-D ou nas doses testadas de Dicamba houve a formação predominante de calo do Tipo I, independente do tratamento.

A formação de embriões somáticos pode ser explicada pela interação das condições ambientais ou dos níveis endógenos de hormônio, que dependem do genótipo e da fase de desenvolvimento do explante (Feher, 2015).

A maturação de embriões é um processo que ocorre antes da germinação de plântulas. Neste trabalho o único fator que influenciou a maturação dos calos foi a presença de CuSO₄ no meio de cultura. Estudos de Cho et al. (2014) demonstraram que o aumento da quantidade de cobre no meio de cultura melhora a regeneração de culturas de calo de milho, uma vez que este é um micronutriente essencial para o desenvolvimento normal das plantas, atuando como ativador ou constituinte de enzimas. Tais resultados diferem dos encontrados por Ombori et al. (2008), que relatou que BAP e ANA foram eficazes na maturação de embriões somáticos de milho. Durante o período de 42 dias, houve uma maior porcentagem de maturação dos calos nos tratamentos em que CuSO₄ estava presente (Tabela 2).

Tabela 2 – Porcentagem média de calos maturados e número de plantas de milho regeneradas na presença ou na ausência de CuSO₄.

Tratamentos	Calos maturados (%)	Nº de plantas regeneradas (%)
Com CuSO ₄	92,5 a	9,0
Sem CuSO ₄	76,87 b	4,8
CV %	27,44	-

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

Estudos têm demonstrado que um aumento do nível do cobre no meio de cultura melhora a regeneração de calos embriogênicos de milho (Cho et al., 2014).

A linhagem L3 mostrou-se eficiente na capacidade embriogênica *in vitro* e foi capaz de regenerar plantas completas e férteis (**Figura 3**). Além disso, esta linhagem tropical tem excelente aptidão agrônômica, o que a torna uma boa opção para ser utilizada em transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* ou biobalística.

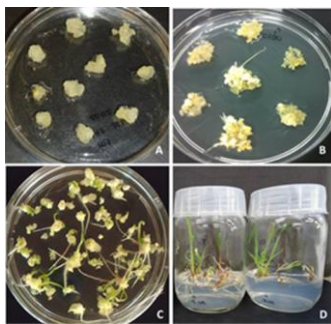


Figura 3. (A) Formação de calos após 4 semanas de cultivo em meio N6 suplementado com 10 mg L⁻¹ de 2,4-D; (B) Maturação após 3 semanas de cultivo no teor médio de CuSO₄; (C) Germinação dos calos; (D) Regeneração de plântulas de milho.

CONCLUSÕES

Meio M1 é eficiente para induzir a formação de calos tipo I (4 mg L⁻¹ Dicamba) e tipo II (10 mg L⁻¹ 2,4-D) na linhagem tropical de milho L3.

A presença de CuSO₄ no meio de cultura aumenta a maturação dos calos tipo II e a regeneração de plantas de milho.

O protocolo de regeneração desenvolvido mostrou ser eficiente para regenerar células transgênicas a partir de embriões zigóticos imaturos.

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA, à Fapemig e à CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ABEBE, D. Z.; TEFFERA, W.; MACHUKA J. S. Regeneration of tropical maize lines (*Zea mays* L.) from mature zygotic embryo through callus initiation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 13, p. 2181-2186, 2008.

ANAMI, S.; MGUTU, A.; TARACHA, C.; COUSSENS, G.; KARIMI, M.; HILSON, P.; LIJSEBETTENS, M.V.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, p. 285-295, 2010.

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.

CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. **Scientia Sinica**, v.16, p.659-668, 1975.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – Stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochim. Bioph. Acta**, v.1849, p.385-402, 2015.

FRAME, B. R.; MCMURRAY, J. M.; FONGER, T. M.; MAIN, M.L.; TAYLOR, K.W.; TORNEY, F. J.; PAZ, M. M.; WANG, K. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. **Plant Cell Rep**, v.25, p.1024-1034, 2006.

GONZALÉZ, G. A.; PACHECO, M. G.; ONETO, C. D. ETCHART, V. J.; KANDUS, M. V.; SALERNO, J. C.; EYHERABIDE, G.; PRESELLO, D.; LEWI, D. M. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 15, n. 1, 2012.

GORJI, A. H.; ZOLNOORI, M.; JAMASBI, A.; ZOLNOORI, Z. In vitro plant generation of tropical maize genotypes. In: International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology, 2001, Singapura, 2011, v. 16, p. 52-59.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola 2016. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sis_tematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Comentarios/lspa_201604comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sis_tematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Comentarios/lspa_201604comentarios.pdf)>. Acesso em 14 de maio de 2016.

LUCENA, A. L. M.; ELOI, I. B. O.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Embriogênese somática em milho: trajetória e eficiência. **Plant Cell Culture e Micropropagation**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 33-77, 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant physiology*, v.15, p.473-497, 1962.

OMBORI, O.; GITONGA, N. M.; MACHUKA, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Biotechnology*, v. 7, n. 2, p. 224-232, 2008.

SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. R. L. Genótipos de milho com alta capacidade para embriogênese somática e regeneração de plantas obtidas a partir de calos. *Scientia Agrícola*, v. 57, n. 4, p. 717-722, 2000.

VASCONCELOS, M. J. V.; FONTES, M. A.; CARVALHO, C. H. S.; LOPES, M. A. Regeneração in vitro de milho tropical de alta qualidade proteica. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 8, n. 2, p. 105-116, 2009.