

EMBRIOGENESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO EM CULTURA DE TECIDOS DE LINHAGENS DE MILHO TROPICAL

Fernanda Ferreira Salgado*

Andréa Almeida Carneiro **

Emanuelle Taís da Silva Souza***

RESUMO

O milho é uma das maiores culturas de cereal produzida e comercializada no mundo. A aplicação de técnicas biotecnológicas, em especial a transgenia, vêm contribuindo decisivamente para o desenvolvimento de novas linhagens de milho tolerantes a diferentes estresses bióticos e abióticos. A produção de linhagens transgênicas é dependente da regeneração *in vitro* de células transformadas do milho. A capacidade de regeneração *in vitro* é influenciada pelo genótipo e pela constituição do meio de cultivo. O objetivo desse trabalho foi estabelecer uma concentração ótima de 2,4-D para a indução de calos embriogênicos em linhagens tropicais de milho L03, L12 e L16, pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo. Embriões imaturos foram cultivados em meio N6 suplementado com diferentes concentrações de 2,4D (1,5; 5,0; 10,0 mg/L), sendo avaliado a porcentagem de calos embriogênicos formados e sua morfologia. Os resultados mostraram que diferentes concentrações de 2,4-D foram necessárias para a indução de calos embriogênicos nas linhagens L03 (5 mg/L), L12 (1,5 mg/L) e L16 (1,5 mg/L), indicando influência do genótipo. Todas as linhagens desenvolveram calos embriogênicos, porém a linhagem L03 apresentou maior formação, cerca de 90%. Estas linhagens poderão ser utilizadas em trabalhos futuros para a produção de milho geneticamente modificado.

Palavras-chave: Concentração de 2,4-D, Embriogênese somática, Genótipos tropicais, Regeneração *in vitro*.

ABSTRACT

Maize is one of the cereal crops most produced and commercialized in the world. The application of biotechnological techniques, especially transgenic, has been contributing for the development of new lines of maize, tolerant to different abiotic and biotic stresses. The production of transgenic lines is dependent of *in vitro* regeneration of maize transformed cells. *In vitro* regeneration capability is influenced by genotype and by the constitution of the culture media. This study aimed to establish a great 2,4-D concentration for the induction of embryogenic calli in tropical maize lines L03, L12 and L16, from Embrapa Milho e Sorgo's germoplasm bank. Immature embryos were cultivated in N6 medium, supplemented with different concentrations of 2,4-D (1.5, 5.0, 10.0 mg/L), being evaluated by the percentage of embryogenic calli formed and their morphology. Results shows that different concentrations of 2,4-D were necessary for embryogenic callus induction in the lines L3 (5.0 mg/L), L12 (1.5 mg/L), and L16 (1.5 mg/L), indicating genotype influence. All the studied maize lines formed embryogenic callus, however, the L03 line showed a higher number of callus, approximately 90%. These maize lines can be used in future studies for genetic modified maize production.

Keywords: 2,4-D concentration, somatic embryogenesis, tropical genotypes, *in vitro* regeneration.

* Graduando em Biotecnologia, Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas; Minas Gerais;

E-mail: fernanda-salgado@outlook.com;

** Pesquisadora Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais; E-mail: andrea.carneiro@embrapa.br

*** Professora na Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas; Minas Gerais;

E-mail: manutsouza@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) apresenta grande importância na economia brasileira sendo um dos cereais mais produzidos, podendo ser utilizado na alimentação do homem, do gado e como matéria-prima para produção de alimentos, combustíveis e uma grande quantidade de produtos industrializados. De acordo com dados fornecidos pela CONAB, a produção na safra de 2014/2015 alcançou aproximadamente 85 milhões de toneladas. Esse aumento se deu em consequência da utilização de técnicas de melhoramento genético, no auxílio de desenvolvimento de novas cultivares mais adaptadas a diversidade ambiental. Atualmente, com o aparecimento de tecnologias de engenharia genética novas ferramentas foram acrescentadas aos programas de melhoramento clássico, contribuindo assim, para um crescente aumento da produção e produtividade, redução da utilização de agroquímicos e conservação da biodiversidade (FEHER, 2015).

Dentre estas novas ferramentas biotecnológicas a transformação genética de plantas pode contribuir para o desenvolvimento de cultivares de milho melhor adaptados aos estresses bióticos e abióticos, através do emprego de genes específicos capazes de alterar o genoma do milho, via complementação, superexpressão ou silenciamento. Entretanto, durante a transformação genética, apenas poucas células dos explantes são modificadas geneticamente e existe a necessidade de selecionar, multiplicar e regenerar estas células para a obtenção de uma planta transgênica. De acordo com Alves *et al.* (2016), a principal barreira na transformação não é a inserção de fragmentos de DNA de interesse nas células das plantas, mas na recuperação de células que adquiriram este DNA através da regeneração de plantas *in vitro*.

O processo de multiplicação e regeneração *in vitro* do milho pode ocorrer por duas vias distintas, a organogênese ou a embriogênese. A embriogênese somática é o método mais utilizado para multiplicação e regeneração do milho e foi descrita pela primeira vez por Green e Philips (1975). Estes autores utilizaram embriões imaturos como fonte de explante para formação de calos embriogênicos e regeneração de plantas *in vitro*. As culturas embriogênicas de milho podem produzir calos do Tipo I e Tipo II. Os calos de Tipo II apresentam maior competência para a regeneração de plantas de milho.

Atualmente existem diversos estudos de transformação genética e regeneração de plantas de milho de clima temperado, sendo escasso estudos sobre o milho tropical. Este projeto justifica-se pela grande importância de desenvolver protocolos de cultura de tecidos, aplicáveis especificamente para o desenvolvimento de embriogênese somática em linhagens de milho tropical visando, futuramente, a utilização das linhagens selecionadas para a produção de plantas transgênicas, expressando características de interesse agrônomico.

Este estudo apresenta a seguinte questão norteadora: Embriões imaturos de linhagens de milho de origem tropical respondem de maneira semelhante quando cultivados em um mesmo meio de cultura? Para responder esta questão foram levantadas duas hipóteses: (1) um aumento de auxina no meio de cultura proporcionará um aumento na indução de calos embriogênicos nos diferentes genótipos de milho tropical testados; (2) A auxina 2,4-D em diferentes concentrações é capaz de induzir a formação de calos embriogênicos nas diversas linhagens de milho tropical. Realizou uma pesquisa laboratorial exploratória, qualitativa, quantitativa e experimental, cujos principais objetivos do presente estudo foram: (1) analisar o desenvolvimento de calos embriogênicos em cultura de tecidos em três linhagens de milho de origem tropical; (2) estabelecer uma concentração ótima da auxina 2,4-D para a indução de calos embriogênicos nas 3 linhagens de milho testadas.

REFERÊNCIAL TEÓRICO

MILHO

O milho (*Zea mays*) é uma gramínea, de ciclo agrônomico anual, monóica, apresenta fecundação cruzada. Seu grão é uma cariopse contendo um embrião (GONÇALVES, 2013). É uma planta alógama com praticamente 100% de reprodução cruzada, pertence à família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L., com $2n = 2x = 20$ cromossomos (PATERNIANI E CAMPOS, 1999).

O milho é uma planta fortemente domesticada e historicamente a espiga de milho mais antiga foi encontrada na região do México, no vale de Tehucan, datada de 7.000 a.C, sendo o México considerado o centro de origem do milho, juntamente

com a Guatemala (RODRIGUES, 2015). Devido à sua adaptabilidade e produtividade, o milho espalhou-se rapidamente pelo mundo depois que os europeus o levaram das Américas para a Europa nos séculos XV e XVI. Este cereal pode ser encontrado em regiões com baixos e altos níveis de precipitação, climas tropicais e temperados e altitudes até 4.000 metros acima do nível do mar (SALVADOR, 1997). Pode ser cultivado em uma ampla gama de condições, no entanto, o limite de temperatura para a sobrevivência e reprodução de milho está entre 10 °C e 30 °C (PATERNIANI E CAMPOS, 1999).

Segundo dados da FAO – *Food and Agriculture Organization*, este cereal ocupa a terceira posição como cultivar de maior produção mundial, após o trigo e o arroz. O Brasil produziu em 2015 aproximadamente 85 milhões de toneladas de milho em 16 milhões de hectares (CONAB, 2016).

Os melhoristas de milho foram os grandes responsáveis pelo aumento da produtividade deste cereal nas últimas décadas, utilizando rigorosos programas de seleção e melhoramento de cultivares (SUN *et al.*, 2013). A partir da segunda metade do século XX, o desenvolvimento de híbridos aumentou a produtividade e a qualidade do milho. Atualmente, informações sobre o genoma do milho vêm sendo disponibilizadas frequentemente (FEUILLET E EVERSOLE, 2009) e existe um grande potencial de utilização destes dados para a melhoria da produtividade deste cereal através da transformação genética.

A transformação genética do milho vem sendo realizada principalmente por meio da biobalística ou *Agrobacterium tumefaciens* (FRAME *et al.*, 2011). Por meio desses sistemas de transformação resistência a diferentes estresses bióticos e abióticos já foram introduzidas no milho. Características relacionadas ao desenvolvimento da planta e à qualidade do produto também podem ser alteradas em plantas geneticamente modificadas (ANDRADE *et al.*, 2003).

CULTURA DE TECIDOS VEGETAL

A cultura de tecidos vegetal *in vitro* é uma técnica utilizada para manipular plantas a nível celular em ambiente asséptico, sob condições controladas de nutrientes, temperatura, umidade e luz (BEVITORI, 2013). Para a produção de milho transgênico é essencial a regeneração de uma planta a partir da célula que foi transformada (DAGLA, 2012). Esta regeneração celular ocorre essencialmente em

cultura de tecido. A regeneração *in vitro* de milho é mais eficiente por meio da embriogênese somática, e vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de criar protocolos bem ajustados para serem aplicados na transformação do milho (ANAMI *et al.*, 2010; AKOYI *et al.*, 2013).

A embriogênese somática *in vitro* é o processo pelo qual células se regeneram, passando por diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. No milho, calos embriogênicos são classificados como Tipo I ou II, os quais se diferenciam basicamente em sua capacidade de regeneração de plantas durante um longo período em cultura (SOUZA, 2015). O calo do Tipo I é compacto, amarelado ou de cor branca. O Tipo II é macio, friável e altamente embriogênico (ARMSTRONG E GREEN, 1985).

Embora ambos os calos sejam capazes de regenerar plantas, as culturas formadas pelo calo Tipo II crescem mais rapidamente, podem ser mantidas por um longo período de tempo e formar um grande número de embriões somáticos. Estas características favorecem a seleção e regeneração de plantas transgênicas (GONZÁLES *et al.*, 2012). O tipo de calo formado e a capacidade de regeneração são características controladas geneticamente. A ocorrência de calos do Tipo II não é tão frequente, apenas poucos genótipos de milho são capazes de formar este tipo de calo (ALVES *et al.*, 2015), especialmente o híbrido temperado Hill (GONZÁLES *et al.*, 2012; RODRIGUEZ *et al.*, 2014), obtido a partir do cruzamento de linhagens A188 × B73. Entretanto, o híbrido Hi II apresenta baixa eficiência agrônômica e é difícil de ser cultivado em condições de clima tropical (ALVES *et al.*, 2016).

Portanto, existe grande interesse na seleção de genótipos tropicais capazes de formarem calos embriogênicos e regenerarem eficientemente *in vitro*, estes genótipos poderão ser utilizados para a produção de plantas transgênicas de milho (GONZÁLES *et al.*, 2012). Este estudo disponibilizará linhagens de milho de origem tropical que apresentem alta capacidade de formação de calos embriogênicos e regeneração *in vitro* juntamente com bom desempenho agrônômico, auxiliando assim no desenvolvimento de programas de melhoramento de milho (GARROCHO-VILLEGAS *et al.*, 2012).

FONTES DE EXPLANTE

De acordo com Akoyi *et al.*, (2013), o explante mais adequado para iniciar culturas regeneráveis de milho é o embrião imaturo excisado da semente, num período de 11 a 18 dias após a polinização, com o comprimento entre 1,0 a 2,0 mm aproximadamente. O período de coleta dos embriões, após a polinização, pode variar de acordo com a região geográfica em que a planta doadora se desenvolve, do seu fenótipo e da época do ano em que se realiza a coleta (SUN *et al.*, 2013; SOUZA, 2015).

Estudos mostraram que embriões de tamanhos menores de 1,0 mm se desenvolvem lentamente ou não apresentam respostas em relação à indução de calos, e embriões maiores que 2,0 a 3,0 mm formam calos moles, escuros e com baixa probabilidade de desenvolvimento (LUCENA *et al.*, 2015).

COMPONENTES DO MEIO DE CULTURA

A composição química e física do meio de cultura apresenta grande relevância para se obter resultados satisfatórios na iniciação e desenvolvimento do explante. O meio nutritivo consiste em uma mistura de macronutrientes e micronutrientes (nutrientes inorgânicos), carboidratos, vitaminas, reguladores de crescimento vegetal, suplementos orgânicos (vitaminas, aminoácidos, etc) (LUCENA *et al.*, 2015). Concentrações adequadas destes nutrientes são fundamentais para uma regeneração eficiente de plantas em cultura de tecidos (MORAIS, 2012).

Macronutrientes e micronutrientes são essências para o desenvolvimento vegetal, pois atuam nas funções fisiológicas, bioquímicas e no metabolismo. Elementos minerais são muito importantes na vida de uma planta, portanto estão sempre presentes no meio de cultivo (OMER *et al.*, 2012). As formulações salinas mais utilizadas no cultivo do milho são o meio MS (MURASHIGE E SKOOG; 1962) e meio N6 (CHU *et al.*, 1975), com algumas modificações genótipo-específicas (GARROCHO-VILLEGAS *et al.*, 2012; GONZÁLES *et al.*, 2012).

No cultivo *in vitro* do milho a sacarose é utilizada como fonte de carbono, devido a sua alta solubilidade e rápida metabolização. A concentração de sacarose pode ser diferente de acordo com o genótipo a ser avaliado, sendo que, os valores mais utilizados estão entre 2% a 3% na etapa inicial de formação e propagação de calos, e etapa de maturação varia entre 3% a 6% (LUCENA *et al.*, 2015).

As auxinas e citocininas atuam como reguladores de crescimento, apresentando um papel importante no cultivo *in vitro*. As auxinas auxiliam na divisão celular e expansão dos tecidos, enquanto as citocininas são regularmente utilizadas para estimular brotações múltiplas (MORAIS, 2012). As substâncias reguladoras de crescimento mais empregadas na indução de calos embriogênicos em milho são o 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) e dicamba (3,6-dicloro-2-ácido metoxybenzoico). Sendo comum no cultivo *in vitro* utilizar diferentes concentrações de 2,4-D e dicamba para avaliar o potencial de indução de calos em um determinado genótipo (GONZÁLES *et al.*, 2012; OMER *et al.*, 2012; SOUZA, 2015). Geralmente, a citocinina não é requerida para indução de calos em gramíneas (GRANDO *et al.*, 2002).

O nitrato de prata (AgNO_3) é utilizado como inibidor da ação do etileno, hormônio que prejudica o desenvolvimento de calos embriogênicos friáveis, tendo efeito benéfico na embriogênese somática favorecendo a produção de calos embriogênicos Tipo II (OMER *et al.*, 2012). As concentrações indicadas para uso estão entre 10 mg/L a 16 mg/L (LUCENA *et al.*, 2015).

METODOLOGIA

MATERIAL VEGETAL UTILIZADO

A pesquisa foi desenvolvida na EMBRAPA Milho e Sorgo, no laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA). Três linhagens de milho tropical (*Zea mays*), L03, L12 e L16, pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo foram cultivadas em casa de vegetação para obtenção de material vegetal. As plantas foram polinizadas, e coletadas entre 12 - 16 dias após a polinização para extração de embriões imaturos.

Para a assepsia, as espigas foram despalhadas e lavadas em solução de etanol a 70%, e posteriormente, imersa em solução de hipoclorito de sódio a 50% de água destilada com duas gotas de detergente comercial, mantido em agitação por 30 minutos. Após este processo, em câmara de fluxo laminar, as espigas passaram por tríplex lavagem com água destilada autoclavada para remoção dos resíduos desinfestantes, seguida da excisão dos embriões com auxílio de bisturi e espátula.

INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS

Foram assepticamente extraídos das espigas 120 embriões imaturos por linhagem, com aproximadamente 1,0 mm de comprimento, e foram posicionados com o eixo embrionário em contato com o meio de indução de calos MIC (Tabela 1), constituído pelos sais N6 (CHU *et al.*, 1975) acrescido de diferentes concentrações (1,5 mg/L; 5,0 mg/L e 10,0 mg/L) da auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). As placas foram vedadas com filme PVC e armazenadas no escuro, em câmara de crescimento com temperatura de 28°C, por 30 dias, sendo transferidos para novo meio de cultura a cada 15 dias. A avaliação final de formação de calos embriogênicos foi realizada após 30 dias de cultivo.

Foram realizados dois experimentos com quatro repetições cada. Sendo que cada uma das repetições foi composta de uma placa contendo 30 embriões imaturos. No primeiro experimento foi verificada a formação de calos embriogênicos pelas linhagens testadas em meio contendo diferentes concentrações de 2,4-D. No segundo, a melhor concentração da auxina, determinada no experimento 1 foi utilizada para o estudo da morfologia dos calos formados.

A morfologia dos calos foi examinada utilizando um estereoscópio Zeiss do tipo Axio16.

Tabela 1- Composição do meio de indução, maturação e regeneração de calos embriogênicos.

Meio	Composição
MIC	4,3 g/L de N6 sais; 30g/L de sacarose; 100mg/L de caseína hidrolisada; 100mg/L de myo-inositol; 2,9g/L de prolina; 3,0g/L de phytigel; 2,4D; 15 mg/L de nitrato de prata; 1,0 ml/L de N6 vitaminas; PH 5,8.
MT	Meio básico MS sais e vitaminas, 60 g/L de sacarose, 100 mg/L de myo-Inositol, 1,25 mg/L de sulfato de cobre (CuSO ₄), 6,0 g/L de phytigel.
MRG	Meio básico MS sais e vitaminas com 30 g/L de sacarose

MATURAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS

Meio MIC que apresentou o melhor resultado para a formação de calos embriogênicos foi utilizado nas etapas de maturação e regeneração. 120 embriões imaturos foram extraídos e plaqueados em meio MICT e mantidos no escuro por 30 dias, sendo subcultivados a cada 15 dias para a obtenção de calos embriogênicos.

Após a indução, os calos embriogênicos formados foram subcultivados em meio de maturação (MT) (Tabela 1). As placas foram fechadas com filme PVC e incubadas no escuro em sala de crescimento com temperatura de 28°C por 30 dias.

GERMINAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS

Os calos maturados apresentando um aspecto opaco e branco foram transferidos para o meio de regeneração e germinação (MRG) de plantas (Tabela 1). As placas foram fechadas com filme PVC e cultivadas a 28°C, com fotoperíodo de 16 horas, até a germinação das plantas. Plantas com aproximadamente 5 cm de comprimento foram aclimatizadas em casa de vegetação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

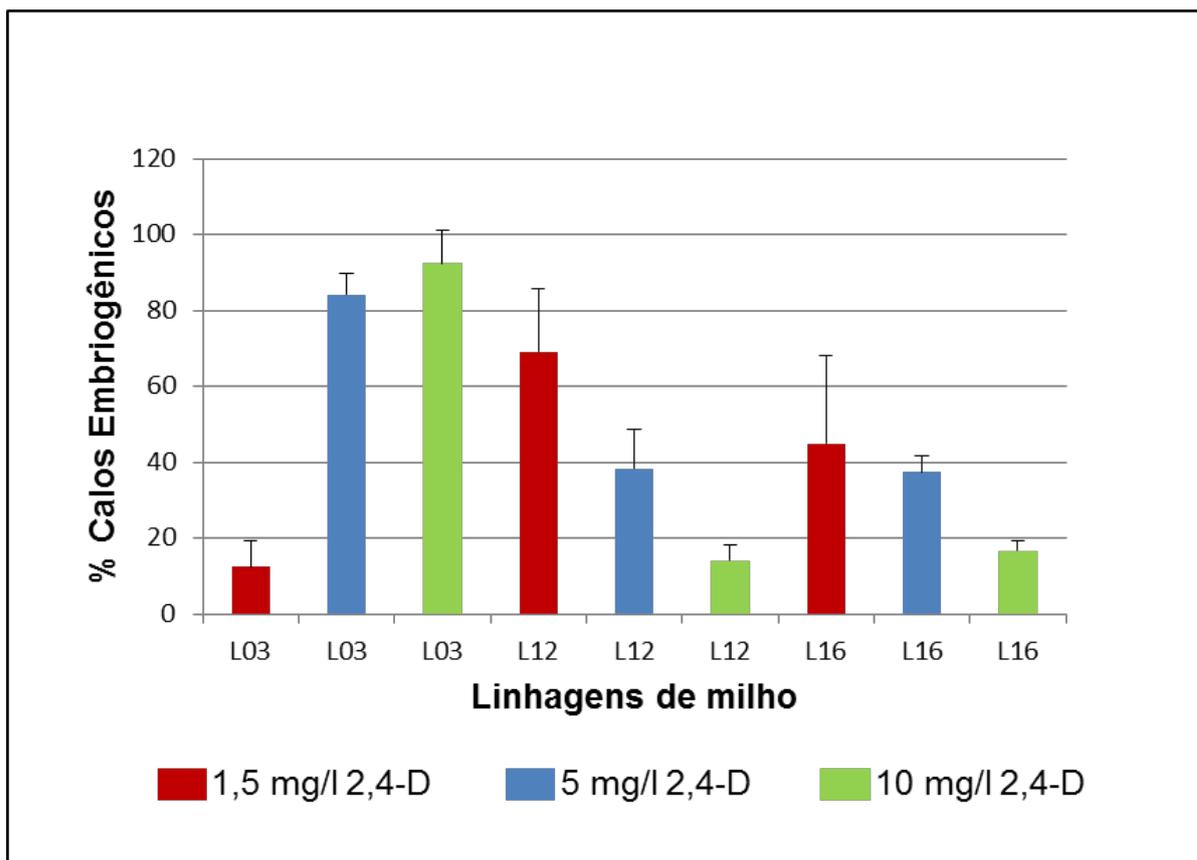
INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS

O meio de cultivo N6 (CHU *et al.*, 1975) suplementado com auxinas é uma das formulações mais utilizadas para a indução de calos embriogênicos em milho. A auxina 2,4D é uma das mais eficientes para a indução de calos embriogênicos em plantas (FEHER.,2015), por conseguinte, a capacidade de formação de calos embriogênicos pelas linhagens tropicais de milho L03, L12 e L16 foi avaliada na presença de diferentes concentrações de 2,4D no meio basal N6.

Nesta pesquisa foi observado que o meio de cultivo e o genótipo de milho utilizados influenciaram a formação de calos embriogênicos de milho em cultura *in vitro*. Os dados apresentados na Figura 1 mostram que a concentração da auxina 2,4-D influenciou na formação dos calos embriogênicos. A linhagem L03 apresentou melhor formação de calos embriogênicos nas concentrações de 5 e 10 mg/L de 2,4-D, nestas concentrações houve o desenvolvimento de calos embriogênicos em 92 % e 84% dos explantes, respectivamente. A menor concentração de 2,4-D (5 mg/L) foi

a escolhida para os estudos de morfologia de calo pois, o 2,4-D pode ocasionar mutações dependentes de sua concentração em plantas; portanto uma menor concentração de 2,4-D no meio de cultivo induz um menor número de mutações somáticas (CENCKI *et al.*, 2010).

Diferentemente do resultado observado para a linhagem de milho L03, a linhagem L12 apresentou melhor resultado de formação de calos embriogênicos (69 %) na concentração de 1,5 mg/L de 2,4-D, enquanto que na concentração de 5 mg/L



38 % dos explantes foram capazes de formar calos embriogênicos e a concentração de 10 mg/L apenas 14 %.

Figura 1- Porcentagem de formação de calos embriogênicos nas linhagens L03, L12 e L16 em diferentes concentrações de 2,4-D.

O padrão de desenvolvimento dos explantes da linhagem L16 foi semelhante ao da linhagem L12, sendo que a melhor concentração de 2,4-D para a indução de calos embriogênicos foi 1,5 mg/L. Nesta concentração 44% dos explantes desenvolveram calos embriogênicos. A concentração ideal de auxina para a indução de calos embriogênicos pode variar de acordo com a espécie e genótipo

utilizado (OMER *et al.*, 2012; PULIANMACKAL *et al.*, 2014). A faixa de concentração mais utilizada desta auxina para o milho é entre 0,5 e 5 mg/L (GORGI *et al.*, 2011).

Neste estudo foi observado que a concentração ótima de 2,4D utilizado para indução de calos embriogênicos foi diferente para as linhagens L03, L12 e L16, evidenciando uma interferência do genótipo. No milho, tanto a iniciação de calos regeneráveis quanto a porcentagem de regeneração de plantas são influenciadas por um componente genético e dependem do genótipo utilizado (ALI *et al.*, 2014)

FORMAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS TIPO I E TIPO II

Para a análise de morfologia dos calos embriogênicos de milho formados foram utilizadas as concentrações de 5, 1,5 e 1,5 mg/L de 2,4-D para as linhagens L03, L12 e L16, respectivamente.

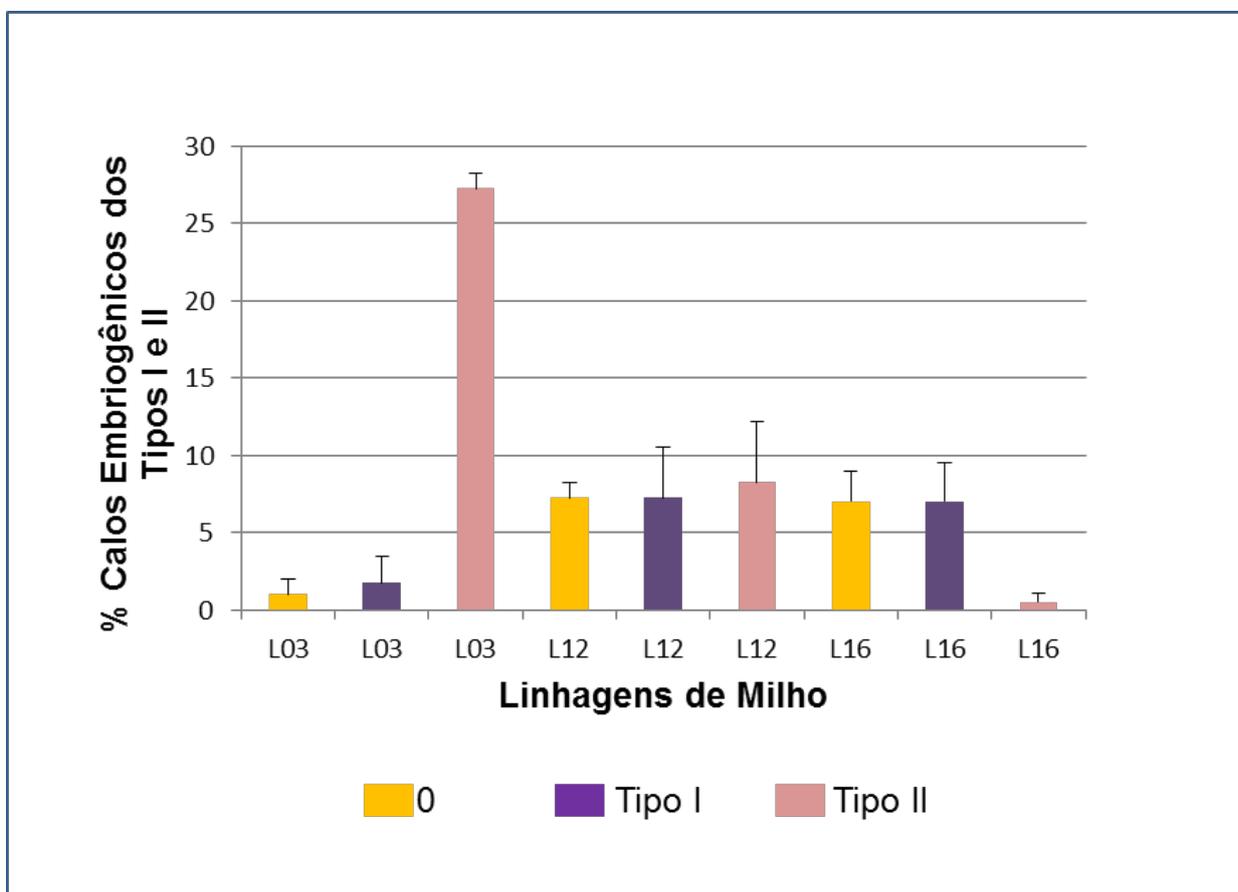
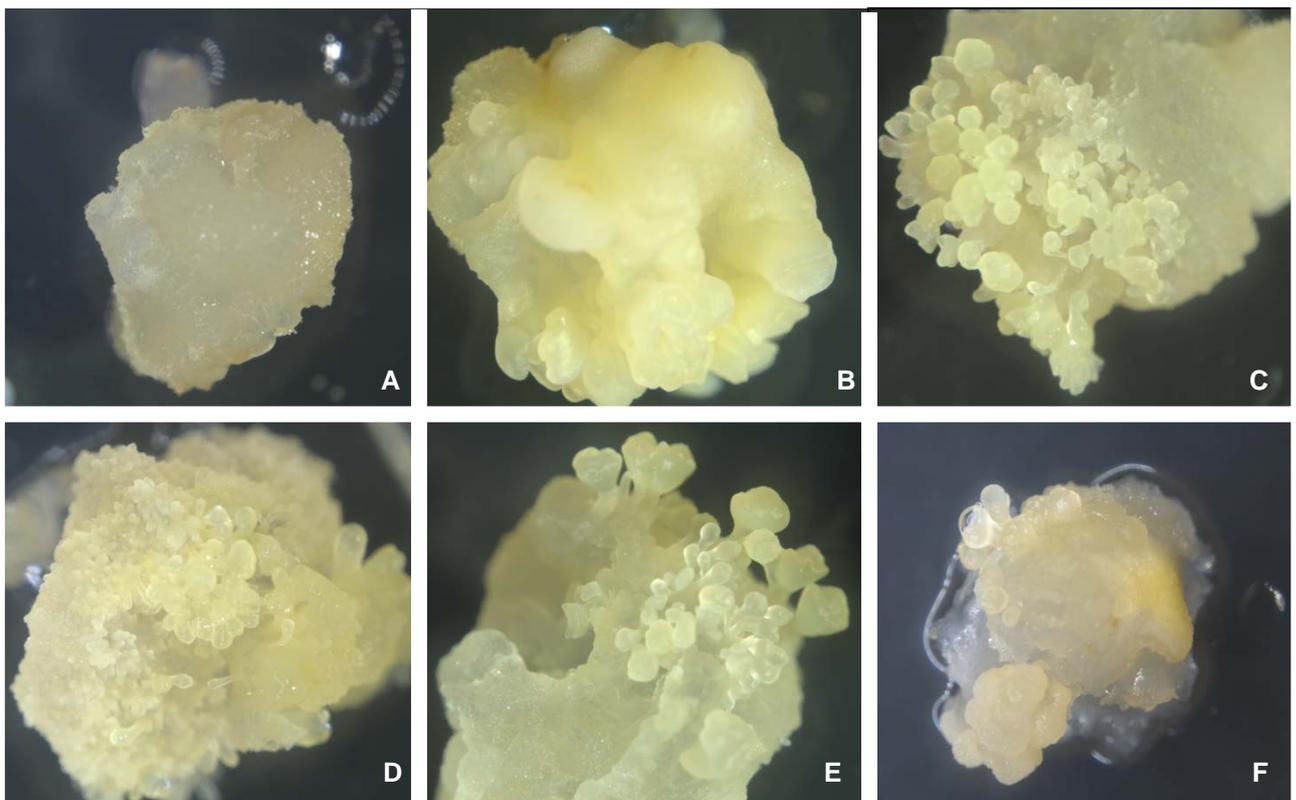


Figura 2 - Porcentagem de calos embriogênicos dos Tipos I e II formados pelas linhagens de milho tropical na presença de 2,4-D. L03 (5 mg/L 2,4-D), L12 (1,5 mg/L 2,4-D) e L16 (1,5 mg/L 2,4-D), onde 0 corresponde a calos não embriogênicos.

A Figura 2 apresenta os resultados da diferenciação dos calos das três

linhagens estudadas. Todas as linhagens formaram calos dos Tipos I e II em diferentes quantidades. A linhagem L03 apresentou melhor resultado em relação a L12 e L16, com uma produção de aproximadamente 90% de calos do Tipo II (Figura 2). A linhagem L12 produziu 27% de calos do tipo II e a linhagem L16 menos que 2%. Calos do Tipo I foram produzidos entre 5 e 10% pelas linhagens L12 e L16 e, menos que 5% pela linhagem L03. Tanto os calos do Tipo II quanto os do Tipo I são capazes de regenerar plantas, entretanto, as culturas formadas por calos do Tipo II crescem mais rapidamente, podem ser mantidas por um longo período de tempo em



cultura e formam um grande número de embriões somáticos. Estas características favorecem a seleção e a regeneração de plantas transgênicas (QUE *et al.*, 2014).

Figura 3 - Tipos de calos formados em meio de cultivo contendo 2,4-D. (A) Calo não embriogênico; (B) Calo embriogênico do Tipo I; (C) Calo embriogênico do Tipo II; (D, E, F) Calos do Tipo II das linhagens (D) L03; (E) L12; (F) L16.

A embriogênese somática é a expressão máxima da totipotência celular em tecidos vegetais, sendo um processo de desenvolvimento que uma célula somática se desenvolve em um embrião, que posteriormente forma uma planta (GUTIÉRREZ-MORA *et al.*, 2012). O processo de embriogênese do milho desenvolve duas formas de calos que podem ser observados na Figura 3. O calo do Tipo I (Figura 3A) é

mais compacto, de cor amarelada ou branca e apresenta baixa eficiência na regeneração de plantas, e o calo de Tipo II (Figura 3B) é de estrutura friável, altamente embriogênico, cresce rapidamente e mantém a capacidade de regeneração de plantas por um maior período de tempo (GARROCHO-VILLEGAS *et al.*, 2012).

Apesar de calos embriogênicos do Tipo II terem sido observados nas três linhagens estudadas, houve uma diferença na quantidade formada destes calos dependendo da linhagem. As Figuras 3D, E e F mostraram o padrão de formação de calos do Tipo II para as linhagens L03, L12 e L16, respectivamente. Pode-se observar que o calo da linhagem L03 apresenta uma grande formação de embriões somáticos recobrando toda a superfície do explante. Esta formação de embriões na superfície do calo diminui na linhagem L12 e foi quase inexistente na L16.

MATURAÇÃO E GERMINAÇÃO

Calos embriogênicos foram transferidos para o meio de maturação de calo (Tabela 1). A maturação é um processo que ocorre antes da germinação das plantas, durante este processo genes relacionados com acumulação de compostos energéticos e tolerância a dessecação são mais expressos (TEOH *et al.*, 2013). A maturação de calos embriogênicos de milho normalmente acontece em ausência de 2,4-D, altas concentrações de agentes geleificantes e metais pesados (FEHER *et al.*, 2015; CHO *et al.*, 2014) e varia entre uma a seis semanas.

Para o estudo da maturação dos calos formados pelas linhagens L03, L12 e L16 utilizou-se o meio MT que além dos sais de MS apresenta em sua constituição alta concentração osmótica (6% sacarose) e CuSO_4 . (CHO *et al.*, 2014) mostraram que a presença do micronutriente Cu em meio de cultura melhora a regeneração de calos de milho. O cobre é um micronutriente essencial para o desenvolvimento de plantas e a sua função está associado à ativação de enzimas.

Os calos que se desenvolveram mais rapidamente durante o processo de maturação e germinação foram os da linhagem L03, aproximadamente 15 dias. A Figura 4 mostra o processo de indução de calos a partir de embriões zigóticos imaturos, a maturação e a regeneração de plantas da linhagem L03. Calos das linhagens L12 e L16 ainda estão em processo de maturação e serão transferidos para o meio de germinação.

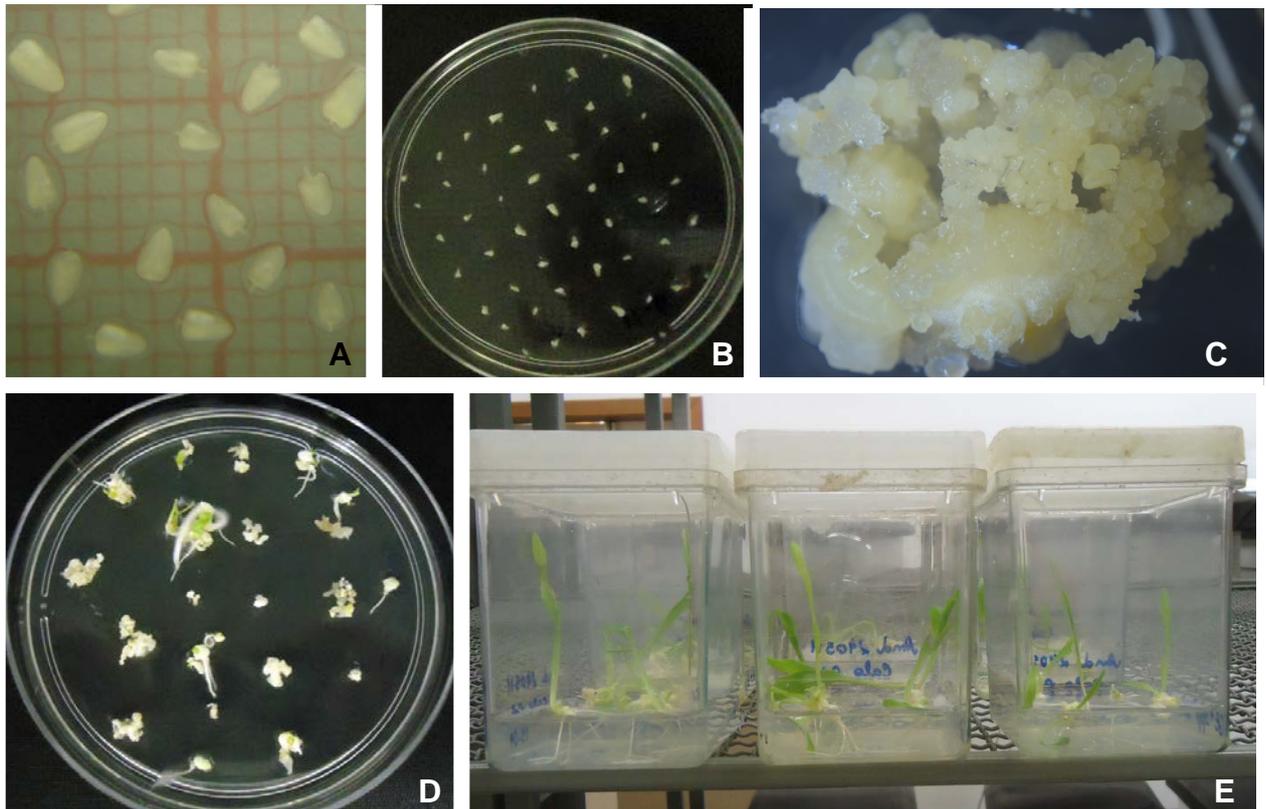


Figura 4 - Regeneração em cultura de tecidos da linhagem de milho tropical L03. (A) Embriões imaturos de diferentes tamanhos, lado do quadriculado vermelho igual a 1 mm; (B) placa contendo embriões entre 1,5 e 2 mm de comprimento; (C) calo embriogênico da linhagem L03; (D) calos em processo de maturação e germinação; e (E) plântulas germinadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, pode-se observar a formação de calos embriogênicos independente do genótipo em meio N6 contendo diferentes concentrações de 2,4D. Em todos os genótipos de milho tropical estudados, a auxina 2,4D induziu a embriogênese somática a partir de embriões imaturos. Porém cada linhagem apresentou uma porcentagem diferente de indução de calos embriogênicos e a concentração ótima de 2,4-D foi dependente do genótipo utilizado, sendo que a concentração ideal para a linhagem L03 foi entre 5 a 10 mg/L enquanto as linhagens L12 e L16 apresentaram melhor desempenho na concentração de 1,5 mg/L.

Ao analisar a formação de calos embriogênicos do Tipo I e Tipo II, podemos observar que as linhagens de milho tropical apresentaram respostas diferentes que

também variaram de acordo com o genótipo em estudo, onde a linhagem L03 apresentou maior formação de calos embriogênicos do Tipo II, enquanto as linhagens L12 e L16 apresentaram resultados inferiores, 27% e 1,6% respectivamente.

Trabalhos futuros podem ser realizados para desenvolver um protocolo de transformação genética eficiente para linhagens de milho tropical para produção de milho transgênico, que apresente eficiência agrônômica.

REFERÊNCIAS

- ALI, Q. *et al.* **Correlation analysis for morpho-physiological traits of maize (*Zea mays* L.)** T. Life Science Journal, v.11, p. 9-13, 2014.
- ALVES, M.C. *et al.* **Estudo de parâmetros que influenciam a transformação genética de milho (*Zea mays* L.) Hill via *Agrobacterium tumefaciens*.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, p.24, 2016.
- ALVES, M. C. *et al.* **Fatores que influenciam a transformação genética de milho (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, v.40, p.191. 2015.
- ANAMI, S. E. *et al.* **Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes.** Plant Cell Tiss Organ Cult, p.285-295, 2010.
- ANDRADE, G.M. **Biologia Molecular do Processo de Infecção por *Agrobacterium* spp.** Fitopatol. bras. V.5, p.465-476, 2003.
- 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.
- AKOYI, J. *et al.* **Dicamba Growth Regulator Promotes Genotype Independent Somatic Embryo genesis from Immature Zygotic Embryos of Tropical Maize.** Inbred Lines v.7, p.677-689, 2013.
- BEVITORE, Rosângela. **Cultivo in vitro do arroz (*Oryza sativa* L.): Conceitos básicos e protocolos.** Embrapa Arroz e Feijão, ed 21, 2013.
- CENCKI, S. *et al.* **Evaluation of 2,4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays.** Ecotoxicology and Environmental Safety, p.1558-1564, 2010.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em 19 abril 2016.

CHO M.J. *et al.* **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. *et al.* **Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source.** *Scientia Sinica*, v. 16, p.659-668, 1975.

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.

FEHÉR, Attila. **Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations.** *Biochimica et Biophysica Acta*, pag. 385-402, 2015.

FEUILLET, C.; EVERSOLE, K. **Solving the maze.** *Plant Science*, v.326, p.1071-1072, 2009.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division 2012. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em 10 março 2016.

FRAME, B. *et al.* **Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos.** *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols Methods in Molecular Biology*, v.710, p. 327–341, 2011.

GARROCHO-VILLEGAS, V. *et al.* **Somatic Embryogenesis: 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, Gabriel 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.

GONZÁLES, G. *et al.* **Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in maize (*Zea mays* L.) inbred lines.** *Electronic Journal of Biotechnology*, v.15, 2012.

GORJI, A Y. **In vitro plant generation of tropical maize genotypes.** *International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology*, v.16, 2011.

GRANDO, M. F. *et al.* **Optimizing embryogenic callus production and plant regeneration from “Tifton 9” bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) seed explant for genetic manipulation.** *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 17, n. 3, p. 213-222, 2002.

- GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. J. **Plant regeneration from tissue cultures of maize.** *Crop. Science*, Madison, v. 15, p. 417-421, 1975.
- GUTIÉRREZ-MORA, A. et al. **Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations**, p.229- 248, 2012.
- LUCENA, A.L.M. et al. **Embriogênese Somática em Milho: Trajetória e Eficiência.** *Plant Cell Cult. Micropropag.*, v. 11, n. 2, p. 33-53, 2015.
- MORAIS, T.P. *et al.* **Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais.** *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.14, n.1, p.110-121, 2012.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.** *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- OMER, R.A. *et al.* **Effects of auxin and source of explants on callus induction of tropical maize.** *Biotechnology* v.4, p. 225-231, 2012.
- PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. **Melhoramento do milho.** In: BORÉM, A. (Ed.). *Melhoramento de espécies cultivadas.* Viçosa: UFV, p.429-485, 1999.
- PULIANMACKAL A.J. *et al.* **Competence and regulatory interactions during regeneration in plants.** v.5, artigo 142, 2014.
- QUE Q *et al.* **Maize transformation technology development for commercial event generation.** *Frontiers Plant Sci.* v.5, p.1-19, 2014.
- RODRIGUES, Mateus Cupertino; **Avaliação de Linhagens de Milho Tropical para Eficiência no uso de Nitrogênio**, 2015. f 46. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Curso de Pós-graduação em Fitotecnia - UFV - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- RODRIGUEZ, J. P. et al; **Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: two sides of the same coin?** Review Article, 2014.
- SALVADOR, R.J.M. In: **The Encyclopedia of Mexico: History, Culture and Society.** Fitzroy Dearborn Publisher, Chicago, Illinois, v.2, 1997.
- SOUZA, Rafaeli 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.
- SUN, L. *et al.* **Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (Zea mays L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis.** *Plant Cell Tiss Organ Cult* v.113, p.103-119, 2013.
- TEOH, K. T. *et al.* **Transcriptome analysis of embryo maturation in maize.** *BMC Plant Biol.* v.13, p.19-34, 2013.