

Embriogênese somática de milho tropical visando a transformação de plantas para eficiência no uso de fósforo e tolerantes ao alumínio.

Maíra de Freitas Pereira¹, Gracielle Teodora da Costa Pinto Coelho², Natália Ticiane Abreu Gonçalves¹, Andréa A. Carneiro³ e Maria José Vilaça de Vasconcelos³

¹Bolsista Projeto McKnight-Embrapa Milho e Sorgo, CP. 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas-MG, mairabiotec@yahoo.com.br, ²Doutorando em Fisiologia Vegetal UFLA, ³Embrapa Milho e Sorgo.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, Regeneração de plantas, *Agrobacterium*, Biobalística

Atualmente existem poucas linhagens de milho tropical identificadas como produtoras de calos embriogênicos do tipo II e que tenha boa capacidade de regeneração *in vitro*, daí a necessidade de encontrar outros genótipos com essas características, para que se possa aumentar a base genética dos programas de melhoramento que usam métodos de cultivo *in vitro* e técnicas de transformação. Desenvolver plantas eficientes a estresses ambientais como alumínio e fósforo requer ajuste de metodologias de embriogênese e regeneração de plantas de genótipos sensíveis a esses estresses.

Com o objetivo de superexpressar genes envolvidos nos mecanismos que as plantas vem se desenvolvendo para superar os estresses abióticos foi ajustado um protocolo para formação de calos embriogênicos com boa capacidade de regeneração de plantas de milho tropical visando a transformação genética por bombardeamento e/ou infecção por *Agrobacterium* em quatro genótipos de milho, contrastantes para o uso de fósforo e tolerância ao alumínio.

As linhagens de milho L3, L11, L22, L36 foram cultivadas em canteiros e casas de vegetação e as espigas coletadas 10 a 15 dias após a polinização. Embriões imaturos das linhagens foram assepticamente extraídos, inoculados e incubados a 27°C, no escuro, por 4 semanas em meios com diferentes sais e concentrações de hormônios.

Os meios para a formação de calos possuem diferentes composições. As semelhanças entre eles consistem em sacarose (30g/L), MES (0,5g/l), suplementados com glicina (30 mM), tiamina – HCl (15µM), piridoxina-HCl(7,5µM) e ácido nicotínico (7,5µM), prolina (700mg/L). O pH é corrigido para 5.8 com KOH e depois o meio é autoclavado.

As diferenças de sais, hormônios e alguns componentes podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1: Composição dos meios de cultura

Reagentes	N6A1	N6A2	N6B1	N6B2	MSA1	MSA2	MSB1	MSB2
Sais N6 (g/L)	3,98	3,98	3,98	3,98	-	-	-	-
Sais MS (g/L)	-	-	-	-	4,3	4,3	4,3	4,3
N6Vitaminas (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Sacarose (g/L)	30	30	30	30	30	30	30	30
Mês (g/L)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Myo-Inositol (g/L)	-	-	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1
Caseína (g/L)	-	-	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1
Prolina (g/L)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
Ágar (g/L)	11	11	-	-	11	11	-	-

Phytigel (g/L)	-	-	2,5	2,5	-	-	2,5	2,5
2,4D (4,5mM)	1,5 mL	3,0 mL	-	-	1,5 mL	3,0 mL	-	-
Autoclavar 121°C/30 minutos								
Dicamba (30mM)	-	-	0,5mL	1,0mL	-	-	0,5mL	1,0mL
AgNO ₃ (50mM)	50µL	50µL	900µL	900µL	50µL	50µL	900µL	900µL

Após 4 semanas todos os calos foram transferidos para o meio de maturação que consiste de sais MS (4,3g/L), suplementado com glicina (30mM), tiamina-HCl (15µM), piridoxina-HCl (7,5µM), ácido nicotínico (7,5µM), myo-inositol (100mg/L), sacarose(60g/L), phytigel (2,5g/L). pH 5.8. Duas semanas após, os calos foram transferidos para magentas contendo meio de regeneração, que consiste de sais MS (4,3g/L), suplementado com glicina (30mM), tiamina-HCl (15µM), piridoxina-HCl (7,5µM), ácido nicotínico (7,5µM), myo-inositol (100mg/L), sacarose(30g/L), phytigel (2,5g/L). pH 5.8. As magentas foram mantidas à luz e a temperatura de 27°C.

Resultados e Discussão

Após 30 dias foi observada a formação de calos embriogênicos em todos os genótipos, e classificados como calos ruins (-) apenas compactos, calos regulares (+) compactos e com poucas nodulações, calos bom (++) compactos e intermediário em relação às nodulações, calos ótimos (+++) com muitas nodulações (Figura 1).

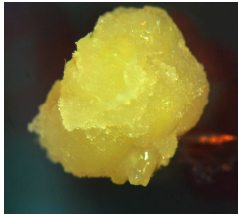
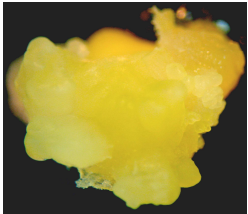
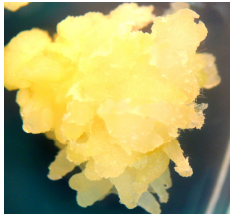
Tipo de calo	Calos ruins (-)	Calos regulares (+)	Calos bons (++)	Calos ótimos (+++)
Exemplo				
Classificação	Calos totalmente esponjosos, sem formações nodulares.	Calos esponjosos com a mínima formação de nódulos na sua estrutura.	Calos esponjosos com aproximadamente 50% da sua estrutura com formações nodulares.	Calos compactos e com o máximo de nodulações evidentes.

Figura 1. Classificação e tipo de calos formados

Analisando as regenerações dessas linhagens concluiu-se que a linhagem L3 em meio MSB2 apresentou melhor formação de calos classificados ótimos (+++): 56,57%. Os calos cultivados em meio N6A1 apresentaram 28,88% de formação de calos classificados ótimos (+++) mas foi a partir desses que se obteve o maior número de plantas regeneradas (Figura 2).

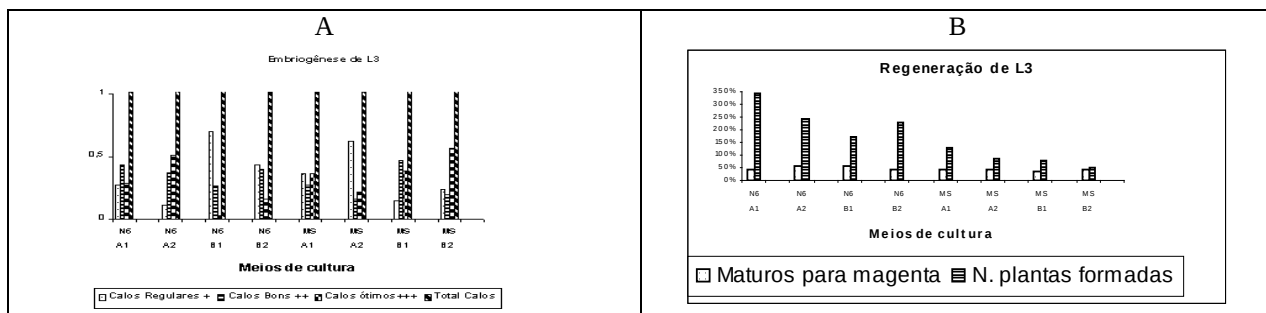


Figura 2. A – Embriogênese somática da linhagem L3
B – Regeneração da linhagem L3

O melhor resultado com a linhagem L11, foi com calos cultivados em meio N6B1 para a formação de calos e em relação a regeneração.(Figura 3).

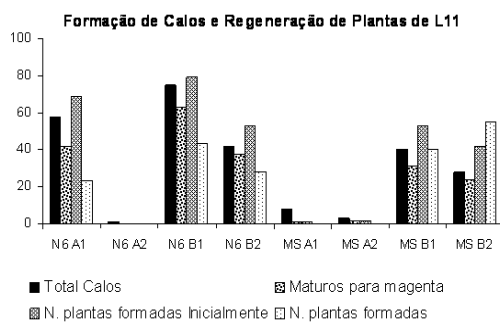


Figura 3. Formação de calos e regeneração de plantas da Linhagem L11

Na embriogênese da linhagem L22 (Figura 4), o meio MSB2 obteve o maior percentual para a formação de calos ótimos, com 65% ; seguido do meio MSB1 com 55%, enquanto o meio N6B2 teve 19,16% para os calos ótimos, e o maior percentual em relação aos outros meios observando o parâmetro de calos considerados bons, além de obter o maior número de plantas regeneradas.

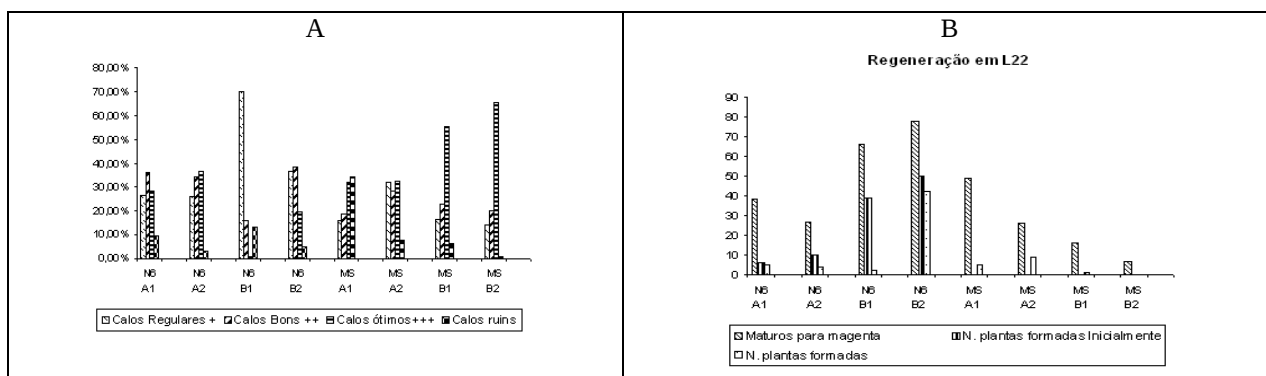


Figura 4. A – Embriogênese somática da linhagem L22
B – Regeneração da da linhagem L22

Referências bibliográficas

Bezerra,J.S.; Willadino, L.; Camara,T.R.;Crescimento de calos embriogênicos de milho submetidos ao estresse salino. Scientia Agricola, v.58, n.2, p.259-263, abr./jun. 2001.

Chu, C.C.; Wang, C.C.; Sun, C.S.; Hsu, C.; Yin, K.C.; Chu, C.Y.; Bi, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments of the nitrogen sources. Science Sinica, v.16, p.659-668, 1975.

Frame, B.R.; MC Murray, J.N.; Fonger, T.N.; 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.

Murashige, T.; Skoog, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, v. 15, p. 473-497, 1962.