

## Indução de calos embriogênicos em milho tropical em diferentes concentrações de 2,4-D

Lívia C. S. Gonçalves<sup>1</sup>, Sandra A. Miranda<sup>1</sup>, Maíra F. Pereira<sup>2</sup>, Maria José V. Vasconcelos<sup>3</sup> e Andréa A. Carneiro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário de Sete Lagoas – Sete Lagoas – MG. E-mail: liviacvc@yahoo.com.br; engambsandra2007@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Viçosa – UFV - Departamento de Microbiologia – Viçosa – MG. E-mail: mairabiotec@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Embrapa Milho e Sorgo – CP 151 – Sete Lagoas – MG. E-mail: mjose@cnpms.embrapa.br; andreac@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: auxina, morfogênese, *Zea mays*.

### Introdução

A transformação genética é uma ferramenta muito importante para o desenvolvimento de plantas com características agrônomicas de interesse, mas depende de um sistema eficiente de regeneração das células transformadas. Regeneração de plantas de milho em cultura de tecidos pode ocorrer via organogênese (ZHONG et al. 1992, 1996) ou embriogênese somática. Entretanto, a metodologia mais estudada é a embriogênese somática, a qual tem a vantagem de produzir uma estrutura bipolar que pode, teoricamente, ser germinada e regenerada em um só passo.

A embriogênese somática no milho acontece através da formação de calos do Tipo I ou II. Os calos do Tipo I são compostos de dois tecidos distintos. Um tecido é duro, compacto, amarelo ou branco e normalmente capaz de regenerar plantas; o outro é granular, amarelo-pálido ou cinza-claro, translúcido e incapaz de regenerar plantas (VASIL; VASIL, 1981). Os calos descritos como do Tipo II são macios, friáveis e altamente embriogênicos (ARMSTRONG; GREEN, 1985; TOMES; SMITH, 1985). As culturas formadoras de calos do Tipo II crescem rapidamente, podem ser mantidas por um longo período de tempo e formam um grande número de embriões somáticos facilmente regeneráveis (VASIL, 1987).

Embora calos do Tipo II sejam os mais eficientes para a produção de plantas transgênicas de milho, calos do Tipo I podem também ser utilizados. A ocorrência de calos embriogênicos friáveis do Tipo II não é tão comum, sendo que apenas um número limitado de genótipos de milho são capazes de expressar este fenótipo em meio de cultivo notadamente a linhagem temperado A188 (ARMSTRONG; GREEN, 1985) e o híbrido HiII.



Sabe-se que, em milho, a iniciação de calos regeneráveis (PHILLIPS et al., 1988), bem como a frequência de regeneração de plantas, são afetadas por um componente genético e dependem do genótipo utilizado (HODGES et al., 1986; PRIOLI; SILVA, 1989). Embora as propriedades de uma cultivar não possam ser facilmente modificadas para torná-la menos recalcitrantes à embriogênese somática, os componentes do meio de cultivo para induzir e apoiar este processo podem ser alterados. Com o avanço da metodologia do cultivo *in vitro* e, particularmente, com modificações na composição dos meios de cultura e nas relações e doses dos reguladores de crescimento, passou a ser possível a regeneração de um crescente número de genótipos (PHILLIPS et al., 1988; PRIOLI; SILVA, 1989). No entanto, a maioria destes genótipos forma apenas calos compactos do Tipo I.

Outra etapa importante no desenvolvimento de embriões somáticos é o processo de maturação e regeneração de plantas. Durante esta fase os embriões zigóticos sofrem várias alterações morfológicas e bioquímicas, tais como deposição de compostos de armazenamento, repressão de germinação e aquisição de tolerância à dessecação (JIMENEZ, 2005). No entanto, existem vários exemplos na literatura em que embriões somáticos cultivados *in vitro* não se desenvolvem nem germinam normalmente. Grandes esforços têm sido dedicados a contornar estes problemas, especialmente complementando o meio de cultura com reguladores de crescimento vegetal, os quais possibilitam que as fases tardias da ES progridam de maneira similar ao desenvolvimento zigótico (JIMENEZ, 2005).

Neste artigo são descritos os estudos para o desenvolvimento de um protocolo de formação e regeneração de calos embriogênicos do Tipo II para a linhagem de milho elite L3 da Embrapa Milho e Sorgo, visando a sua utilização para a produção de plantas transgênicas.

## **Material e Métodos**

Sementes de milho da linhagem L3 foram crescidas em canteiros na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil. As espigas com 8-16 dias após a polinização foram colhidas e esterilizadas com 50% de água sanitária comercial e 0,01% Tween 20, durante 40 minutos, lavadas três vezes com água destilada esterilizada para posterior extração dos embriões. Embriões imaturos, entre 1 e 2 mm de comprimento, foram isolados e cultivados com o eixo embrionário em contato com a superfície do meio de indução de calos IC (N6 sais e vitaminas N6 (CHU et al., 1975), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 2,87 g L<sup>-1</sup> de L-prolina, 200 mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 30 g L<sup>-1</sup> sacarose, 2,5 g L<sup>-1</sup> Phytigel, 1,7 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata)



suplementado com o regulador de crescimento 2,4-D nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 mg.L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 5,8 com hidróxido de potássio 1 N antes da autoclavagem. Cada tratamento foi composto de seis repetições e cada unidade de repetição formada por 20 embriões imaturos, num total de 120 embriões por tratamento. As culturas foram mantidas em placas de Petri (100x25 mm), no escuro, a 27°C para a iniciação e manutenção de calos, durante quatro semanas, com um subcultivo após duas semanas.

A regeneração dos calos foi iniciada após o seu subcultivo por duas semanas em meio RM - sais e vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 3 g Phytigel L<sup>-1</sup>, pH 5,8 no escuro, a 25°C para a maturação dos embriões somáticos. Os embriões somáticos foram transferidos para Magenta contendo meio de regeneração RM (Ms sais e vitaminas, 100 mg.L<sup>-1</sup> mio-inositol, 60 g.L<sup>-1</sup> sacarose, 4,5 g.L<sup>-1</sup> Phytigel) suplementado ou não com reguladores de crescimento vegetal 1 mg. L<sup>-1</sup> AIA, Zeatina e ABA. No meio RM1, sem reguladores de crescimento, foram avaliados 348 calos, enquanto que no meio RM2, com reguladores de crescimento, foram avaliados 324 calos. Embriões maturados mostrando uma coloração branca-opaca foram transferidos para meio MS (MS sais e vitaminas, 3% sacarose e 3 g.L<sup>-1</sup> Phytigel) para germinação.

## Resultados e Discussão

A embriogênese somática (ES) é a reestruturação do desenvolvimento de células somáticas para a via embriogênica e constitui a base da totipotência celular de plantas superiores (IMIN et al., 2004; NISHIWAKI et al., 2000). Em contraste com a embriogênese zigótica, a ES é um processo de propagação não sexual, onde as células somáticas diferenciam-se em embriões somáticos. O desenvolvimento embrionário zigótico começa com a formação do zigoto após a fertilização, enquanto que no somático células somáticas adquirem competência embriogênica como resultado da exposição a diferentes estímulos químicos e/ou físicos. Reguladores de crescimento vegetal, especialmente as auxinas, são componentes-chave para a indução do potencial embriogênico das células somáticas. Neste trabalho, embriões imaturos de milho da linhagem tropical L3 foram subcultivados em diferentes concentrações de 2,4-D e distintos tipos de calos embriogênicos foram formados (Figura 1). Na ausência de 2,4-D não foram produzidos calos embriogênicos de qualquer natureza. Em concentrações mais baixas de 2,4-D (0,5 e 1,5 mg.L<sup>-1</sup>) apenas calos



embriogênicos do Tipo I foram encontrados. Entre 2,0 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup> mais de 80% dos calos formados foram do Tipo I, enquanto que em concentrações mais elevadas (10 e 15 mg.L<sup>-1</sup>) calos do Tipo II foram mais frequentes (Figura 2). O sucesso da utilização do 2,4-D para a indução de calos embriogênicos obtido neste trabalho está de acordo com os dados de literatura que apontam que as auxinas são os reguladores de crescimento vegetal mais utilizado para induzir a embriogênese somática na maioria das plantas já estudadas, provavelmente por causa da sua participação na regulação do ciclo e da divisão celular (FEHÉR et al., 2003; GAJ, 2004). Em seu trabalho Gaj (2004) mostra que em 49% dos protocolos que utilizam reguladores de crescimento vegetal para a indução da embriogênese somática, a auxina 2,4-D foi a que apresentou melhor resultado. Em várias espécies, é necessário ocorrer a maturação do embrião antes do processo de germinação do embrião somático. Durante a maturação mudanças biofísicas das células levam ao acúmulo de materiais de armazenamento (BOZHKOV; ARNOLD, 1998) e tolerância à dessecação (BLACKMAN et al., 1992) para a conversão dos calos em embriões e, em seguida, para a sua maturação (MERKELE et al., 1995). A embriogênese somática pode ser influenciada ainda pelo potencial osmótico do meio de maturação (WALKER; PARROTT, 2001), como por exemplo, os carboidratos que comumente são usados nas culturas como fontes de carbono para o desenvolvimento de tecidos (IRAQI; TREMBLAY, 2001) em plântulas. Estes compostos podem interferir na embriogênese somática alterando o potencial osmótico do meio e/ou funcionar como nutriente (LI et al., 1998) nas culturas. Em muitas espécies, o aumento da concentração de açúcares em geral pode melhorar a maturação dos embriões somáticos, como descreve Li et al. (1998) e Iraqi e Tremblay (2001). Inclusão de ABA no meio de cultura durante as fases finais de desenvolvimento dos embriões somáticos, assemelham-se, de certo modo, ao aumento natural de hormônios endógenos observados em vários embriões zigóticos. Portanto, este regulador de crescimento vegetal é utilizado para estimular a maturação e, ao mesmo tempo, para evitar germinação precoce (GARCIA-MARTÍN et al., 2005). Neste trabalho embriões somáticos obtidos em meio IC suplementado com 10 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D foram subcultivados em meio RM contendo 6% de sacarose suplementado ou não com AIA, Zetina e ABA para indução da maturação. Calos maturados foram subcultivados em meio MS para germinação. Calos provenientes do meio RM1 formaram 0,86 plantas/calos, enquanto que os maturados no meio RM2 formaram 1,18 plantas/calos (Figura 3). A eficiência de germinação dos calos maturados foi baixa, indicando



que ainda existe a necessidade de otimização desta fase do processo para que a linhagem L3 seja utilizada com sucesso na produção de plantas transgênicas.

## Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro do CNPq, Fapemig, Fundação McKnight e Embrapa

## Referências

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, New York, v. 164, n. 2, p. 207-214, 1985.

BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 100, p. 225-230, 1992.

BOZHKOVA, P. V.; ARNOLD, S. Polyethyleneglycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 211-224, 1998.

CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; BI, C. V. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. **Scientia Sinica**, Peking, v.18, p. 659-668, 1975.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 74, p. 201-228, 2003.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 43, p. 27-47, 2004.

GARCÍA-MARTÍN, G.; MANZANERA, J. A.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E. Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 80, p. 171-177, 2005.

HODGES, T. K.; KAMO, K. K.; IMBRIE, C. W.; BECWAR, M. R. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. **Bio/Technology**, v. 4, p. 199-223, 1986.

IMIN, N.; DE JONG, F.; MATHESIUS, U.; VAN NOORDEN, G.; SAEED, N. A.; WANG, X. D.; ROSE, R. J.; ROLFE, B. G. Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, p. 1883-1896, 2004.



IRAQI, D.; TREMBLAY, F. M. The role of sucrose during maturation of blackspruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 111, p. 381-388, 2001.

JIMENEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 47, p. 91-110, 2005.

LI, X.Y.; HUANG, F. H.; MURPHY, B.; GBUR JUNIOR, E E. Polyethylene glycol maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v. 34, p. 22-26, 1998.

MERKELE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis implants**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p.155-203.

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

NISHIWAKI, M.; FUJINO, K.; KODA, Y.; MASUDA, K.; KIKUTA, Y. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. **Planta**, New York, v. 211, p. 756-759, 2000.

PHILLIPS, R. L.; SOMERS, D. A.; HIBBERD, K. A. Cell/tissue culture and *in vitro* manipulation. In: SPRAGUE, G. F.; DUDDLEY, J. W. (Ed.). **Corn and corn improvement-agronomy**. 3. ed. Madison: American Society of Agronomy, 1988. p. 345-387. (ASA. Monograph n. 18).

PRIOLI, L. M.; SILVA, W. J. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 553-566, 1989.

TOMES, D. T.; SMITH, O. S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 70, p. 505-509, 1985.

VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems of the improvement of cereal and grass crops. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 128, p.193-218, 1987.

VASIL, V.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* and *P. americanum* X *P. purpureum* hybrid. **American Journal of Botany**, Bronx, v. 68, p. 864-872, 1981.

WALKER, D. R.; PARROTT, W. A. Effect of polyethyleneglycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 64, p. 55-62, 2001.

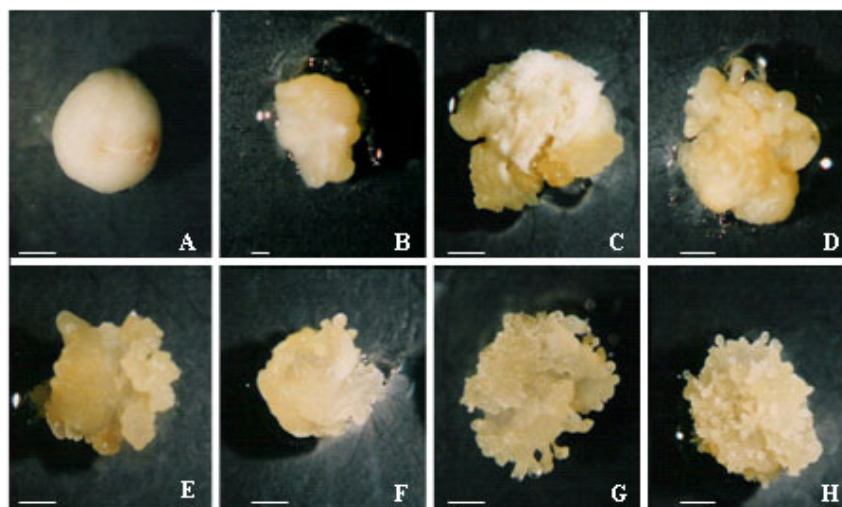


ZHONG, H.; SRINIVASAN, C.; STICKLEN, M. B. In-vitro morphogenesis of corn *Zea mays* L. I. Differentiation of multiple shoots clumps and somatic embryos from shoot tips. **Planta**, New York, v. 187, p. 483-489, 1992.

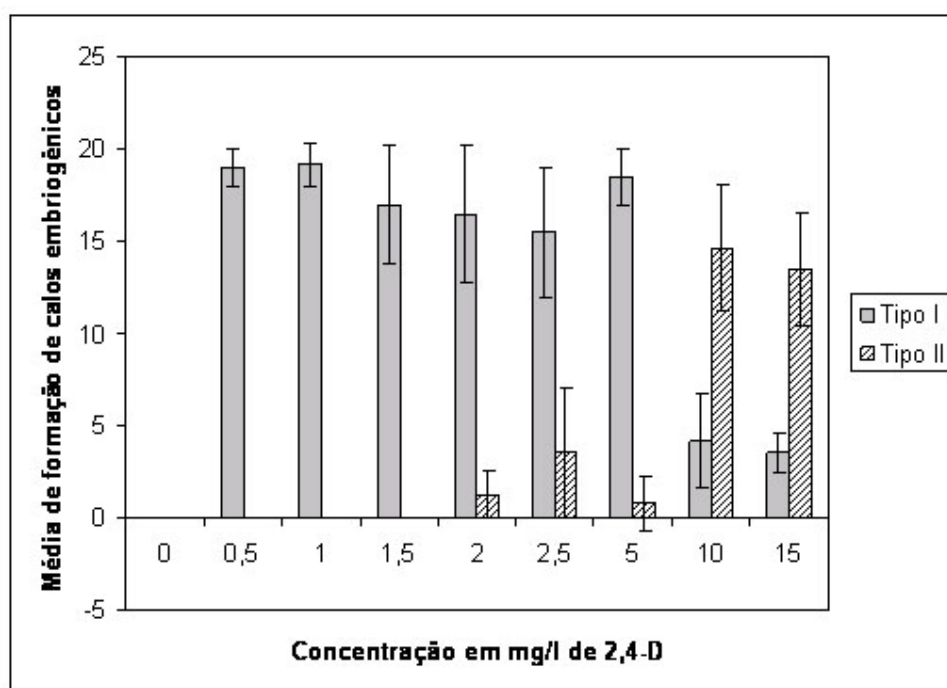
ZHONG, H.; ZHANG, S.; SUN, B.; WARKENTIN, D.; STICKLEN, M. B. The competence of maize shoot meristems for integrative transformation and expression of transgenes. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 110, p. 1097-1107, 1996.

Apoio: FAPEMIG



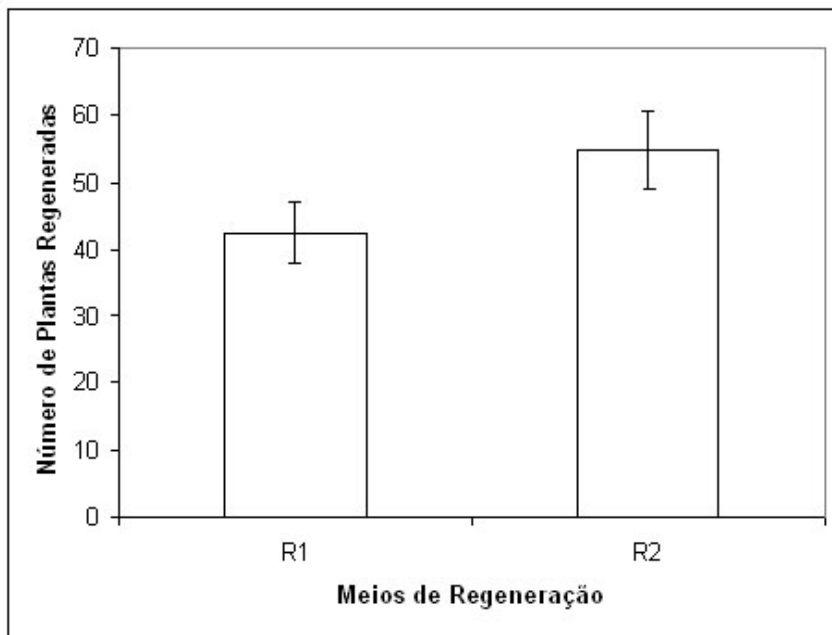


**Figura 1:** Formação de calos embriogênicos da linhagem de milho tropical L3 em diferentes concentrações de 2,4-D. (A) 0 mg/l; (B) 0,5 mg/l; (C) 1,0 mg/l; (D) 1,5 mg/l; (E) 2,0 mg/l; (F) 5,0 mg/l; (G) 10,0 mg/l; (F) 15,0 mg/l. Barra = 1 mm.



**Figura 2:** Quantidade de calos embriogênicos formados a partir de embriões zigóticos imaturos da linhagem de milho L3 na presença de diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D.





**Figura 3:** Número de plantas regeneradas a partir de embriões somáticos obtidos de embriões zigóticos imaturos da linhagem de milho L3 na presença (R2) ou ausência (R1) de reguladores de crescimento vegetal.