

RESUMO

Regeneração do genótipo modelo Hi-II de milho com diferentes concentrações de fitorreguladores

AUTOR PRINCIPAL:

Bernardo Variani H. Torres

E-MAIL:

ber_torres92@hotmail.com

TRABALHO VINCULADO À BOLSA DE IC::

Pibic UPF ou outras IES

CO-AUTORES:

Dielli Aparecida Didoné, Cássia Ceccon, Marília Silva

ORIENTADOR:

Ph.D. Magali Ferrari Grando

ÁREA:

Ciências Agrárias

ÁREA DO CONHECIMENTO DO CNPQ:

Fitotecnica

UNIVERSIDADE:

Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO:

A capacidade de regenerar plantas transgênicas de milho está correlacionada com a habilidade de formação de calos embriogênicos. A regeneração de plantas de milho a partir de embriões somáticos induzidos in vitro se dá em etapas. A primeira etapa se refere à maturação dos embriões somáticos através do cultivo em meio de cultura com alta concentração de sacarose, no escuro e sem a adição de reguladores de crescimento (Frame et al., 2002; Vega et al., 2008). A segunda etapa da regeneração se refere ao desenvolvimento dos brotos e enraizamento. Uma estratégia publicada por Frame et al. (2011) mostra uma solução para maior eficiência na regeneração de plantas transgênicas do híbrido Hi-II, o qual utiliza um pré-tratamento de regeneração com menor concentração da auxina 2,4-D. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência e a utilização do sistema de pré-regeneração em conjunto com diferentes concentrações de fitoreguladores 2,4-D e ABA na etapa de regeneração de plantas.

METODOLOGIA:

Calos embriogênicos do híbrido de milho Hi-II obtidos de embriões imaturos foram cultivados em 5 tratamentos, 4 de Pré-reg e 1 de RegI (Tabela 1): T1: sem 2,4-D; T2: com 0,25 mgL⁻¹ de 2,4-D; T3: com 0,25 mg 2,4-D + 1 μM ABA; T4: com 0,1 mgL⁻¹ 2,4-D + 1 μM ABA; T5: sem 2,4-D + 60 gL⁻¹ de sacarose. Em pré-reg permaneceram 14 dias no escuro a 25°C, no meio de RegI permaneceram 15 dias sem luz a 25°C. Posteriormente foram transferidos para o meio de RegII e mantidos em fotoperíodo 16h/8h até a formação de brotos e plântulas. As plântulas com 1,5cm foram transferidas para vidros com meio RegII. Após, as plântulas foram aclimatizadas e transferidas para vasos e mantidas em casa de vegetação até atingir a maturidade. O delineamento foi o DCC com 5 repetições. A unidade experimental uma placa de petri com 500mg de calos embriogênicos. Foram avaliados número de embriões somáticos maduros, plântulas formadas e transferidas para aclimatização, plantas adultas e espigas formadas por tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Os calos embriogênicos cultivados nos tratamentos T2 e T4 apresentaram maior frequência da manutenção da embriogenicidade comparado aos demais (Tabela 2). Quanto à formação de embriões maduros na etapa de Reg I e formação de plântula na etapa de Reg II, houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo que o T2 foi superior ao tratamento T1 e ao T5, não diferindo dos T3 e T4 (Tabela 2). No total foram regeneradas 1.081 plantas, sendo que 410 plantas foram geradas do tratamento T2. Comparando o desempenho dos diferentes tratamentos na velocidade da emergência de plantas após transferidas para a luz, o T2 apresentou uma resposta mais rápida, promovendo a formação das primeiras plantas em 8 dias (Figura 1). Os T3 e T4 que eram suplementados com 1 μ M ABA em combinação com o 2,4-D, apresentaram um aumento no tamanho dos calos de 7 e 8 vezes, respectivamente, do seu tamanho inicial no retardo do início de formação de plântulas para o T4 em 10 dias e do aumento na produção de plântulas para ambos os tratamentos em um mês após o T2 (Figura 1). O rápido desempenho na formação de plântulas após a transferência para a luz no tratamento T2 se deve pela perfeita maturação dos embriões os quais apresentavam estruturas bipolares e esbranquiçadas, que possuíam eixo embrionário e radicular capaz de formar uma planta completa. Quando estas estruturas são expostas a luz, recebem estímulo para a germinação. Os embriões maduros são resultado da maturação dos embriões somáticos devido ao estresse osmótico causado pela alta concentração de açúcar encontrado no meio RegI (Figura 2c, d e e). Foram aclimatizadas 30 plantas para cada tratamento. O tratamento T2 mostrou melhor resultado tanto no número de plantas aclimatizadas, apresentando uma frequência de 93,3%, como no número de plantas adultas obtidas (76,7%) (figura 3).

CONCLUSÃO:

O meio de pré-regeneração se mostrou fundamental na etapa de regeneração de plantas. A adição dos fitoreguladores ABA e 2,4-D proporcionou um aumento na divisão celular retardando o início do desenvolvimento de plântulas. O T2 (Pré-reg com 0,25 mgL⁻¹ de 2,4-D) demonstrou ser mais eficaz na resposta de produção de plantas no processo de regeneração

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Huang XQ, Wei ZM (2004) High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (Zea mays L.). Plant Cell Reports 22: 793-800.
Pcterson, G; Smith, R. (1991). Effect of abscisic acid and callus size on regeneration of american and international rice varieties. Plant Cell Reports. v.10, p35-38.
FRAME, B. et al. Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos. Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, v. 710, p. 327-341, 2011.

Tabela 1 - Meios utilizados para regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos de milho (FRAME et al. 2011)

Preparação dos embriões somáticos para regeneração	
Melos de cultura	Sais MS acrescido das vitaminas MS (0,5 mg.L ⁻¹ de tiamina HCl, 2 mg.L ⁻¹ de glicina, 0,5 mg.L ⁻¹ de piridoxina HCl, 0,5 mg.L ⁻¹ de ácido nicotínico), 100 mg.L ⁻¹ de mio-inositol, 0,25 mL/L 2,4-D, 30 g.L ⁻¹ sacarose, 3 g.L ⁻¹ Phytigel, pH 5,8.
Pré-Reg.	
Maturação dos embriões somáticos	
Reg. I	Sais MS, acrescidos de vitaminas MS, 100 mg.L ⁻¹ de mio-inositol, 60 g.L ⁻¹ sacarose, 3 g.L ⁻¹ Phytigel, pH 5,8.
Germinação dos embriões somáticos	
Reg.II	Mesmo Reg. I com reduzida concentração de sacarose 30 g.L ⁻¹ ; pH 5,8.

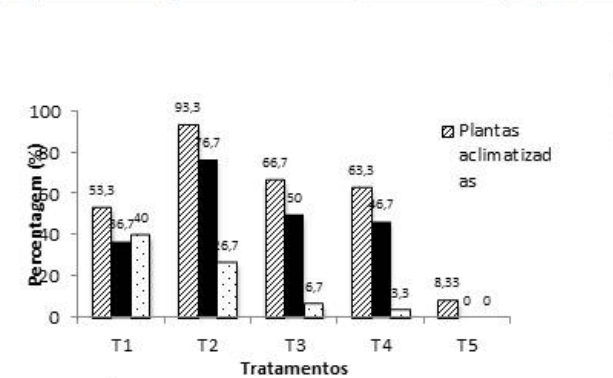


Figura 3: Número de plantas aclimatizadas, plantas adultas e de espigas formadas nos 5 diferentes tratamentos de regeneração do genótipo Hi-II de milho. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2013.

Tabela 2: Formação média de embriões maduros, brotações e plântulas nos diferentes tratamentos de regeneração com diferentes concentrações de fitoreguladores. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2013.

Tratamentos	Pré-Regeneração	Regeneração I	Regeneração II
	Frequência média de calos que mantiveram a embriogenicidade (%)	Número de embrião maduro	Número de plântulas regeneradas
1	13,85 b	71 b	118 bc
2	100,0 a	197 a	410 a
3	44,0 b	266 a	240 ab
4	89,0 a	225a	289 ab
5	32,0 b	62 b	24 c
Média/Total	55,8	821	1.081
CV(%)	49,15%	30,85%	48,35%

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

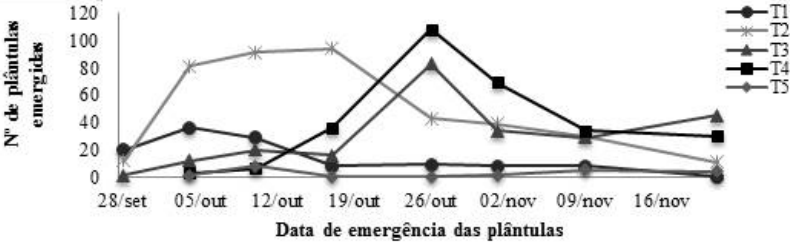


Figura 1: Desempenho dos diferentes tratamentos na emergência de plântulas após transferidos para a presença de luz na regeneração do genótipo Hi-II de milho. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2013.

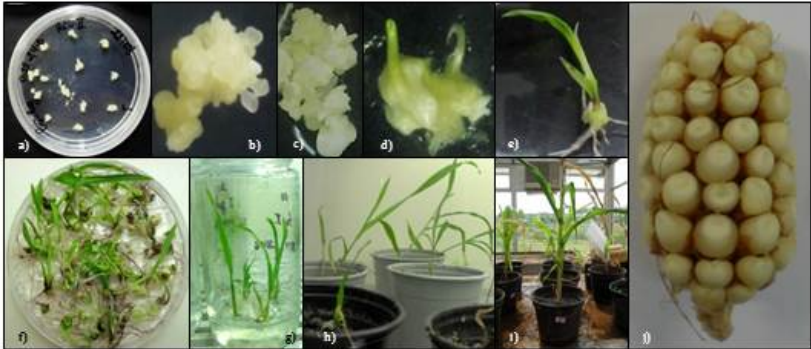


Figura 2: Etapas do processo de regeneração do híbrido de milho Hi-II: a) Placa contendo 500mg de calo embriogênico; b) Calo embriogênico apresentando embriões alongados (Pré-regeneração); c) Calo apresentando embriões maduros (Regeneração I); d) Aspecto do embriões maduro com escutelo e radícula desenvolvidos (Regeneração II); e) Plântula germinada do embrião maduro; f) Placa contendo plântulas no meio de Regeneração II; g) Plântulas em vidros em câmara de crescimento controlada; h) Aclimação de plântulas em potes de 500 ml; i) Plantas adultas em casa de vegetação; j) Espiga produzida por plantas regenerados *in vitro*. Passo Fundo, FAMV/UPF, 2013.

Assinatura do aluno

Assinatura do orientador