

SELEÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO PIPOCA COM POTENCIAL PARA INDUÇÃO DE CALOS

Mariana Fernandes Rocha (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Sandra Aparecida de Oliveira Collet (Orientador), e-mail: marianarocha1819@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biologia Celular, Genética e Biotecnologia/Maringá, PR.

Biologia Geral/Genética Vegetal

Palavras-chave: calos embriogênicos, variação somaclonal, microssatélites

Resumo:

A aplicação da Biotecnologia para o desenvolvimento de novas cultivares de milho é uma grande aliada do melhoramento genético, propiciando benefícios diretos a agricultores e consumidores. A cultura de tecidos é uma ferramenta biotecnológica, muito utilizada para clonar plantas em escala comercial, além de colaborar para a transformação genética e conservação de espécies vegetais. Em plantas regeneradas por meio de cultura de tecidos, frequentemente podem surgir indivíduos que se distinguem da planta original em um ou mais caracteres, e essas alterações podem ser estáveis e transmissíveis aos descendentes. Esse fenômeno é denominado de variação somaclonal, os variantes somaclonais, quando de natureza herdável, podem apresentar tanto caracteres agrônômicos importantes para o melhoramento vegetal como perda dos mesmos. O aparecimento dessas variações em plantas pode ser investigado através de marcadores moleculares do tipo microssatélite. O DNA foi extraído de plantas germinadas de sementes e de plantas regeneradas de cultura de calos, de duas linhagens de milho-pipoca. Um total de 18 primers foi selecionado do banco de primers para microssatélites de milho do laboratório de biotecnologia vegetal do DBC – UEM. Os primers selecionados demonstraram potencial para avaliar a variação somaclonal das plantas regeneradas e compará-las com as plantas germinadas de sementes.

Introdução

O milho pipoca pertence à espécie *Zea mays L. var. everta* (Sturtev.) L. H. Bailey, à família Poaceae, subfamília Panicoideae e tribo Maydeae. A aplicação da Biotecnologia no desenvolvimento de novas cultivares de milho é uma grande aliada do melhoramento genético, propiciando benefícios diretos a agricultores e consumidores. A Biotecnologia pode ser utilizada para o desenvolvimento de variedades resistentes a pragas e tolerantes a herbicidas ou que proporcionem melhor aproveitamento de água e

nutrientes. Um dos exemplos particularmente importante para os agricultores do Brasil é o emprego do milho tolerante à seca, que pode auxiliar na utilização mais eficiente da água disponível.

A cultura de tecidos é uma excelente ferramenta biotecnológica, muito utilizada para clonar plantas em escala comercial, além de colaborar na realização de estudos de transformação genética e conservação de espécies vegetais. Cultivo de tecido é o conjunto de metodologias que permitem o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta (explante) em um ambiente asséptico, sob condições controladas de nutrientes, temperatura, umidade e luz (BEVITORI, 2013).

A regeneração celular ocorre essencialmente em cultura de tecido. A regeneração in vitro de milho é mais eficiente por meio da embriogênese somática. Em plantas regeneradas por meio de cultura de tecidos, frequentemente podem surgir indivíduos que se distinguem da planta original em um ou mais caracteres e essas alterações podem ser estáveis e transmissíveis aos descendentes. Esse fenômeno, denominado de variação somaclonal é de natureza imprevisível, podendo ser herdável (genética) ou não herdável (epigenética). Os variantes somaclonais, quando de natureza herdável, podem apresentar tanto caracteres agrônômicos importantes para o melhoramento vegetal como perda dos mesmos. Algumas das mudanças genéticas são devidas a alterações no nível de ploidia, rearranjos e recombinações cromossômicas, migração de elementos e transposição e mutação genica (JAIN, 2001; KAEPLER et al., 2000). O aparecimento dessas variações em plantas pode ser investigado através de marcadores moleculares do tipo microssatélite. Microssatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSR, do inglês, Simple Sequence Repeats) são partes constituintes de DNAs de eucariotos formados de sequências de um a cinco nucleotídeos que se repetem. Essas sequências repetitivas são flanqueadas por sequências únicas e para que os microssatélites possam ser utilizados como marcadores moleculares, são necessários primers complementares às sequências únicas que flanqueiam os microssatélites utilizados em PCRs. Neste caso, os primers constituem-se de 18 a 24 nucleotídeos, em número suficientemente grande para que este primer não encontre outra sequência complementar que não seja a do microssatélite.

Materiais e métodos

Material Vegetal

As sementes das linhagens de milho-pipoca, identificadas por C12 e C15, pertencentes ao programa de melhoramento de milho-pipoca da Universidade Estadual de Maringá (UEM), foram semeadas no campo da Fazenda Experimental (FEI) da UEM.

Cultura de calos embriogênicos

As espigas de cada linhagem de milho-pipoca foram coletadas entre 12-20 dias após a polinização, e devidamente esterilizadas. Na câmara

asséptica, os embriões imaturos foram retirados dos grãos, e inoculados em placas de petri contendo meio de cultura para indução de calos. As placas foram mantidas em câmara de crescimento sob $28^{\circ} \text{C} \pm 1$, no escuro, por 15 dias. O método para a esterilização e inoculação dos embriões foi descrito por Lucena, 2004.

Extração e quantificação de DNA das plantas

O DNA foi extraído de folhas jovens de todas as plantas das duas linhagens de milho-pipoca, tanto para as plantas germinadas de modo convencional quanto para as regeneradas. As amostras foram preparadas individualmente e o DNA foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Hoisington et al. (1994). O DNA extraído de cada amostra foi quantificado utilizando o equipamento Picodrop. Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e utilizadas para amplificar as sequências específicas.

Teste e seleção dos primers microssatélites

Para a escolha dos marcadores polimórficos, foram avaliados 27 microssatélites já mapeados em milho comum. Para a amplificação dos microssatélites foi utilizado o programa Touchdown PCR. Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose MS-8 (4%) O gel foi preparado com 50% agarose MS-8 e 50% agarose normal. A eletroforese foi realizada com uma diferença de potencial de 60 volts durante 4,5 horas. Os géis foram corados com brometo de etídio contendo $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$. A imagem foi capturada com Ultraviolet Transilluminador High Performance - Edas 290, utilizando o programa Kodak 1D 3.5.

Resultados e Discussão

Com o monitoramento da cultura de calos, nos meios de cultura MS e N6, não foi observada a formação de calos na concentração de 0% de sacarose e nem na concentração 0% de 2,4-D, nesta última condição, ocorreu apenas a formação de raízes. Os calos cultivados com 2,4-D formaram brotos mais rapidamente. As plantas regeneradas, utilizadas para extração de DNA, foram cultivadas em meio N6, que se mostrou o mais adequado para a regeneração, com 6% de sacarose e diferentes concentrações de 2,4-D (1,2; 2,2 e 3,2 mg/L)

A concentração do DNA extraído das plantas germinadas de sementes da linhagem C12 variou de 34,2 a 153,7 ng/L e na linhagem C15 variou de 24,4 a 473,7 ng/L. Já nas plantas regeneradas em cultura, a concentração variou de 27,2 a 85,8 ng/L.

Dos 27 primers testados para amplificação das regiões microssatélites, foram selecionados 18 primers, por apresentarem melhor resolução no gel, são eles: umc 2196, umc 2262, umc 2245, umc 2281, umc 1336, umc 1071, umc 1736, umc 2343, umc 1241, umc 1292, umc 2080, umc 2116, bnlg 1083, umc 1077, umc 1590, umc 1653, umc 2226 e umc 2115. Estes primers

estão bem distribuídos no genoma de milho e assim poderão fornecer informações sobre a estabilidade genômica das plantas regeneradas.

Conclusões

- O meio N6 foi o melhor para a indução de calos nas duas linhagens testadas de milho pipoca;
- A presença de 2,4-D foi importante para a formação dos calos e a maior concentração testada (3,2 mg/L) foi a melhor para a indução de brotos das duas linhagens de milho pipoca;
- Dezoito primers de microssatélites selecionados demonstraram potencial para avaliar a variação somaclonal das plantas regeneradas e para compará-las com as plantas germinadas de sementes.

Agradecimentos

Agradeço a orientação, a UEM pela oportunidade e ao CNPq pela bolsa concedida.

Referências

BEVITORI, Rosangela. Cultivo in vitro do arroz (*Oryza sativa* L.): conceitos básicos e protocolo. **Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão**, 2013.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. Laboratory Protocols: **CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. Second Edition, Mexico, D.F.: CIMMYT, 50p. 1994.

JAIN, S.M. Tissue cultured –derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v.118, n.2, p.153-166, 2001.

KAEPLER, Shawn M.; KAEPLER, Heidi F.; RHEE, Yong. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. In: **Plant Gene Silencing**. Springer, Dordrecht, 2000. p. 59-68.

LUCENA, A. L. M. **Indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas em linhagens de milho-pipoca**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) Maringá, Universidade Estadual de Maringá, 2004, 54p.