

Embriogênese Somática e Regeneração de Plantas de *Sorghum Bicolor* a Partir de Cultura de Inflorescência Madura



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
201**

**Embriogênese Somática e Regeneração
de Plantas de *Sorghum Bicolor* a Partir
de Cultura de Inflorescência Imatura**

Andréa Almeida Carneiro
Rosângela Luci Brandão
Fabiane Lacerda Moraes
Gleyce Aparecida dos Santos Moreira
Rayanne Pereira de Oliveira
Maria José Vilaça de Vasconcelos
Meire de Cássia Alves
Newton Portilho Carneiro

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2019*

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo
Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Maria Marta Pastina

Secretário-Executivo
Elena Charlotte Landau

Membros
*Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria
Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira
Simeone, Roberto dos Santos Trindade e
Rosângela Lacerda de Castro*

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Mônica Aparecida de Castro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Mônica Aparecida de Castro

Foto da capa
Andréa Almeida Carneiro

1ª edição
Publicação digitalizada (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Embriogênese somática e regeneração de plantas de *Sorghum bicolor* a partir
de cultura de inflorescência imatura / Andréa Almeida Carneiro ... [et al.].
– Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2019.
23 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e
Sorgo, ISSN 1679-0154; 201).

1. Sorgo. 2. Gene. 3. Genética vegetal. I. Carneiro, Andréa Almeida. II.
Brandão, Rosângela Luci. III. Moraes, Fabiane Lacerda. IV. Moreira, Gleyce
Aparecida dos Santos. V. Oliveira, Rayanne Pereira de. VI. Vasconcelos,
Maria José Vilaça de. VII. Alves, Meire de Cássia. VIII. Carneiro, Newton
Portilho. IX. Série.

Sumário

Resumo	05
Abstract	07
Introdução.....	08
Material e Métodos	09
Resultados e Discussão	12
Conclusões.....	19
Referências	19

Embriogênese Somática e Regeneração de Plantas de *Sorghum Bicolor* a Partir de Cultura de Inflorescência Madura

Andréa Almeida Carneiro¹

Rosângela Luci Brandão²

Fabiane Lacerda Moraes³

Gleyce Aparecida dos Santos Moreira⁴

Rayanne Pereira de Oliveira⁵

Maria José Vilaça de Vasconcelos⁶

Meire de Cássia Alves⁷

Newton Portilho Carneiro⁸

Resumo – Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é a base da alimentação de mais de 300 milhões de pessoas em regiões semiáridas da África e Ásia. Sendo uma cultura economicamente importante, o desenvolvimento de cultivares mais produtivas por meio da introdução de genes de resistência a vários estresses bióticos e abióticos é altamente desejável. Entretanto, este cereal tem se mostrado extremamente recalcitrante quando cultivado *in vitro*, e para gerar uma variedade transgênica é imprescindível que a cultivar transformada seja capaz de regenerar eficientemente em cultura de tecido. A embriogênese somática é uma forma de regeneração comum entre os cereais. Calos embriogênicos podem ser classificados como Tipo I ou II, sendo que os calos friáveis (Tipo II) são preferidos em protocolos de transformação genética por apresentarem uma alta taxa de crescimento e de regeneração de plantas. Porém, a formação destes calos é observada em um número limitado de genótipos. Objetivando identificar genótipos de

¹ Bióloga, PhD, Pesquisadora Embrapa Milho e Sorgo

² Bióloga, Ds, Universidade Federal de Lavras

³ Eng. Agrôn., Universidade Federal de São João Del-Rei

⁴ Eng. Florestal, Bolsista Embrapa Milho e Sorgo

⁵ Bióloga Ms, Bolsista Embrapa Milho e Sorgo

⁶ Farmacêutica Bioquímica, Ph.D, Pesquisadora Embrapa Milho e Sorgo

⁷ Bióloga Ms, Analista Embrapa Milho e Sorgo

⁸ Biólogo, PhD, Pesquisador Embrapa Milho e Sorgo

sorgo capazes de formar calos embriogênicos friáveis (CEF), inflorescências imaturas de nove linhagens de sorgo foram cultivadas nos meios de culturas CIM e N6 a 25 °C, na ausência de luz, durante 4 semanas, com subcultivos a cada 2 semanas. Entre os dois meios de cultura testados, o meio CIM foi superior, mostrando-se adequado para a formação de CEF e regeneração de plantas. Das linhagens testadas, duas (CMSXS 102B e CMSXS 156B) tiveram maior formação de CEF e apresentaram maior taxa de regeneração.

Termos para indexação: embriogênese somática, inflorescência, *Sorghum bicolor*.

Somatic Embryogenesis and Regeneration of Sorghum Bicolor Plants from Immature Inflorescence Culture

Abstract – Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) is a staple food for more than 300 million people in semi-arid regions of Africa and Asia. As an economically important crop the development of more productive cultivars by introducing resistance genes to various biotic and abiotic stresses is highly desirable. However, this cereal has been extremely recalcitrant when grown *in vitro*, and in order to generate a transgenic variety it is essential that the transformed cultivar be able to regenerate efficiently in tissue culture. Somatic embryogenesis is a common form of regeneration among cereals. Embryogenic callus can be classified as Type I or II, and the friable callus (Type II) is preferred in genetic transformation protocols because it has a high rate of plant growth and regeneration. However, the formation of this type of callus is observed in a limited number of genotypes. In order to identify sorghum genotypes capable of forming friable embryogenic callus (FEC), immature inflorescences of nine sorghum lines were cultivated in CIM and N6 culture media at 25 °C in the absence of light for four weeks, with subcultures every 2 weeks. Between the two culture media tested, the CIM medium was superior, being suitable for FEC formation and plant regeneration. Among the tested strains, two (CMSXS 102B and CMSXS 156B) had higher FEC formation and presented higher regeneration rate.

Index terms: somatic embryogenesis, inflorescence, *Sorghum bicolor*.

Introdução

O crescimento populacional, principalmente em países em desenvolvimento, vem ocasionando um aumento contínuo no consumo de produtos agrícolas. Para enfrentar tal situação, o incremento da produtividade por meio da incorporação de novas tecnologias ao processo de produção é estratégia chave.

Dos meios modernos disponíveis para a geração de novas tecnologias de produção de alimentos e controle de pragas, nenhum individualmente ofereceu maior potencial de ganho do que o melhoramento de plantas. A revolução biotecnológica ocorrida nas últimas décadas possibilitou o desenvolvimento de tecnologias que oferecem ao melhoramento genético acesso a novas fontes de variabilidade (Naylor et al., 2004; O'Kennedy et al., 2006). Em especial, o aprimoramento das tecnologias de DNA recombinante, e as mutações sítio-direcionadas têm gerado um crescente interesse pela aplicação desses conhecimentos em programas de melhoramento de plantas. O sucesso da aplicação destas novas técnicas de melhoramento depende da possibilidade de transformação genética de plantas e requer, portanto, a utilização de genótipos com alta capacidade de regeneração em cultura de tecidos. Entretanto, a maioria das cultivares de sorgo é extremamente recalcitrante quando cultivada *in vitro* (Kishore et al., 2006). Para a obtenção de um protocolo eficiente de transformação genética é necessário que vários parâmetros sejam otimizados, entre eles a regeneração das células transformadas em cultura *in vitro*.

Culturas de calos embriogênicos de cereais são classificadas em dois tipos (Tipo I e Tipo II), que se diferenciam na morfologia, na textura e na taxa de crescimento. De acordo com Armstrong e Green (1985), Bregitzer et al. (1989) e Elkonin et al. (1995), os calos do Tipo I também conhecidos como calos embriogênicos compactos (CEC) produzem culturas maciças nas quais os embriões somáticos se apresentam em estruturas complexas e organizadas. Os do Tipo II conhecidos como calos embriogênicos friáveis (CEF) formam culturas com embriões somáticos que fragmentam facilmente ao serem tocados com auxílio de uma pinça. Calos do Tipo II apresentam alta taxa de crescimento, maior uniformidade e por isso são os preferidos para os trabalhos de transformação genética. Porém, a formação de calos

embriogênicos do Tipo II é observada em um número limitado de genótipos de sorgo (Elkonin et al., 1995; Kaepler; Pedersen, 1997).

Os protocolos de transformação genética de planta são desenvolvidos para genótipos adaptados à propagação *in vitro*, desse modo, fica evidente a necessidade de identificação de linhagens com alta capacidade regenerativa em cultura de tecidos e também o desenvolvimento de protocolos de regeneração *in vitro* funcionais para um maior número de plantas de uma mesma espécie. Portanto, este trabalho teve como objetivo a identificação de genótipos de sorgo capazes de regenerar eficientemente *in vitro* pelo processo de embriogênese somática, visando posterior utilização deste protocolo na geração de plantas transgênicas.

Material e Métodos

Preparo do explante

Inflorescências jovens de sorgo, entre 3,0 e 5,0 cm de comprimento, de nove linhagens-elites pertencentes à Embrapa Milho e Sorgo (CMSXS 101B, CMSXS 102B, CMSXS 107B, CMSXS 112B, CMSXS 156B, CMSXS 157B, CMSXS 210B, CMSXS 230B e CMSXS 232B), foram testadas quanto a sua eficiência de formação de calos embriogênicos e regeneração em cultura de tecidos. Colmos contendo as inflorescências imaturas foram desinfestados em etanol 70% e água estéril. Em seguida, as folhas foram retiradas com o auxílio de um bisturi, e a panícula foi exposta.

Indução de calos embriogênicos

As panículas isoladas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 5 mm e cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura CIM, que consiste de meio MS básico (Murashige; Skoog, 1962) contendo modificações conforme descrito por Tadesse et al. (2003) ou meio N6 (Chu et al., 1975) (Tabela 1). As placas foram seladas com parafilm® e incubadas em câmara de crescimento, no escuro a 26-28 °C, durante quatro semanas com subcultivo após duas semanas.

Com auxílio do estereoscópio (Zeiss stemi SV 11) foram analisadas as características formação de calos embriogênicos, calos embriogênicos friáveis, presença de mucilagem e escurecimento dos calos em meio de cultura. Estas características foram qualitativamente avaliadas, com peso de 1 a 3 (Tabela 2), nas diferentes linhagens testadas, de acordo com a escala de avaliação descrita por Kaeppler e Perderson (1996) com algumas modificações. A identificação dos calos foi baseada no trabalho de Gupta et al. (2006), que fizeram a caracterização de calos não embriogênicos (CNE), calos embriogênicos friáveis (CEF) e calos embriogênicos compactos (CEC).

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo usados para a cultura de tecido de sorgo.

Composição	Constituinte mg L ⁻¹	Meio CIM mg L ⁻¹	Meio N6 mg L ⁻¹	Meio RM mg L ⁻¹	Meio MS mg L ⁻¹
Sais	¹ MS	4.300	0	4.300	4.300
	² N6	0	4.300	0	0
Regulador de crescimento	³ 2,4 D	2,5	2,0	0	0
	⁴ ANA	0	0	0,25	0
Vitaminas	¹ MS	4.300	0	0	0
	² N6	0	4.300	0	0
	Myo-Inositol	100	100	100	100
	Ac.Nicotínico	0	0	0	1,0
	Piridoxina HCl	0	0	0	10,0
Suplementos	Tiamina HCl	1	0	0	1
	Glicina	7,5	0	0	0
	Prolina	0	2.900	0	0
	Caseína enzimática	0	100	0	0
	DL-asparagina	100	0	0	0
	Cinetina	0,2	0	0	0
	Sacarose	30 000	30 000	60 000	15 000
	Geneticina	2,5	0	0	0
⁵ Phytigel	2 500	2 500	2 500	2 500	

Mistura basal de sais com macro e micronutrientes, de acordo com Murashige e Skoog (1962). Sigma M5524.

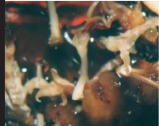
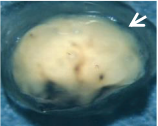
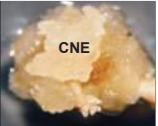
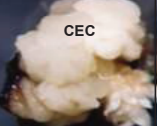

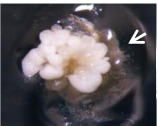
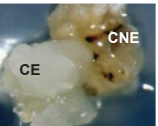
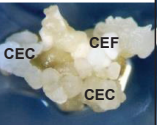


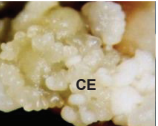
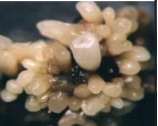
Mistura basal de sais com macro e micronutrientes, de acordo com Chu et al. (1975). Sigma C1416.

Ácido 2,4 diclorofenoxiacético. Sigma D84072.

Ácido naftalenoacético. Sigma N0640.

Agente geleificante. Sigma P8169

Tabela 2 - Escala de avaliação de escurecimento do calo e do meio de cultura, presença de mucilagem (M), calos embriogênicos (CE) e calos embriogênicos friáveis (CEF) em inflorescência jovem de sorgo cultivado *in vitro*.

Nota	Escurecimento	Mucilagem	Calos Embriogênicos	Calos Friáveis
1	 Calos e meio de cultura escuros	 Alta produção de mucilagem. Calos totalmente cobertos por mucilagem	 Calo não embriogênico (CNE).	 Calo embriogênico compacto (CEC). Só podem ser subdividido cortando com bisturi.
2	 Presença de calos claros e escuros e meio de cultura escuro.	 Média produção de mucilagem. Calos parcialmente cobertos com mucilagem	 Calos apresentando setores embriogênicos e não-embriogênicos.	 Calo embriogênico apresentando setores compactos e setores friáveis.
3	 Calos e meio de cultura claros.	 Calos não apresentam mucilagem.	 Calo embriogênico (CE).	 Altamente friáveis. Calos facilmente separados com utilização de espátula.

Regeneração de plantas a partir de embriões somáticos de sorgo

Para a regeneração, calos embriogênicos foram cultivados em meio RM (Tabela 1) e incubados a 25 °C no escuro. Após 2 a 3 semanas, os embriões somáticos maduros de coloração branca opaca foram cultivados em meio MS sob fotoperíodo de 16 horas (40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa) a 25 °C para germinação. Quando as raízes estavam bem desenvolvidas e as estrutura foliares medindo aproximadamente 6 cm de comprimento, as

plântulas foram transplantadas para vasos contendo uma mistura de 2/3 de solo e 1/3 de matéria orgânica (TDP 30/15) produzida pela empresa Terra do Paraíso (Holambra, São Paulo). Cada vaso foi coberto com uma sacola plástica transparente e, em seguida, transferido para casa de vegetação. Os vasos foram irrigados abundantemente antes do transplante. Nos dias seguintes, para reduzir a umidade e aclimatar a plântula de sorgo, a cobertura plástica dos vasos foi suspensa gradativamente e retirada ao final de uma semana. A irrigação foi realizada individualmente, de acordo com a necessidade de cada vaso.

Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com os tratamentos constituídos de acordo com um fatorial 2 x 9, com três repetições, sendo cada repetição constituída por uma inflorescência por placa. Avaliaram-se o escurecimento de calos e meio de cultura, a presença de mucilagem, a formação de calos embriogênicos somáticos e o número de calos friáveis, sendo os dados transformados para $(x)^{1/2}$, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

Resultados e Discussão

Indução e crescimento de calos embriogênicos

Dois meios de indução de calos embriogênicos baseados nos sais MS (CIM) e N6 (Tabela 1) foram comparados quanto à eficiência de indução de embriões somáticos em inflorescências imaturas de diferentes linhagens de sorgo. Inflorescências de sorgo entre 20 e 50 mm de comprimento são ótimas para a formação de calos e a regeneração de plantas *in vitro* (Cai; Butler, 1990), e a sua utilização para regeneração de plantas de sorgo em cultura de tecidos pode superar a limitação genotípica de maneira mais eficiente do que a utilização de embriões imaturos (Gupta et al., 2006).

Na Tabela 3 e Figura 1 observa-se que houve diferença significativa entre os genótipos avaliados e as características analisadas. Os resultados

revelaram que não houve escurecimento do meio de cultivo e nem dos calos quando as linhagens CMSXS 101B, 102B, 112B, 156B e 157B foram cultivadas em meio CIM (Nota 3) (Figura 1). No meio N6, o mesmo resultado foi observado para as linhagens CMSXS 112B, 156B, 157B e 230B. Apesar do não escurecimento destas linhagens em meio N6 houve a formação de grande quantidade de mucilagem, exceto para a linhagem CMSXS156B (Nota 1) (Figura1).

Tabela 3. Taxa média das avaliações do escurecimento do calo, presença de mucilagem, formação calos embriogênicos (1), por inflorescências de sorgo cultivadas em meio N6 e CIM. .

Genótipo	Escurecimento		Mucilagem		Embriogênicos		Friáveis	
	N6	CIM	N6	CIM	N6	CIM	N6	CIM
CMSXS 101B	1,33a	3,00c	1,00a	1,33a	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a
CMSXS 102B	1,67ab	3,00c	1,00a	2,33abc	1,00a	3,00c	1,00a	2,67c
CMSXS 107B	1,33a	2,33bc	1,00a	1,33a	1,00a	2,33bc	1,00a	2,00b
CMSXS 112B	3,00c	3,00c	1,00a	2,00abc	2,00b	2,67bc	1,00a	2,00b
CMSXS 156B	3,00c	3,00c	3,00c	2,67bc	1,00a	2,67bc	1,00a	2,67c
CMSXS 157B	3,00c	3,00c	1,00a	1,67ab	1,00a	2,00b	1,00a	2,00b
CMSXS 210B	2,33bc	2,00b	1,33ab	2,00abc	1,00a	2,00b	1,00a	2,00b
CMSXS 230B	3,00c	2,00b	1,00a	1,33a	1,00a	2,33bc	1,00a	2,00b
CMSXS 232B	1,00a	1,00a	2,33bc	3,00c	1,00a	2,67bc	1,00a	2,00b
Média	2,19A	2,48B	1,44A	1,96B	1,11A	2,30B	1,00A	2,04B

⁽¹⁾ Escala de notas para as características avaliadas está apresentada na Tabela 2

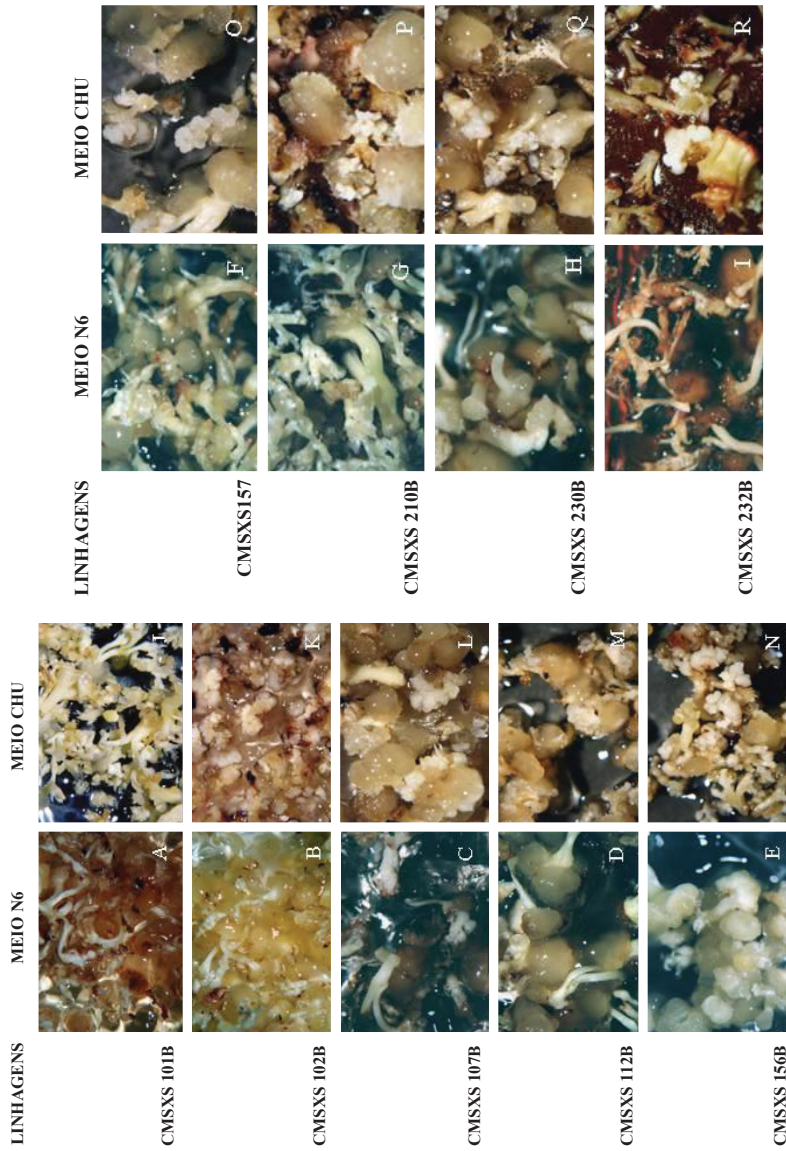


Figura 1. Inflorescência jovem de sorgo em meios de indução de calos N6 (A-I) e CIM (J-R). Aumento 6X (A, B,C,F,G, I e K) e 8X (D,E,H,L a R)

Entre os dois meios de cultura testados, o meio CIM foi superior para a formação de calos embriogênicos. Das nove linhagens testadas neste estudo, somente a linhagem CMSXS 112B formou calos embriogênicos em meio N6 (Nota 2). Oito linhagens (CMSXS 102B, 107B, 112B, 156B, 157B, 210B, 230B e 232B) formaram calos embriogênicos em meio CIM (Notas 2 a 3). A linhagem CMSXS 101B não formou CE em nenhum dos meios testados (Nota 1). Lusardi e Lupotto (1990), Kaepler e Pederson (1996), Elkonin e Pakhomova (2000) e Sato et al. (2004) também observaram que a composição do meio MS é mais propícia para a formação de calos em um maior número de linhagens de sorgo do que a do meio N6.

A composição do meio de cultura é um fator importante que afeta a morfogênese *in vitro* (Elkonin; Pakhomova, 2000; Sato et al., 2004). A regeneração de vários genótipos de sorgo por meio de embriogênese somática tem sido descrita a partir de diferentes meios de cultura. Alguns estudos compararam o efeito dos sais basais MS (Murashige; Skoog, 1962) e N6 (Chu et al., 1975) na indução da embriogênese somática e concluíram que existe uma forte influência do genótipo de sorgo na produção de calos e na regeneração *in vitro* (Lusardi; Lupotto, 1990; Elkonin et al., 1995; Kaepler; Pedersen, 1996; Sato et al., 2004). A principal diferença entre as formulações de sais MS e N6 é a concentração total de nitrogênio inorgânico mais alta, além de uma relação mais baixa de nitrato de amônio na formulação MS (Armstrong et al., 1991; Elkonin; Pakhomova, 2000).

Diferença na capacidade de regeneração entre genótipos de arroz mostrou estar associada com o loco que comanda a quebra dos produtos tóxicos do metabolismo do nitrato (Nishimura et al., 2005), sugerindo que o potencial genético para estabelecer a embriogênese pode ser influenciado pelos sais presentes no meio como previamente sugerido por Hodges et al. (1986). Em meio CIM, a maioria das linhagens formou CEC em maior quantidade do que CEF. As linhagens CMSXS 102B e CMSXS 156B se destacaram na produção de CEF (Nota 2,67), além de não apresentarem mucilagem nem escurecimento dos calos e do meio de cultura (Tabela 3 e Figura 1K e N).

Os resultados mostram que as linhagens que apresentaram maior número de calos embriogênicos friáveis não apresentaram escurecimento dos calos e do meio de cultura. Esses resultados corroboram os apresentados por Elkonin et al. (1995) e Kaepler e Pedersen (1996), que também observaram

maior número de calos embriogênicos friáveis em linhagens de sorgo que apresentaram menos mucilagem e escurecimento de calos.

Segundo Oberthur et al. (1983), o escurecimento observado nos calos e no meio de cultura de sorgo é em razão dos compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são derivados do metabolismo secundário, os quais exercem importante papel no metabolismo de muitas espécies de plantas, bem como na defesa contra insetos e microrganismos. No entanto, no cultivo *in vitro* de sorgo, a produção de compostos fenólicos pode prejudicar a formação de calos e o desenvolvimento da planta (Kresovich et al., 1987; George, 1996; Zhu et al., 1998). O dano causado nas células durante a excisão dos explantes leva à liberação dos compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado (George; Sherrington, 1984). Esses compostos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas que inibem o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura, ocasionando, não raramente, até a morte deles (Grattapaglia; Machado, 1998).

De acordo com Elkonin et al. (1995), a formação de CE em sorgo está correlacionada com a supressão da produção de pigmentos escuros. Ainda segundo esses autores, a presença de prolina no meio de cultura pode suprimir a produção de pigmentos escuros, inibindo enzimas que fazem parte da síntese de compostos fenólicos.

Para minimizar os efeitos negativos da oxidação fenólica durante o cultivo *in vitro*, antioxidantes podem ser adicionados aos meios de cultivo, destacando-se o carvão ativado e o polyvinylpyrrolidona PVP (Pan; Van Staden, 1998). O carvão ativado promove a adsorção de compostos fenólicos e torna as enzimas polifenol oxidase e peroxidase inativas (Ebert et al., 1993; Pan; Van Staden, 1998). O PVP reage com os compostos oxidantes no meio de cultura, evitando que eles fiquem disponíveis para se oxidarem (George, 1996). Em palmeira, o carvão ativado foi o antioxidante que melhor reduziu o nível de oxidação dos explantes e do meio de cultura, conseqüentemente aumentando a sobrevivência do explante e a organogênese (Tisserat, 1979). Nas linhagens de sorgo avaliadas não foi observado efeito similar do carvão ativado, além disso, a adição de carvão ativado (1 g L^{-1}) em meio de cultura CIM inibiu a formação de calos embriogênicos (dados não apresentados). Estes dados corroboram com as observações de Van Nguyen et al. (2007),

que observaram um aumento na sobrevivência de embriões imaturos de sorgo com a adição de carvão ativado em meio de cultura, e uma redução no número de embriões que formaram calos. Segundo estes autores, o efeito inibitório do carvão ativado na formação de calos pode ser por causa da adsorção de componentes essenciais do meio de cultura como, por exemplo, o 2,4-D. Ebert et al. (1993) reportaram que 99,5% de 2,4-D adicionado em meio de cultura foi adsorvido pelo carvão ativado em cinco dias em meio líquido e dez dias em meio sólido. A formação de calos embriogênicos e a regeneração de plantas de sorgo *in vitro* dependem do genótipo, do meio de cultura e do explante utilizado. Concordando com esta afirmação, Kaeppler e Pedersen (1996) e Bordón et al. (2000) sugerem que, em função das diferenças qualitativas e quantitativas na morfogênese *in vitro*, as condições de regeneração das plantas devem ser otimizadas para cada espécie ou cultivar (Guo; Liang, 1993; Gupta et al., 2006).

Regeneração de plantas através de embriogênese somática

A regeneração de plantas foi conduzida com as linhagens CMSXS 102B, 107B, 112B, 156B, 157B, 210B, 230B e 232B, que produziram calos embriogênicos em meio CIM.

A frequência de regeneração está apresentada na Tabela 4. Todas as linhagens testadas foram capazes de regenerar plantas, mas foi detectada variação quanto a esta habilidade. As linhagens CMSXS 102B e CMSXS 156B, que tiveram maior formação de CEF, apresentaram maior taxa de regeneração (47% e 50%, respectivamente), enquanto que as linhagens CMSXS 112B e 232B que tiveram alta formação de CE mas baixa produção de CEF, apresentaram taxa de regeneração mais baixa (7,7% e 26,7%, respectivamente), concordando, portanto, com os resultados de Kaeppler e Pedersen (1997) e de Seetharama et al. (2000), que mostraram que CEF de sorgo foram considerados mais eficientes para a regeneração de plantas.

Tabela 4. Embriogênese e regeneração de calos de inflorescências de sorgo cultivadas em meio CIM.

Genótipos	Regeneração	
	Número de calos transferidos	Frequência de calos que produziram plantas (%)
CMSXS 102B	55	47h
CMSXS 107B	85	1,18a
CMSXS 112B	65	7,70c
CMSXS 156B	118	50f
CMSXS 157B	99	21d
CMSXS 210B	18	28,6e
CMSXS 230B	67	1,5b
CMSXS 232B	135	26,7g

O meio CIM utilizado para a formação de calos embriogênicos apresenta em sua constituição auxina (2,5 mg L⁻¹ 2,4-D) e citocinina (0,5 mg L⁻¹ cinetina). Vários estudos mostraram que a combinação de reguladores de crescimento pode estimular a embriogênese *in vitro*. Geralmente, para a indução de maior número brotações utilizam-se as citocininas, pois estas estimulam a produção da parte aérea e elevam as taxas de multiplicação. Já as auxinas, apesar de não promoverem a proliferação de brotações, incrementam o crescimento da cultura, já que estão relacionadas com a regulação da morfogênese em conjunto com as citocininas (Hu; Wang, 1983).

Sharma et al. (1989) relataram que calos formados a partir de embriões imaturos de sorgo, em meio contendo auxina e citocininas, foram altamente regeneráveis. Cai e Butler (1990) recomendam a combinação de baixas concentrações de auxinas e 0,5 mg L⁻¹ de citocinas para regeneração de plantas de sorgo. Corroborando com esta afirmação Hagio (2002) alega que uma ação combinada da auxina 2,4-D e da citocinina é necessária para a indução de calos regeneráveis de sorgo. Segundo Maheswari et al. (2006), a

ótima combinação de auxina e citocinina para a indução de calos e eficiente regeneração é, provavelmente, um reflexo dos conteúdos endógenos desses reguladores de crescimento. Segundo a hipótese de Skoog e Miller (1957), o balanço entre citocinina e auxina tem um papel essencial na morfogênese de plantas, tendo forte influência na formação de raízes e brotos.

Gupta et al. (2006) observaram que os coeficientes de variação fenotípicos e genotípicos foram maiores para a característica de regeneração de planta do que para a característica de indução de calos. Diversos trabalhos feitos com cereais têm demonstrado que a capacidade de regeneração *in vitro* é determinada geneticamente. Tomes e Smith (1985), estudando morfogênese em milho, concluíram que a regeneração é um caráter hereditário. Isso foi reportado por Lazar et al. (1984) para trigo e Wu e Chen (1987) para arroz. Já Lange et al. (1995) e Gupta et al. (2006), além de comprovarem que a regeneração e a embriogênese são caracteres controlados geneticamente, estimaram que a ação gênica aditiva é um componente importante no controle genético dessas características.

Conclusões

O meio de cultivo CIM foi adequado para a indução de calos embriogênicos friáveis e regeneração *in vitro* de linhagens de *Sorghum bicolor* L. Moench.

Linhagens de sorgo que apresentaram maior porcentagem de formação de calos embriogênicos friáveis (CEF) tiveram maior taxa de regeneração *in vitro*.

Este protocolo de indução de calos embriogênicos a partir de inflorescências imaturas de sorgo poderá ser utilizado em programas de melhoramento para a regeneração de plantas geneticamente modificadas a partir de células transformadas com genes de interesse.

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.

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. L. Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. **Maize Genet Coop Newsl**, v. 65, p. 92-93, 1991.

BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J. L.; GARCIA-LUIS, A. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks. **Annal of Botany**, v. 86, n. 1, p. 159-166, 2000.

BREGITZER, P. P.; SOMERS, D. A.; RINES, H. W. Development and characterization of friable, embryogenic oat callus. **Crop Science**, v. 29, n. 3, p. 798-803, 1989.

CAI, T.; BUTLER L. G. Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several high-tannin sorghums. **Plant Cellular Tissue and Organic Culture**, v. 20, n. 2, p. 101-110, 1990.

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.

EBERT, A.; TAYLOR, F.; BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cellular Tissue and Organic Culture**, v. 33, n. 2, p. 157-162, 1993.

ELKONIN, L. A.; LOPUSHANSKAYA, R. F.; PAKHOMOVA, N. V. Initiation and maintenance of friable, embryogenic callus of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) by amino acids. **Maydica**, v. 40, n. 2, p. 153-157, 1995.

ELKONIN, L. A.; PAKHOMOVA, N. V. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. **Plant Cellular Tissue and Organic Culture**, v. 61, n. 2, p. 115-123, 2000.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programa e resumos**. São Carlos: RBSIB: UFScar, 2000. p. 255-258.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: practice**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In.: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação**

genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa/SPI/CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

GUO, J. H.; LIANG, G. H. Callus induction and plant regeneration of cultivated and wild sorghums. **Cytologia**, v. 58, p. 203-210, 1993.

GUPTA, S.; KHANNA, V. K.; SINGH, R.; GARG, G. K. Strategies for overcoming genotypic limitations of *in vitro* regeneration and determination of genetic components of variability of plant regeneration traits in sorghum. **Plant Cellular Tissue and Organic Culture**, v. 86, n. 3, p. 379-388, 2006.

HAGIO, T. Adventitious shoot regeneration from immature embryos of sorghum. **Plant Cell, Tissue and Organic Culture**, v. 68, n. 1, p. 65-72, 2002.

HODGES, T. K.; KAMO, K. K.; IMBRIE, C. W.; BECWAR, M. R. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. **Nature Biotechnology**, v. 4, p. 219-223, 1986.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 177-227.

KAEPLER, H. F.; PEDERSEN, J. F. Media effects on phenotype of callus cultures initiated from photoperiod-insensitive, elite inbred sorghum lines. **Maydica**, v. 41, n. 2, p. 83-89, 1996.

KAEPLER, H. F.; PEDERSEN, J. F. Evaluation of 41 elite and exotic inbred *Sorghum* genotypes for high quality callus production. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 48, n. 1, p. 71-75, 1997.

KISHORE, S. N.; VISARADA, K. B. R. S. Y.; ARAVINDA LAKSHMI, Y.; PASHUPATINATH, E.; RAO, S. V.; SEETHARAMA, N. In vitro culture methods in sorghum with shoot tip as the explant material. **Plant Cellular Report**, v. 25, n. 3, p. 174-182, 2006.

KRESOVICH, S.; MCGEE, R. E.; PANELLA, L.; REILLEY, A. A.; MILLER, F. R. Application of cell and tissue culture techniques for the genetic improvement of sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench: progress and potential. **Advances in Agronomy**, v. 41, p. 147-170, 1987.

LANGE, C. E.; FEDERIZZI, L. C.; CARVALHO, F. I. F.; TAVARES, M. J. C. M. S.; DORNELLES, A. L. C.; HANDEL, C. L. Genetic analysis of somatic embryogenesis and plant regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Genetics and Breeding**, v. 49, p. 195-200, 1995.

LAZAR, M. D.; BAENZIGER, P. S.; SCHAEFFER, G. W. Combining ability and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat

(*Triticum aestivum* L.) anther culture. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 68, n. 1/2, p. 131-134, 1984.

LUSARDI, M. C.; LUPOTTO, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sorghum* species. **Maydica**, v. 35, p. 59-66, 1990.

MAHESWARI, M.; JYOTHILAKSHMI, N.; YADAV, S. K.; VARALAXMI, Y.; VIJAYA LAKSHMI, A.; VANAJA, M.; VENKATESWARLU, B. Efficient plant regeneration from shoot apices of *Sorghum*. **Biology Plant**, v. 50, n. 4, p. 741-744, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAYLOR, R. L.; FALCON, W. P.; GOODMAN, R. M.; JAHN, M. M.; SENGOOBA, T.; TEFERA, H.; NELSON, R. J. Biotechnology in the developing world: a case for increased investments in orphan crops. **Food Policy**, v. 29, n. 1, p. 15-44, 2004.

NISHIMURA, A.; ASHIKARI, M.; LIN, S.; TAKASHI, T.; ANGELES, E. R.; YAMAMOTO, T.; MATSUOKA, M. Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 33, p. 11940-11944, 2005.

O'KENNEDY, M. M.; GROOTBOOM, A.; SHEWRY, P. R. Harnessing sorghum and millet biotechnology for food and health. **Journal of Cereal Science**, v. 44, n. 3, p. 224-235, 2006.

OBERTHUR, E.; NICHOLSON R. L.; BUTLER, L. G. Presence of polyphenolic materials, including condensed tannins in sorghum callus. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 660-662, 1983.

PAN, J. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal *in vitro* culture: a review. **Plant Growth Regulators**, v. 26, n. 3, p. 155-163, 1998.

SATO, S.; CLEMENTE, T.; DWEIKAT, I. Identification of an elite sorghum genotype with high *in vitro* performance capacity. **In Vitro Cellular Development Biology**, v. 40, n. 1, p. 57-60, 2004.

SEETHARAMA, N.; SAIRAM, R. V.; RANI, T. S. Regeneration of sorghum shoot apex cultures and field performance of the progeny. **Plant Cell, Tissue and Organic Culture**, v. 61, n. 2, p. 169-173, 2000.

SHARMA, V.; KOTHARI, S. L.; CHANDRA, N. *In vitro* regeneration, field transfer of plantlets and growth to maturity of plants of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Current Science**, v. 58, n. 10, p. 586-588, 1989.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposium of Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.

TADESSE, Y.; SÁGI, L.; SWENNEN, R.; JACOBS, M. Optimisation of transformation conditions and production of transgenic sorghum (*Sorghum bicolor*) via microparticle bombardment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2003.

TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, n. 19, p. 1275-1283, 1979.

TOMES, D. T.; SMITH, O. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 70, n. 5, p. 505-509, 1985.

VAN NGUYEN, T.; THU, T. T.; CLAEYS, M.; ANGENON, G. *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved in vitro regeneration system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, n. 2, p. 155-164, 2007.

WU, C. Y.; CHEN, Y. Study of differences between genotypes in anther culture of Japonica rice. **Acta Genetica Sinica**, v. 14, p. 168-174, 1987.

ZHU, H.; MUHUKRISHNAN, S.; KRISHNAVENI, S.; WILDE, G.; JEOUNG, J. M.; LIANG, G. H. Biolistic transformation of sorghum using a rice chitinase gene. **Journal of Genetics & Breeding**, v. 52, p. 243-252, 1998.

Embrapa

Milho e Sorgo



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL