



Isabel R. P. de Souza¹, José A. S. Rodrigues¹e Robert E. Schaffter¹

¹Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, Sete Lagoas, MG, 35701-970. E-mail:
avelino@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: lignina, *brown midrib*, anatomia.

Introdução

Estratégias genética e química têm sido utilizadas para melhorar a digestibilidade de fibras de forragem (Campbell e Sederoff, 1996). Dentre estas, mutantes naturais forrageiros *Brown midrib* (*bmr*) têm apresentado considerável interesse agrônomo, nos últimos 30 anos, uma vez que reduz o conteúdo de lignina e conseqüentemente melhora a digestibilidade (Cherney et al., 1991). Estes mutantes, em sorgo, são fenotipicamente caracterizados pela presença de uma pigmentação amarronzada na nervura central das folhas e esclerênquima do colmo. Embora a relação entre lignina e digestibilidade de forragem seja conhecida há muito tempo, isto não está totalmente entendido. É provável que ambos, conteúdo total de lignina e composição do monômero de lignina tenham importância. Lignina é um polímero aromático, o qual em gramínea é composto por monolignóis *para*-coumaril, coniferil e sinapil álcoois. O conteúdo dos ácidos hidroxicinâmicos, especialmente *p*-coumárico e ferúlico, tem sido inversamente correlacionado com a digestibilidade da parede celular, e apresenta-se alterado em alguns mutantes *bmr* (Kuc e Nelson, 1964; Kuc et al, 1968). Este trabalho teve como objetivo verificar a utilização do corante floroglucinol-HCl, o qual tem sido utilizado tradicionalmente para detectar cinamil aldeídos e lignina (Wardrop, 1971), na discriminação de genótipos de sorgo forrageiro utilizados para corte e pastejo, com fenótipos normais e *bmr6*.

Material e Métodos

Híbridos

O gene *Brown midrib* (*bmr 6*) foi introduzido nas linhagens-elites parentais de sorgo (BR007A, TX2784R, TX2785R, TX635A) utilizando-se técnicas de cruzamentos padrões de retrocruzamento e conduzidas pelo método genealógico tradicional, dentro das atividades do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. Estas linhagens foram utilizadas para produzir híbridos simples isogênicos para o gene *Bmr6* empregando-se técnicas de cruzamentos padrões.

Coleta de tecido vegetal

Foram utilizados três híbridos isogênicos, versões normal e *bmr6*: BR007A x TX2785R, TX635A x TX2785R e BR007A x TX2784R. Para as análises de coloração, foi coletada de diversas plantas, a terceira folha abaixo da folha bandeira e o terço médio inferior do colmo, aos 40 dias após plantio.

Coloração com Floroglucinol-HCL

As espécimes foram obtidas através de cortes manuais realizados com bisturi na parte mediana da terceira folha e do colmo. Solução aquosa saturada de floroglucinol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi misturada, imediatamente antes da coloração, com solução de HCl 20% na proporção de 1:1. As espécimes foram colocadas sobre lâmina de microscópio e coradas com a solução de floroglucinol-HCl pelo período necessário para distinção dos híbridos isogênicos normal e *bmr6*.

Microscopia ótica

Foto-documentação das espécimes foi obtida por meio de microscópio estereoscópio Stemi SV6 Zeiss com máquina fotográfica acoplada.

Resultados e Discussão

Seções transversais do colmo de plantas de sorgo normal e *bmr6* foram inicialmente comparadas sem coloração e pode-se verificar no fenótipo do mutante a presença da coloração amarronzada (**Figura 1**). Estas seções foram então coradas com solução de floroglucinol-HCL, reagente usado para detectar cinamil aldeídos e lignina (Wardrop, 1971). Enquanto a anatomia dos tecidos mostra claramente que não houve alteração em *bmr*, podem ser vistas diferenças no padrão de coloração. No colmo da versão normal dos híbridos, pouca coloração com floroglucinol-HCl foi evidente (**Figuras 2 e 3**), entretanto nos colmos contendo o gene *bmr6*, forte coloração ocorreu nos vasos do xilema, na bainha vascular e no parênquima subepidermal. Coloração também foi verificada nos mesmos tecidos da nervura central em *bmr6* (**Figuras 4, 5 e 6**), entretanto, as células do parênquima e do parênquima subepidermal apresentavam coloração mais intensa do que as do colmo. Tanto para a nervura foliar, quanto para o colmo, a solução floroglucinol-HCL permitiu distinguir através da coloração as versões normal e *bmr6* a partir de 2 min, sendo que com 6 min a coloração era bem mais intensa. Pillonell et al. (1991) e Halpin et al. (1998) verificaram também em sorgo *bmr6* e em milho *bmr1*, respectivamente, um aumento semelhante na coloração por floroglucinol. Este aumento tem sido verificado em mutantes *bmr* que apresentam redução na atividade da cinamil álcool desidrogenase (CAD), a qual afeta a composição do polímero de lignina, com subsequente aumento na coloração devido provavelmente a uma incorporação de cinamil aldeídos, substratos para CAD (Clifford, 1974). Embora o floroglucinol reaja de certa forma com vários fenólicos, esta coloração intensa com os aldeídos, tem sido proposta como específica (Provan et al., 1997). Conclui-se, deste trabalho, que os híbridos simples isogênicos de sorgo, versões normal e *bmr6* apresentaram coloração diferencial com a solução de floroglucinol-HCL, no colmo e na nervura central.

Agradecimentos

Ao laboratorista Célio Ramos das Neves pela valiosa contribuição na obtenção dos cortes de colmo e nervura.

Literatura Citada

Campbell, M.M. & Sederoff, R.R. Variation in lignin content and composition: mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol* 110: 3-13, 1996

Cherney, J.H.; Cherney, D.J.R.; Akin, D.E & Axtell, J.D. Potential of brown-midrib low-lignin mutants for improving forage quality. *Adv. Agron.* 46:157-198, 1991.

Clifford, M.N. Specificity of acidic phloroglucinol reagents. *J. Chromatogr.*, 94: 321-324, 1974.

Halpin, C.; Knight, M.E.; Foxon, G.A.; Campbell, M. M.; Boudet, A. M.; Boon, J. J.; Chabbert, B.; Tollier, M. T. & Schuch, W. Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant J.*, 6: 339-350., 1994.

Kuc, J. & Nelson, O. E. The abnormal lignins produced by the brown-midrib mutants of maize. I. The brown-midrib-1 mutant. *Arch. Biochem. Biophys.*, 105: 103-113, 1964.

Kuc, J., N; Nelson, O. E. & Flanagan, P. Degradation of abnormal lignins in the brown midrib mutants and double mutants of maize. *Phytochemistry*, 7: 1435-1436, 1968

Pillonel, C.; Mulder, M. M.; Boon, J.J.; Foster, B. & Binder, A. Involvement of cinnamyl-alcohol dehydrogenase in the control of lignin formation in *Sorghum bicolor* L. Moench. *Planta*, 185, 538-544, 1991.

Provan, G.J.; Scobbie, L. & Chesson, A. Characterisation of lignin from CAD and OMT deficient mutants of maize. *J. Sci. Food Agric.*, 73: 133-142, 1997.

Van Soest, P. J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. End ed. Cornell University Press, Ithaca, NY, 1994.

Wardrop, A. B. Occurrence and formation in plants. In *Lignins: Occurrence, Formation Structure and Reactions* (Sarkanen, K. V. & Ludwig, C. H., eds) New York: Wiley-Interscience, pp. 19-41, 1971.



FIGURA 1. Cortes transversais do colmo de HS isogênicos, BR007AzTX2784, versão normal à esquerda e versão *bmr6* à direita apresentando coloração amarronzada no sistema vascular. Fotos tiradas utilizando-se microscópio estereoscópio Stemi SV6 Zeiss, magnificação de 40 X.

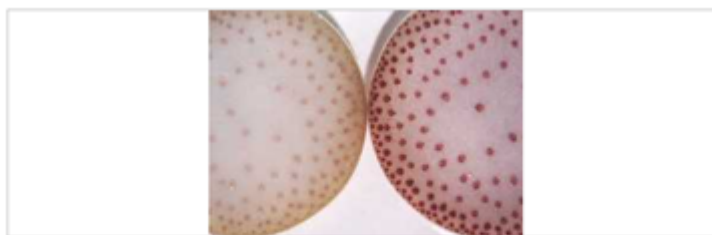


FIGURA 2. Cortes transversais do colmo de HS isogênicos, BR007AxTX2784, versões normal à esquerda e *bmr6* à direita, corados com floroglucinol-HCl por 3 min. Fotos tiradas utilizando-se microscópio esterioscópico Stemi SV6 Zeiss, magnificação de 6 X.



FIGURA 3. Cortes transversais do colmo de HS isogênicos, BR007AxTX2785, versões normal à esquerda e *bmr6* à direita, corados com floroglucinol-HCl por 3 min. Fotos tiradas utilizando-se microscópio esterioscópico Stemi SV6 Zeiss, magnificação de 25 X. BV= bainha vascular, P= parênquima, PS=parênquima subepidermal com esclerênquima, X= xilema.



FIGURA 4. Cortes transversais da nervura central de folhas de HS isogênicos BR007AxTX2785, versões normal à esquerda e *bmr6* à direita, corados com floroglucinol-HCl por 6 min. Fotos tiradas utilizando-se microscópio esterioscópico Stemi SV6 Zeiss, magnificação de 20 X.

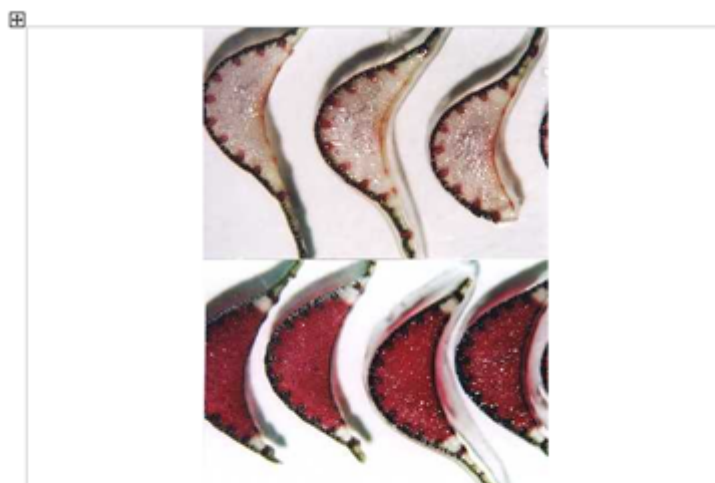


FIGURA 5. Cortes transversais da nervura central de folhas de HS isogênicos, TX635AxTX2785, versões normal e *bmr6*, acima e abaixo respectivamente, corados com floroglucinol-HCl por 6 min. Fotos tiradas utilizando-se microscópio esterioscópico Stemi SV6 Zeiss, magnificação de 12 X.



FIGURA 6. Cortes transversais da nervura central de folhas de HS isogênicos, BR007AxTX2784, versões normal e *dwarf*, acima e abaixo respectivamente, corados com floroglucinol-HCl por 6 min. Fotos tiradas utilizando-se microscópio estereoscópico Stemi SV6 Zeiss, magnificação de 40X.



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C