

REGENERAÇÃO IN VITRO DE CULTIVARES DE *Sorghum bicolor* VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Wanessa Valadares^(1,3); Fabiane Lacerda^(1,3); Maria José Vilaça de Vasconcelos⁽²⁾; Meire de Cássia Alves⁽²⁾; Andréa Almeida Carneiro⁽²⁾

⁽¹⁾ Graduanda em Agronomia / Universidade Federal de São João Del Rey

⁽²⁾ Embrapa Milho e sorgo

⁽³⁾ Colaboração semelhante no desenvolvimento do projeto

Introdução

Sorgo é o quinto cereal mais cultivado do mundo (SATO et al., 2004). A produtividade do sorgo no Brasil é variável, em média 2.500 kg/ha. Programas de melhoramento têm trabalhado intensamente para aumentar a produtividade de diferentes linhagens. Alternativamente, a tecnologia do DNA recombinante e a geração de plantas transgênicas também têm sido utilizadas na melhoria genética do sorgo. Entretanto, o sorgo é extremamente recalcitrante quando cultivado in vitro (KISHORE et al., 2006) e o sucesso da aplicação das modernas técnicas de transformação genética de plantas requer a utilização de genótipos com alta capacidade de regeneração (OLDACH et al., 2001; KISHORE et al., 2006). Os protocolos de transformação genética de planta são desenvolvidos para genótipos adaptados à propagação in vitro, tanto por organogênese quanto por embriogênese. Para a obtenção de um protocolo eficiente de transformação genética de sorgo é necessário que a sua regeneração em cultura de tecidos seja otimizada.

Culturas de calos embriogênicos são classificadas em Tipos I e/ou II e são normalmente formadas quando o material vegetal é cultivado em meios suplementados com auxinas, tais como 2,4-D (PETRILLO et al., 2008). Os calos do Tipo I são estruturas compactas, amarelas ou brancas e, normalmente, capazes de regenerar planta. Os calos do Tipo II são macios, friáveis e altamente embriogênicos (ARMSTRONG; GREEN, 1985). Embora ambos os calos sejam capazes de regenerar plantas, as culturas formadoras de calos do Tipo II crescem mais rapidamente, podem ser mantidas por um longo período de tempo e formam um grande número de embriões somáticos

(VASIL, 1987). Estas características favorecem a seleção e regeneração de plantas transgênicas (QUE et al., 2014).

A formação de calos embriogênicos do Tipo II é observada em um número limitado de genótipos de sorgo (ELKONIN et al., 1995; KAEPLER; PEDERSON, 1997). Desse modo, existe a necessidade de identificação de linhagens elite com alta capacidade regenerativa em cultura de tecidos e o desenvolvimento de protocolos de regeneração. Portanto, esta pesquisa teve como objetivo a identificação de genótipos de sorgo capazes de regenerar eficientemente pelo processo de embriogênese somática, visando posteriormente sua utilização na geração de plantas transgênicas. Foram avaliados 3 genótipos de sorgo quanto a sua capacidade de formar calos embriogênicos do Tipo II em presença de 2,4-D.

Materiais e Métodos

Material Vegetal: Três linhagens de sorgo do banco germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo BRS 508, BRS 509, BRS 511 foram testadas quanto a sua eficiência de formação de calos embriogênicos e regeneração em cultura de tecidos. Neste estudo foram utilizadas inflorescências jovens com 3,0 a 5,0 cm de comprimento. Sementes de estas cultivares foram plantadas em canteiros na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG e aproximadamente 120 dias após o plantio as inflorescências foram coletadas.

Esterilização do material vegetal: Aproximadamente 15 cm de colmos contendo as inflorescências imaturas foram coletados e desinfestados em etanol 70% e água estéril. Em seguida, em câmara de fluxo laminar as folhas foram retiradas com o auxílio de um bisturi, deixando-se somente a panícula. As panículas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 5 mm.

Meio de cultivo: Os meios de cultivo utilizados para a regeneração in vitro de sorgo nas várias etapas do processo foram aqueles desenvolvidos por Brandão et al. (2005) e estão descritos na Tabela 1. A solução contendo sais, sacarose e 2,4-D foi autoclavada e os demais constituintes esterilizados por filtração adicionados à solução já autoclavada.

Indução de calos embriogênicos: Fragmentos das panículas foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura CIMRS (Meio de indução de calos) selados com filme PVC e cultivados em câmara de crescimento, no escuro, a 26-28 °C por 30 dias, com um subcultivo após 15 dias.

Regeneração e germinação: Oito gramas de calos embriogênicos foram transferidos para 3 placas contendo meio de maturação RM por 2-3 semanas, no escuro a 26-28 °C. Os calos maduros foram transferidos para novas placas contendo meio de germinação (meio H). Para germinação as placas foram incubadas em ambiente iluminado a 26-28 °C e um fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro).

Aclimatização: Plantas com aproximadamente 5 cm e duas a três folhas foram transferidas para vasos contendo solo, vermiculita e areia na proporção de 1:1:1. O número de plantas regeneradas a partir de 8 g de calos embriogênicos foi registrado para cada cultivares estudados. Na primeira semana em casa de vegetação as plântulas permaneceram protegidas sob uma cobertura plástica transparente para aclimatização.

Tabela 1. Composição dos Meios de Cultura usados para a Regeneração de Sorgo Sacarino

	Constituinte	Meio CIMRS	Meio RM	Meio H
Sais	MS Sais	4,3 g	4,3 g	4,3 g
Regulador de Crescimento	2-4 D 1 mg/L	2,5 mL	0	0
	ANA 1mg/L	0	200 µL	0
	Myo-Inositol	100 mg	100 mg	0
Vitaminas	Prolina	0,7 g	0	0
	Solução TG	1,0 mL	0	0
	Vitaminas MS	0	1,0 mL	1,0 mL

Suplementos	L- Asparagina	100 mg	0	0
	Cinetina	200 µL	0	0
	MES	0,5 g	0	0
	PVPP	10 g	0	0
	Sacarose	30 g	60 g	30 g
	Tioxin	2,0 mL	0	0
	Phytigel	3,0 g	4,0 g	3,0 g

Resultados e discussão:

A composição do meio de cultura é um fator importante na morfogênese in vitro (ELKONIN; PAKHOMOVA, 2000; SATO et al., 2004). A regeneração de vários genótipos de sorgo, por meio de embriogênese somática indireta, tem sido descrita a partir de diferentes meios de cultura. Alguns estudos têm comparado o efeito dos sais basais, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e N6 (CHU et al., 1975), na indução de calos embriogênicos em diferentes cultivares de sorgo e têm constatado forte influência do genótipo na produção de calos e habilidade de regeneração in vitro (LUSARDI; LUPOTTO, 1990; ELKONIN et al., 1995; KAEPLER; PEDERSEN, 1996; SATO et al., 2004). Esses trabalhos observaram que, em alguns genótipos, a formação de calos embriogênicos de boa qualidade e regeneráveis ocorre em meio com N6 sais, e outras em meio com MS sais. A principal diferença entre estas formulações de sais é que os sais MS contêm uma concentração total mais alta de nitrogênio inorgânico, mas uma mais baixa relação de nitrato de amônio do que N6 sais (ARMSTRONG et al., 1991; ELKONIN; PAKHOMOVA, 2000).

Neste projeto foi testado o meio MS suplementado com 2,4-D para a indução de calos embriogênicos a partir de inflorescência imatura com 3 a 5 cm de comprimento. De acordo com Cai e Butler (1990), inflorescências de sorgo entre 2 e 5 mm de comprimento são ótimas para a formação de calos e a regeneração de plantas in vitro. Segundo Gupta et al. (2006), a utilização de

inflorescências imaturas de sorgo pode superar a limitação genotípica de maneira mais prática do que a utilização de embriões imaturos.

Nossos resultados revelaram que em meio CIMRS suplementado com 2,4-D e antioxidantes (ácido ascórbico e PVPP), todas as linhagens foram capazes de formar calos embriogênicos com eficiência variável (Tabela 2). A linhagem BRS509 foi a que produziu o maior número de calos embriogênicos e um menor escurecimento do meio de cultivo. O escurecimento observado é em razão provavelmente do acúmulo de compostos fenólicos no meio de cultivo (OBERTHUR et al., 1983) (Figura 1).

Tabela 2. Número de calos desenvolvidos a partir de fragmento de inflorescências

Cultivar	BRS 508	BRS 509	BRS 511
N° Total de Explantes	72 calos	60 calos	123 calos
N° de Calos Desenvolvidos ¹	59 calos	56 calos	86 calos
% em cima do n° total de calos	81,9%	93,3%	69,9%

¹ contagem realizada antes dos calos serem transferidos para o meio de cultura RM (maturação)

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 predadores 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 fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura, ocasionando, não raramente, até a morte deles (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

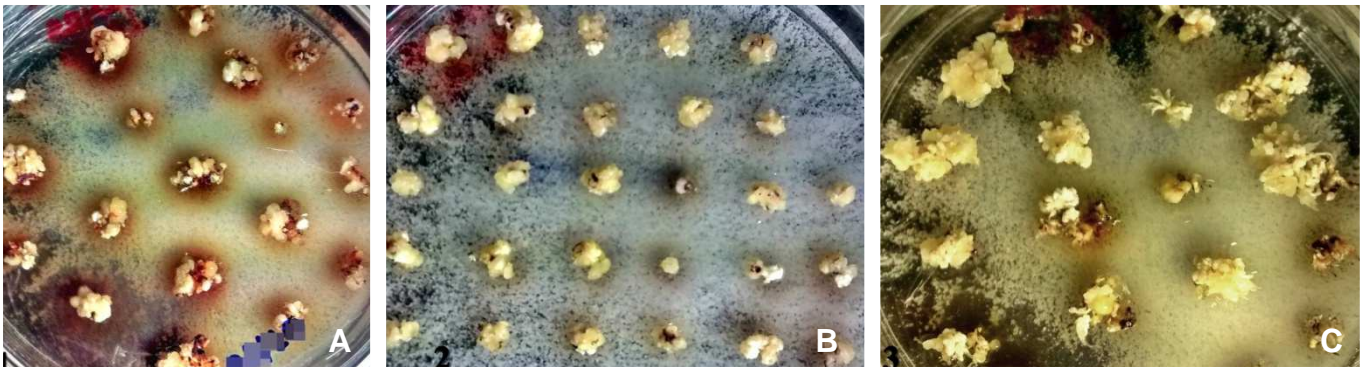


Figura 1. Calos embriogênicos de sorgo. (A) BRS 508; (B) BRS509; (C) BRS511.

Os calos embriogênicos desenvolvidos foram transferidos para o meio de Maturação (RM) contendo ANA e sem 2,4-D, neste meio não houve adição de PVPP. Calos embriogênicos que tinham um fenótipo transparente e aquoso tornaram-se brancos opacos entre 3 e 4 semanas de incubação (Figura 2).

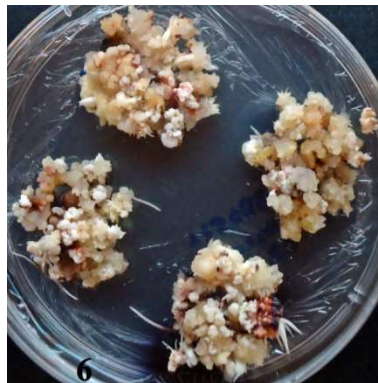


Figura 2. Calos embriogênicos de sorgo maduros. Observe as estruturas esbranquiçadas e o início de desenvolvimento de raízes.

Calos maduros foram transferidos para o meio de germinação e plântulas germinadas foram observadas a partir da segunda semana. Plantas foram obtidas a partir de todas as linhagens, sendo que a linhagem BRS509 foi a mais eficiente (Tabela 3 e Figura 3).

Tabela 3. Número de plântulas que regeneraram a partir de 8 gramas de calos maturados

Cultivar	BRS 508	BRS 509	BRS 511
Quantidade em gramas de Calos Maturados	8,0 g	8,0 g	8,0 g
Nível de Oxidação	++	+	++
Nº de Plântulas que Regeneraram	28 plântulas	32 plântulas	16 plântulas

* + baixo escurecimento do meio; ++ médio; +++ alto

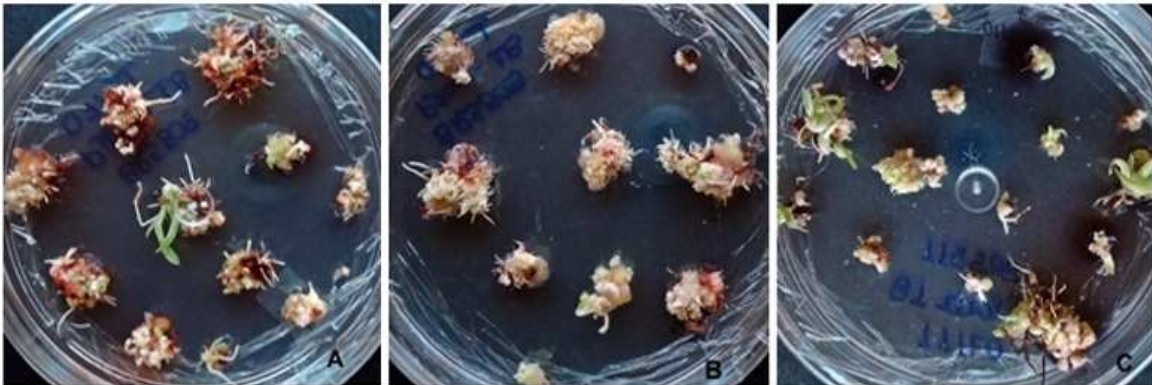


Figura 3. Calos de sorgo germinando. (A) BRS 508; (B) BRS 509; (C) BRS 511.

Neste projeto a regeneração in vitro através da embriogênese somática de três linhagens de sorgo BRS508, BRS509 e BRS511 foi avaliada. Todas as linhagens foram capazes de formar calos embriogênicos e produzir plantas. A linhagem BRS509 foi a que mais se destacou podendo ser utilizada futuramente para o desenvolvimento de protocolos para transformação genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.

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 unavailability of germplasm with high Type II culture formation response. **Maize Genetics Coop Newsletter**, v. 65, p. 92-93, 1991.

BRANDÃO, R. L.; CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; SCHAFFERT, R. E.; PAIVA, L.; COELHO, G. T. da C. P. **Transformação genética do sorgo utilizando o bombardeamento de partículas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. 37 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 43).

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**, Dordrecht, v. 20, 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.

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**, Bergamo, v. 40, 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**, Dordrecht, v. 61, p. 115-123, 2000.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: practice. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. pt. 2, 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: Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

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**, Dordrecht, v. 86, p. 379-388, 2006.

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**, Dordrecht, v. 48, p. 71-75, 1997.

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

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 Cell Reports**, Berlin, v. 25, 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**, New York, v. 41, p. 147-170, 1987.

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

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

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

OLDACH, K. H.; MORGENSTERN, A.; ROTHER, S.; GIRGI, M.; O'KENNEDY, M. M.; LO'R, Z. H. Efficient in vitro plant regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] and *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, p. 416-421, 2001.

PETRILLO, C. P.; CARNEIRO, N. P.; PURCINO, A. A. C.; CARVALHO, C. H. S.; ALVES, J. D.; CARNEIRO, A. A. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of brazilian maize inbred lines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 3, p. 371-378, 2008.

QUE, Q.; ELUMALAI, S.; LI, X.; ZHONG, H.; NALAPALLI, S.; SCHWEINER, M.; FEI, X.; NUCCIO, M.; KELLIHER, T.; GU, W.; CHEN, Z.; CHILTON, M. D. M. Maize transformation technology development for commercial event generation. **Frontiers of Plant Science**, New Haven, v. 5, p. 1-19, 2014.

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

VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems of improvement of cereal and grass crops. **Journal of Plant. Physiology**, Stuttgart, v. 128, p. 193-218, 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 and Breeding**, Rome, v. 52, p. 243-252, 1998.