

## Regeneração *in vitro* de cultivares de *Sorghum bicolor* via embriogênese somática

**Fabiane Lacerda Moraes** <sup>(1)</sup>; **Maria José Vilaça Vasconcelos** <sup>(2)</sup>; **Meire de Cássia Alves** <sup>(3)</sup>; **Andréa Almeida Carneiro** <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Estudante de Engenharia Agrônômica; Universidade Federal de São João Del-rei *campus* Sete Lagoas; Sete Lagoas; Minas Gerais; lacerda\_fabiane@hotmail.com

<sup>(2)</sup> Pesquisadora na Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas; Minas Gerais

<sup>(3)</sup> Analista na Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas; Minas Gerais

**RESUMO:** Com o objetivo de testar a eficiência de formação de calos embriogênicos e regeneração em cultura de tecido foi conduzido um experimento em laboratório onde quatro linhagens de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* L. Moench) BRS 508, BRS 509, BRS 511 foram utilizadas. Inflorescências jovens entre 3,0 a 5,0 cm comprimento foram fragmentadas e plaqueadas em meio de cultura CIMRS suplementado com 2,4-D para indução de calos. Após 30 dias os calos formados foram transferidos para meio de maturação RN, e em seguida para meio de germinação H. Plântulas foram aclimatadas em casa de vegetação em solos 1:1:1. O meio de indução de calos (CIMRS) foi suplementado com antioxidantes (PVPP e ácido ascórbico) para diminuir o efeito tóxico de compostos fenólicos produzidos pelo sorgo quando cultivados em cultura de tecido. Os resultados mostraram que todas as linhagens foram capazes de formar calos embriogênicos embora com eficiência variável. A linhagem BRS509 produziu um maior número de calos embriogênicos e um menor escurecimento do meio de cultivo.

**Termos de indexação:** Sorgo, reguladores de crescimento, antioxidantes.

### INTRODUÇÃO

*Sorghum bicolor* (L.), o quinto cereal mais cultivado do mundo (Sato et al., 2004), é extremamente recalcitrante quando cultivado *in vitro* (Kishore et al., 2006). 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). Para a obtenção de um protocolo eficiente de transformação genética de sorgo é necessário que vários parâmetros, entre eles a regeneração em cultura de tecidos seja otimizada. 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 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 & Luppoto, 1990; Elkonin et al., 1995; Kaepler & Pedersen, 1996; Sato et al., 2004).

Os protocolos de transformação genética de planta são desenvolvidos para genótipos adaptados à propagação *in vitro*, tanto por organogênese quanto por embriogênese e essas plantas muitas vezes apresentam baixa qualidade agrônômica.

Desse modo, fica evidente não apenas a necessidade de identificação de linhagens elite com alta capacidade regenerativa em cultura de tecidos, mas também o desenvolvimento de protocolos de regeneração funcionais para um maior número de plantas de uma mesma espécie. Esta pesquisa teve como objetivo a identificação de genótipos de sorgo sacarino capazes de regenerar eficientemente pelo processo de embriogênese somática, visando sua utilização na geração de plantas transgênicas.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas inflorescências jovens com 3,0 a 5,0 cm de comprimento. Sementes das linhagens BRS 508, BRS 509, BRS 511 pertencentes ao banco germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo foram plantadas em casa de vegetação na 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 destilada 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 5mm.

### 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) (Tabela 1) suplementado com antioxidantes (ácido ascórbico e PVPP). A solução contendo sais, sacarose e 2,4-D foi autoclavada, os demais constituintes foram esterilizados por filtração e adicionados à solução já autoclavada.

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

Composição	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	2,5 mL	0	0
Vitaminas	ANA 1mg/L	0	200 µL	0
	Myo-Inositol	100 mg	100 mg	0
	Prolina	0,7 g	0	0
	Solução TG	1,0 mL	0	0
Suplementos	Vitaminas MS	0	1,0 mL	1,0 mL
	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 (comercial)	60 g (comercial)	30 g (comercial)
	Tioxin	2,0 mL	0	0
	Phytigel	3,0 g	4,0 g	3,0 g

### Indução de calos embriogênicos

Fragmentos das panículas foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura CIMRS, 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 de 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 cultivar estudada. Na primeira semana em casa-de-vegetação as plântulas permaneceram protegidas sob uma cobertura plástica transparente para aclimatização.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

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. 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 testadas foram capazes de formar calos embriogênicos embora com eficiência variável (Tabela 2). A linhagem BRS 509 foi a que produziu um maior número de calos embriogênicos e um menor escurecimento do meio de cultivo. O escurecimento observado é devido provavelmente ao acúmulo de compostos fenólicos no meio de cultivo.

Tabela 2. Numero de Calos e Plântulas desenvolvidas a partir de fragmentos de inflorescências

Cultivar	BRS 508	BRS 509	BRS 511
Nº Total de Explantes	72 calos	60 calos	123 calos
Nº de Calos Desenvolvidos <sup>1</sup>	59 calos	56 calos	86 calos
Nº de Plântulas que Regeneraram	28 plântulas	32 plântulas	16 plântulas
% em cima do nº total de calos (-)	81,90%	93,30%	69,90%

<sup>1</sup> contagem realizada antes dos calos serem passados para o meio de cultura RM

Segundo Oberthur et al. (1983), o escurecimento observado nos calos e no meio de cultura de sorgo é devido aos 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 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).

#### CONCLUSÕES

Todas as linhagens foram capazes de formar calos embriogênicos e produzir plantas.

A linhagem BRS509 se destacou podendo ser utilizada futuramente para o desenvolvimento de protocolos para transformação genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.

#### AGRADECIMENTOS

A Embrapa e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

#### REFERÊNCIAS

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

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, 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**, 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**, v.41, p.83-89, 1996

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**, 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 Agricultural Food Chemistry**, 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**, 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. (2008) Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of brazilian maize inbred lines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43(3):371-378.

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 Plant Sci**. 5:1-19. 2014.

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, p.57-60, 2004.

VASIL, I. K. (1987) Developing cell and tissue culture systems of improvement of cereal and grass crops. **J. Plant. Physiol.** 128:193-218.

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, Rome**, v.52, p.243-2

