

Regeneração em Cultura de Tecido de Cultivares de *Sorghum bicolor* através de Organogênese

Introdução

Em função do crescimento populacional, principalmente em países em desenvolvimento, vem aumentando continuamente o consumo de produtos agrícolas. Para enfrentar tal situação, o incremento da produtividade, pela incorporação de novas tecnologias ao processo de produção, é estratégia-chave. Dos meios modernos disponíveis e utilizáveis 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. No entanto, o que se percebe, atualmente, é que a aplicação dos métodos tradicionais da genética tem levado o rendimento das culturas a patamares cada vez mais estacionários, a custos cada vez mais elevados. Entretanto, a revolução biotecnológica ocorrida na última década possibilitou o desenvolvimento de tecnologias que permitem acesso a novas e variadas fontes de variabilidade genética. Em especial, o aprimoramento das tecnologias de DNA recombinante e a otimização dos processos de transformação genética de vegetais têm gerado um crescente interesse na aplicação desses conhecimentos para a geração de nova variabilidade genética, utilizável em programas de melhoramento de plantas.

O sorgo, o sexto cereal mais cultivado do mundo (Emani *et al.*, 2002), é uma cultura economicamente importante e constitui a base da alimentação para mais de 300 milhões de pessoas, em regiões semi-áridas da África e da Ásia (Casas *et al.*, 1993; Tadesse *et al.*, 2003). No Brasil, é plantado em 718.431 ha, com uma produção total de 1.569.337 t, na safra 2002/2003 (IBGE, 2003). Verifica-se, porém, que a sua produtividade é baixa (1.500 a 2.500 kg/ha) e extremamente variável. Sendo uma cultura economicamente importante, o desenvolvimento de cultivares superiores mais produtivas, através da introdução de genes de resistência a vários estresses bióticos e abióticos, é altamente desejável. Entretanto, esse cereal, tem-se mostrado extremamente recalcitrante quando cultivado *in vitro* e o sucesso da aplicação das modernas técnicas de transformação genética de plantas requer a utilização de genótipos com alta capacidade de regeneração em cultura de tecidos.

Organogênese e Embriogênese

A regeneração ou morfogênese *in vitro* é o processo de formação de órgãos a partir de outros pré-existentes, podendo ocorrer através da embriogênese somática ou organogênese. Na embriogênese somática, ocorre a formação de embriões somáticos, com fases similares às de formação do embrião zigótico, embora, obviamente, sem fecundação (Segura, 1993). A embriogênese somática é um tipo de morfogênese em que, a partir de tecidos provenientes diretamente do explante (embriogênese direta) ou de calos (embriogênese indireta), formam-se embriões zigóticos. A embriogênese

Sete Lagoas, MG
Outubro, 2005

Autores

Rosângela Luci Brandão

Bolsista McKnight Foundation.
rosangela-brandao@bol.com.br

**Mariana Cintinale Abreu
Gonçalves**

Bolsista McKnight Foundation.
marianaabreu7@hotmail.com

Caroline Pereira Petrillo

Bolsista McKnight Foundation.
carolpetrillo@terra.com.br

**Gracielle Teodora da Costa
Pinto Coelho**

Mestranda UFLA e McKnight
Foundation. gracielle@ufla.br

Robert Eugene Scharffert

Eng.-Agr. Ph. D. Pesquisador
da Embrapa Milho e Sorgo.
scharffer@cnpms.embrapa.br

Newton Portilho Carneiro

Biólogo. Ph. D. Pesquisador da
Embrapa Milho e Sorgo.
newtonc@cnpms.embrapa.br

Andréa Almeida Carneiro

Bióloga, Ph. D. Pesquisadora
da Embrapa Milho e Sorgo.
Autora para correspondência.
andreac@cnpms.embrapa.br

somática, na maioria dos cereais, utiliza como explantes, para a cultura de tecidos, embriões zigóticos imaturos, que precisam ser produzidos regularmente durante todo o ano, para suprir um programa de transformação genética, e, devido às condições climáticas, nem sempre é possível a obtenção de um grande número de embriões imaturos diariamente.

Na morfogênese, através do processo de organogênese, tecidos vegetais se diferenciam em meristemas caulinares e/ou radiculares, originando caules ou raízes, respectivamente. Quando a formação de órgão é decorrente diretamente de tecido do explante, ou de pequena proliferação do mesmo, denomina-se organogênese direta. Quando ocorre a partir de células do calo, denomina-se organogênese indireta (George, 1996). Um protocolo eficiente de organogênese de milho foi desenvolvido por O'Connor-Sanchez *et al.* (2002), utilizando sementes maduras. A utilização de sementes maduras como explantes, em um programa de transformação genética de sorgo, é altamente desejável, uma vez que essas sementes podem ser estocadas e utilizadas durante todo o ano, eliminando os problemas encontrados com a produção de embriões imaturos.

Cultivo *in vitro* de *Sorghum bicolor*

A formação de calos e a regeneração de plantas de sorgo *in vitro* dependem do genótipo, do meio de cultura e do explante utilizado (Guo *et al.*, 1993; George, 1996). O desenvolvimento do sorgo em cultura de tecidos tem-se mostrado bastante recalcitrante. O principal problema encontrado no cultivo *in vitro* de sorgo é a produção de compostos fenólicos (Zhu *et al.*, 1998; Kresovich *et al.*, 1987), que podem prejudicar o desenvolvimento da planta (George, 1996). Segundo Cai *et al.* (1987), linhagens de sorgo que têm altas quantidades de tanino estão mais favoráveis a produzir compostos fenólicos em cultura de tecido do que linhagens com baixas quantidades de tanino. Cai *et al.* (1994), com o objetivo de descrever um método para cultivar, *in vitro*, panículas de sorgo até a fase de obtenção de sementes, observaram que a frequência de sementes

produzidas variou de 30% a 97%, dependendo do meio de cultura e do genótipo. Eles relataram que as linhagens que apresentavam maior quantidade de tanino produziram menor número de sementes e isso ocorreu, provavelmente, devido à liberação de compostos fenólicos.

Para a obtenção de um protocolo eficiente de transformação genética de sorgo, é necessário que vários parâmetros, entre eles a regeneração do cultivar *in vitro*, sejam otimizados. Portanto, este trabalho teve como objetivos a identificação de genótipos de sorgo capazes de regenerar eficientemente, *in vitro*, pelo processo de organogênese, como também a avaliação da influência do período de permanência desses calos, em meio de multiplicação, na regeneração de plantas de sorgo, visando utilizar esses dados posteriormente na geração de plantas transgênicas.

Formação de Calos Organogênicos

Objetivando selecionar linhagens de sorgo que formem calos organogênicos apropriados para transformação genética e capazes de regenerar eficientemente *in vitro*, foram testadas 15 linhagens pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo (CMSXS 101B, CMSXS 102B, CMSXS 107B, CMSXS 112B, CMSXS 114R, CMSXS 116R, CMSXS 156B, CMSXS 157B, CMSXS 173R, CMSXS 178B, CMSXS 180R, CMSXS 210B, CMSXS 211B, CMSXS 230B e CMSXS 232B). Inicialmente, as sementes foram imersas em uma solução de etanol 50% durante 10 minutos e lavadas em água corrente por 30 minutos. Em seguida, as sementes foram desinfestadas superficialmente com uma solução de hipoclorito de sódio 50% e Tween 20 0,01%, durante 30 minutos, e lavadas com água destilada esterilizada por cinco minutos. O passo anterior foi repetido três vezes. Sementes de cada genótipo foram secadas em papel toalha autoclavado e cultivadas com o ápice embrionário voltado para cima, com o auxílio de uma pinça (Figura 1A a 1C), em placa de Petri contendo meio de cultura MPC + Cu (Tabela 1). Foram plaqueadas dez sementes por placa e, para cada genótipo, foram feitas quatro repetições. As placas

foram incubadas a 25°C, na presença de luz, durante duas semanas. Assim que as sementes germinaram, ocorreu a formação de calo ao nível do meristema apical (Figura 1D); esses calos foram separados do explante inicial e subcultivados por mais quatro semanas, em meio de multiplicação MPC + Cu.

Entre as linhagens testadas, CMXS 112B, CMSXS

Tabela 1. Composição do meio de cultura MPC (mg/L).

Composição	MPC + CU
NH ₄ NO ₃	1 650
KNO ₃	1 900
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.84
Na ₂ EDTA	37.24
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ . 7H ₂ O	0.25
KI	0.83
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.275
Sucrose	30 000
Casein hydrolysate	0.5
Glycine	2
Thiamine. HCl	0.1
Pyridoxine. HCl	0.5
Nicotinic acid	0.5
2,4-D	1
BAP	1
Myo-inositol	100

102B e, CMSXS 210B (Tabela 2) foram as que melhor desenvolveram calos organogênicos. As linhagens incapazes de formarem calos apropriados para transformação genética e, conseqüentemente, regenerarem plantas *in vitro*, foram prejudicadas, possivelmente, pela liberação de compostos fenólicos, uma vez que o meio de cultura ao redor e abaixo dos embriões plaqueados tornou-se escuro. É importante informar que todas as linhagens testadas neste trabalho apresentam tanino. Segundo George (1996), diferentes genótipos, além de diferirem na quantidade de substâncias fenólicas produzidas, podem diferir na toxicidade e na sensibilidade. O meio de cultura também foi fator importante, que contribuiu para o desenvolvimento de explantes de sorgo, no trabalho

Tabela 2. Produção de calos organogênicos por linhagens de *Sorghum bicolor* pertencentes à Embrapa Milho e Sorgo.

Linhagens de <i>Sorghum bicolor</i>	Presença de Calos Organogênicos
CMSXS 101B	+ +
CMSXS 102B	+ + +
CMSXS 107B	-
CMSXS 112B	+ + +
CMSXS 114R	+ +
CMSXS 116R	+ +
CMSXS 156B	+
CMSXS 157B	+
CMSXS 173R	+
CMSXS 178B	+
CMSXS 180R	+ +
CMSXS 210B	+ + +
CMSXS 211B	+
CMSXS 230B	+
CMSXS 232B	+

(-) ausência de calos organogênicos

(+) presença de calos organogênicos

desenvolvido por Cai *et al.* (1994). As linhagens testadas por esses autores apresentaram performances diferentes, dependendo da composição do meio de cultivo em que foram mantidas.

Regeneração de Plantas

Para avaliar a influência do período de permanência de calos organogênicos (Figura 2A) em meio de multiplicação na regeneração de plantas de sorgo, calos da linhagem CMSXS 112B foram mantidos por 27, 9 e 6 semanas em meio de multiplicação MPC + CU e, posteriormente, transferidos para Magentas (Sigma) contendo meio MS[MS sais e vitaminas (Murashige & Skoog, 1962), 60 g/L sacarose, 100 mg/L myo-inositol, 3 g/L phytigel, pH 5.8) e cultivados a 26°C em luz (16 horas,) durante 16 dias. Os calos mantidos em meio de multiplicação durante seis semanas apresentaram a melhor taxa de regeneração, sendo que em 80% deles houve a formação de raízes, em 35% as folhas se alongaram, em 30% folhas e raízes cresceram simultaneamente e em 10% não houve o desenvolvimento de nenhuma das duas estruturas (Figura 2B). Em 20% dos calos

cultivados durante nove semanas houve a formação de raízes, em 10% apenas as folhas se alongaram, em 5% houve o crescimento simultâneo de folhas e raízes e em 60% não houve o desenvolvimento de nenhuma das duas estruturas (Figura 2C). Já após 27 semanas de cultivo, 85% dos calos organogênicos não desenvolveram nenhuma das duas estruturas (Figura 2D).

Esses resultados confirmam que a formação de calos e a regeneração de plantas dependem do genótipo e da constituição do meio de cultivo utilizado. Também revelam que existe uma influência do tempo de permanência dos calos organogênicos em meio de multiplicação sob o processo de regeneração de plantas de sorgo. Quanto menor o tempo gasto no processo de multiplicação dos calos, maior a eficiência de regeneração de plantas.

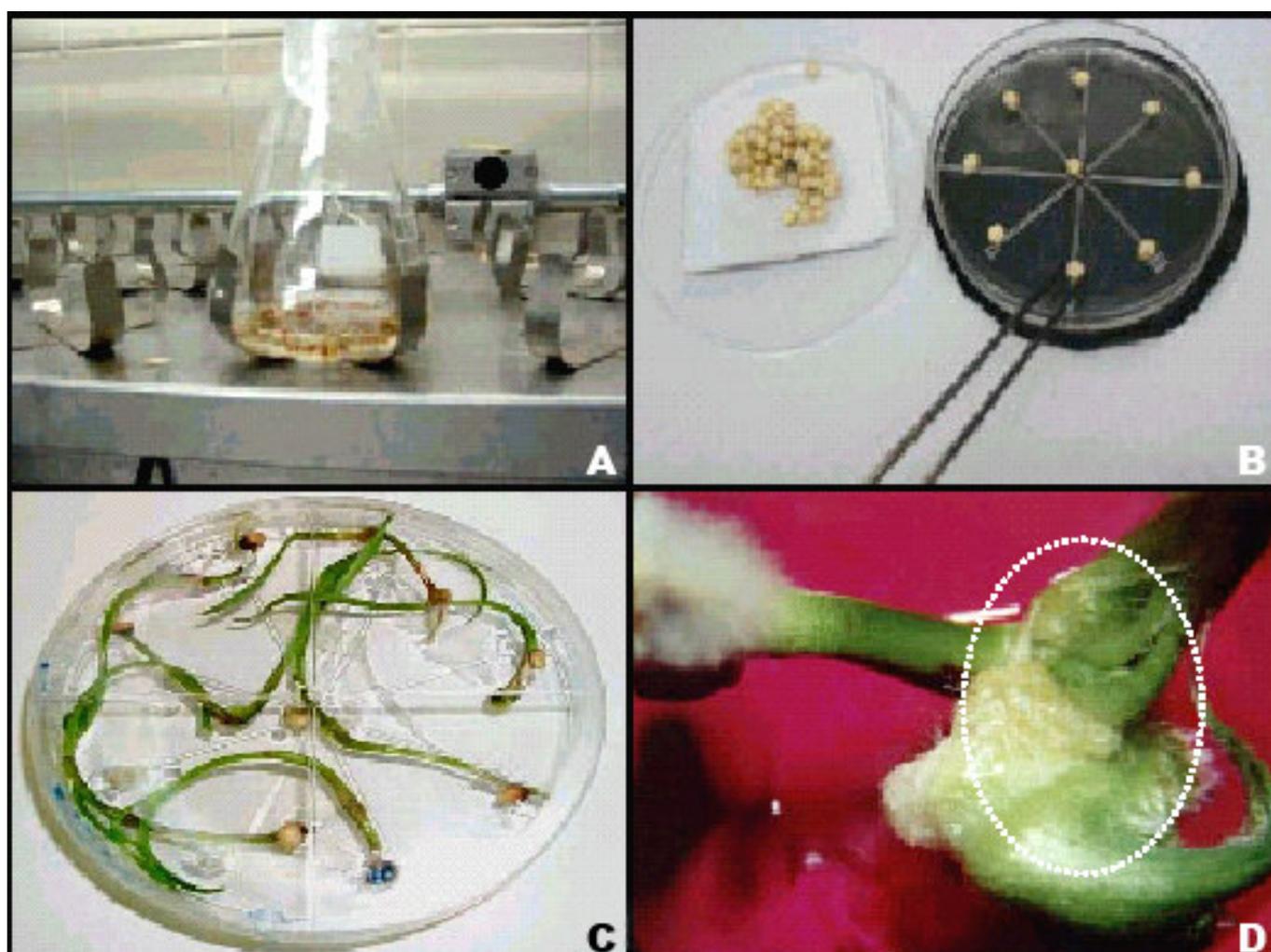


Figura 1: Indução de calos organogênicos de sorgo a partir de sementes germinadas. (A) Desinfestação das sementes em solução detergente. (B) Plaqueamento das sementes em meio MPC + CU. (C) Sementes germinadas duas semanas após plaqueamento. (D) Calo formado na altura do meristema apical.

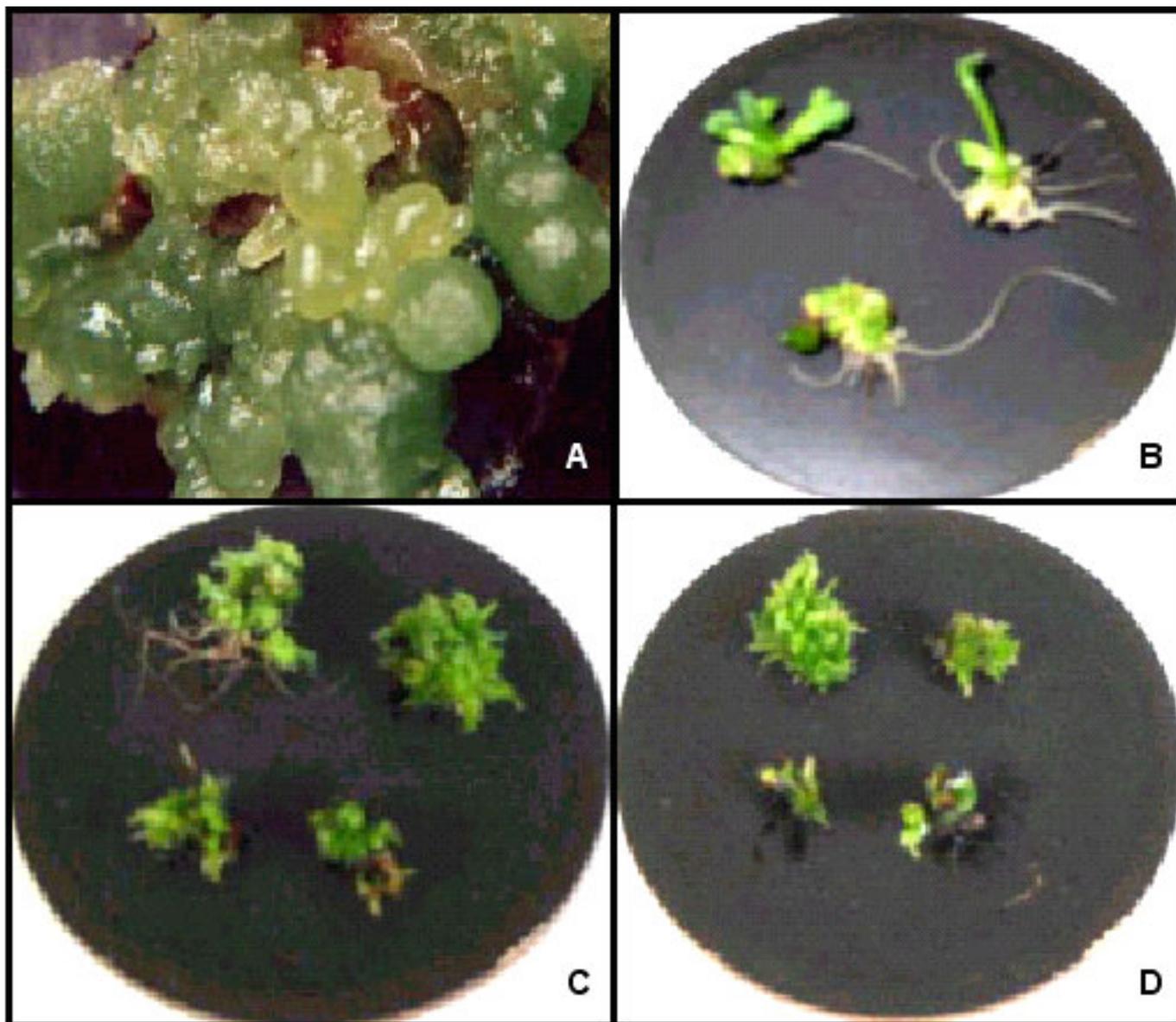


Figura 2: Fenótipo de Calos Organogênicos de Sorgo. (A) Calo proveniente de área meristemática de sementes, após três meses de cultivo em meio MPC + CU, na presença de luz. **(B)** Calos cultivados seis semanas em meio MPC + CU, na presença de luz e 16 dias em meio de regeneração MS. **(C)** Calos cultivados nove semanas em meio MPC + CU, na presença de luz e 16 dias em meio de regeneração MS. **(D)** Calos cultivados 27 semanas em meio MPC + CU, na presença de luz e 16 dias em meio de regeneração MS.

Financiamento

Este projeto é financiado com recursos dos Programas SEP/Embrapa e The McKnight Foundation Collaborative Crop Research Program.

Referências Bibliográficas

CAI, T.; DALY, B.; BUTLER, L. Callus induction and plant regeneration from shoot portions of mature embryos of high tannin sorghums. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 9, p. 245-252, 1987

CAI, T.; EJETA, G.; BUTLER, L. G. Development and maturation of sorghum seeds on detached panicles grown *in vitro*. **Plant Cell Reports**, New York, v.14, p.116-119, 1994..

CASAS, A. M.; KONONOWICZ, A. K.; ZEHR, U. B.; TOMES, D. T.; AXTELL, J. D.; BUTTLER, L. G.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 90, p. 11212-11216, 1993..

EMANI, C.; SUNILKMAR, G.; RATHORE, K. S. (Transgene silencing and reactivation in sorghum. **Plant Science**, Limerick, v. 162, p. 181-192, 2002.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture Part 1 The Technology**. Wilts:Exegetics, 1996. 575-1333

GUO, J. H.; LIANG, G. H. Callus Induction and Plant Regeneration of Cultivated and Wild Sorghums. **Cytologia**, San Francisco, v. 58, p. 203-210, 1993.

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.

O'CONNOR-SANCHEZ, A.; CABRERA-PONCE, J. L.; VALDEZ-MELARA, M.; TELLEZ-RODRIGUEZ, P.; PONS-HERRANDEZ, J. L.; HERRARA-ESTRELLA, L. Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, p. 302-312, 2002

SEGURA, J. Morfogênese in vitro. In: BIETO, J. A.; TALON, M. (Ed.) **Fisiologia y Bioquímica Vegetal**.

Madrid: Interamericana, 1993. p. 381-392.

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

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.

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. 243-252, 1998.

Circular Técnica, 59

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Endereço: MG 424 Km 45 Caixa Postal 151 CEP
35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3779 1000

Fax: (31) 3779 1088

E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2005): 200 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira

Secretário-Executivo: Paulo César Magalhães

Membros: Camilo de Lélis Teixeira de Andrade,
Cláudia Teixeira Guimarães, Carlos Roberto Casela,
José Carlos Cruz e Márcio Antônio Rezende Monteiro

Expediente

Supervisor editorial: Clenio Araujo

Revisão de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira

Editoração eletrônica: Dilermando Lúcio de Oliveira