

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Sorghum*  
*bicolor* (L. MOENCH) VISANDO TOLERÂNCIA  
AO AL<sup>+3</sup>**

**ROSÂNGELA LUCI BRANDÃO**

**2007**

**ROSÂNGELA LUCI BRANDÃO**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Sorghum bicolor* (L. Moench)  
VISANDO TOLERÂNCIA AO AL<sup>+3</sup>**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Co-orientadora

Dra. Andréa Almeida Carneiro

Lavras  
Minas Gerais – Brasil  
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Brandão, Rosângela Luci.

Transformação genética de *Sorghum bicolor* (L. Moench), visando tolerância  
ao Al<sup>3+</sup> / Rosângela Luci Brandão. - Lavras: UFLA, 2007.

116 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Sorgo. 2. Organogênese. 3. Embriogênese. 4. Transformação genética. 5.  
*ALMT1*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.920487328

**ROSÂNGELA LUCI BRANDÃO**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Sorghum bicolor* (L. Moench)  
VISANDO TOLERÂNCIA AO AL<sup>+3</sup>**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 22 de novembro de 2007.

PhD. Andréa Almeida Carneiro	EMBRAPA Milho e Sorgo
PhD. Newton Portilho Carneiro	EMBRAPA Milho e Sorgo
Prof. Dr. Renato Paiva	UFLA
Prof. Dr. Antônio Chalfun-Júnior	UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva  
UFLA  
(Orientador)

Lavras  
Minas Gerais – Brasil

*O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.*

Thomas Huxley

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Nadir e Dilse e aos meus irmãos, Rejane, Eliane, Dilcésar, Juscelino e Rogério, pelo amor e apoio transmitidos em todas as etapas da minha vida. Aos meus sobrinhos, Isabella, Bruno e Guilherme, pelo amor, alegria e carinho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus,

*“Você se fez presente em todos os momentos firmes ou trêmulos. E, passo a passo, pude sentir a Sua mão na minha, transmitindo-me a segurança para enfrentar meu caminho a seguir...”*

Aos meus orientadores, Dra. Andréa Almeida Carneiro e Dr. Luciano Vilela Paiva, pelas orientações, essenciais para o meu crescimento, como pesquisadora.

Ao pesquisador Dr. Newton Portilho de Carneiro, por suas valiosas sugestões e pelo tempo de que dispôs para me ajudar nos trabalhos de pesquisa.

Aos pesquisadores Dr. Robert Eugene Schaffert e Dr. Carlos Henrique S. Carvalho, pelo apoio e confiança em mim depositados.

Ao pesquisador Dr. Antônio Carlos de Oliveira, pela paciência nos trabalhos de estatística.

Ao pesquisador Dr. Jurandir Vieira de Magalhães.

À pesquisadora Dra Isabel Regina Prazeres de Souza.

Às amigas Ivana, Ângela, Gracielle, Mariana, Ruth, Flávia, Miriam, Carol, Janeth, Renata, Débora, Adriana, Fernanda e amigo Gustavão, pela grande amizade, pelo carinho e, principalmente, por estarem sempre presente nas horas em que precisei.

Aos amigos dos laboratórios de biologia celular, bioquímica de plantas e molecular da Embrapa, Raymundo, Anderson, Joaquim, Edmilson, Maíra, Marília, Leandro, Rosângela Santos, Célio e Ubiraci, pelo auxílio e apoio.

Aos técnicos: Gislene, Miguel, Doca, Sr. Geraldo e Edna, pela ajuda nos experimentos.

Aos amigos da UFLA, Ângela, Mina, Carol, Karine, Humberto, Guilherme, Ivana, os Andersons, Zé, Kalynca e Marcus.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da UFLA.

Aos amigos, Izonel e Lena.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à McKnight Foundation, pelas bolsas de estudo concedidas.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL**

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>3</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>6</b>
2.1 Origem e importância econômica da cultura do sorgo.....	6
2.2 Toxicidade e tolerância ao alumínio em plantas.....	7
2.3 Transformação genética de plantas.....	9
2.3.1 Aspectos gerais.....	9
2.3.3 Transformação genética em sorgo.....	11
2.4 Morfogênese <i>in vitro</i> .....	13
2.4.1 Morfogênese <i>in vitro</i> em sorgo.....	15
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>19</b>

### **CAPÍTULO II: REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE *Sorghum bicolor* (L. Moench) POR MEIO DE ORGANOGÊNESE**

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
2.1 Cultivo <i>in vitro</i> .....	32
2.2 Regeneração de plantas.....	33
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	<b>37</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>38</b>

### **CAPÍTULO III: REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE *Sorghum bicolor* VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
2.1 Preparo do explante.....	45
2.2 Maturação e regeneração dos explantes.....	48
2.3 Análises estatísticas.....	48
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
3.1 Indução e crescimento de calos embriogênicos.....	49
3.2 Regeneração de plantas através de embriogênese somática.....	57
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>61</b>



## **CAPÍTULO IV: GENETIC TRANSFORMATION OF IMMATURE SORGHUM INFLORESCENCE VIA MICROPROJECTILE BOMBARDMENT**

<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>69</b>
<b>2 MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>71</b>
2.1 Plant material and explant preparation.....	71
2.2 Plasmid constructs .....	71
2.3 Particle bombardment .....	72
2.4 Expression analysis.....	73
2.5 Selection procedures .....	74
2.6 Plant DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) and Southern blot hybridization analysis .....	75
2.7 Statistical analysis.....	76
<b>3 RESULTS .....</b>	<b>77</b>
3.1 Explant preparation and selection of transformed calli in vitro.....	77
3.2 Transient and stable transformation.....	79
3.3 Evaluation of transgenic material .....	81
<b>4 DISCUSSION .....</b>	<b>84</b>
<b>5 REFERENCES.....</b>	<b>87</b>

## **CAPÍTULO V: TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SORGO COM GENE *ALMT1* DE TRIGO, VISANDO Á OBTENÇÃO DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO x**

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>97</b>
2.1 Transformação genética de sorgo via biobalística .....	97
2.1.1 Preparação do explante na cultura de tecidos .....	97
2.1.2 Construção gênica.....	97
2.1.3 Biobalística .....	98
2.1.4 Seleção de calos bombardeados e regeneração de plantas.....	98
2.2 Extração DNA e reação em cadeia polimerase (PCR).....	99
2.3 Análise hidropônica de tolerância ao Al.....	100
2.4 Análises estatísticas .....	102
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>103</b>
3.1 Regeneração de plantas e confirmação da transformação de sorgo .....	103

3.2 Avaliação de tolerância ao alumínio .....	105
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>112</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>113</b>

## **CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL**

## RESUMO

BRANDÃO, Rosângela Luci. **Transformação genética de *Sorghum bicolor* (L. Moench), visando tolerância ao Al<sup>+3</sup>**. 2007, 116 p. Tese (Doutorado em Agronomia. Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A transformação genética tem sido frequentemente associada a programas de melhoramento genético. Esta técnica permite a introdução de gene(s) exógeno(s) no genoma das plantas, modificando características específicas. Pode ser uma importante ferramenta de auxílio aos programas de melhoramento convencional de sorgo. Entretanto, a maioria dos protocolos de transformação genética requer o estabelecimento prévio de sistemas de regeneração de plantas *in vitro*. Portanto, com a finalidade de produzir plantas transgênicas de sorgo com um aumento de tolerância ao alumínio tóxico presente em solos ácidos, os objetivos deste trabalho foram (i) selecionar cultivares de sorgo capazes de regenerarem, eficientemente, em cultivo *in vitro* via organogênese ou embriogênese; (ii) otimizar parâmetros para transformação via biobalística de inflorescências imaturas de sorgo e (iii) produzir plantas transgênicas de sorgo expressando o transportador de malato, *ALMT1*, isolado de trigo. Inicialmente, identificou-se três genótipos de sorgo, dentre 15 testados, capazes de eficientemente regenerar *in vitro* via organogênese em meio MS basal suplementado com CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 2,4-D, e BAP. Também, foi estabelecido que mais de 6 semanas de cultivo neste meio prejudica a regeneração das plantas. Regeneração de sorgo via embriogênese foi testada usando duas formulações de meio de cultivo, MS (meio CIM) e N6 (meio N6) meio basal suplementado com 2,4-D. Fragmentos de inflorescência imatura de 9 cultivares de sorgo elite desenvolveram calos embriogênicos (CE) em meio CIM, e duas cultivares foram selecionadas por sua mais alta produção de CE. A cultivar CMSXS 102B foi usada para a otimização dos parâmetros de bombardeamento de micropartículas através da análise da expressão transiente da antocianina. Os parâmetros testados incluem pressão de aceleração, distância de vôo da micropartícula e o tempo de permanência dos explantes em meio osmótico antes do bombardeamento. O mais alto número de células expressando o gene da antocianina foi obtido quando calos embriogênicos foram cultivados em meio osmótico durante 4 horas antes do bombardeamento, posicionados 3 cm de distância da plataforma do microcarreador e bombardeados com uma pressão de aceleração do gás hélio de 1000 psi. A utilização destes parâmetros permitiu obter plantas transgênicas de sorgo, expressando os genes *GUS* e *bar*, com uma eficiência de transformação variando de 1,01% a 3,33%. Finalmente, os parâmetros biobalísticos estabelecidos foram utilizados para gerar plantas transgênicas de sorgo expressando o gene *ALMT1*. Plantas T<sub>1</sub> mostraram um aumento no nível de tolerância ao Al<sup>+3</sup> quando crescidas em cultura hidropônica sobre estresse de alumínio, comparadas com o controle não transgênico.

---

Comitê Orientador: Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA/ DQI (orientador); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-orientadora), Embrapa Milho e Sorgo.

## ABSTRACT

BRANDÃO, Rosângela Luci. **Genetic transformation of *Sorghum bicolor* (L. Moench) aiming  $Al^{+3}$  tolerance.** 2007, 116 p. Thesis (Doctoral Program in Agronomia/ Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG - Brazil.\*

The genetic transformation has been frequently associated with conventional genetic breeding programs. This technique allows the introduction of exogenous gene(s) into plant genomes, modifying specific characteristics. It can be an important supplementary tool for sorghum conventional breeding programs. However, most of the genetic transformation protocols require a previous establishment of an efficient *in vitro* regeneration system. Therefore, with the purpose of producing transgenic sorghum plants with increase tolerance to toxic aluminum present in acidic soils, the objectives of this research were (i) to select sorghum cultivars able to efficiently regenerate *in vitro* via organogenesis or embryogenesis; (ii) to optimize biolistic transformation parameters for sorghum immature inflorescence and (iii) to produce transgenic sorghum plants expressing the malato transporter gene, *ALMT1*, isolated from wheat. Initially, it was identified three sorghum genotypes, out of 15 tested, able to efficiently regenerate *in vitro* via organogenesis in MS basal medium supplemented with  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 2,4-D, and BAP. Also, it was established that more than six weeks cultivation in this medium impaired plant regeneration. Sorghum regeneration via embryogenesis was tested using two tissue culture media formulations, MS (CIM medium) and N6 (N6 medium) basal salts supplemented with 2,4-D. Fragments of immature inflorescences of 9 elite sorghum cultivars developed embryogenic calli (EC) efficiently in CIM media, and two cultivars were selected for their highest production of EC. The cultivar CMSXS 102B was used for the optimization of microparticle bombardment parameters throughout the analysis of the transient expression of anthocyanin. The tested parameters included acceleration pressure, microprojectile flying distance and the time of explants on osmoticum prior bombardment. Higher transient expression of reporter gene was attained when embryogenic calli were cultivated in osmotic medium during 4 hours before the bombardment, positioned at 3 cm distant from the microcarrier release platform and shot at 1000 psi of helium accelerating pressure. These parameters were used to generate transgenic sorghum plants, expressing the GUS and *bar* genes, with a transformation efficiency ranging from 1.01 to 3.33%. Finally, the biolistic parameters established were used to generate transgenic sorghum plants expressing *ALMT1* gene.  $T_1$  plants showed an increase level of tolerance to  $Al^{+3}$  when grown in hydroponic culture under aluminum stress, compared with untransformed control.

---

Guidance Committee: Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA/ DQI (advisor); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-advisor), Embrapa Milho e Sorgo.

## 1 INTRODUÇÃO

As técnicas de biotecnologia, aliadas ao melhoramento convencional, podem contribuir significativamente para um aumento do desenvolvimento vegetativo e da biomassa das plantas. A introdução de genes via transformação genética representa um importante instrumento para atingir esses objetivos. Por meio da transformação genética podem-se incorporar genes com características agronômicas desejáveis, levando ao desenvolvimento de cultivares cada vez mais produtivas, adaptadas às mais diversas condições de cultivo e resistentes a diferentes pragas e doenças, com mínimas alterações no genoma.

Desde o final da década de 1970, vem sendo realizada, com sucesso, a transformação genética de plantas dicotiledôneas com genes de outras espécies não entrecruzáveis. Muitas dessas espécies são hospedeiras naturais de *Agrobacterium tumefaciens*, um patógeno que se tornou extremamente útil em engenharia genética de plantas, devido a sua capacidade de infectar e transferir material genético para o genoma vegetal (revisado por Zupan & Zambryski, 1997). Outras técnicas de transformação utilizando DNA livre, tais como microinjeção, eletroporação e biobalística (revisado por Potrykus, 1990), foram desenvolvidas para espécies que, até recentemente, eram consideradas não-suscetíveis à infecção por *A. tumefaciens*, tais como as poáceas.

Sorgo, o quinto cereal mais cultivado do mundo, é uma cultura economicamente importante. Devido ao seu valor agronômico e nutritivo, é uma planta que pode ser comparada ao milho (Rodrigues et al., 2002). Com o crescimento dos setores da avicultura, da suinocultura e da bovinocultura, a demanda de grãos no Brasil cresce sistematicamente (Coelho et al., 2002). Apesar do aumento nas safras brasileiras de milho, ainda há dificuldades para o atendimento a essa demanda em expansão.

Assim sendo, o sorgo aparece como uma alternativa interessante, uma vez que o cultivo dessa espécie pode atender com maior economia uma parte da demanda brasileira de grãos (Coelho et al., 2002). Entretanto, o sorgo nunca se firmou como uma cultura com características comerciais marcantes (Duarte, 2003).

Os principais fatores que afetam os sistemas de produção da cultura de sorgo são os de aspectos econômico, ambiental, tecnológico e qualidade do produto (Coelho et al., 2002; Duarte, 2003).

Desse modo, a utilização da biotecnologia, principalmente a transformação genética, poderá constituir importante ferramenta de auxílio ao melhoramento tradicional de sorgo. Entretanto, sabe-se que o sucesso da aplicação das modernas técnicas de transformação genética de plantas requer um protocolo de regeneração *in vitro*, a partir de cultura de células e ou tecidos, eficiente. Assim, estudos que tenham como objetivo estabelecer protocolos de regeneração *in vitro* associados à transformação genética de sorgo, visando à obtenção de plantas resistentes e ou tolerantes a diferentes estresses bióticos ou abióticos, é altamente desejável e promissores.

Em sorgo, existem protocolos para a regeneração *in vitro* de plantas que possibilitam a associação com técnicas de transformação genética. Entretanto, a maioria desses protocolos é, geralmente, eficiente em relativamente poucos genótipos e esses, muitas vezes, apresentam baixa qualidade agronômica. Dessa forma, fica evidente a necessidade de estudos para a otimização do processo de regeneração *in vitro* e sua associação com técnicas de transformação genética.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi estabelecer parâmetros para o desenvolvimento de cultivo *in vitro* de sorgo por meio da organogênese ou da embriogênese somática e utilizar esses dados para a regeneração de células de sorgo transformadas via biobalística com o gene *ALMT1*. Nesse sentido, os resultados deste estudo serão apresentados, a seguir, na forma de artigos científicos.

Os dois primeiros capítulos dizem respeito à identificação de genótipos de sorgo capazes de regenerar eficientemente *in vitro* pelo processo de organogênese a partir de sementes germinadas e pela embriogênese somática a partir de inflorescência jovem. No terceiro capítulo, apresentam-se os resultados da otimização do processo de transformação genética de sorgo, via biobalística e, finalmente, no último validamos os dados obtidos anteriormente, produzindo plantas transgênicas de sorgo expressando o gene de tolerância ao alumínio isolado

de trigo (*ALMT1*), via bombardeamento de calos embriogênicos formados a partir de inflorescência imatura.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Origem e importância econômica da cultura do sorgo

O sorgo é uma planta anual, monocotiledônea, pertencente à família Gramínea/Poaceae, cujo nome científico é *Sorghum bicolor* L. Moench. A origem do sorgo está, provavelmente, na África, embora algumas evidências indiquem que possa ter havido duas regiões de dispersão independentes, África e Índia (Bennett & Breen, 1990). Esse cereal é o produto da intervenção do homem, que domesticou a espécie e, ao longo de gerações, vem transformando-a para satisfazer às suas necessidades (Ribas, 2003). Segundo registros arqueológicos, a domesticação do sorgo deve ter acontecido por volta de 3.000 a.C., no Egito Antigo, a partir da Etiópia (Doggett, 1970).

O sorgo é uma planta típica de clima quente, de características xerófilas que, além da baixa exigência em termos de nutrientes minerais, apresenta tolerância a fatores abióticos, tais como estresse hídrico, salinidade e encharcamento (Tabosa et al., 1999). É cultivado extensivamente em todo o mundo, especialmente nas zonas áridas e semi-áridas, onde a precipitação anual situa-se entre 375 e 625 mm ou onde esteja disponível irrigação suplementar (Ribas, 2003). Em diferentes regiões da África e Índia, é uma cultura muito popular na alimentação, na produção de silagem e de combustível (Jogeswar et al., 2007). Em regiões como a América do Norte e Sul, Europa e Austrália, destina-se, especialmente, à produção de rações. Atualmente, é o quinto cereal mais importante do mundo, atrás apenas do trigo, do arroz, do milho e da cevada (Sato et al., 2004; Girijashankar et al., 2005; Howe et al., 2006).

No Brasil, acredita-se que o sorgo tenha chegado da mesma forma que nas Américas do Norte e Central, por meio dos escravos africanos (Duarte, 2003). No entanto, somente a partir da década de 1970 se tornou importante comercialmente, quando a área de plantio alcançou 80 mil hectares, concentrando-se, principalmente, no Rio Grande do Sul e em São Paulo (Tabosa et al., 1999).

O sorgo tem mostrado grande potencial de produção no país, pois apresenta vantagem adaptativa distinta quando comparado a outros cereais. A sua notável

resistência à seca e a outros fatores de estresse abióticos viabiliza a sua produção em ambientes problemáticos para outras culturas e também apresenta grande amplitude de épocas de plantio (Coelho et al., 2002; Ribas, 2003; Duarte, 2003). Sua produção pode ser mecanizável do plantio à colheita, utilizando equipamentos já empregados em outras culturas, como soja, trigo e arroz (Coelho et al., 2002). No entanto, segundo Santos (2007), durante os últimos 30 anos, a área cultivada de sorgo tem apresentado flutuações na produtividade, em decorrência, principalmente, de políticas econômicas e tem na comercialização o principal fator limitante. Ainda segundo este pesquisador, as condições em que o sorgo se desenvolve - áreas de risco e com insumos limitados - resultam na obtenção de baixos níveis de produtividade e de produções instáveis.

Dessa forma, a geração de tecnologias deve levar em consideração não apenas a otimização do processo produtivo em sistemas com elevada aplicação de tecnologia, mas também favorecer o modelo praticado pela agricultura de subsistência, aumentando a disponibilidade de cultivares mais resistentes a estresses bióticos e abióticos e com melhor desempenho em condições de baixa aplicação de insumos.

No cerrado brasileiro, por exemplo, região de solos ácidos e ricos em alumínio, o melhoramento para tolerância a esse metal é considerado um excelente caminho para aumentar o desempenho de plantas economicamente importantes cultivadas. Isso porque o alumínio ( $Al^{+3}$ ) é um fator limitante na agricultura, prejudicando o crescimento e o desenvolvimento de plantas sensíveis a este metal.

## **2.2 Toxidez e tolerância ao alumínio em plantas**

O alumínio trocável, além de ser um elemento nocivo ao crescimento do sistema radicular, interfere na absorção e na movimentação de fósforo, cálcio e magnésio na planta, contribuindo, também, para a adsorção do fósforo no solo (Echart & Cavalli-Molina, 2001). Plantas não adaptadas, que crescem em solos contendo alumínio trocável em níveis tóxicos, têm o crescimento do sistema radicular prejudicado, ou paralisado, uma vez que as raízes se tornam curtas e

grossas (Kochian, 1995). As anomalias e os danos causados ao sistema radicular ocasionam exploração de menor volume de solo pelas plantas, resultando em prejuízos na absorção de nutrientes e no aproveitamento da água do solo (Echart & Cavalli-Molina, 2001).

No Brasil, os solos ácidos são frequentemente encontrados na região que compreende o Cerrado, área que cobre uma extensão de 205 milhões de ha, dos quais mais de 200 milhões são aptos à agricultura (Adámoli et al., 1985). Regiões de cerrado caracterizam-se por apresentar elevada acidez, alta saturação de alumínio, baixa disponibilidade de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, zinco, boro e cobre e, em sua maioria, reduzida capacidade de retenção da água (Silva & Malavolta, 2000). Esses aspectos tornam necessário o desenvolvimento de materiais tolerantes a acidez e pouco exigentes na fertilidade do solo.

Um grande número de evidências tem indicado a exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes como tendo um importante papel na detoxificação do Al externo à célula, em raízes de várias espécies de plantas (Ma & Furukawa, 2003). Elevados níveis de exsudação de ácidos di- e tricarbóxicos ativados pela presença do Al têm se correlacionado positivamente com a tolerância diferencial ao Al (Kochian et al., 2004). Diversas plantas, incluindo o milho e o trigo, exsudam ácidos orgânicos pelas raízes, os quais estão envolvidos na tolerância ao Al e no mecanismo pelo qual as plantas adquirem P do solo (Kochian, 1995). Ácidos orgânicos produzidos pelas raízes podem interagir com o Al, evitando que ele seja absorvido pelas plantas.

A transformação genética, uma importante ferramenta biotecnológica, tem sido utilizada com sucesso em programas de melhoramento (O’Kennedy et al., 2006; Visarada & Kshore, 2007). Essa técnica molecular permite a produção de plantas transgênicas mais aptas a solos ácidos. Delhaize et al. (2004) relataram que plantas de cevada transformadas com o gene *ALMT1* de trigo apresentaram maior exsudação de malato que plantas controle, refletindo no aumento da tolerância a alumínio. Entretanto, por ser um cereal altamente recalcitrante para a transformação genética, poucos laboratórios no mundo têm utilizando esse método para o melhoramento de sorgo (Visarada & Kishore, 2007).

Assim, tornam-se de grande importância investigações científicas direcionadas à otimização dos processos da morfogênese *in vitro*, bem como o estabelecimento de protocolos de transformação genética para sorgo.

## **2.3 Transformação genética de plantas**

### **2.3.1 Aspectos gerais**

A produção de plantas transgênicas depende da introdução estável do DNA exógeno no interior do genoma de células de plantas, seguido por regeneração das plantas e subsequente expressão do(s) gene(s) introduzido(s) (Walden & Wingender, 1995). Existem vários métodos de transformação de plantas, sendo estes agrupados em duas categorias: transferência direta e indireta. A transferência indireta é aquela que, para intermediar a transformação, utiliza um vetor como *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* (Brasileiro & Dusi, 1999), *Rhizobium* sp., *Sinorhizobium meliloti* e *Mesorhizobium loti* (Broothaerts et al., 2005). Já a transferência direta de DNA é baseada em métodos físicos ou químicos. Dentre estes se destacam a transformação com polietilenoglicol (PEG), a eletroporação de protoblastos e a biobalística (Aragão et al., 1992).

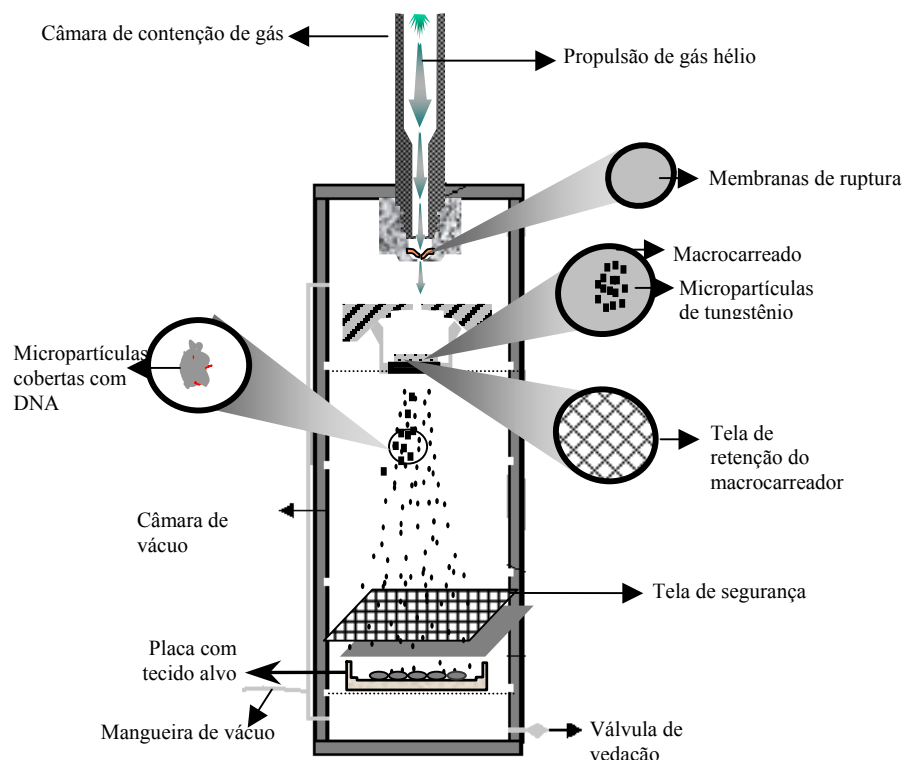
A técnica de biobalística consiste na inserção de micropartículas de ouro ou tungstênio, revestidas com DNA de interesse, no núcleo de plantas. Uma vez dentro da célula, a construção gênica pode-se integrar no genoma da planta. As micropartículas são aceleradas por gás hélio comprimido, a uma velocidade de até 1.500 km/h e penetram nas células do tecido alvo. Esse processo ocorre no interior de uma câmara sob vácuo, para evitar que o ar provoque a desaceleração das micropartículas. O aparelho responsável por gerar a onda de choque é denominado de acelerador de micropartículas, também conhecido como “gene gun” (Figura 1).

Esse aparelho contém um reservatório no qual a pressão do gás hélio é mantida por meio de “membrana de ruptura”, que é fabricada para se romper a pressões predeterminadas. O canhão gênico utiliza uma membrana macrocarreadora, de grande resistência e baixo peso, a qual suporta ou carrega as micropartículas cobertas com DNA. A liberação do hélio produz uma onda de choque em direção à membrana macrocarreadora. O complexo membrana

macrocarreadora e micropartículas é acelerado em direção ao tecido alvo. A membrana macrocarreadora é retida por uma tela para evitar que ela venha a colidir com o alvo. Entretanto, as micropartículas continuam aceleradas em direção aos explantes vegetais. A técnica é bastante versátil, pois, além da transformação nuclear, também pode ser utilizada para transformar organelas, como a mitocôndria ou o cloroplasto. Essa técnica é relativamente simples, rápida e não envolve muito investimento de infra-estrutura e equipamentos.

O processo da biobalística tem se mostrado efetivo desde a transformação de microrganismos até plantas e animais (Sanford et al., 1993). Uma das principais vantagens é a eficiência na transformação de Gimnospermas e Angiospermas monocotiledôneas, o que não é observado na transformação por meio de *Agrobacterium* (Brasileiro & Cançado, 2000). Outra vantagem em se usar a técnica da biobalística é que vários tecidos podem ser bombardeados, como, por exemplo, inflorescências, micrósporos ou embriões imaturos e não existe o problema da necessidade da utilização de uma *Agrobacterium* específica para a linhagem com que se está trabalhando (Becker et al., 1994; Barcelo et al., 1994). Uma das desvantagens do uso da biobalística é que, normalmente, várias cópias da construção gênica são transferidas para a planta (Kohli et al., 2003; Yao et al., 2006), mas esse problema pode ser solucionado por meio de técnicas de genética básica.

A biobalística é um método bastante eficiente para a introdução de novas características em cereais (Becker et al., 1994). Vários protocolos de regeneração e transformação de cereais usando essa técnica já foram publicados (Casas et al., 1993; Brettschneider et al., 1997; Devi & Sticklen, 2002; Tadesse et al., 2003; Gao et al., 2005a; Girijashankar et al., 2005).



**FIGURA 1.** Esquema do processo de transferência direta de genes através da biobalística.

### 2.3.3 Transformação genética em sorgo

A obtenção de plantas transgênicas de sorgo tem sido realizada por diferentes métodos, tais como a introdução direta de DNA em protoplastos (Battraw & Hall, 1991; Tagu et al., 1988), o co-cultivo de calos organogênicos e embriões zigóticos imaturos com *Agrobacterium* (Zhao et al. 2000; Jeoung et al., 2002; Gao et al., 2005a; 2005b; Howe et al., 2006) e o bombardeamento de embriões zigóticos imaturos (Casas et al., 1993; Zhu et al., 1998; Krishnaveni et al., 2001; Able et al., 2001; Emani et al., 2002), inflorescência jovem (Casas et al., 1997; Tadesse et al., 2003) ou meristema apical (Girijashankar et al., 2005) com partículas metálicas carregando o DNA de interesse

Apesar da existência de trabalhos mostrando a transformação genética de algumas cultivares de sorgo, mediada por bombardeamento de partículas, a frequência de regeneração de plantas transgênicas tem sido muito baixa. A eficiência de transformação obtida quando embriões zigóticos imaturos de sorgo

são utilizados como explante para a transformação via *Agrobacterium* ou biobalística variou de 0,08% a 1,3% (Casas et al., 1993; Casas et al., 1997; Zhu et al., 1998; Emani et al. 2002; Tadesse et al., 2003). Na tentativa de aumentar a eficiência de transformação via biobalística, Girijashankar et al. (2005) utilizaram meristema apical de sorgo e obtiveram eficiência de 1,5%.

Segundo Christou (1992) e Sanford et al. (1993), a eficiência da transformação por biobalística depende de fatores físicos, biológicos e ambientais. Esses parâmetros incluem a concentração de micropartículas e DNA, condições de aceleração das partículas, distância do tecido alvo, condições da cultura antes e depois do bombardeamento e o tipo e as condições fisiológicas dos explantes (Tadesse et al., 2003). Desse modo, a maioria dos trabalhos de transformação genética de sorgo está focada na otimização de parâmetros para incrementar a regeneração deste cereal em cultura de tecidos e naqueles para otimizar a transferência de genes. Estudos de avaliação da eficiência de diferentes promotores para direcionar a síntese de proteínas heterólogas, bem como para identificar genes de seleção e repórteres mais eficazes, têm sido publicados (Zhong et al., 1998; Able et al., 2001; Harshavardhan et al., 2002; Jeoung et al., 2002; Tadesse et al., 2003).

Genes de importância agrônômica vêm sendo introduzidos com sucesso em várias espécies de cereais. Em sorgo, apenas três laboratórios conseguiram expressar proteínas de interesse agrônômico. Zhu et al. (1998) e Krishnaveni et al. (2001) transformaram plantas de sorgo com o gene da quitinase do arroz, o qual tem sua atividade aumentada após infecção por fungos, bactérias e vírus, estando, portanto, envolvido em alguns mecanismos de resistência a doenças. O gene *cryIAc*, isolado de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), foi introduzido em sorgo para tolerância à broca *Chilo partellus* (Girijashankar et al., 2005).

Embora o Brasil esteja entre os dez primeiros produtores de sorgo do mundo, ainda necessita de técnicas adequadas para a regeneração em cultura de tecidos para as principais cultivares de sorgo. Este fato tem restringido a utilização da biotecnologia para a obtenção de plantas transgênicas de cultivares adaptadas às condições agroecológicas do país. Vale ressaltar que os trabalhos de transformação

genética de cultivares utilizadas no Brasil iniciaram-se bem recentemente, tendo instituição pioneira a Embrapa Milho e Sorgo.

O conhecimento da morfogênese *in vitro* é de fundamental importância para o sucesso na obtenção de plantas transgênicas. Os aspectos gerais da morfogênese *in vitro*, e especialmente da embriogênese de sorgo, são revistos a seguir.

#### **2.4 Morfogênese *in vitro***

O processo morfogenético é o resultado da divisão e da diferenciação celular organizada que dependem, basicamente, da atividade e expressão de determinados genes. O processo de diferenciação celular reflete, em última análise, o efeito de, pelos menos, três grupos de fatores. O primeiro é o fator genético, que incorpora o estoque de potencialidades que podem ser expressas durante o desenvolvimento; o segundo fator está representado pelas características originadas durante a ontogênese e, por último, existem as características cuja expressão depende apenas do ambiente (Kerbaudy, 1999).

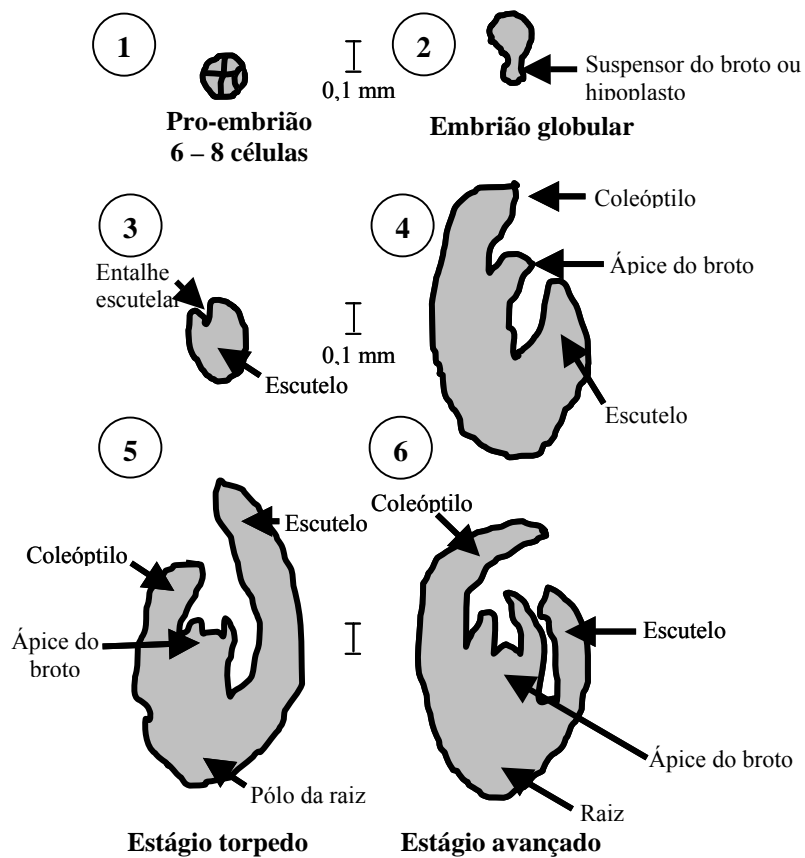
Atualmente, sabe-se que as células cultivadas *in vitro* podem manifestar sua totipotência, seguindo duas rotas alternativas: (i) organogênese, que conduz à diferenciação de meristemas caulinares e ou radiculares, originando caule ou raízes, respectivamente; (ii) embriogênese somática, que conduz à formação de embriões somáticos, seguindo as fases do embrião zigótico, embora, obviamente, sem fecundação (Segura, 1993). Ambas as rotas podem ocorrer de forma direta ou indireta. Na embriogênese somática ou organogênese indireta, um calo é formado, mantido e proliferado antes do desenvolvimento dos embriões somáticos e, na direta, os embriões somáticos se originam diretamente sobre a superfície do explante, sem passar pela fase de proliferação de calo (George, 1996; Mordhorst et al., 1997).

O padrão de desenvolvimento de um embrião somático em dicotiledôneas apresenta muitas características morfológicas semelhantes às do embrião zigótico.



Inicialmente, ambos são caracterizados pela diferenciação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular. Ambos passam pelos estádios de desenvolvimento pró-embriônários e embriônários propriamente ditos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, num processo ontogenético que pode ser subdividido em vinte diferentes estágios que representam três grandes eventos (Jurgens & Mayer, 1992). Os estágios em monocotiledôneas são um pouco diferentes dos estágios em dicotiledôneas. No estágio globular, embriões somáticos são inicialmente confundidos com meristema apical, o que dificulta estabelecer se a embriogênese aconteceu (George, 1996). Porém, os embriões de monocotiledôneas dão origem a meristemas de corpos globulares discretos, os quais, quando crescem, desenvolvem estruturas semelhantes ao escutelo e coleóptilo (George, 1996) (Figura 2).

Na embriogênese somática indireta, os calos embriogênicos em espécies de cereais, como milho, sorgo e aveia, são classificados em dois tipos (Tipo I e Tipo II), que se diferenciam na morfologia, textura e taxa de crescimento. De acordo com Armstrong & Green (1985), Bregitzer et al. (1989), Elkonin et al. (1995), os calos do Tipo I, também conhecidos como calos embriogênicos compactos (CEC), produzem culturas compactas nas quais os embriões somáticos normalmente se apresentam em estruturas complexas e organizadas. Os do Tipo II, conhecidos como calos embriogênicos friáveis (CEF), formam culturas friáveis que apresentam alta taxa de crescimento, maior uniformidade e permitem o estabelecimento de culturas de células em suspensão e de protoplastos. Por isso, são os preferidos para os trabalhos de transformação genética *in vitro*.



**FIGURA 2.** Esquema dos estágios da embriogênese em monocotiledôneas. Adaptado de George (1996).

#### 2.4.1 Morfogênese *in vitro* em sorgo

Os estudos de cultura de tecidos em sorgo têm proporcionado a regeneração de plantas por meio de diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, tais como cultura de células em suspensão (Brar et al., 1979; Karunaratne & Scott, 1981; Chourey & Sharpe, 1985), indução de organogênese (Syamala & Devi 2003; Maheswari et al., 2006) e indução da embriogênese somática (Bhaskaran & Smith, 1988 Lusardi & Lupotto, 1990; Elkonin et al., 1995; Gendy et al., 1996; Gupta et al., 2006).

A regeneração de plantas de sorgo, por meio da embriogênese *in vitro*, tem sido descrita a partir de diferentes explantes tais como embriões imaturos (Cai et al., 1987; Ma et al., 1987; Elhag & Butler, 1992; Guo & Liang, 1993; Elkonin et al., 1995; Oldach et al., 2001; Sato et al., 2004), folhas (Wernicke & Brettell, 1980, 1982), meristema apical (Bhaskaran & Smith, 1988; Seetharama et al., 2000) e inflorescência imatura (Lusardi & Lupotto, 1990; Kaeppler & Pedersen, 1996 e 1997; Elkonin & Pakhomova, 2000; Jogeswar et al., 2007). Todavia, a proporção de explantes responsivos é, algumas vezes, muito baixa e o processo morfo genético não tem sido completamente caracterizado na maioria dos trabalhos.

Dunstan et al. (1978) caracterizaram histologicamente o processo de embriogênese somática a partir de embriões imaturos de *Sorghum bicolor*. Os autores observaram que o desenvolvimento do meristema e de estruturas semelhantes a embriões somáticos podem iniciar diretamente de células do escutelo primário, ou seja, pelo processo de embriogênese direta.

A influência do nitrogênio e do fósforo na indução de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos e fragmentos de inflorescência jovem em diferentes cultivares de *Sorghum bicolor* foi estudada por Elkonin & Pakhomova (2000). Esses autores constataram que, em alguns genótipos de sorgo, o aumento das concentrações de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  no meio de cultura suplementado com aminoácidos, significativamente aumenta a indução e crescimento de calos embriogênicos e sua habilidade de regeneração. Altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  com baixas concentrações de  $\text{NO}_3^-$  resultaram na formação de calos embriogênicos compactos (CEC), enquanto altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) ou N6 (Chu et al., 1975) favorecem a proliferação de calos embriogênicos friáveis (CEF).

Alguns trabalhos têm demonstrado a forte influência do genótipo na produção de calos e habilidade de regeneração *in vitro* (Ma et al., 1987; Kaeppler & Pedersen, 1997; Jogeswar et al., 2007), sugerindo a necessidade de estudos específicos para cada genótipo, visando um melhor ajuste nos protocolos de regeneração *in vitro*. Ma et al. (1987) fizeram uma seleção em vinte cultivares de

sorgo em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com o regulador de crescimento 2,4-D. Dessa seleção, o genótipo C401 foi identificado como o melhor para cultura *in vitro*.

Kaeppler & Pedersen (1997), com o objetivo de identificar genótipos de sorgo que produzem calos embriogênicos de alta qualidade, observaram que, entre 41 genótipos de sorgo estudados, somente 12 produziram calos embriogênicos friáveis. Hagio (2002) examinou a capacidade de regeneração de 11 genótipos de sorgo em meio MS suplementado com citocininas (cinetina e 6-benzyladenina). Duas cultivares, 'C.Kafir' e 'PE 932025', exibiram alta frequência de indução de calos e regeneração.

Guo & Liang (1993) estudaram, em sete cultivares e oito espécies selvagens de sorgo - Xinliang 1, Jinliang 5, Xiongyue 334, Xin White, KS 21R, C-401 e PI-2 e *S.niloticum*, *S. miliaceum*, *S. vigatum*, *S. plumosum*, *S. arundinaceum*, *S. sudanese*, *S. aethiopicum* e *S. versicolor*, respectivamente - a indução de calos e a regeneração de plantas em três diferentes meios de cultura. Os autores utilizaram embriões imaturos de plantas mantidas em casa de vegetação e meios de cultura que consistiam do meio MS, suplementado com cinetina, caseína hidrolisada, reguladores de crescimento, diferentes concentrações de glicina e auxinas e com e sem asparagina. O meio MZ (com 2 mg L<sup>-1</sup> de glicina, 5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D e 0,3 mg L<sup>-1</sup> cinetina) e o meio MA (com 7,7 mg L<sup>-1</sup> de glicina, 200 mg L<sup>-1</sup> de asparagina, 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIA e 0,5 mg L<sup>-1</sup> ABA) foram significativamente mais efetivos na indução de calos do que o meio MN (com 2 mg L<sup>-1</sup> de glicina, 2,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0,3 mg L<sup>-1</sup> cinetina, 300 mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada). O meio MA foi o melhor para a regeneração de seis cultivares, enquanto os meios MZ e MN foram melhores para a regeneração da espécie *S.versicolor*. O meio de enraizamento contendo ANA foi o mais efetivo no desenvolvimento de um sistema de raiz forte. Os autores concluíram que os efeitos genótipo e meio, bem como a interação entre os mesmos, significativamente afetaram a indução de calos e a regeneração de plantas.

O principal problema encontrado no cultivo *in vitro* de sorgo é a produção de compostos fenólicos, que podem prejudicar a formação de calos e o desenvolvimento da planta (Kresovich et al., 1987; George, 1996; Zhu et al., 1998).

Cai et al. (1987) observaram que cultivares de sorgo que apresentam altas concentrações de tanino têm tendência a produzir grandes quantidades de composto fenólicos em cultura, o que dificulta o cultivo de calos em comparação a cultivares com baixas concentrações de tanino. Elhag & Butler (1992) foram capazes de induzir calos e regenerar plantas em genótipos de sorgo com alta produção de compostos fenólicos. Estes autores utilizaram como explantes embriões imaturos, que foram cultivados em meio de cultura MS suplementado com 2,4-D ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), água de côco (10%) e zeatina ( $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ ). Elkonin et al. (1995) estudaram o efeito dos aminoácidos na indução e na manutenção de calos embriogênicos friáveis de *Sorghum bicolor* (L.) Moench em dois tipos de explantes (embriões imaturos e inflorescência jovem). Constataram que a adição de altas concentrações de asparagina e prolina (1-3 g/l) ao meio de cultura (MS ou N6), contendo 2,4-D, aumenta a proliferação de calos embriogênicos e diminui a produção de compostos fenólicos na cultura de tecido de sorgo. Calos embriogênicos friáveis aparecem em culturas crescidas em meio N6 com adição desses aminoácidos.

A embriogênese e a organogênese *in vitro* de sorgo têm sido descritas para diversas espécies e cultivares. A necessidade de maximizar o número de plantas regeneradas com a manutenção da fidelidade genética contribuiu para uma ampla diversificação das condições do cultivo *in vitro*. Assim, diferentes tipos de explantes, meios de cultura e condições ambientais para a regeneração do sorgo em cultura de tecidos são citados na literatura. Diante do exposto, fica evidente que as condições de cultivo *in vitro* são cultivar-dependente. Desse modo, os estudos de tipos de explantes, meios de culturas e condições de cultivo visando à embriogênese *in vitro* devem ser otimizados para as cultivares estudadas.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLE, J.A.; RATHUS, C.; GODWIN, I.D. The investigation of optimal bombardment parameters for transient and stable transgene expression in sorghum. **In Vitro Cell Dev. Biology**, v.37, p.341-348, 2001.

ADÂMOLI, J.; MACEDO, J.; AZEVEDO, L.G.; MADEIRA, N.J.S. Caracterização da região dos Cerrados. In: GOETERD, W.J. (Ed.). **Solos dos cerrados: tecnologias e estratégias de manejo**. São Paulo: EMBRAPA/Nobel, 1985. p.33-74.

ARAGÃO, F.J.L.; SÁ, M.F.G.DE.; ALMEIDA, E.R.; GANDER, E.S.; RECH, E.L. Particle bombardment mediated expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Plant Molecular Biology**, Tucson, v.20, p.357-359, 1992.

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.

BARCELO, P.; HAGEL, C.; BECKER, D.; MARTIN, A.; LORZ, H. Transgênic cereal (tritordeum) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue. **Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v.5, p.583-592, 1994.

BATTRAW, M.; HALL, T.C. Stable transformation of sorghum-bicolor protoplasts with chimeric neomycin phosphotransferase-ii and beta-glucuronidase genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.82, p.161-168, 1991.

BECKER, D.; BRETTSCHEIDER, R.; LORZ, H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. **Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v.5, p.299-307, 1994.

BENNET, R. J.; BREEN, C.M. The aluminum signal: new dimensions to mechanisms of aluminium tolerance. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT-SOIL INTERACTIONS AT LOW PH, 2., 1990, Beckley. **Plantsoil interactions at low pH: proceedings...** Dordrecht: Kluwer, 1991. p.703-716.

BENNETT, W.F.; TUCKER, B.B.; MAUNDER, A.B. **Modern grain sorghum production**. Iowa: Iowa State University, 1990.

BHASKARAN, S.; SMITH, R.H. Enhanced somatic embryogenesis in *Sorghum bicolor* from shoot tip culture. **In Vitro Cellular Development Biology**, v.21, p.65-70, 1988.

BRAR, D.S.; RAMBOLD, S.; GAMBORG, O.; CONSTABEL, F. Tissue culture of corn and sorghum. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, v.95, p.377-388, 1979.

BRASILEIRO, A.C.M.; CANÇADO, G.M. de A. Plantas transgênicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.204, p.28-35, 2000.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. v.2, p.679-736.

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

BRETTSCHEIDER, R.; BECKER, D; LÖRZ, H. Efficient transformation of scutellar tissue of immature embryos. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.94, p.737-748, 1997.

BROOHAERTS, W.; MITCHELL, H. J.; WEIR, B.; KAINES, S.; SMITH, L.M.A.; YANG, W.; MAYER, J.E.; ROA-RODRIGUEZ, C.; JEFFERSON, R.A. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria, **Nature**, v.433, p.629-633, 2005.

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

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 of the United States of America**, Washington, v.90, n.23, p.11212-11216, 1993.

CASAS, A.M.; KONONOWICZ, A.K.; HAAN, T.G.; ZHANG, L.; TOMES, D.T.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Transgenic sorghum plants obtained after microprojectile bombardment of immature inflorescences. **In vitro Cellular Development Biology—Plant**, v.33, p.92-100, 1997.

COELHO, A.M.; WAQUIL, J.M.; KARAN, D.; CASELA, C.R.; RIBAS, P.M. Seja o doutor do seu sorgo. Piracicaba: POTAFOS, 2002, 24 p. (Arquivo do agrônomo, 14).

CHOUREY, P.; SHARPE, D. Callus formation from protoplasts of Sorghum cell suspension cultures. **Plant Science**, v.39, p.171-175, 1985.

- CHRISTOU, P. Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. **Plant Journal**, v.2, p.275-281, 1992.
- 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.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; HEBB, D.M.; YAMAMOTO, Y.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, H. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. **Proc. Natl. Academic Science**, v.101, p.15249-15254, 2004.
- DEVI, P.; STICKLEN, M. Culturing shoot-tip clumps of pearl millet *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] and optimal microprojectile bombardment parameters for transiente expression. **Euphytica**, Wageningen, v.125, p.45-50, 2002.
- DOGGETT, H. **Sorghum**. London: Longmans, 1970. p. 430. (Tropical Agriculture Series).
- DUARTE, J.O. **Sorgo**: aspectos econômicos. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003. 28p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 28).
- DUNSTAN, D.I.; SHORT, K.C.; THOMAS, E. The anatomy of secondary morphogenesis in cultured scutellum tissue of *Sorghum bicolor*. **Protoplasma**, v.97, p.251-260, 1978.
- ECHART, C.L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genética. **Ciência Rural**, v.31, p.531-541, 2000.
- ELHAG, H.; BUTLER, L.G. Effect of genotype, explant age and medium composition on callus production and plant regeneration from immature embryos of sorghum. **Arab. Gulf. Journal Science Res.**, v.10, p.109-119, 1992.
- ELKONIN, I.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, p.153-157, 1995.
- ELKONIN, L.A.; PAKHOMOVA, N.V. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. **Plant Cell Tissue Organ. Culture**, v.61, p.115-123, 2000.
- EMANI, C.; SUNILKMAR, G.; RATHORE, K. S. Transgene silencing and reactivation in sorghum. **Plant Science**, Limerick, v.162, p.181-192, 2002.



- GAO, Z.; JAYARAJ, J.; MUTHUKRISHNAN, S.; CLAFLIN, L.; LIANG, G.H. Efficient genetic transformation of Sorghum using a visual screening marker. **Genome**, v.48, p.321-333, 2005a.
- GAO, Z.; XIE, X.; LING, Y.; MUTHUKRISHNAN, S.; LIANG, G.H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated sorghum transformation using mannose selection. **Plant Biotechnology Journal**, v.3, p.591-599, 2005b.
- GENDY, C.; SÉNE, M.; BUI VAN, L.E.; VIDAL, J.; TRÂN THANH VÂN, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Plant Cell Reports**, v.15, p.900–904, 1996.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: practice**. 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361p. Part. 2.
- GIRIJASHANKAR, V.; SHARMA, H.C.; SHARMA, K.K.; SWATHISREE, V.; PRASAD, L.S.; BHAT, B.V.; ROYER, M.; SECUNDO, B.S.; NARASU, M.L.; ALTOSAAR, I.; SEETHARAMA, N. Development of transgenic sorghum for insect resistance against the spotted stem borer (*Chilo partellus*). **Plant Cell Reports**, v.24, p.513–522, 2005.
- 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.
- 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.
- 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 Tiss. Organ. Cult.**, v.86, p.379–388, 2006.
- HAGIO, T. Adventitious shoot regeneration from immature embryos of sorghum. **Plant Cellular Tiss. Organic Culture**, v.68, p.65-72, 2002.
- HARSHAVARDHAN, D.; RANI, T.S.; ULAGANATHAN, K.; SEETHARAMA, N. An improved protocol for regeneration of *Sorghum bicolor* from isolated shoot apices. **Plant Biotechnology**, v.19, p.163–171, 2002.
- HOWE, A.; SATO, S.; DWEIKAT, I.; FROMM, M.; CLEMENTE, T. Rapid and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum. **Plant Cellular Reports**, v.25, p.784-791, 2006.
- JEOUNG, J.M.; KRISHNAVENI, S.; MUTHUKRISHNAN, S.; LIANG, G.H. TRICK, H.N. Optimization of sorghum transformation parameters using genes for

green fluorescent protein and  $\beta$ -glucuronidase as visual markers. **Hereditas**, v.137, p.20-28, 2002.

JOGESWAR G.; RANADHEER, D.; ANJALIAH, V.; KAVI KISHOR, P.B. High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench from immature inflorescence explants. **Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.43, p.159-166, 2007.

JURGENS, G.; MAYER, U. Arabidopsis. In: BARD, J. (Ed.). **Embryos: a colour atlas of developing embryos**. London: Wolfe, 1992. p.32-37.

KAEPPLER, 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.

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

KARUNARATNE, S.M.; SCOTT, K.J. Mitotic activity in protoplasts isolated from *sorghum bicolor* (L.) leaves. **Plant Science Letters**, v.23, p.11-16, 1981.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em culturas de células e tecidos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI, 1999. v. 2, p. 519-531.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.46, p.237-260, 1995.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.459-493, 2004.

KOHLI, A.; TWYMAN, R.M.; ABRANCHES, R.; WEGEL, E.; STOGER, E.; CHRISTOU, P. Transgene integration, organization and interaction in plants. **Plant Molecular Biology**, v.52, p.247-258, 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.

KRISHNAVENI, S.; JEOUNG, J.M.; MUTHUKRISHNAN, S.; LIANG, G.H. Transgenic sorghum plants constitutively expressing a rice chitinase gene show

improved resistance to stalk rot. **Journal of Genetics and Breeding**, v.55, p.151–158, 2001.

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

MA, H.; GU, M.; LIANG, G. H. Plant regeneration from cultured immature embryos of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Theoretical Applied Genetic**, v.73, p.389–394, 1987.

MA, J.F.; FURUKAWA, J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.97, p.46-51, 2003.

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, p.741-744, 2006.

MORDHORST, A.P.; TOONEN, M.A.J.; DE VRIES, S.C. Plant embryogenesis. **Critical Review Plant Science**, v.16, p.535–576, 1997.

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.

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 Cellular Reports**, v.20, p.416–421, 2001.

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

POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.79, p.125-134, 1990.

RODRIGUES, P.H.M.; SENATORE, A.L.; LUCCI, C.S.; ANDRADE, S.J.T.; LIMA, F.R.; MELOTTI, L. Valor nutritivo da silagem de sorgo tratada com inoculantes enzimo-microbianos. **Acta Scientiarum**, Londrina, v.24, p.1141-1145, 2002.

RIBAS, P.M. **Sorgo**: introdução e importância Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2003. 16p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 26).

SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSELL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. In: WU, R. (Ed.). **Recombinant DNA – Part H**. San Diego: Academic, 1993. p.483-510 (Methods in Enzymology, 217).

SANTOS, F.G. **Cultura de sorgo e suas possibilidades**. Portal do Agronegocio. 2007. Disponível em:  
<<http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto&&idT=1075>>.  
Acesso em: 15 out. 2007.

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.

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

SEGURA, J. Morfogénesis *in vitro*. In: BIETO, J.A.; TALON, M. (Ed.). **Fisiologia y bioquímica vegetal**. Madrid: Interamericana, 1993. p.381-392.  
SILVA, A.R.; MALAVOLTA, E. A conquista do cerrado. In: PATERNIANI, E. (Org.). **Agricultura brasileira e pesquisa agropecuária**. Brasília: EMBRAPA, 2000. p.31-44.

SYAMALA, D.; PRATHIBHA, D. Efficient regeneration of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) from shoot-tip explants. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.41, p.1482-1486, 2003.

TABOSA, J.N.; LIMA, G.S.; LIRA, M.A.; TAVARES FILHO, J.J.; BRITO, A.R. M.B. Programa de melhoramento de sorgo e milho em Pernambuco. In: QUEIROZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.). **Simpósio “Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro”**. Petrolina – PE, EMPRAPA Semi-Árido/EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 29p, 1999.

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

TAGU, D.; BERGOUNIOUX, C.; CRETIN, C. Direct gene-transfer in petunia-hybrida electroporated protoplasts - evidence for co-transformation with a phosphoenolpyruvate carboxylase cDNA from sorghum leaf. **Protoplasma**, v.146, p.101-105, 1988.

VISARADA, K.B.R.S.; KISHORE, N.S. Improvement of Sorghum through transgenic technology. **ISB News Report**, p.1-3, 2007.

WALDEN, R.; WINGENDER, R. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. **Trends Biotechnology**, v.13, p.324-331, 1995.

WERNICKE, W.; BRETTELL, R.I.S. Somatic embryogenesis from *Sorghum bicolor* leaves. **Nature**, v.287, p.138-139, 1980.

WERNICKE, W.; BRETTELL, R.I.S. Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor* culture initiation. **Protoplasma**, v.111, p.19-27, 1982.

YAO, Q.; CONG, L.; CHANG, J.L.; LI, K.X.; YANG, X.G.; HE, G.Y. Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.14, p.3737-3746, 2006.

ZHAO, Z.Y.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; MILLER, M.; WANG, N.; PANG, H.; RUDERT, M.; SCHROEDER, S.; HONDRED, D.; SELTZER, J.; PIERCE, D. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. **Plant Molecular Biology**, v.44, p.789-798, 2000.

ZHONG, H.; WANG, W.; STICKLEN, M. In vitro morphogenesis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench: efficient plant regeneration from shoot apices. **Journal of Plant Physiology**, v.153, p.719-726, 1998.

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.

ZUPAN JR., ZAMBRYSKI, P. The *Agrobacterium* DNA transfer complex. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v.16, p.279-295, 1997.

**CAPÍTULO II: REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE  
*Sorghum bicolor* (L. Moench) POR MEIO DE ORGANOGÊNESE**

## RESUMO

BRANDÃO, Rosângela Luci. Regeneração in vitro de cultivares de Sorghum bicolor por meio de organogênese. In: \_\_\_\_\_. **Transformação genética de Sorghum bicolor (L. Moench), visando tolerância ao Al<sup>3+</sup>**. 2007. Cap. 2, p.27-39. Tese (Doutorado em Agronomia. Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Sorgo é o quinto cereal mais importante no mundo. Por ser uma cultura economicamente importante, o desenvolvimento de cultivares superiores 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 o sucesso da aplicação das modernas técnicas de transformação genética de plantas requer a utilização de genótipos com alta capacidade de regeneração in vitro. Assim sendo, os objetivos deste projeto foram: i) identificar genótipos de sorgo capazes de regenerar eficientemente in vitro pelo processo de organogênese em meio MPC+CU e ii) avaliar a influência do período de permanência de calos organogênicos em meio de multiplicação na regeneração de plantas de sorgo. Culturas de calos de 15 cultivares elite de sorghum foram iniciadas a partir de meristema apical de sementes germinadas. Três cultivares, CMCXS102B, 112B and 210B foram identificadas como superiores na produção de calos organogênicos. Para a avaliação da influência do período de cultivo de calos organogênicos em meio de multiplicação na regeneração de plantas de sorgo, calos da linhagem CMSXS 112B, com 27, 9 e 6 semanas de cultivo em meio MPC, foram transferidos para magentas contendo meio MS e incubadas sob fotoperíodo de 16-h (40 µmol. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa), a 25oC. Os calos com seis semanas apresentaram a melhor taxa de regeneração, já os calos com 27 semanas não apresentaram regeneração. Esses resultados revelaram que o tempo de permanência dos calos organogênicos em meio de multiplicação influencia o processo de regeneração de sorgo.

Palavras-chave: cultura de tecidos, sorgo, regeneração, calos organogênicos, compostos fenólicos,

---

Comitê Orientador: Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA/ DBI (orientador); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-orientadora), Embrapa Milho e Sorgo.

## ABSTRACT

BRANDÃO, Rosângela Luci. *In vitro* plant regeneration of *Sorghum bicolor* cultivars via organogenesis. In: \_\_\_\_\_. **Transformação genética de *Sorghum bicolor* (L. Moench), visando tolerância ao Al<sup>+3</sup>**. 2007. C. 2, p.28-37. Thesis (Doctoral Program in Agronomia/ Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG -Brazil.\*

Sorghum is the fifth most important cereal crop in the world. Because it is an economically important crop, the development of superiors' cultivars more productive via introduction of resistance genes to several biotic and abiotic stresses, is highly desirable. However, sorghum is considered a recalcitrant crop when cultured *in vitro* and the success of modern techniques of genetic transformation require the utilization of genotypes with high regeneration capacity. The objectives of this research were: i) to identify sorghum genotypes able to regenerate *in vitro* via organogenesis in MPC+Cu medium, (ii) to evaluate the influence of the cultivation of callus in MPC+Cu medium in the regeneration of sorghum cultivars. Callus cultures of 15 elite sorghum genotypes were initiated from shoot apices from germinating seedlings. Three cultivars, CMSXS102B, 112B and 210B were identified as superior for the production of organogenic callus. For the evaluation of the influence of the cultivation time of organogenic calli in MPC+Cu media in the plant regeneration, callus of CMSXS 102B cultivar with 27, 9 and 6 weeks after culture were placed in MS media and incubated at 16-h photoperiod ( $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) and 25°C. The best results were obtained with callus transferred after 6 weeks in culture, after 27 weeks in culture the regeneration frequency was 0%. These results indicated that the permanence period of organogenic callus in multiplication media influence in the regeneration of sorghum.

Key-words: Tissue culture, sorghum, regeneration, organogenic callus, phenolic compounds.

---

Guidance Committee: Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA/ DQI (advisor); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-advisor), Embrapa Milho e Sorgo.



## 1 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 tem gerado um crescente interesse pela aplicação desses conhecimentos para a geração de nova variabilidade genética, utilizável em programas de melhoramento de plantas.

O sorgo, o quinto cereal mais cultivado do mundo (Jogeswar et al., 2007), 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 620.620 ha, com uma produção total de 1.556.016 t, na safra 2006 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE, 2007). Verifica-se, porém, que a sua produtividade é baixa (1.500 a 2.500 kg/ha) e extremamente variável.

Por tratar-se de uma cultura economicamente importante, o desenvolvimento de cultivares superiores mais produtivas, por meio 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.

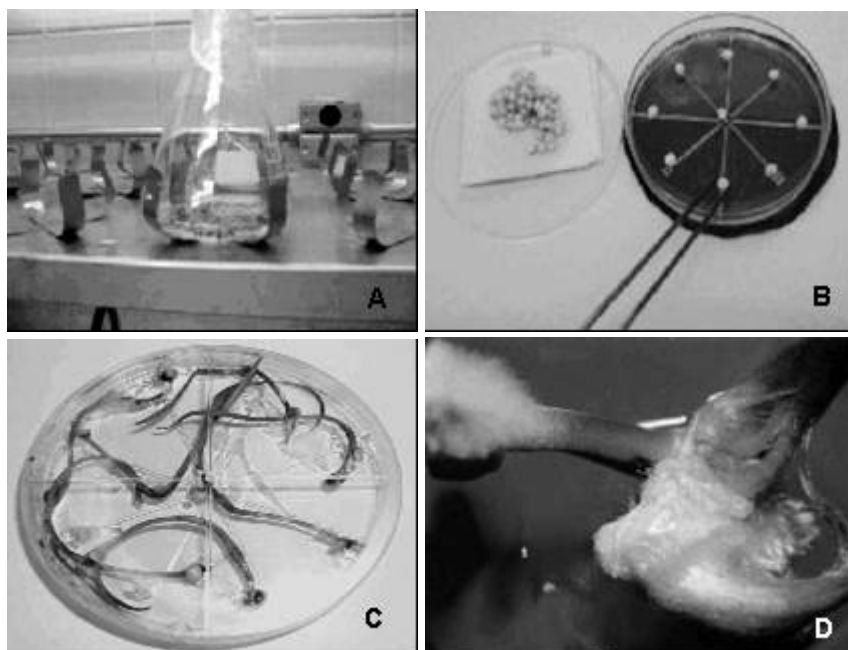
O presente trabalho foi realizado com o objetivo de selecionar linhagens de sorgo capazes de formar em meio MPC+Cu calos organogênicos regeneráveis *in vitro*. Posteriormente, as linhagens selecionadas poderão ser utilizadas em programas de transformação genética deste cereal.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Cultivo *in vitro*

Foram testadas quinze linhagens elites 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, com o auxílio de uma pinça foram colocadas com o eixo embrionário voltado para cima em placa de Petri contendo meio de cultura MPC + Cu [MS sais (Murashige & Skoog, 1962), 1,25 mg L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, 2 mg L<sup>-1</sup> BAP, 500 mg L<sup>-1</sup> caseína, 100 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol, e 30 g L<sup>-1</sup> sacarose] (Figura 1A a 1C). Foram colocadas dez sementes por placa e para cada genótipo foram feitas quatro repetições. As placas foram incubadas, a 25°C, sob fotoperíodo de 16-h (40 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa), durante duas semanas. Assim que as sementes germinaram, ocorreu a formação de calo no meristema apical (Figura 1D). Esses calos foram separados do explante inicial e subcultivados por mais quatro semanas, em meio de indução MPC+Cu.



**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.

## 2.2 Regeneração de plantas

Para avaliar a influência do período de permanência de calos organogênicos 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 e Skoog, 1962),  $60 \text{ g L}^{-1}$  sacarose,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  myo-inositol,  $3 \text{ g L}^{-1}$  phytigel, pH 5,8 e cultivados, a  $26^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16-h ( $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as linhagens testadas, CMXS 112B, CMSXS 102B e CMSXS 210B foram as que melhor desenvolveram calos organogênicos em meio MPC+Cu (Tabela 1). Nas linhagens incapazes de formar calos e, conseqüentemente, de regenerar plantas *in vitro*, foi observado escurecimento dos calos e meio de cultura.

Segundo Oberthur et al. (1983), o escurecimento observado nos calos e no meio de cultura de sorgo é devido os compostos fenólicos. 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 dos mesmos (Grattapaglia & Machado, 1998). Alguns trabalhos de cultura *in vitro* de sorgo têm demonstrado que 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). Cai et al. (1987) observaram que cultivares de sorgo que apresentam altas concentrações de tanino têm tendência a produzir grandes quantidades de composto fenólicos em cultura, o que dificulta o cultivo de calos em comparação a cultivares com baixas concentrações de tanino. Segundo George (1996), diferentes genótipos, além de diferirem na quantidade de substâncias fenólicas produzidas, diferem na toxicidade e na sensibilidade a esses compostos. O meio de cultura também foi fator importante, que contribuiu para o desenvolvimento de explantes de sorgo, no trabalho desenvolvido por Cai et al. (1994), em que as linhagens testadas apresentaram performances diferentes, dependendo da composição do meio de cultivo em que foram mantidas.

**TABELA 1:** Capacidade de produção de calos organogênicos em cultura de tecidos. (-) ausência de calos organogênicos; (+) presença.

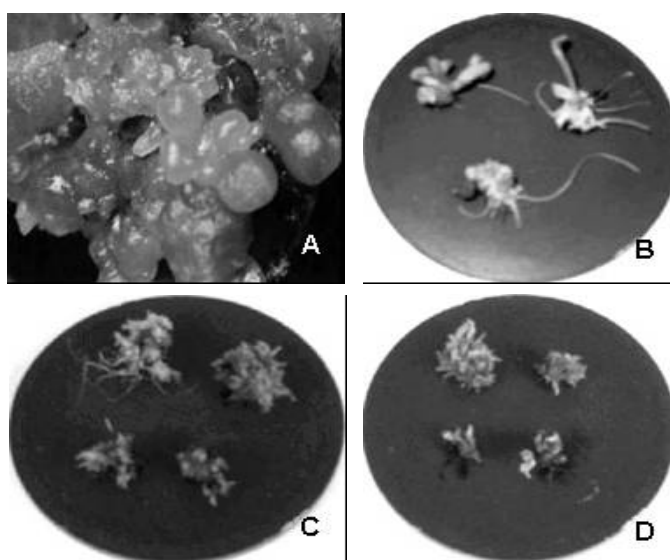
<b>Linhagens de sorgo<sup>(1)</sup></b>	<b>Presença de calos organogênicos</b>
CMSXS 101B	++
CMSXS 102B	+++
CMSXS 107B	-
CMSXS 112B	+++
CMSXS 114R	+
CMSXS 116R	++
CMSXS 156B	+
CMSXS 157B	+
CMSXS 173R	+
CMSXS 178B	+
CMSXS 180R	++
CMSXS 210B	+++
CMSXS 211B	+
CMSXS 230B	+
CMSXS 232B	+

(1) Linhagens pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo

Os calos mantidos em meio de multiplicação durante seis semanas apresentaram a melhor taxa de regeneração; 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 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 enlongaram-se, 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 o tempo de permanência dos calos organogênicos em meio de multiplicação influencia o processo de regeneração das plantas de sorgo. Quanto menor o tempo de cultivo em meio de multiplicação dos calos, maior a eficiência de regeneração de plantas. Resultados semelhantes foram observados por Cai &

Butler (1990) que relataram que a proporção de subcultivo e a frequência de regeneração de calos embriogênicos de sorgo decrescem com a idade. Além disso, a formação de pigmento e a perda de vigor foram obstáculos na manutenção dos calos. Geralmente, a frequência da taxa de escurecimento do calo, depois de 120-160 dias em cultura, dependendo do genótipo, variou de 30% a 80%. As frequências de regeneração de duas linhagens utilizadas pelos autores, IS8768 e IS425, diminuíram 31% e 37%, respectivamente, depois de 160 dias em cultura e de 70% a 80% dos calos embriogênicos subcultivados escureceram.



**FIGURA 2:** Fenótipo de calos organogênicos de sorgo. (A) Calo proveniente de área meristemática de sementes germinadas, 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 9 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.

#### 4 CONCLUSÕES

- As cultivares testadas apresentaram diferenças na formação de calos organogênicos, indicando alta influência do genótipo no sistema de organogênese *in vitro* de sorgo.

- O tempo de permanência dos calos em meio de cultivo influenciou na taxa de regeneração de plantas de sorgo; quanto menor o tempo dos calos em meio de indução, maior a taxa de regeneração de plantas.



## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAI, T.; BUTLER, L. Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several high-tannin sorghums. **Plant Cellular Tissue and Organic Culture**, v.90, p.101-110, 1990.

CAI, T.; DALY, B.; BUTLER, L. Callus induction and plant regeneration from shoot portions of mature embryos of high tannin sorghum. **Plant Cell Tissue Organic Culture**, 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 Cellular 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.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Wilts: Exegetics, 1996. Part. 1, p.575-1333.

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: Embrapa/SPI/CNPQ, 1998. v.1, p.183-260.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento da produção agrícola**. 2007. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_2007\\_05\\_5.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_2007_05_5.shtm)>. Acesso em: 7 jun. 2007.

JOGESWAR, G.; RANADHEER, D.; ANJIAH, V.; KISHOR, P.B.K. High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench from immature inflorescence explants. **In Vitro Cellular Development Biology-Plant**, v.43, p.159-166, 2007.

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.

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.

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 Organic Culture**, Hague, v.75, p.1-18, 2003.

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.

**CAPÍTULO III: REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE  
*Sorghum bicolor* VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

## RESUMO

BRANDÃO, Rosângela Luci. Regeneração *in vitro* de cultivares de *Sorghum bicolor* via embriogênese somática. In: \_\_\_\_\_. **Transformação genética de *sorghum bicolor* (L. Moench) visando tolerância ao Al<sup>3+</sup>**. 2007. Cap 3, p. 40-65. (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é à base da alimentação de mais de 300 milhões de pessoas, em regiões semi-áridas da África e Ásia. Sendo uma cultura economicamente importante, o desenvolvimento de cultivares superiores 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, na geração de uma variedade transgênica, é imprescindível que a planta em estudo regenere-se eficientemente em cultura de tecido. A embriogênese somática, com a formação de calos do Tipo I e II, é uma forma de regeneração comum entre os cereais. Calos embriogênico friáveis (Tipo II) são os mais utilizados em protocolos de transformação genética de plantas. Porém, a formação destes calos é observada em um número limitado de genótipos. Objetivando identificar genótipos de 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. Devido o escurecimento de calos e meio de cultura, nenhuma das linhagens testadas formou calos embriogênicos friáveis no meio N6. Entre os dois meios de cultura testados, o meio CIM foi superior, mostrando-se adequado para a formação de CEF e regeneráveis *in vitro*. Das linhagens testadas, duas (CMSXS 102B e CMSXS 156B) tiveram maior formação de CEF e apresentaram maior taxa de regeneração em meio MS.

Palavras-chave: Embriogênese, calo embriogênico compacto, compostos fenólicos.

---

Comitê Orientador: Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA/ DQI (orientador); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-orientadora), Embrapa Milho e Sorgo.

## ABSTRACT

BRANDÃO, Rosângela Luci. *In vitro* regeneration of *Sorghum bicolor* cultivars via somatic embryogenesis. In: \_\_\_\_\_. **Transformação genética de *sorghum bicolor* (L. Moench) visando tolerância ao Al<sup>3+</sup>**. 2007. C. 3, p. 40-73 Thesis (Doctoral Program in Agronomia/ Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG -Brazil.\*

Sorghum is the basal food for more than 300 million people of the arid and semiarid zones of the Africa and Asia. Sorghum is an economically important crop plant, the development of superiors' cultivars more productive via introduction of resistance gene to several biotic and abiotic stresses, is highly desirable. However, this cereal has been one of the most recalcitrant when cultivated *in vitro*, and in the generation of a transgenic cultivar, it is crucial that the specie in study have one efficient *in vitro* plant regeneration system. The somatic embryogenesis, with formation of Type I and II callus is a common type of regeneration among cereals. Friable embryogenic calli (Type II) are the most utilized in protocol of genetic transformation of plants. However, the formation of this calli is observed in a limited number of cultivars. The objective of this study was to identify friable embryogenic callus (FEC) producing sorghum genotypes. Immature inflorescences of 9 elite sorghum cultivars were placed on media designated CIM and N6 and maintained in the dark at 25°C for four weeks, with subcultured at 2 week intervals. Due to medium and callus darkened, none of the tested lines produced embryogenic callus on N6 media. Between the two culture media tested the CIM media was superior in the production of *in vitro* FEC and plant regeneration. Two cultivars (CMSXS 102B and CMSXS 156B) produced the highest FEC and plant regeneration on MS media.

Key-words: Embryogenesis, Compact embryogenic callus, phenolic compounds.

---

Guidance Committee: Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA/ DQI (advisor); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-advisor), Embrapa Milho e Sorgo.

## 1 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 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 (Naylor et al., 2004; O’Kennedy et al., 2006). Em especial, o aprimoramento das tecnologias de DNA recombinante e a otimização dos processos de transformação genética de vegetais têm gerado um crescente interesse pela aplicação desses conhecimentos para a geração de nova variabilidade genética, utilizável em programas de melhoramento de plantas (O’Kennedy et al., 2006).

Sorgo, o quinto cereal mais cultivado do mundo (Sato et al., 2004), tem se mostrado 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 em cultura de tecidos (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 da cultura *in vitro*, sejam otimizados.

Culturas de calos embriogênicos em espécies de cereais como milho, sorgo e aveia 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 & 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 compactas nas quais os embriões somáticos normalmente se apresentam em estruturas complexas e organizadas. Os do Tipo II, conhecidos como calos embriogênicos friáveis (CEF), formam culturas friáveis com embriões somáticos discretamente arranjados na cultura, são facilmente separados com o auxílio de uma pinça, apresentam alta taxa de crescimento, maior uniformidade e permitem o estabelecimento de culturas de células em suspensão e de protoplastos, por isso são os preferidos para os trabalhos de transformação genética *in vitro*. Porém, a formação de calos embriogênicos do Tipo II é observada em um número limitado de genótipos (Elkonin et al., 1995; Kaepler & Pederson, 1997).

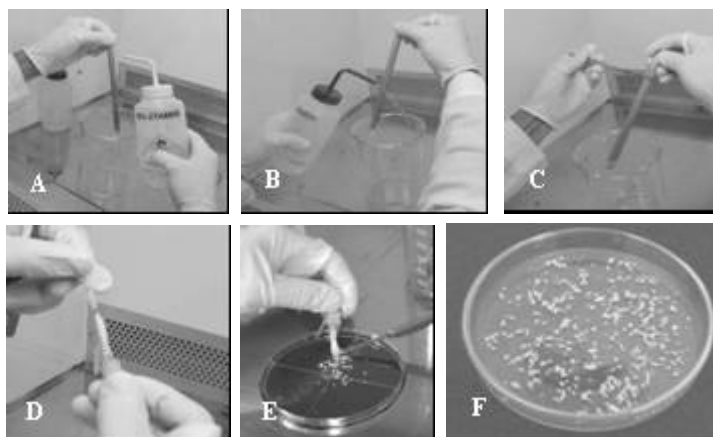
Os protocolos de transformação genética de planta são desenvolvidos para genótipos adaptados à propagação *in vitro*, tanto por organogênese quanto por embriogênese e essas plantas muitas vezes apresentam baixa qualidade agronômica.

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 *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 elite capazes de formar CEF e regenerar eficientemente, *in vitro*, pelo processo de embriogênese somática, visando posteriormente sua utilização na geração de plantas transgênicas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparo do explante

Para este trabalho foram utilizadas como material vegetal inflorescências jovens, as quais foram coletadas entre 3,0 e 5,0 cm de comprimento. Nove linhagens elites pertencentes ao banco de germoplasma da 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. Inflorescências imaturas foram desinfestadas em etanol 70% e água estéril (Figura 1A e B). Em seguida, as folhas foram retiradas com o auxílio de um bisturi, deixando-se somente a panícula (Figura 1C e D). As panículas foram cortadas em fragmentos de, aproximadamente, 5 mm (Figura 1E) 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) e meio N6 (Chu et al., 1975) (Tabela 1 -Figura 1F). As placas foram seladas com parafilm® ou filme de PVC, incubadas em câmara de crescimento, no escuro a 26°-28°C, durante três semanas.



**FIGURA 1** Indução de calos embriogênicos a partir de panícula jovem de sorgo em meio de cultivo. (A) Desinfestação da planta com etanol 70%; (B) enxágüe da planta com água estéril; (C) retirada da parte foliar com o auxílio de um bisturi; (D) liberação da panícula; (E) corte da panícula (~5mm) com auxílio do bisturi; (F) fragmentos da panícula em meio de cultura.




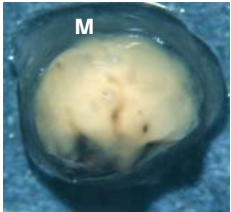



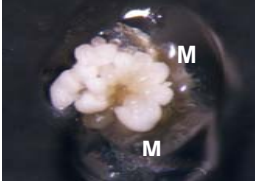
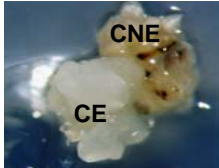
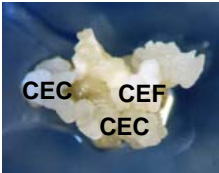
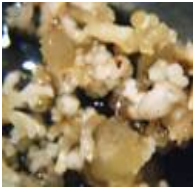

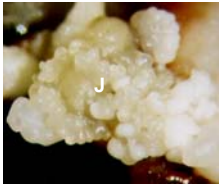
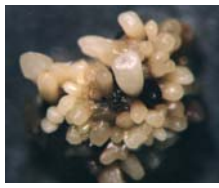
**TABELA 1.** Composição dos meios de cultivo usados para a cultura de tecido de sorgo

Composição	Constituinte mg L <sup>-1</sup>	Meio CIM mg L <sup>-1</sup>	Meio N6 mg L <sup>-1</sup>	Meio RM mg L <sup>-1</sup>	Meio MS mg L <sup>-1</sup>
Sais	<sup>1</sup> MS	4.300	0	4.300	4.300
	<sup>2</sup> N6	0	4.300	0	0
Regulador de crescimento	<sup>3</sup> 2,4 D	2,5	2,0	0	0
	<sup>4</sup> ANA	0	0	0,25	0
Vitaminas	<sup>1</sup> MS	4.300	0	0	0
	<sup>2</sup> 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
	Tiamina HCl	1	0	0	1
Suplementos	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
	<sup>5</sup> Phytigel	2 500	2 500	2 500	2 500

- (1) Mistura basal de sais com macro e micronutrientes, de acordo com Murashige & Skoog, (1962). Sigma M5524.  
(2) Mistura basal de sais com macro e micronutrientes, de acordo com Chu et al. (1975). Sigma C1416.  
(3) Ácido 2,4 diclorofenoxiacético. Sigma D84072.  
(4) Ácido naftalenoacético. Sigma N0640.  
(5) Agente geleificante. Sigma P8169

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 e meio de cultura, que foram qualitativamente avaliadas, com peso de 1 a 3, nas diferentes linhagens testadas, de acordo com a escala de avaliação descrita por Kaeppler & Perderson (1996) com algumas modificações e reproduzida na Tabela 2. 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 compactos (CEC) derivados de inflorescência jovem de sorgo.

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

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 subdivido 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 compacto 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.

## **2.2 Maturação e regeneração dos explantes**

Para a regeneração dos calos embriogênicos, estes foram subcultivados 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 subcultivados em meio MS, sob fotoperíodo de 16-h (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 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 feita individualmente, de acordo com a necessidade de cada vaso

## **2.3 Análises estatísticas**

O delineamento experimental 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 comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Indução e crescimento de calos embriogênicos

O material vegetal utilizado para iniciar o cultivo *in vitro* de linhagens de sorgo foi a inflorescência imatura, com 30-50 mm de comprimento. De acordo com Cai & Butler (1990), inflorescências de sorgo entre 20 e 50 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 para cultura *in vitro* pode superar a limitação genotípica de maneira mais prática do que a utilização de embriões imaturos.

Neste estudo observou-se que inflorescências entre 30-50 mm de comprimento, mas com aristas já desenvolvidas (Figura 2B), não formaram calos de maneira eficiente e, portanto não foram utilizadas nos experimentos.



**FIGURA 2.** Inflorescências imaturas da linhagem CMSXS 112B de sorgo. (A) Inflorescência imatura apropriada para formação de calos embriogênicos; (B) inflorescência imatura com desenvolvimento precoce, ou seja, mais madura e com aristas mais visíveis do que as da figura A. Aumento 10X.

Na Tabela 3 observa-se que os genótipos e os meios de cultura diferem significativamente no escurecimento do calo e meio de cultura, na presença de mucilagem e na formação de calos embriogênicos e friáveis ( $P < 5\%$  para todas as variáveis testadas). Nossos resultados revelaram que em meio CIM, as linhagens CMSXS 101B, 102B, 112B, 156B e 157B não apresentaram escurecimento de calos e meio de cultura (Nota 3) e a linhagem CMSXS 232B não apresentou mucilagem (Nota3) (Figura 3 A-R). No meio N6 não houve escurecimento do calo e meio de cultura nas linhagens CMSXS 112B, 156B, 157B e 230B (Nota 3). No

entanto, a presença de mucilagem nas linhagens CMSXS 112B, 157B e 230B foi alta (Nota 1) (Figuras 3B e K; 3G e P, respectivamente).

Entre os dois meios de cultura testados, o meio CIM foi superior. Das nove linhagens testadas neste estudo, somente a linhagem CMSXS 112B apresentou formação de calos embriogênicos (CE) em meio N6 (Nota 2), nas demais linhagens, embriões somáticos não foram detectados (Nota 1). Oito linhagens (CMSXS 102B, 107B, 112B, 156B, 157B, 210B, 230B e 232B) apresentaram formação de CE em meio CIM (Notas 2 a 3). A linhagem CMSXS 101B não formou CE em nenhum dos meios testados (Nota 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Lusardi & Lupotto (1990) e Elkonin & Pakhomova (2000) que, estudando diferentes meios de cultura em vários genótipos de sorgo, observaram que algumas cultivares não formaram CE em meio N6, enquanto em meio com MS sais a maioria das linhagens testadas formou CE.

Sato et al. (2004), com o objetivo de identificar genótipos de sorgo, com alta capacidade de formação de CE e regeneração de planta, observaram que nenhuma das quatro linhagens testadas apresentou formação de calos embriogênicos em meio N6 e o melhor meio para a formação de calos embriogênicos foi o M11 (meio MS com 7,57 mM a mais de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

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 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; Kaeppler & 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).

Diferença na capacidade de regeneração entre genótipos de arroz mostrou estar associada com o loci 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 componentes do sal basal no meio de cultura de tecidos, como previamente sugerido por Hodges et al. (1986). Desse modo, neste estudo, inflorescências imaturas das respectivas linhagens estudadas foram cultivadas em meio CIM, que contém MS sais e no meio N6 (Chu et al., 1975).

**TABELA 3** Taxa média das avaliações do escurecimento do calo e meio de cultura, presença de mucilagem, formação calos embriogênicos e friáveis, por inflorescências de sorgo cultivadas em meio N6 e CIM.

Genótipo	Escurecimento		Mucilagem		Embriogênicos		Friáveis	
	N6	CIM	N6	CIM	N6	CIM	N6	CIM
CMSXS101B	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

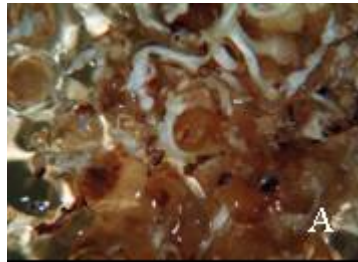
Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem significativamente (Tukey, 0,05).

**Linhagem**

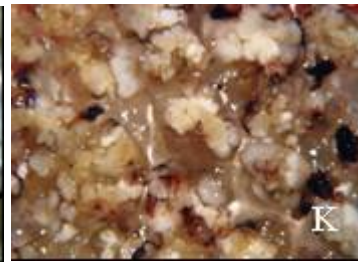
**N6**

**CIM**

**CMSXS 101B**



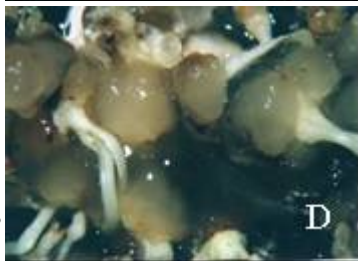
**CMSXS 102B**



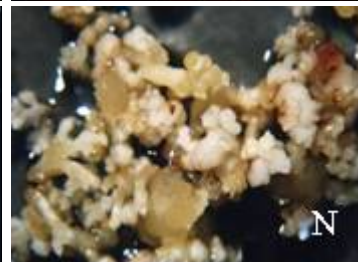
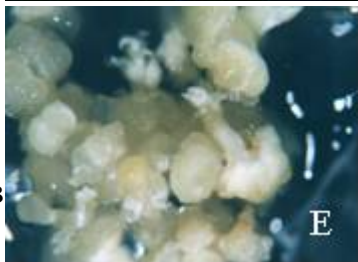
**CMSXS 107B**

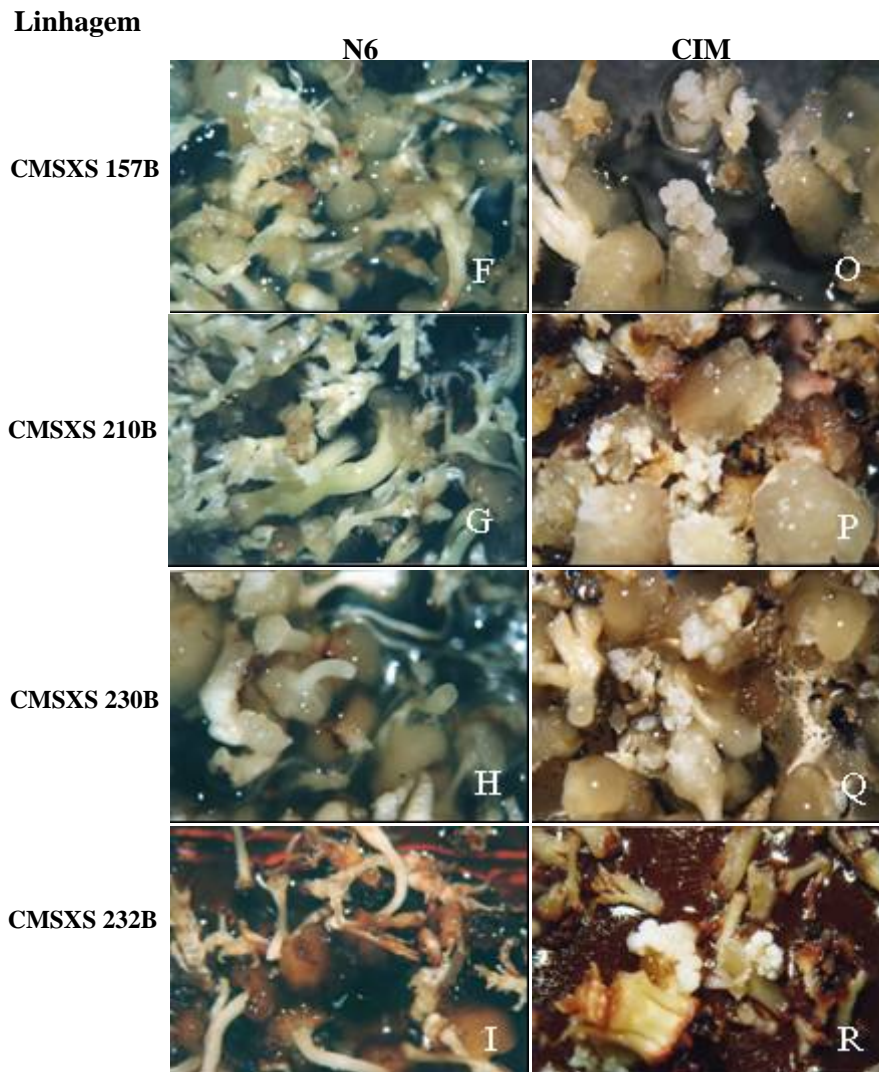


**CMSXS 112B**



**CMSXS 156B**





**FIGURA 3** 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).

Em meio CIM, a maioria das linhagens formou CEC em maior quantidade do que CEF, com exceção da linhagem CMSXS 101B, que não apresentou formação de calos embriogênicos (Nota 1). As linhagens CMSXS 102B e CMSXS 156B se destacaram na produção de CEF (Nota 2,67) e foram as que não apresentaram mucilagem e escurecimento de calos e meio de cultura (Tabela 3 e Figura 4K e N), enquanto que nas linhagens CMSXS 112B e 232B, as quais apresentaram mucilagem e escurecimento de calos e meio de cultura,



respectivamente (Notas 1,67 e 1), o número de CEC foi maior do que CEF (Tabela 3 e Figura 4M e R). Resultado semelhante foi observado por Gupta et al. (2006); de oito genótipos de sorgo testados, somente um produziu CEF. Kaepler & Pederson (1996), estudando o efeito do meio de cultura na formação de CEF em 11 linhagens elites de sorgo, observaram que meios de cultura com MS saís (SIM2B5/SMM2B5) apresentaram crescimento de calos de alta qualidade para a maioria dos genótipos testados e somente dois dos genótipos testados (B Wheatland e Piper Sudangras) formaram CEF em meio com N6 saís.

Os resultados mostram que as linhagens que apresentaram maior número de calos embriogênicos friáveis não apresentaram escurecimento de calos e meio de cultura. Esses resultados corroboram os apresentados por Elkonin et al. (1995) e Kaepler & 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 devido os 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). 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 dos mesmos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Cai et al. (1987) observaram que linhagens de sorgo que têm altas quantidades de tanino são 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 entre 30% a 97%, dependendo do meio de cultura e do genótipo. Estes autores concluíram que as linhagens que apresentavam maior quantidade de tanino produziram menor número de sementes e isso ocorreu, provavelmente, devido à liberação de compostos fenólicos. Já Oberthur et al. (1983), estudando a presença de polifenóis, incluindo taninos condensados, em calos de sorgo, observaram que tanino condensado não está presente em quantidade detectável em folhas completamente desenvolvidas de sorgo, enquanto análises de calos detectaram grande quantidade deste composto. Esses autores especularam que a síntese de tanino condensado em calos, mas não nos tecidos vegetativos da planta de sorgo, pode ser resultado de estresses só reconhecidos por células menos diferenciadas e tecidos morfológicamente menos desenvolvidos do calo.

Nesse sentido, várias pesquisas já foram desenvolvidas no intuito de verificar o potencial antioxidante de algumas substâncias (George, 1996; Pan & Staden, 1998) e, dessa forma, minimizar os efeitos negativos da oxidação fenólica durante o cultivo *in vitro*. Dentre os antioxidantes utilizados, destacam-se o carvão ativado e o PVP (Pan & 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 Standen, 1998). O PVP reage com os compostos oxidantes no meio de cultura, evitando que os mesmos 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, por isso, passou a ser incluído como procedimento-padrão (Tisserat, 1979). No entanto, neste experimento, não foi observado efeito similar do carvão ativado nas linhagens testadas; além disso, a adição de carvão ativado ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) em meio de cultura CIM inibiu a formação de calos embriogênicos (dados não mostrados).

Van Nguyen et al. (2007) observaram que a adição de carvão ativado em meio de cultura aumentou a sobrevivência de embriões imaturos de sorgo, no entanto, reduziu o número de embriões formando calos. Segundo estes autores, o efeito inibitório na formação de calos pode ser devido à adsorção de componentes

essenciais do meio de cultura, como 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. Segundo Pan & Staden (1998), a adição de carvão ativado no meio de cultura pode promover ou inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e do explante utilizado.

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. Estes autores constataram também que, em diferentes cultivares de sorgo, o cultivo de embriões imaturos e CEC em meio N6 suplementado com altas concentrações de asparagina e prolina (1-3 g L<sup>-1</sup>) permite a obtenção de CEF. No entanto, neste experimento, na maioria dos genótipos estudados, inflorescências imaturas cultivadas em meio MS suplementado com asparagina e cinetina (CIM) apresentaram maior proliferação de calos embriogênicos e menor presença de mucilagem e escurecimento de calos e meio de cultura do que inflorescências cultivadas em meio N6 suplementado com prolina (100 mg L<sup>-1</sup>).

Resultados semelhantes foram encontrados por Kaeppler & Pedersen (1996) que também observaram maior formação de calos embriogênicos e menor formação de mucilagem e pigmentação escura, na maioria dos genótipos de sorgo cultivados em meio MS basal do que no meio N6 basal. Estes autores também utilizaram como explantes inflorescência imatura. Concordando com o tipo de explante utilizado, Elkonin & Pakhomova (2000) também observaram maior formação de CE, em inflorescências imaturas de sorgo cultivadas em meio MS do que no meio N6. Estes resultados corroboram com as afirmações de Guo & Liang (1993) e de Gupta et al. (2006). Segundo esses autores, a formação de calos 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 & Pederson (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.

### 3.2 Regeneração de plantas através de embriogênese somática

O teste para a regeneração de plantas foi conduzido com as linhagens CMSXS 102B, 107B, 112B, 156B, 157B, 210B, 230B e 232B, as quais produziram calos embriogênicos em meio CIM.

A frequência de regeneração está representada na Tabela 4. Todas as linhagens testadas mostraram capacidade 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 as linhagens CMSXS 112B e 232B, que tiveram alta formação de CE, mas baixa produção de CEF, apresentaram taxa de regeneração baixa (7,7% e 26,7%, respectivamente), concordando, portanto, com os resultados de Kaeppler & Pedersen (1997) e de Seetharama et al. (2000), em que CEF de sorgo foi considerado altamente favorável para regeneração.

A frequência de regeneração para as linhagens CMSXS 157B e 210B foi de 21% e 28,6%, respectivamente e, para as linhagens CMSXS 107B, 112B e 230B foi baixa, variando de 1,18% a 7,70%. Ma et al. (1987), com objetivo de identificar genótipos de sorgo capazes de formar calos e regenerar plantas, utilizaram como explante embriões imaturos. Os autores constataram que alguns genótipos não produziram calos regeneráveis e outros apresentavam alta frequência de regeneração, dependendo do meio de cultura utilizado. Isso indica que cultura de embriões pode ser dependente do meio.

Nossos resultados revelaram que o tipo de meio de cultura utilizado, nas linhagens testadas de sorgo, influenciou na formação de calos embriogênicos. Foi constatada a superioridade do meio CIM em relação ao meio N6, que apresentou formação de CE em quase todas as linhagens. Desse modo, para o teste de regeneração, foram utilizados somente calos formados a partir de explantes cultivados em meio CIM, o qual apresenta, em sua composição, dois reguladores de crescimento, auxina ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D) e citocinina ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  cinetina).

Vários estudos demonstraram que a combinação de determinados reguladores de crescimento estimula 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 em combinação com citocinina, foram altamente regeneráveis. Cai & Butler (1990) recomendam a combinação de baixas concentrações de auxinas e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de citocinas para regeneração de plantas de sorgo. Corroborando com esta afirmação, Hagio (2002) afirma 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 & Miller (1957), citocinina junto com auxina tem um papel essencial na morfogênese de plantas, tendo forte influência na formação de raízes e brotos e seu relativo crescimento.

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 & Smithe (1985), estudando morfogênese em milho, concluíram que a regeneração é um caráter herdável. Alta estimativa de herdabilidade para regeneração de planta também foi reportada por Lazar et al. (1984), em trigo e Wu & 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.

**TABELA 4** – Embriogênese e regeneração de calos de inflorescências de sorgo cultivadas em meio CIM.

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

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente (Tukey, 0,05).

## 4 CONCLUSÕES

O cultivo de inflorescência jovem em meio de cultura CIM se mostrou adequado para a formação de calos embriogênicos friáveis e regeneração *in vitro* em linhagens elites de *Sorghum bicolor* L. Moench.

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

Este protocolo poderá ser utilizado em diferentes programas de melhoramento para a introdução de genes de interesse em plantas de sorgo.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, 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, 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, p.101–110, 1990.
- CAI, T.; DALY, B.; BUTLER, L. Callus induction and plant regeneration from shoot portions of mature embryos of high tannin sorghum. **Plant Cellular Tissue and Organic Culture**, 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 Cellular Reports**, New York, v.14, p.116-119, 1994.
- 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, 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, 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, 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. Part. 2, 1361p.

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: 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**, San Francisco, 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 Tiss Organic Culture**, v.86, p.379-388, 2006.

HAGIO, T. Adventitious shoot regeneration from immature embryos of sorghum. **Plant Cellular Tiss Organic Culture**, v.68, 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. **Nat. 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.; 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.

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.

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, 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

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**, Roma, 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 Applied Genetic**, v.68, p.131-134, 1984.

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

MA, H.; GU, M.; LIANG, G.H. Plant regeneration from cultured immature embryos of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Theoretical Applied Genetic**, v.73, p.389-394, 1987.

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, p.741-744, 2006.

MADAKADZE, R.M.; KROCHKO, J.E.; SENARATNA, T. Identification and characterization of storage proteins in zygotic and somatic embryos of geranium (*Pelargonium x hortorum*). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.125, p.525-529, 2000.

MCKERSIE B.D.; BROWN D.C.W. Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. **Seed Science Research**, v.6, p.9-126, 1996.

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.

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, 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. **PNAS**, 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, 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, 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.

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

PENCE, V.C. Abscisic acid and the maturation of cacao embryos *in vitro*. **Plant Physiology**, v.98, p.1391–1395, 1992.

PERÁN-QUESADA, R.; SÁNCHEZ-ROMERO, C.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. **Scientia Horticulturae**, v.102, p.64-73, 2004.

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.

SEETHARAMA, N.; SAIRAM, R.V.; RANI, T.S. Regeneration of sorghum shoot apex cultures and field performance of the progeny. **Plant Cell Tissue Organic Culture**, v.61, 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. Curr. Science**, v.58, p.586–588, 1989.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biology**, v.11, p.118-231, 1957.

TADESSE, Y.; SÁGI, L.; SWENNEN, R.; JACOBS, M. Optimisation of transformation conditions and production of transgenic sorghum (*Sorghum bicolor*)

via microparticle bombardment. **Rev. Plant Biotechnology Applied Genetics**, v.75, p.1-18, 2003.

TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, 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**, Berlin, v.70, p.505-509, 1985.

THOMAS, T.L. Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview. **Plant Cell**, v.5, p.1401–1410, 1993.

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 Tiss Organic 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**, Rome, v.52, p.243-252, 1998.

**CAPÍTULO IV: GENETIC TRANSFORMATION OF IMMATURE  
SORGHUM INFLORESCENCE VIA MICROPROJECTILE  
BOMBARDMENT**

## RESUMO

BRANDÃO, Rosângela Luci. Genetic Transformation of Immature Sorghum Inflorescence via Microprojectile Bombardment. In: \_\_\_\_\_. **Transformação genética de *Sorghum bicolor* (L. Moench), visando tolerância ao Al<sup>3+</sup>**. 2007. Cap 4, p. 66-91. Tese (Doutorado em Agronomia. Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Um sistema de transformação por meio do bombardeamento de partículas para genótipos de sorgo foi desenvolvido usando fragmentos de inflorescência imatura como explante. Os parâmetros biobalísticos testados, por meio da observação da expressão transiente do gene repórter antocianina, incluem pressão do gás hélio, distância percorrida pelo microcarreador e permanência dos explantes em meio osmótico. Maior expressão do gene da antocianina foi obtida quando calos embriogênicos foram cultivados em meio osmótico durante 4 horas antes do bombardeamento, posicionados a 3 cm de distância da plataforma do microcarreador e bombardeados com uma pressão de aceleração do gás hélio de 1000 psi. Esses parâmetros foram utilizados para a geração de plantas transgênicas de sorgo contendo os genes *bar* e *uidA*. A eficiência da transformação usando esse protocolo variou de 1,01% a 3,33%. O tempo total requerido desde o bombardeamento dos explantes até o estabelecimento de plantas no solo foi de 16 semanas. A maioria das plantas transformadas era morfológicamente normal. A integração estável, a expressão e a herança dos genes transgênicos foram confirmadas por análise molecular e genética. O gene *bar* segregou de maneira mendeliana nas progênies T<sub>1</sub> da maioria das plantas transgênicas.

Palavras-chave: Biobalística, transformação sorgo, antocianina.

---

Comitê Orientador: Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA/ DQI (orientador); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-orientadora), Embrapa Milho e Sorgo

## ABSTRACT

BRANDÃO, Rosângela Luci. Genetic Transformation of Immature Sorghum Inflorescence via Microprojectile Bombardment In: \_\_\_\_\_. **Transformação genética de *Sorghum bicolor* (L. Moench) visando tolerância ao Al<sup>+3</sup>**. 2007. Cap 4, p. 66-91. Thesis (Doctoral Program in Agronomia/ Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG -Brazil.\*

A microprojectile bombardment transformation system for sorghum genotype was developed using fragments of immature inflorescences as explants. Biolistic parameters tested, throughout the analysis of the transient expression of anthocyanin reporter gene, included time of explants on osmoticum prior bombardment, pressure of the accelerating helium pulse, and microprojectile flying distance. Higher transient expression of the anthocyanin reporter gene was attained when embryogenic calli were cultivated in osmotic medium during 4 hours before the bombardment, positioned at 3 cm distant from the microcarrier release platform and shot at 1000 psi of helium accelerating pressure. These parameters were used to generate transgenic sorghum plants containing *bar* and *uidA* genes. Transformation efficiency ranged from 1.01 to 3.33%. The total time required from explant bombardment to the establishment of plants in soil was 16 weeks. Most of the transformants were morphologically normal. Stable integration, expression, and inheritance of the transgenes were confirmed by molecular and genetic analysis. Transgenes in T<sub>1</sub> progeny segregated in a Mendelian fashion in the majority of events

Key-words: Biolistics, sorghum transformation, anthocyanin.

---

Guidance Committee: Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA/ DQI (advisor); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-advisor), Embrapa Milho e Sorgo.

## 1 INTRODUCTION

Sorghum, an important crop in the arid and semi-arid regions of the world, is primarily used in Brazil as a supply for an increasing livestock market. However, it has been verified that Brazilian sorghum productivity is low (1,500 to 2,500 kg/ha) and extremely variable along the years, typical of a culture sowed in marginal climate conditions and mainly, without the use of high input technologies (Coelho et al., 2002). Conventional breeding programs have already done a great deal of researches to increase the sorghum productivity, though in some fields, the gains obtained by these programs are reaching stationary levels due to a lack of genetic variability that can be readily used in crop improvement programs (Nwanze et al., 1995). Alternatively, recombinant DNA technology and the generation of transgenic plants can amplify the gene pool that can be used to improve sorghum environmental fitness and nutritional qualities.

However, unlike others poaceae sorghum transformation has been a challenging mainly due to recalcitrance in tissue culture and long periods of selection required for the recovery and regeneration of putative transgenic plants (Casas et al., 1993, Zhao et al., 2000; Jeoung et al., 2002; Howe et al., 2006). Nevertheless, since the earliest 90's, the work of some laboratories around the world have been generating improvements in sorghum regeneration and transformation that are ensuing in more consistent protocols. Transgenic sorghum plants have been generated via biolistic (Casas et al., 1993; Casas et al., 1997; Zhu et al., 1998; Able et al., 2001; Emani et al., 2002; Jeoung et al., 2002; Devi & Sticklen, 2003; Tadesse et al., 2003; Girijashankar et al., 2005) or *Agrobacterium* mediated transformation (Zhao et al., 2000; Carvalho et al., 2004; Gao et al., 2005; Howe et al., 2006; Van Nguyen et al., 2007). The efficiency of the mentioned protocols range from 0.08% to 5%, where the highest level of transformation was achieved using the *Agrobacterium*.

Immature zygotic embryos were the target explant choice for the majority of the sorghum transformation protocols (Casas et al., 1993; Able et al., 2001; Emani et al., 2002; Jeoung et al., 2002; Carvalho et al., 2004; Gao et al., 2005;



Howe et al., 2006;), but mature embryos (Tadesse et al., 2003), shoot tips (Tadesse et al., 2003; Girijashankar et al., 2005), calli formed from immature inflorescence (Casas et al., 1997) or from shoot apices (Devi & Sticklen, 2003) have also been used with limited success. One of the constraints in working with immature embryos is the intensive work to generate large quantities of explants to be used in the transformation procedures; in this sense, immature inflorescences are easier to work with and show very good regeneration rates in tissue culture (Cai & Butler, 1990; Kaepler & Pedersen, 1997; Jogeswar et al., 2007).

Even though outstanding studies aiming to identify sorghum genotypes able to produce high quality callus from immature inflorescence in tissue culture have been conducted, the efficiency to produce transgenic sorghum plants using this type of explant is still very low which imply in a labor-intensive procedure. Here, we report improvements made in the transformation process that enable us to obtain a reliable protocol where putative transgenic plants can be produced with higher efficiency and shorter period of time from immature sorghum inflorescence.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Plant material and explant preparation

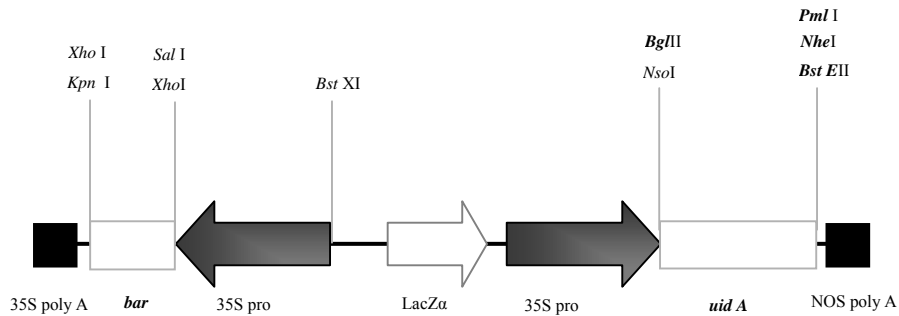
Seeds from nine *Sorghum bicolor* (Moench L.) accessions were obtained from the Embrapa Maize and Sorghum National Research Center – Brazil. Shoots were harvested at different developmental stages (3 to 5 cm in length), from field grown plants previous to the appearance of the flag leaf. The outermost leaf blades were removed and shoots rinsed with 70% ethanol and sterile distilled water. Following, immature inflorescences were dissected, under sterile conditions, chopped into segments of approximately 5 mm long and cultivated on callus induction medium (CIM) as described by Tadesse et al. (2003) , with minor modifications [MS salts (Murashige & Skoog, 1962), 1 mg L<sup>-1</sup> thiamine HCl, 7.5 mg L<sup>-1</sup> glycine, 100 mg L<sup>-1</sup> DL-asparagine, 100 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol, 0.2 mg L<sup>-1</sup> kinetin, 2.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D and 30 g L<sup>-1</sup> sucrose]. Medium pH was adjusted to 5.8 with 1 N potassium hydroxide prior autoclaving. Cultures were incubated at 25°C in dark, embryogenic calli start to appear as soon as two weeks of incubation.

For the biolistic experiments 30 calli pieces of approximately 3 mm diameter were uniformly distributed within a 35 mm diameter circle of 60 x 15 mm Petri dishes containing CIM media in which a higher osmotic value was achieved by the addition of 12% sucrose.

### 2.2 Plasmid constructs

The genetic cassettes p35S::*Cl* and p35S::*Bperu* (Goff et al., 1990), used in the transient transformation experiments, were made available by Dr. Vicki Chandler from the Department of Plant Science, University of Arizona, Tucson, Arizona. These plasmids contain the CaMV35S promoter, directing the expression of *B-peru* (1.9Kb) and *Cl* (1.1 Kb) cDNAs, maize *Adh1* intron and nopaline synthase terminator. For the stable transformation experiments it was used the plasmid pCAMBIA3301 (Cambia, Canberra, Australia) which contains  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene (Jefferson et al., 1987) and the *bar* gene (De

Block et al., 1987) that encodes phosphinothricin acetyltransferase (PAT), both driven by the CaMV35S promoter (Figure 1).



**Figure 1** - Transformation vector pCambia 3301 expression cassette. Arrows indicate cloning direction. Regulatory sequences (polyadenylation signals – poly A and promoters –pro) are shown as filled segments and coding sequences as unfilled ones. NOS = nopaline synthase, lacZ $\alpha$  =  $\alpha$  subunit of bacterial lactase.

### 2.3 Particle bombardment

Embryogenic calli were bombarded with tungsten microprojectiles using a biolistics particle helium acceleration device (Biomics – Brasília / Brazil). For the transient experiments 3  $\mu$ L of each plasmid (stock 1  $\mu$ g/ $\mu$ L), p35S::CI and p35S::Bperu, were co-precipitated with tungsten particles, while for the stable transformation 5  $\mu$ L pCAMBIA3301 plasmid (stock 1  $\mu$ g/ $\mu$ L) were used. To precipitate DNA onto the microparticles, DNA plasmidial were mixed with 50 $\mu$ L (60 mg.mL<sup>-1</sup>) tungsten particle M10 (Sylvania, GTE Chemicals/ Towanda – USA) under low agitation. Next, 50 $\mu$ L of 2.5M CaCl<sub>2</sub> and 20 $\mu$ L of 0.1M spermidine were sequentially added and homogenized. The mixture was kept for three minutes under low agitation and for an additional three minutes without agitation. Particles coated with DNA were centrifuged five seconds and the supernatant was removed. DNA-coated particles were washed carefully once with 150 $\mu$ L 70% ethanol, twice with 100% ethanol, and suspended in 60 $\mu$ L 100% ethanol. Seven microliters of DNA-coated particle were deposited at the center of sterile macrocarries membrane (Ficael, São Paulo, SP).

Eighteen treatments (Table 1) were designed to test the time of explants on osmoticum prior bombardment, pressure of the accelerating helium pulse, and microprojectile flying distance, in transient sorghum transformation. The distance between the high pressure chamber and the macrocarrier membrane (8 mm), the distance between the macrocarrier membrane and the retention screen (17 mm) and the vacuum pressure (27 mmHg) were maintained constant. For each treatment three plates containing 30 calli pieces were bombarded once.

**TABLE 1:** Conditions tested in stable transformation experiments.

Treatments	Osmotic Media (hours)	Helium Pressure (psi)	Microcarrier Flying Distance (cm)
1	0	1 000	3
2	0	1 000	6
3	0	1 000	9
4	4	1 000	3
5	4	1 000	6
6	4	1 000	9
7	24	1 000	3
8	24	1 000	6
9	24	1 000	9
10	0	1 200	3
11	0	1 200	6
12	0	1 200	9
13	4	1 200	3
14	4	1 200	6
15	4	1 200	9
16	24	1 200	3
17	24	1 200	6
18	24	1 200	9

## 2.4 Expression analysis

*Anthocyanin:* For the anthocyanin expression studies, bombarded calli were incubated at 25°C for two days in the darkness. The number of anthocyanin spots was scored under a stereoscope (Zeiss Stemi SV11).

*GUS*: GUS expression was detected after explants being incubated at 37°C for 20 h in a solution containing 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D glucuronide (X-Gluc, Sigma Chem. Co.), 50 mM phosphate buffer pH 6.8, 20% methanol, 1% Triton X-100 (Rueb & Hensgens, 1998). After staining, chlorophyll was extracted from leaf tissue in 70% ethanol for 30-60 min.

*PAT*: Seeds from four independent transgenic T<sub>0</sub> plants tested positive by PCR and PAT activity analyses were propagated, and the T<sub>1</sub> plants screened for PAT and GUS enzyme activity inheritance. From each T<sub>0</sub> line 50 seeds were propagated in greenhouse. Seedlings with four leaves were sprayed with 0.6% aqueous solution of the commercial herbicide Finale<sup>TM</sup> (Agrevo) to confirm expression of the *bar* gene. Control non-transgenic plants or segregating seedlings showed symptoms in 2–5 days and were dead within 2 weeks. Leaf material from PPT-resistant plants was GUS stained as described above. Chi-square goodness of fit was used to test the significance of observed versus expected ratios.

## 2.5 Selection procedures

Explants were cultured on solid CIM media at 25°C in the dark for one week before the beginning of selection. Following, they were transferred to selective SE media (modified CIM supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> kinetin and without DL-asparagine) containing 15  $\mu$ L L<sup>-1</sup> of the herbicide Finale<sup>®</sup> (3 mg L<sup>-1</sup> 4-hidroxi(methyl) phosphynol-DL-homoalanine ammonium salt) for one week. After that the explants were moved to 30 and 45  $\mu$ L L<sup>-1</sup> herbicide on weekly basis. Growing calli were cultured for one more week in a SE media supplemented with 45  $\mu$ L L<sup>-1</sup> herbicide, and subsequently transferred to a callus maturation media RM [MS salts and vitamins (Murashige & Skoog, 1962), 60 g L<sup>-1</sup> sucrose, 100 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol, 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA, 3 g L<sup>-1</sup> phytigel, pH 5.8) supplemented with 30  $\mu$ L L<sup>-1</sup> herbicide and cultured in the dark at 25°C for somatic embryo maturation. Approximately 2 to 4 weeks later, mature somatic embryos showing a white and opaque coloration were transferred to Magenta boxes (Sigma – São Paulo - Brazil) containing germination media composed by MS media without plant growth regulators, supplemented with 15  $\mu$ L L<sup>-1</sup> herbicide and placed in a lighted (16 hours

/ 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) growth room. Germinated plantlets (4-6 cm) were cultured in soil, for the first week under a plastic lid, in a greenhouse.

## **2.6 Plant DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) and Southern blot hybridization analysis**

*PCR:* Total genomic DNA was isolated from leaf tissue of primary transformants using a CTAB protocol described by Saghai-Marooof et al. (1984). The presence of *bar* and *uidA* genes were detected, initially, by the Polymerase Chain Reaction (PCR). The 407 bp coding region of *bar* gene was amplified using primers (AGAAACCACGTCATGCC and TGCACCATCGTCAACCAC). The 406 bp coding region of *uidA* gene was amplified using the specific primers (TCGTGCTGCGTTTCGATG and GCATCACGCAGTTCAACG). Each 25  $\mu\text{L}$  amplification reactions containing 50 ng of template DNA, 5  $\mu\text{M}$  each primer, 500  $\mu\text{M}$  dNTP mixture, 2.5  $\mu\text{L}$  Taq DNA polymerase reaction buffer and 1 unit Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) were carried out using a thermal cycler (Eppendorff Mastercycler) under the following conditions: 94°C for 5 min; 30 cycles 94°C for 60 s; 55°C for 30s, and a final extension at 72°C for 10 min. The amplified products were separated by electrophoresis in a 1.2% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

*Southern Blot:* Ten micrograms of total genomic DNA from each  $T_0$  plant was completely digested with *XhoI* at 37°C overnight. Digested DNA fragments were separated by electrophoresis in 0.8% agarose gel, then transferred onto a Hybond-N<sup>+</sup> nylon membrane (Amersham, São Paulo, Brazil) according to Sambrook et al. (1989). The blot was hybridized with a P<sup>32</sup> labeled *bar* gene coding region. Negative control samples consisted of non-transgenic genomic DNA. After overnight hybridization at 65°C, the membranes were washed in 2X SSC, 0.1% SDS at room temperature and in 1X SSC, 0.1% SDS at 65°C and were exposed to Kodak<sup>TM</sup> XAR-5 film at 75°C for 3 days.

## **2.7 Statistical analysis**

The data obtained from the experiment measuring transient was collated in Microsoft Excel (Version 5). The experimental design was in randomized blocks, factorial 2x3x3 (2 pressure of the accelerating helium pulse, 3 time of explants on osmoticum and 3 microprojectile flying distance), with three application, totalizing 54 experimental units. Data were subjected to ANOVA and means compared by Tukey test ( $p < 0.05$ ), using the statistical program SISVAR 4.0 (Ferreira, 2000).

### 3 RESULTS

#### 3.1 Explant preparation and selection of transformed calli in vitro

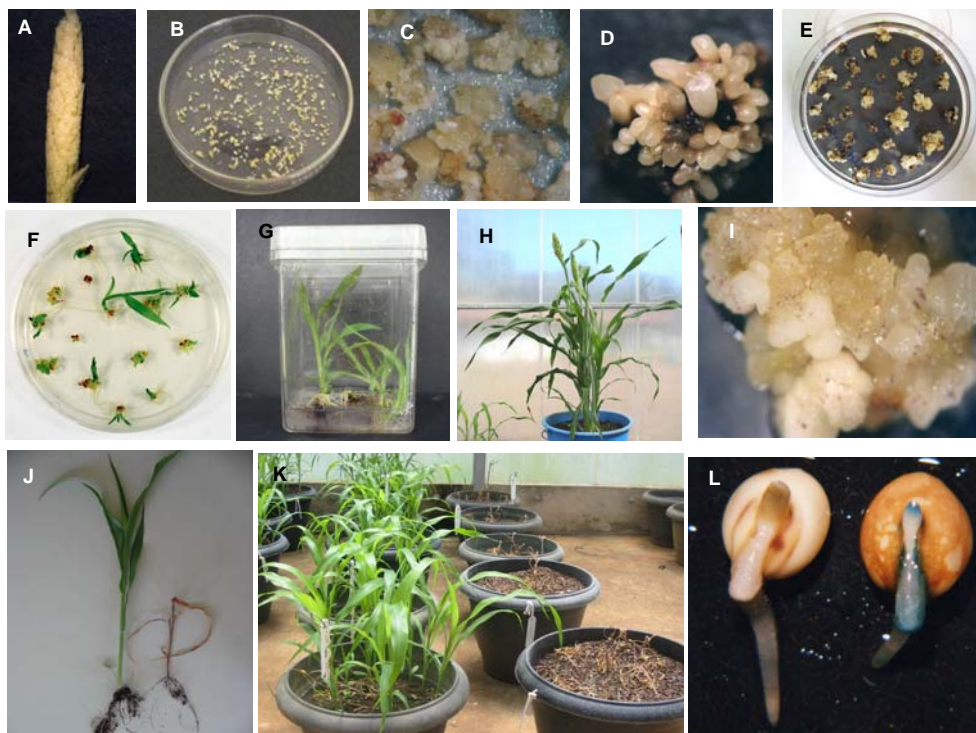
Nine *Sorghum bicolor* (Embapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas-MG, Brazil) accessions were selected and screened for the quality of callus produced 4 weeks after cultivation of immature inflorescence on callus induction media (CIM). Embryogenic calli were produced at different level of efficiency by all of the accessions (data not shown), however the accession CMSXS102B had a higher percentage of immature inflorescence sections producing embryogenic callus (85%) and was used in this study.

Explants from immature inflorescence of sorghum were subjected to bombardment two weeks after cultivation in CIM media (Fig. 2A, B and C), with plasmids contained the *B-peru* and *Cl* or *bar* and GUS genes for transient and stable transformation experiments, respectively. Within this cultivation period, explants start to expanded and enlarge at the edges. Embriogenic calli had a compact appearance, initially. The yellowish, compacted bombarded calli developed in more friable structures in the next weeks of cultivation. After bombardment, calli were transferred back to CIM media without selection pressure for one week, and then transferred to selection medium. Growth of bombarded callus was slightly inhibited and some of them turned brown on selection medium supplemented with 3.0 mg L<sup>-1</sup> of PPT, compared to non-bombarded ones. When the concentration of PPT on selection medium was increased to 6 mg L<sup>-1</sup> most of bombarded calli turned black, after one week cultivation. To reduce escapes within chimerical clusters, surviving bombarded clumps were carefully divided and cultured, at one week intervals, onto selection medium supplemented with 9 mg L<sup>-1</sup> of PPT, during four weeks. At this herbicide concentration complete inhibition of bombarded calli growth was observed, most calli turned dark, necrotic and died (Fig. 2D). In preliminary studies (data not shown) we could not regenerate any transgenic sorghum plants when bombarded calli were cultivated on selection media supplemented with 9 mg L<sup>-1</sup> directly after the resting period, then again when selection was done using 3 or 6 mg L<sup>-1</sup> PPT during the entire process, a lot of



escapes plants regenerated . A gradual increase in the concentration of the selective agent probably decrease the growth rate of the non-transgenic cells, allowing the transgenic ones to developed in a healthier environment, without toxic compounds released from dead non-transgenic cells. After six weeks selection, calli were transferred onto maturation media supplemented with 6 mg L<sup>-1</sup> of PPT. On this medium, as soon as the yellowish calli become white and opaque, between 2 to 4 weeks of cultivation, they were transferred onto germination medium. A concentration of 3 mg L<sup>-1</sup> of PPT was used for the differentiation and germination of mature calli that occurs around 20 days of cultivation. Control non-bombarded explants did not survive on selection medium containing 6 mg L<sup>-1</sup> of PPT. This selection procedure has been used successfully in different transformation experiments using calli derived from immature inflorescence of sorghum.

Bombarded calli was kept on selection and/or maturation media for 10 to 12 weeks, and up to 4 weeks in the germination medium. The overall time for selection and regeneration of putative transgenic plants using this protocol is around 16 weeks (Fig. 2A-H)



**Figure 2.** Transformation of *Sorghum bicolor* plants mediated by biolistic. (A) Isolated immature inflorescence; (B) segments of immature inflorescences on callus induction medium (CIM); (C and D) Embryogenic callus induced from immature inflorescence; (E) PPT-resistant callus obtained 6 weeks after bombardment-mediated transformation and selection; (F and G) Regeneration of seeds from PPT resistant callus; (H ) Transgenic *Sorghum* plants; (I) Transient anthocyanin expression three days after bombardment of embryogenic callus; (J and K) Transformed (left) and untransformed (right) regenerated plants 2 weeks after local application of herbicide to the leaves; (L) GUS staining of control (left) and transgenic (right) germinated seeds.

### 3.2 Transient and stable transformation

Factors such as the length of explants on higher osmotic media prior bombardment, the accelerating pressure of helium pulse, and the microprojectile flying distance, control the success of plant transformation via biolistic. These factors may vary among the different explants used, therefore it is important their optimization to guarantee a successful gene transfer. In this study, the optimization of DNA delivery parameters was initially performed using the transient expression of maize *R* and *CI* transcriptional activators. All bombardments were carried out

with plasmidial DNA from the same stock, and the number of anthocyanin spots ranged from 3 to 348 depending on the particle bombardment conditions used.

Statistical data analyses of the transient anthocyanin expression (Fig.2I – Table 2) identify interactions among the different factors studied. Embryogenic calli submitted to 1000 psi of helium accelerating pressure, cultivated during four hours in a higher osmotic medium and positioned at 3 cm from the microcarrier launch platform (Treatment 4) presented a number of cells expressing anthocyanin significantly larger than when the explants were positioned at 6 or 9 cm (Treatment 5 and 6). Without the pre-cultivation of explants in an osmotic medium, there were no difference among the positioning of explants (Treatments 1 to 3) and the overall amount of anthocyanin spots was lower. When the acceleration pressure was raised to 1200 psi the only significant difference that emerged among the treatments 10 to 18 was when embryogenic calli were pre-cultured during 24 hours under a higher osmotic pressure and positioned at 3 or 6 cm from the microcarrier launch platform (Treatments 16 and 17).

The highest number of cells expressing the anthocyanin genes was attained when embryogenic calli were cultivated in osmotic medium during 4 hours before the bombardment, positioned at 3 cm distant from the microcarrier release platform and shot using 1000 psi of helium accelerating pressure. Therefore, this conditions were used in six independent experiments to test stable transformation of embryogenic calli obtained from immature sorghum inflorescences, with a cassette containing the *bar* and *iudA* genes. The transformation efficiency for these sets of experiments ranged from 1.01% to 3.33 % (Table 3).

**Table 2.** Mean number of anthocyanin spots induced transiently by Ubi+Anthocyanin+NOS constructs in embryogenic callus of the sorghum.

Time in osmotic medium	TARGET DISTANCE		
	Pressure 1000 psi		
	3 cm	6 cm	9 cm
Without pre-treatment	(1) 30,2833 aA	(2) 47,2466 aA	(3) 37,0133 aA
4 hours	(4) 91,3566 bB	(5) 52,7866 aAB	(6) 31,1700 aA
24 hours	(7) 74,9300 bA	(8) 79,2400 aA	(9) 42,8133 aA
Time in osmotic medium	Pressure 1200 psi		
Without pre-treatment	(10) 43,1833 aA	(11) 41,6866 aA	(12) 44,6266 aA
4 hours	(13) 44,7366 aA	(14) 74, 2633 aA	(15) 44,3700 aA
24 hours	(16) 88,5766 bB	(17) 59,0866 aB	(18) 18,3433 aA

Note: Means followed by the same small letter in the vertical and capital letter in the horizontal are not significantly different at 5% level according to Tukey's multiple range test. Numbers in parentheses represent the number different treatments.

**Table 3:** Biolistic transformation of calli from immature sorghum inflorescence.

Experiment number	Number of events	Number of callus bombarded	% Efficiency
RLB3962008	1	93	1.07
RLB5420703	3	120	2.5
RLB5430703	2	60	3.33
RLB5222202	2	180	1.11
RLB020106	3	296	1.01
RLB120705	2	150	1.33

### 3.3 Evaluation of transgenic material

To estimate the transgene copy number and the inheritance of the *bar* gene, T<sub>1</sub> progenies were tested for their tolerance to the herbicide Finale®. Germinated T<sub>1</sub> transgenic and control seedlings at the stage of five leaves were sprayed with herbicide and scored for damage seven days after the application. Transgenic

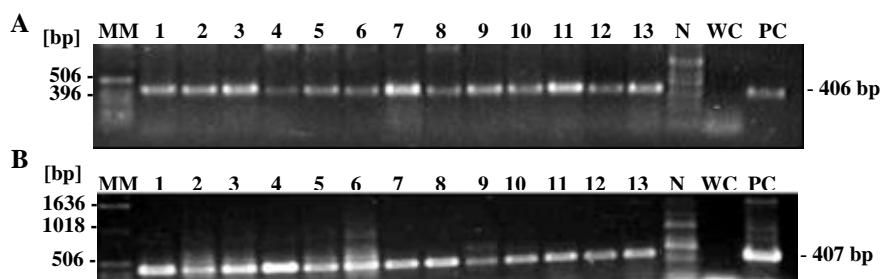
seedlings segregated for the presence of the *bar* gene, there were plants with and without tissue damage, while all control non-transgenic plants presented necrosis and die (Fig. 2J and K).

Segregation data obtained from six T<sub>1</sub> progenies sprayed with herbicide is presented in Table 4. Among the progenies of self pollinated T<sub>0</sub> transgenic plant lines, Chi-square tests showed a Mendelian segregation ratio of 3:1 for four lines. Indicating that the *bar* gene was inserted in a single locus, efficiently inherited and transcribed in T<sub>1</sub> progeny plants. Two lines (Lines 5 and 6) showed a 1:1 ratio, suggesting semi-dominance.

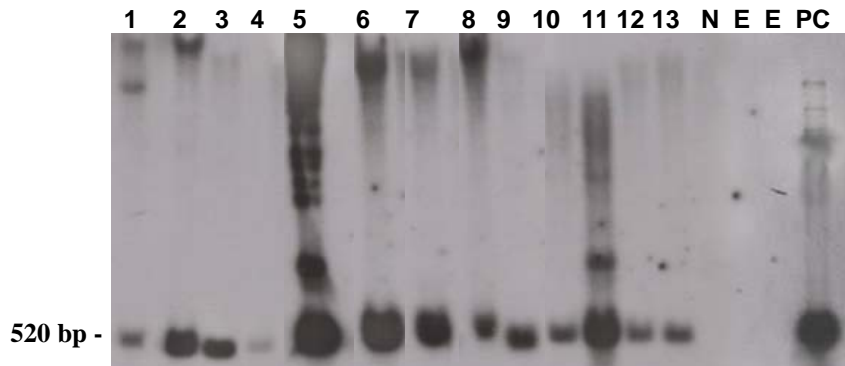
Leaves of all T<sub>0</sub> transgenic events tested negative for the β-glucuronidase expression. However, GUS expression could be detected in germinated seeds (T<sub>1</sub>) of event RLB5420703 (Fig. 2L).

The presence of *uidA* and *bar* genes in genomic DNA of 16 independent T<sub>0</sub> lines was confirmed by PCR analysis of genomic DNA. The results revealed the presence of 406 bp band of *uidA* and 407bp band of *bar* genes in all of the plants tested (Fig. 3A and B).

The stable integration of the *bar* gene in the transgenic events were analyzed by Southern blotting of genomic DNA digested with *Xho*I, which cuts outside the *bar* coding sequence releasing a 564 bp fragment. No hybridization signal was present in the digested DNA from the untransformed plants (Fig. 4).



**Figure 3.** PCR analysis of genomic DNA from primary (T<sub>0</sub>)transformants. (A) PCR amplification of a *uidA* gene, showing the 406 bp fragment (lanes 1-13). (B) PCR amplification of a 407 bp fragment of the *bar* gene (lanes 1-13). MM, molecular weight marker; N, control non-transgenic sorghum plants; W, water control; P, positive control (plasmid).



**Figure 4.** Southern blot analysis of genomic DNA from transgenic sorghum plants (cultivar CMSXS 102B). Genomic DNA was digested with *Xho*I and hybridized with a radiolabelled 520 pb *bar* fragment of plasmid DNA. Lanes: 1-13 putative transformed plants; N, non-transgenic *S. bicolor* DNA; E, empty lane; P, positive control (plasmid).

**Table 4** Independent transgenic T<sub>1</sub> generation plants analyzed for the inheritance and segregation of PPT resistance

Lines Number	The number of PPT-resistant plants	The number of PPT-sensitive plants	Segregation ratio (PPT resistant-:PPT sensitive-plants)	Chi-square
1 (RLB3962008)	28	16	3:1	$\chi^2 = 3,03$ ; P>0,05
2 (RLB5222202)	07	01	3:1	$\chi^2 = 0,67$ ; P>0,05
3 (RLB5430703)	34	12	3:1	$\chi^2 = 0,029$ ; P>0,05
4 (RLB5420703)	37	8	3:1	$\chi^2 = 1,25$ ; P>0,05
5 (RLB2109056A)	23	25	1:1	$\chi^2 = 0,83$ ; P>0,05
6 (RLB2109053B)	28	20	1:1	$\chi^2 = 1,33$ ; P>0,05
Wild-type plant (CMSXS102B)	0	50	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>

<sup>a</sup> – ND, Not determined

## 4 DISCUSSION

The purpose of this study was to develop an efficient and reproducible transformation system for immature inflorescence of sorghum. Immature inflorescence proved to be an excellent explant by increase considerably the quantity of tissue competent of embryogenic callus production. A large number of high quality callus is relatively easy and fast to produce from immature inflorescence. It seems that the ability of this tissue to form embryogenic callus is less genotype dependent than immature embryos, because inflorescence from several cultivars tested by Kaepler & Pedersen (1997), Casas et al. (1997) and, also, by this study produced embryogenic callus, even though in variable quality and quantity. This makes the immature inflorescence an effective tissue to be used in different research programs aiming to introduce agronomic important genes in sorghum through genetic transformation.

Transient expression of anthocyanin was used to adjust biolistic parameters for the production of stable transgenic plants. We chose to work with this report gene because its expression does not require fixation or substratum, the protein accumulates in isolate cells, and did not express in tissue seriously wounded (Bowen, 1992). Therefore, anthocyanin allows us to detect in a rapid and precise manner the most efficient combination of biolistics parameters that rendered a higher transient expression. The frequency of transient activity expression as an indicator of stable transformation efficiency has already been used, successfully, by Christiansen et al. (2005) to optimize the transformation conditions of *Brachypodium distachyon*. They observed that treatments with a higher number of GUS spots where the ones that produced a larger number of stable transgenic events.

An important step in the transformation via biolistics is the wound suffered by the explant during the microparticle incursion into the cell. Usually to minimize this type of problem and to increase the capacity for somatic embryogenesis and plant regeneration, the target cells are plasmolised by an osmotic treatment (Armaleo et al., 1990; Vain et al. 1993; Brettschneider et al., 1997, Devi &

Sticklen, 2002). In this study all treatments where sorghum explants were incubated in an osmotic media few hours before bombardment produced a higher number of anthocyanin spots, confirming that plasmolysis of cells can reduce damage and increase the efficiency of bombardments.

Acceleration pressure and microcarrier flying distance are parameters that influence the ability to deliver DNA into various explants. Analyzing the transient expression of anthocyanin, it was observed that a helium gas pressure of 1000 psi combined with a distance of 3 cm rendered the higher number of reporter gene spots. This combination of biolistic physical parameters when tested in stable transformation experiments showed an efficiency of up to 3.33%. Even though, biolistic parameters should be optimized for each equipment and explant used, other authors found optimal bombardment conditions similar to our results. Casas et al. (1993) and Tadesse et al. (2003) were able to generate transgenic sorghum plants via biolistic using a macrocarrier flying distance of 6 cm and a pressure of 1100 psi.

We introduced the *uidA* and *bar* genes under the control of the CaMV35S promoter into sorghum CMSXS102B genome. The transformed statuses of the events produced were determined by a combination of PCR and Southern blot analysis, together with assays demonstrating functional gene product, PAT and GUS, activity. Histochemical GUS activity was absent in leaves of the T<sub>0</sub> plants, but could be detected in the T<sub>1</sub> germinating seeds of one of the events investigated in this study. The absence of GUS expression in transgenic sorghum has been reported by several investigators (Emani et al., 2002; Carvalho et al., 2004; Girijashankar et al., 2005; Van Nguyen et al., 2007). Factors such as methylation based silencing (Emani et al., 2002), regulatory sequences present in the genetic cassette (Chen et al., 1998; Chen et al., 1999; Tadesse et al., 2003; Carvalho et al., 2004), phenolic compounds typically present in the sorghum tissue culture (Jefferson et al., 1987; Vainstein et al., 1993; Santi et al., 2003; Carvalho et al., 2004), might have contributed for the absence of GUS expression.

The analysis of PPT-resistance showed that the trait was expressed by all the transgenic events recovered, probably because of the herbicide selection



pressure. Also, it was inherited by the T<sub>1</sub> progenies with a typical Mendelian segregation pattern in four out of six transgenic lines studied. This indicated that four transgenic lines have single or multiple inserts at the same position of the genome. Two lines showed a 1:1 segregation ratio; this type of segregation had already been reported in wheat, rice and maize (Cheng et al., 1997; Dai et al., 2001; Ishida et al. 1996). This abnormal segregation pattern might be partially caused by gene silence or non-detectable gene expression in the transgenic plants (Cheng et al., 1997). Instability of transgene expression in plants is often associated with multiple copies of transgenes being integrated at the same locus, as well as position effects due to random integration, which may inhibit transgene expression and even lead to transgene silencing (Yao et al., 2006). Moreover, large transgene loci can result in excision of the transgene locus and the undesirable loss of transgene expression in subsequent generations. Particle bombardment often generates multicopy integration at the same transgenic loci (Kohli et al., 2003), and this may lead to co-suppression and gene silencing (Vaucheret et al., 1998; Kikuchi et al., 2005).

We report here a transformation methodology for immature inflorescence of sorghum, via biolistics, with a relatively rapid timeframe that may reduce the somaclonal variation in tissue culture (Cai & Butler, 1990) and shorten the time need to produce transgenic events. These transformation conditions are already in use at Embrapa Maize and Sorghum (Sete Lagoas-MG/ Brazil) to introduce genes of agronomical interest into the sorghum genome.

## 5 REFERENCES

ABLE, J. A.; RATHUS, C.; GODWIN, I. D. The investigation of optimal bombardment parameters for transient and stable transgene expression in sorghum. **In Vitro Cellular Dev. Biology**, v.37, p.341-348, 2001.

ARMALEO, D.; YE, G.N.; KLEIN, T.M.; SHARK, K.B.; SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Current Genetic**, v.17, p.97-103, 1990.

BOWEN, B. Anthocyanin genes as visual markers in transformed maize tissues. In: GALLAGHER, S.R. (Ed.). **Gus protocols: using the gus gene as reporter of gene expression**. London: Oval Road, 1992. p.163-175.

BRETTSCHEIDER, R.; BECKER, D.; LÖRZ, H. Efficient transformation of scutellar tissue of immature embryos. **Theory Applied Genetic**, v.94, p.737-748, 1997.

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.

CARVALHO, C.H.S.; ZEHR, U.B.; GUNARATNA, N.; ANDERSON, J.; KONONOWICZ, H. H.; HODGES, T.K.D.; AXTELL, J.D. *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. **Genetic Molecular Biology**, v.27, p. 259-269, 2004.

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. **Proc. Natl. Academic Science**, v.90, p.11212-11216, 1993.

CASAS, A.M.; KONONOWICZ, A.K.; HAAN, T.G.; ZHANG, L.; TOMES, D.T.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Transgenic sorghum plants obtained after microprojectile bombardment of immature inflorescences. **In Vitro Cellular Dev. Biology**, v.33, p.92-100, 1997.

CHEN, C.; ARDILES-DIAZ, W.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. A poplar gene for caffeoyl-coenzyme A 3-*O*-methyltransferase. **Plant Physiology**, v.120, p.635, 1999.

CHEN, C.; MEYERMANS, H.; VAN DOORSSELAERE, J.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. A gene encoding caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase (CCoAOMT) from *Populus trichocarpa*. **Plant Physiology**, v.117, p.719, 1998

- CHENG, M.; FRY, J.E.; PANG, S.; ZHOU, H.; HIRONAKA, C.M.; DUNCAN, D.R.; CONNER, T.W.; WAN, Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, v.115, p.971-980, 1997.
- CHRISTIANSEN, P.; ANDERSEN, C.H.; DIDION, T.; FOLLING, M.; NIELSEN, K.K. A rapid and efficient transformation protocol for the grass *Brachypodium distachyon*. **Plant Cellular Reports**, v.23, p.75-78, 2005.
- COELHO, A.M.; WAQUIL, J.M.; KARAN, D.; CASELA, C.R.; RIBAS, P.M. Seja o doutor do seu sorgo. Piracicaba: POTAFOS, 2002, 24 p. (Arquivo do agrônomo, 14).
- DAI, S.; ZHENG, P.; MARMEY, P.; ZHANG, S.; TIAN, W.; CHEN, S.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. **Molecular Breeding**, v.7, p.25-33, 2001.
- DE BLOCK, M.; BOTTERMAN, J.; VANDEWIELE, M.; DOCKX, J.; THOEN, C.; GOSSELE, V.; RAO MOVVA, N.; THOMPSON, C.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. **Embo. Journal**, v.6, p.3513-2518, 1987.
- DEVI, P.; STICKLEN, M. Culturing shoot-tip clumps of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] and optimal microprojectile bombardment parameters for transiente expression. **Euphytica**, v.125, p.45-50, 2002.
- DEVI, P.; STICKLEN, M. In vitro culture and genetic transformation of sorghum by microprojectile bombardment. **Plant Biosystems**, v.137, p.249-254, 2003.
- EMANI, C.; SUNILKUMAR, G.; RATHORE, K. S. Transgene silencing and reactivation in sorghum. **Plant Science**, v. 162, p.181-192, 2002.
- FERREIRA, D.F. **Programa SISVAR.exe**: sistema de análise de variância. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.
- GAO, Z.; XIE, X.; LING, Y.; MUTHUKRISHNAN, S.; LIANG, G. H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated sorghum transformation using mannose selection. **Plant Biotechnology Journal**, v.3, p.591-599, 2005.
- GIRIJASHANKAR, V.; SHARMA, H.C.; SHARMA, K.K.; SWATHISREE, V.; SIVARAMA PRASAD, L.; BHAT, B.V.; ROYER, M.; SECUNDO, B.S.; NARASU, M.L.; ALTOSAAR, I.; SEETHARAMA, N. Development of transgenic sorghum for insect resistance against the spotted stem borer (*Chilo partellus*). **Plant Cellular Reports**, v.24, p.513-522, 2005.

- GOFF, S.A.; KLEIN, T.M.; ROTH, A.B.; FROMM, M.E.; CONE, K.C.; RADICELLA, J.P.; CHANDLER, V.L. Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of B regulatory gene into maize tissues. **Embo. Journal**, v.9, p.2517-2522, 1990.
- HOWE, A.; SATO, S.; DWEIKAT, I.; FROMM, M.; CLEMENTE, T. Rapid and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum. **Plant Cellular Reports**, v.25, p.784-791, 2006.
- ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, v.14, p.745-750, 1996.
- JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, v. 6, p. 3901-3907, 1987.
- JEOUNG, J.M.; KRISHANAVENI, S.; MUTHUKRISHNANA, S.; TRICK, H.N.; LIANG, G.H. Optimization of sorghum transformation parameters using genes for green fluorescent protein and  $\beta$ -glucuronidase as visual markers. **Hereditas**, v.137, p.20-28, 2002.
- JOGESWAR, G.; RANADHEER, D.; ANJALIAH, V.; KISHOR, P.B.K. High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench from immature inflorescence explants. **In Vitro Cellular Dev. Biology Plant**, v.43, p.159-166, 2007.
- KAEPPLER, H.F.; PEDERSEN, J.F. Evaluation of 41 elite and exotic inbred *Sorghum* genotypes for high quality callus production. **Plant Cell Tissue Organic Culture**, v.48, p.71-75, 1997.
- KIKUCHI, R.; SAGE-ONO, K.; KAMADA, H.; ONO, M. Efficient transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* with a ternary plasmid in *Pharbitis nil*. **Plant Biotechnology**, v.22, p.295-302, 2005.
- KOHLI, A.; TWYMAN, R.M.; ABRANCHES, R.; WEGEL, E.; STOGER, E.; CHRISTOU, P. Transgene integration, organization and interaction in plants. **Plant Molecular Biology**, v.52, p.247-258, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NWANZE, K.F.; SEETHRAMA, N.; SHARMA, H.C.; STENHOUSE, J.W.; FREDERIKSEN, R.; SHANTHARAM, S.; RAMAN, K. Biotechnology in pest management: improving resistance in sorghum to insect pests. Environmental

impact and biosafety: issues of genetically engineered sorghum. **Afr. Crop Science Journal**, v.3, p.209-215, 1995.

RUEB, S.; HENSGENS, L.A.M. Improved histochemical staining for  $\beta$ -glucuronidase activity in monocotyledonous plants. **Rice Genetic Newsl.**, v.6, p.168-169, 1998.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proc. Natl. Academic Science**, v.81, p.8014-8019, 1984.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v.18, p.88.

SANTI, C.; SVISTOONOFF, L.C.; AUGUY, F.; DUHOUX, E. Choosing a reporter for gene expression studies in transgenic actinorhizal plants of the *Casuarinaceae* family. **Plant and Soil**, v.254, p.229-237, 2003.

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.

TUKEY, J.W. **The problem of multiple comparisons**. Princeton: Princeton University, 1953.

VAINSTEIN, A.; FISHER, M.; ZIV, M. Applicability of reporter genes to carnation transformation. **HortScience**, v.28, p.1122-1124, 1993.

VAIN, P.; MCMULLEN, M.D.; FINER, J.J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cellular Reports**, v.12, p.84-88, 1993.

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 Tiss Organic Culture**, v.91, n.2, p.155-164, 2007.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J.B.; MOURRAIN, P.; PALAUQUI, J.C.; VERNHETTES, S. Transgene-induced gene silencing in plants. **Plant Journal**, v.16, p.651-659, 1998.

ZHAO, Z.Y.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; MILLER, M.; WANG, N.; PANG, H.; RUDERT, M.; SCHROEDER, S.; HONDRED, D.; SELTZER, J.; PIERCE, D.

*Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. **Plant Molecular Biology**, v.44, p.789-798, 2000.

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.

YAO, Q.; CONG, L.; CHANG, J.L.; LI, K.X.; YANG, X.G.; HE, G.Y. Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.14, p.3737-3746, 2006.

**CAPÍTULO V: TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SORGO COM GENE  
*ALMT1* DE TRIGO, VISANDO À OBTENÇÃO DE TOLERÂNCIA AO  
ALUMÍNIO**

## RESUMO

BRANDÃO, Rosângela Luci. Transformação genética de sorgo com gene *ALMT1* de trigo visando à obtenção de tolerância ao alumínio. In: \_\_\_\_\_. **Transformação genética de *Sorghum bicolor* (L. Moench), visando tolerância ao  $Al^{+3}$** . 2007. C. 5, p. 92-116. (Doutorado em Agronomia. Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A toxicidade do alumínio ( $Al^{+3}$ ) é um dos principais fatores limitantes ao desenvolvimento das plantas em solos ácidos. Nos últimos anos, ocorreram consideráveis avanços no entendimento do mecanismo de resistência ao alumínio em plantas. Em algumas cultivares de trigo (*Triticum aestivum*), por exemplo, foi identificado que a tolerância ao alumínio é associada com o efluxo de malato dependente de Al. Recentemente foi isolado nesta espécie o gene *ALMT1*, que codifica uma proteína transportadora de malato ativada por  $Al^{+3}$ . O gene *ALMT1* é constitutivamente expresso em maior quantidade no ápice de raízes de linhagens de trigo tolerante ao alumínio do que em linhagens sensíveis a esse metal. Portanto, no presente estudo, calos embriogênicos de sorgo da linhagem CMSXS102B, sensível ao alumínio foram transformados com o gene *ALMT1* de trigo. Plantas transgênicas de sorgo foram obtidas via biobalística. A construção usada para a transformação continha o gene *ALMT1* de trigo sob o controle do promotor da ubiquitina, e os genes *uidA* e *bar* direcionados pelo promotor CaMV35S. Células transformadas foram selecionadas em meio contendo o herbicida glufosinato de amônia. O crescimento radicular das plantas transgênicas de sorgo contendo o gene *ALMT1* foi avaliado sob o estresse de Al. Plantas T<sub>1</sub> mostraram alto nível de tolerância ao Al quando crescidas em cultura hidropônica sobre estresse de alumínio quando comparadas com o controle não transgênico. As linhagens transgênicas testadas apresentaram taxa de segregação 3:1, sugerindo a integração de uma cópia do cassete gênico nos transgênicos

Palavras-chave: tolerância ao alumínio, gene *ALMT1*, transportador de malato, sorghum.

---

Comitê Orientador: Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA/ DQI (orientador); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-orientadora), Embrapa Milho e Sorgo.



## ABSTRACT

BRANDÃO, Rosângela Luci. Genetic transformation of sorghum, with the *ALMT1* gene of wheat, aiming to produce plants tolerant to aluminum. In: \_\_\_\_\_. **Transformação genética de *Sorghum bicolor* (L. Moench), visando tolerância ao Al<sup>+3</sup>**. 2007. Cap 5, p. 92-116. Thesis (Doctoral Program in Agronomia/ Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG -Brazil.\*

Aluminum toxicity is one of the major limiting factors regarding plant development in acidic soils. In the last years, considerable advances in the understanding of aluminum resistance mechanism have been achieved. In some wheat (*Triticum aestivum*) cultivars it has been identified that aluminum tolerance is associated with malate efflux dependent of Al<sup>+3</sup>. Recently, it was isolated from this species the *ALMT1* gene, encoding an Al-activated malate transport protein. The *ALMT1* gene is expressed constitutively in larger amount in the root apices of resistant genotypes than in sensitive genotypes. Therefore, in the present study, sorghum embryogenic callus of CMSXS102B Al-sensitive lines were transformed with *ALMT1* gene of wheat. Transgenic plants of sorghum were obtained via biolistic transformation. The construct used for the transformation contained the *ALMT1* gene driven by the ubiquitin promoter, also the *uidA* and *bar* genes driven by CaMV35S promoter. Transformed cells were selected on medium containing the herbicide ammonium glufosinate. The root growth of sorghum transgenic plants with *ALMT1* gene was assessed under Al stress. T<sub>1</sub> plants showed high level of Al tolerance when grown in hydroponic culture under aluminum stress when compared with untransformed control. The tested transgenic lines presented 3:1 segregation ratio, suggesting single copy integration of genetic cassette of transgene.

Key-words: Aluminum tolerance, *ALMT1* gene, malate transporter, sorghum.

---

Guidance Committee: Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA/ DQI (advisor); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-advisor), Embrapa Milho e Sorgo.

## 1 INTRODUÇÃO

A adaptação de plantas para agricultura tropical é sinônimo de adaptação para estresse de solos. Deficiência e toxicidade de nutrientes nos solos limitam a produção ao redor do mundo (Nguyen et al., 2001). Tanto nos trópicos quanto em zonas temperadas são encontrados solos ácidos, os quais limitam à exploração agrícola dessas regiões. O efeito da acidez do solo sobre as plantas provém, principalmente, das alterações químicas, entre elas: solubilização na solução do solo do alumínio (Al), manganês (Mn) e ferro (Fe), atingindo níveis tóxicos, assim como a complexação de alguns elementos essenciais, sendo o fósforo (P) o mais limitado (Kochian, 1995).

O alumínio, além de abundante, apresenta alta disponibilidade, sendo facilmente absorvido pelas plantas em solos ácidos de todo o mundo. Este elemento tem efeitos tóxicos responsáveis por anormalidades no crescimento de espécies importantes para a agricultura (Clarkson, 1969; Matsumoto et al., 1976). Em decorrência de vários processos de acidificação, formas fitotóxicas de  $Al^{+3}$  são liberadas para a solução do solo em níveis que afetam o crescimento das plantas (Kochian, 1995). Secreção de ácidos orgânicos e fosfato pelos ápices da raiz e alcalinização da rizosfera são alguns dos mecanismos mais importantes de resistência ao Al (Wenzl et al., 2001). Os ácidos orgânicos, como citrato, malato e oxalato, na rizosfera, podem proteger as plantas do estresse provocado pelo alumínio, por se ligarem com cátion tóxico  $Al^{+3}$  e formar complexos inofensivos (Ryan et al., 2003). Acredita-se também que algumas espécies liberem citrato quando há deficiência de P no solo (Ryan et al., 2003).

Diversas plantas, incluindo o milho e o trigo, liberam ácidos orgânicos pelas raízes, os quais estão envolvidos na tolerância ao Al e no mecanismo pelo qual as plantas adquirem P do solo (Kochian, 1995). O citrato, por exemplo, exudado pelas raízes, pode liberar fosfato de formas não disponíveis para formas mais facilmente assimiláveis para plantas (Hue et al., 1986).

Em trigo tem sido muito estudado o mecanismo para tolerância ao alumínio (Delhaize et al., 2004). Ryan et al. (1997) e Zhang et al. (2001) identificaram, na membrana plasmática de células do ápice da raiz, um canal de anion, permeável para o malato, ativado por Al. Sasaki et al. (2004), usando linhagens de trigo quase-isogênicas que diferem na tolerância ao alumínio, clonaram o gene de trigo transportador de malato ativado pelo Al, identificado como *ALMT1*. Este gene foi utilizado por Delhaize et al. (2004) para transformar plantas de cevada sensíveis ao alumínio. Estes autores demonstraram que as plantas transgênicas superexpressando *ALMT1* são mais tolerantes ao Al do que plantas selvagens.

A estratégia do melhoramento de plantas em desenvolver genótipos que tolerem a presença do Al no solo vem tendo elevada importância. A recente disponibilidade de genes envolvidos na síntese de ácidos orgânicos e na aquisição de fosfato proporciona nova oportunidade para o desenvolvimento de plantas tolerantes ao Al e com aquisição de P mais eficiente. Desse modo, este trabalho foi realizado com o objetivo de transformar plantas da linhagem CMSXS 102B de sorgo, sensível ao alumínio, com gene *ALMT1*, e verificar se superexpressão desta proteína é capaz de conferir tolerância ao alumínio a plantas de sorgo transgênicas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

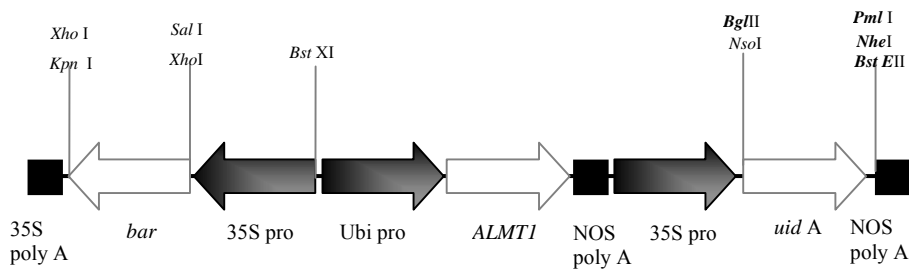
### 2.1 Transformação genética de sorgo via biobalística

#### 2.1.1 Preparação do explante na cultura de tecidos

A embriogênese somática foi induzida de acordo com Brandão et al. (2005). Inflorescências imaturas de 3 a 5 cm de comprimento da linhagem CMSXS 102B (sensível ao alumínio) foram desinfestadas em etanol 70% e água estéril, cortadas (~5mm) e cultivadas em placas de Petri contendo o meio CIM [MS sais (Murashige & Skoog, 1962), 30 g L<sup>-1</sup> sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol, 1 mg L<sup>-1</sup> tiamina, 7,5mg L<sup>-1</sup> glicina, 100 mg L<sup>-1</sup> DL-asparagina, 0,2 mg L<sup>-1</sup> cinetina e 2,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D]. As placas foram seladas com parafilm ou filme de PVC e mantidas, a 26°-28°C, no escuro. Calos embriogênicos, formados após 30 dias de subcultivo, foram usados como explantes para a transformação genética via biobalística.

#### 2.1.2 Construção gênica

O cassete gênico utilizado é composto pelo promotor da ubiquitina, direcionando a síntese do gene *ALMT1-1* (referido como *ALMT1* no texto; acesso no GenBank no. AB081803 – gentilmente cedido por Leon V. Kochian, Universidade de Cornell) e pelo terminador NOS (Figura 1). Para o bombardeamento foi utilizado o vetor pCambia 3301 (Cambia, Canberra, Austrália). O vetor possui o gene de seleção que codifica para a proteína fosfenotricina acetiltransferase (*bar*) e o gene repórter *uidA*, ambos sob o controle do promotor e terminador CaMV35S.



**FIGURA 1** Representação esquemática da construção gênica usada para a transformação de calos embriogênicos de sorgo. Mapa parcial do plasmídeo pCambia3301 contendo os genes: 35S::BAR::35S, UBI::ALMT1::NOS e 35S::GUS::NOS. NOS: terminador; CaMV35S: promotor constitutivo viral; UBI: promotor constitutivo do milho; *bar*: gene que confere resistência a fosfotricina; *ALMT1* gene que confere resistência ao AI em trigo; GUS: gene repórter.

### 2.1.3 Biobalística

Calos embriogênicos foram bombardeados com micropartículas de tungstênio, utilizando o equipamento Gene Gun (Biomics – Brasília / Brasil), que promove a introdução direta de genes. O protocolo utilizado foi o descrito por Brandão et al. (2005).

### 2.1.4 Seleção de calos bombardeados e regeneração de plantas

A seleção de plantas transgênicas foi iniciada 15 dias após o bombardeamento, quando os calos de sorgo foram transferidos para meio de multiplicação CIM (MS sais, 30 g L<sup>-1</sup> sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol, 1 mg L<sup>-1</sup> tiamina, 7,5mg L<sup>-1</sup> glicina, 0,2 mg L<sup>-1</sup> cinetina e 2,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D e 2,5 g/L phytigel), suplementado com dosagens crescentes de glufosinato de amônia (6 e 9 mg L<sup>-1</sup>). Calos que se desenvolveram em meio seletivo foram transferidos para o meio de maturação RM (MS sais e vitaminas, 60 g/L sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol, 0,2 mg L<sup>-1</sup> ANA, 3 g L<sup>-1</sup> phytigel, pH 5.8), acrescido de 6 mg L<sup>-1</sup> glufosinato de amônia.

Para regeneração, calos embriogênicos foram transferidos para meio MS, suplementado com 3 mg L<sup>-1</sup> glufosinato de amônia e cultivados, a 26°C, em luz (16

horas). Plantas com aproximadamente 5 cm de altura foram transferidas para solo em casa de vegetação, onde completaram seu ciclo reprodutivo.

## 2.2 Extração DNA e reação em cadeia polimerase (PCR)

DNA genômico foi isolado de 10 plantas bombardeadas utilizando-se o método de Saghai-Marroof et al. (1984). Três gramas de tecido fresco foram macerados em N<sub>2</sub> líquido e, em seguida, foram adicionados 10 mL tampão CTAB [100 mM de Tris-HCL pH 8,0, 2% de CTAB (*cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*), 1,4M de NaCl, 20mM de EDTA (ethylene diamine tetra acetate) e 2% de β-mercaptoetanol]. A reação foi incubada, a 65°C, por 90 minutos e homogeneizada a cada 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 5ml de clorofórmio/octanol (24:1), misturou-se gentilmente por 10 minutos e centrifugou-se, a 10.000 rpm, por 10 minutos, removendo-se o sobrenadante em seguida. Para a eliminação total do fenol, esta etapa foi repetida duas vezes. Para precipitação do DNA, adicionaram-se 6 mL de isopropanol à temperatura de -20°C e o precipitado (DNA) foi coletado com anzol de vidro. Posteriormente, o DNA foi transferido para 3mL de TE pH 8,0 (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0).

Para a quantificação do DNA, uma alíquota foi aplicada em gel de agarose 0,8%. A quantificação foi feita com a utilização de um marcador molecular de concentração conhecida (100 ng.μL<sup>-1</sup>) que foi aplicado juntamente com as amostras.

A presença das construções gênicas UBI::ALMTI::NOS e 35S::BAR::NOS nas plantas transformadas, foi confirmada utilizando-se PCR com os *primers* específicos 5'-AAA GGA TCC ATG GAT ATT GAT ACG GCA GAG AG-3' x 5'-AAA GGA TCC CTA CAA AAT AAC CAC GTC AGG CAA AGG-3' e 5'-TGC ACC ATC GTC AAC CAC-3' x 5'-AGA AAC CAC GTC ATG CC-3', respectivamente, gerando fragmentos de 1380 e 407pb, respectivamente. Cada 25 μl de reação continham tampão de PCR 10X, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada um dos *primers*, 25 ng de DNA e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram feitas utilizando-se um termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) programado para uma

desnaturação inicial de 15 segundos a 94°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação, a 94°C, por 15 segundos, anelamento, a 55°C, por 15 segundos e extensão, a 72°C, por 15 segundos, seguidos de uma extensão final, a 72°C, por 4 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese a 100 volts por 3 horas, em gel de agarose 1,5% utilizando-se tampão TAE (90 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0). Os géis foram tratados com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), visualizados sob luz ultravioleta e as imagens capturadas e estocadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene).

### **2.3 Análise hidropônica de tolerância ao Al**

As linhagens de sorgo (*sorghum bicolor* ssp. *bicolor*), CMSXS 102B e SC566-14, utilizadas neste trabalho, fazem parte do programa de melhoramento da Embrapa Milho Sorgo. Para este experimento, foram utilizadas 84 sementes das plantas transgênicas, 16 sementes da linhagem parental CMSXS 102B (sensível) e 12 sementes da linhagem SC566-14 (tolerante).

As sementes foram escarificadas com areia esterelizada por cinco minutos, para quebra de dormência. Posteriormente, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio, a 0,5%, por 10 minutos sob agitação constante, efetuando-se, posteriormente, oito lavagens sucessivas, sendo então colocadas para germinar em rolos de papel de germinação. Os rolos foram colocados em bandejas contendo água deionizada por um período de quatro dias, em câmara de crescimento com temperatura diurna média de 27±3°C, noturna de 20±3°C e fotoperíodo de 12 horas.

As plântulas foram transferidas para copos plásticos perfurados, acomodados em placas de PVC dentro de bandejas contendo 8 litros de solução nutritiva, sem alumínio, como descrito por Magnavaca (1987), nos quais foram mantidas por 48 horas com aeração constante. Num total de 4 bandejas (2 sem Al e 2 com Al), foram coladas 49 plântulas/bandejas, sendo 42 plântulas da progênie dos eventos transgênicos (ALMT1-S1 e ALMT1-S2), 4 da linhagem parental CMSXS102B (sensível) e 3 da linhagem SC566-14 (tolerante). Após esse período, foi adicionada solução nutritiva com a mesma constituição anterior, porém, com a

adição de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ( $148\mu\text{M Al}^{+3}$ ) nos tratamentos contendo Al. Os experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento, utilizando-se as mesmas condições ambientais utilizadas para germinação.

Para estudos genéticos de tolerância ao Al, foram utilizados os mesmos parâmetros descritos por Magalhães et al. (2004). O comprimento da raiz seminal de cada plântula das linhagens e das progênies foi medido após 24 (C24h) e 48 horas (C48h) de crescimento em solução nutritiva completa sem alumínio, para obter-se o comprimento controle ( $C_c=C48h-C24h$ ) e após cinco dias de crescimento em solução nutritiva contendo  $148\mu\text{M Al}$  (C120h+Al).

Foi determinado o seguinte índice de tolerância nas progênies  $T_1$ : CRR (% crescimento radicular relativo) =  $[(C120h+Al - C48h)/ C_c \times 5] \times 100$ . Nas progênies  $T_1$ , a adoção de um controle independente não é possível, uma vez que cada indivíduo da população representa um genótipo distinto. Dessa maneira, os valores de comprimento controle foram multiplicados por cinco, assumindo-se que as taxas de crescimento na ausência de Al são uniformes entre genótipos durante o período de exposição de cinco dias ou que as variações nas taxas são uniformes entre genótipos. Para as linhagens, caso em que foi possível a adoção de um controle independente sem adição de Al durante todo o período experimental, foi obtido o crescimento radicular líquido num período de cinco dias,  $CL = C120h+Al - C48h$ . Valores percentuais de crescimento líquido relativo (CLR) foram obtidos pela divisão do crescimento líquido medido após cinco dias de exposição ao Al pelo crescimento líquido obtido de plântulas cultivadas nas mesmas condições experimentais, porém, na ausência de Al (controle). As plântulas foram também qualitativamente avaliadas, recebendo nota de 1 a 6, de acordo com os danos visuais causados pelo Al à raiz (Figura 2). A combinação das diferenças na porcentagem do CRR e danos visuais de raiz entre parentais (sensível e tolerante ao Al) foi utilizada para classificar a progênie  $T_1$ . Após avaliação qualitativa, as plântulas foram transferidas para solo em casa de vegetação, para desenvolverem-se. As plantas que sobreviveram foram abalizadas por PCR para confirmar a presença do gene *ALMT1*.





**FIGURA 2** Nota dos danos visuais na raiz das progênies T<sub>1</sub> das plantas transgênicas ALMT1-S1 e ALMT1-S2 crescidas sob estresse de Al<sup>3+</sup>. (1) Raiz com crescimento de 10 a 28mm, pigmentada e sem raízes laterais; (4) raiz com crescimento de 35 a 68mm, apresentado regiões pigmentadas e com raízes laterais; (5) raiz com crescimento de 35 a 68mm, com pequena pigmentação e com raízes laterais; (6) raiz com crescimento acima de 99mm, sem pigmentação e com raízes laterais.

#### 2.4 Análises estatísticas

O teste de  $\chi^2$  foi utilizado para avaliar a hipótese de normalidade dos valores de CRR nas progênies T<sub>1</sub> e para verificar o ajuste da segregação individual do gene *ALMT1* a um modelo monogênico dominante com o auxílio do software GQMOL (Cruz & Schuster, 2001).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Regeneração de plantas e confirmação da transformação de sorgo

Dez plantas regeneradas foram transferidas para casa de vegetação, após passarem por um processo de seleção com PPT (fosfinotricina - glufosinato de amônia) em cultura de tecidos. Análise de PCR das 10 plantas regeneradas confirmou a inserção do gene *bar* no genoma de nove plantas e, entre essas nove plantas, quatro apresentavam o gene *ALMT1*, mostrando a amplificação dos fragmentos esperados de, aproximadamente, 407 pb e 1.380 pb, respectivamente (Figuras 3A e B). Como esperado, nenhuma amplificação foi observada em DNA genômico de plantas não transformadas (controle).

Esses resultados revelam que, durante o processo de transformação via biobalística, em alguns dos eventos ocorreu quebra do DNA plasmidial, gerando mais de um fragmento, sendo que um dos fragmentos gerado continha o gene *bar*, mas não o gene *ALMT1*.

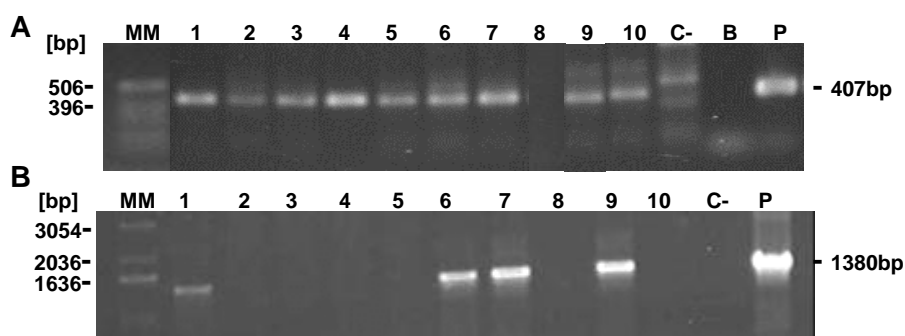
Krysiak et al. (1999a,b) e Mazus et al. (2000) observaram que micropartículas de tungstênio podem promover a fragmentação, ao acaso, de DNA celular e plasmidial. Krysiak et al. (1999a) relacionam essa toxicidade do tungstênio à sua habilidade de catalisar a hidrólise de algumas ligações fosfodiéster do DNA celular. Mazus et al. (2000) e Fraga et al. (2006) sugerem que a quebra do DNA plasmidial por micropartículas de tungstênio pode ser parcialmente dependente do pH. Fraga et al. (2006), em seus experimentos com bombardeamento, não observaram quebra de DNA plasmidial em presença de micropartículas de tungstênio, no entanto, observaram quebra do DNA plasmidial quando repetiram os experimentos, utilizando o mesmo protocolo de Krysiak et al. (1999a,b). Nos experimentos de Fraga et al. (2006), o DNA plasmidial é ressuspenso em solução tampão, pH 7,0. Já nos experimentos de Krysiak et al. (1999a,b), a solução tampão (TE) utilizada para diluir o DNA apresentava pH 8,0. No entanto, em nossos experimentos, o DNA plasmidial é ressuspenso em água ultrapura autoclavada que tem pH 7,0.

**TABELA 1** Resumo da caracterização molecular da geração T<sub>0</sub> de plantas transgênicas de sorgo.

Eventos de transformação	Número de plantas regeneradas	Análise de PCR		Nome das plantas T <sub>0</sub> *
		BAR	ALMTI	
I	3	3		BAR-S1, BAR-S2, BAR-S3
II	1	1		BAR-S4
III	1	1	1	ALMT1-S1
IV	1	1	1	ALMT1-S2
V	2	2	1	ALMT1-S3, BAR-S5
VI	2	1	1	ALMT1-S4

\* plantas com os dois genes foram nomeadas ALMT1

O maior número de plantas transgênicas com o gene *bar* do que com gene *ALMT1* é explicado pelo processo de seleção, uma vez que o agente seletivo utilizado neste trabalho (PPT) seleciona plantas transgênicas com o gene *bar*. Das 10 plantas regeneradas, uma não era transgênica para gene de seleção *bar*, resultando, portanto, em 10% de escape. Outros trabalhos de transformação de sorgo, utilizando o mesmo agente seletivo (PPT), também obtiveram falso positivo nos experimentos, só que em maior quantidade. Casas et al. (1997) obtiveram 97% de escape e Girijashankar et al. (2005) obtiveram 87% de escape.



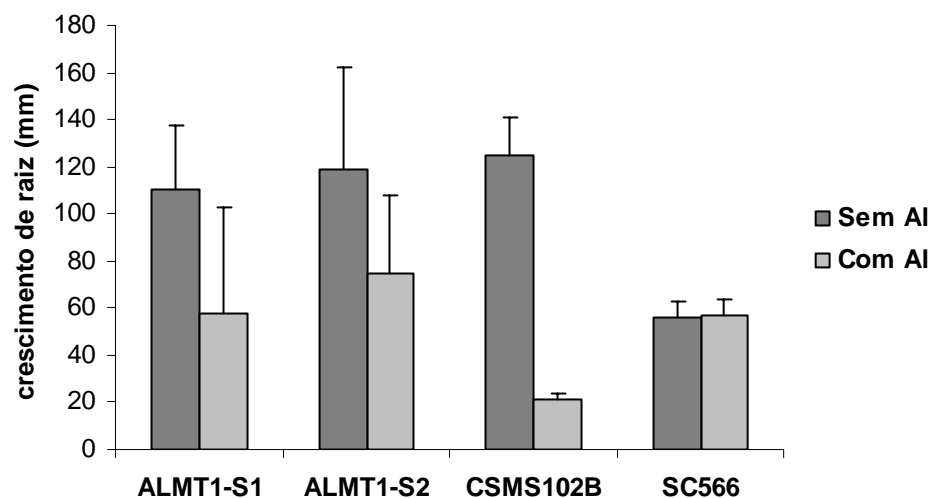
**FIGURA 3.** Análise de PCR de DNA genômico extraído de plantas bombardeadas. (A) Amplificação de PCR de fragmentos de 407 bp do gene *bar* em plantas transgênicas T<sub>0</sub> (linhas 1-7 e 9-10), planta não transformada (linha 8). (B) Amplificação de PCR do gene *ALMT1* mostrando fragmentos de 1.380bp (linhas 1, 6, 7 e 9), plantas não transformadas (2-5, 8 e 10). MM = marcador de peso molecular; P = plasmídeo (controle positivo), B = branco (reação sem DNA), C = controle negativo (plantas de sorgo não transformadas).

Das quatro plantas transgênicas que apresentavam o gene *ALMT1*, sobre o controle do promotor constitutivo da ubiquitina (*ubi*) de milho, somente as plantas ALMT1-S1 e ALMT1-S2 produziram sementes.

### **3.2 Avaliação de tolerância ao alumínio**

De acordo com Delhaize et al. (2004), a tolerância ao alumínio pode ser avaliada determinando-se o crescimento de raiz de plantas em hidroponia, quando na presença do mesmo. Portanto, neste trabalho, para avaliar se o gene em estudo confere maior tolerância ao estresse de alumínio, foram feitas avaliações no crescimento das raízes de plantas transgênicas e plantas controle sob o estresse do íon  $Al^{+3}$ . Progenie das plantas de sorgo transgênicas (ALMT1-S1, ALMT1-S2) e plantas controle (não transformadas) da linhagem parental CMSXS102B (sensível ao Al) e da linhagem SC566-14 (tolerante ao Al) foram submetidas ao estresse de alumínio em solução com  $148\mu m$  de  $Al^{+3}$ , por cinco dias em hidroponia. De acordo com Magalhães et al. (2004), essas condições permitem extrair as maiores diferenças de crescimento de raiz entre plantas de sorgo tolerante e sensível ao alumínio.

Experimentos resumidos na Figura 4 mostram que a progênie das plantas transgênicas (ALMT1-S1 e ALMT1-S2) e da planta parental CMS102B (sensível) apresentou, em solução sem Al, maior e melhor crescimento de raiz do que as plantas da linhagem SC566-14 (tolerante). Estas não apresentaram diferença significativa nos dois tratamentos testados. Observa-se também que progênies das plantas transgênicas (ALMT1-S1 e ALMT1-S2), em solução com Al, apresentaram melhor crescimento de raiz do que as plantas da linhagem parental (sensível). Delhaize et al. (2004), também observaram que plantas transgênicas de cevada superexpressando *ALMT1* apresentaram maior crescimento de raiz do que plantas selvagens.



**FIGURA 4** Média do crescimento da raiz de plantas transgênicas e controle em solução nutritiva com Al. Plântulas da progênie dos eventos transgênicos (ALMT1-S1 e ALMT1-S2), do parental CMSXS 102B (sensível) e da linhagem SC566-14 (tolerante) foram crescidas em solução nutritiva sem alumínio e com alumínio por 5 dias.

Plantas transgênicas  $T_1$  e plantas da linhagem tolerante (SC566-14), tratadas com  $148\mu\text{m}$  de  $\text{Al}^{+3}$ , não tiveram o ápice da raiz afetado pelo alumínio. No entanto, as plantas da linhagem parental CMS102B (sensível) e das  $T_1$  não transgênicas apresentaram engrossamento do ápice da raiz (Figura 4C), sintoma também relatado por Delhaize & Ryan (1995) e por Sasaki et al. (1996) em trigo, sob estresse de alumínio. O espessamento, aparentemente, é causado pela inibição do alongamento celular e pelo aumento no alargamento de algumas camadas de células, em particular das células do córtex (Sasaki et al., 1996).

Segundo Grabski & Schindler (1995), o enrijecimento da rede de filamentos de actina, provocado pelo  $\text{Al}^{+3}$ , interfere na divisão celular, o que também contribui para a ocorrência desses espessamentos. Delhaize et al. (2004) também observaram que plantas de cevada transgênicas para o gene *ALMT1* não apresentaram danos no ápice de raiz em hidroponia com  $\text{Al}^{+3}$ , enquanto a planta parental selvagem e as plantas não transgênicas da progênie de  $T_0$  apresentaram danos no ápice da raiz. Segundo estes mesmos autores, plantas  $T_1$  não transgênicas

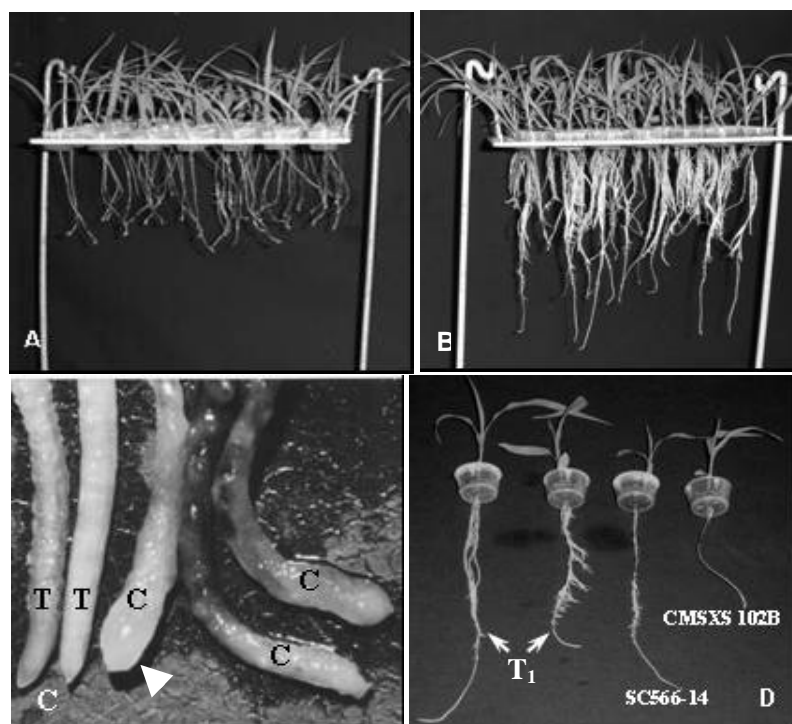
derivadas do mesmo evento de transformação que gerou as plantas T<sub>1</sub> transgênicas são controles ideais, pois, além de apresentarem o mesmo parental T<sub>0</sub>, este foi bombardeado e cultivado *in vitro*.

Neste trabalho, adotou-se o mesmo critério utilizado por Magalhães et al. (2004) para identificar genótipos de sorgo sensíveis e tolerantes ao alumínio. Indivíduos que apresentaram taxa de crescimento radicular relativo (CRR) entre 10% a 30% foram considerados sensíveis, enquanto os indivíduos que apresentaram taxa entre 60% a 120% foram considerados tolerante. Nas plantas sensíveis, após a exposição ao Al<sup>+3</sup>, observou-se, em maior intensidade, decréscimo no crescimento da parte área e do sistema radicular, raízes danificadas e escuras, além de redução na formação de raízes laterais (Figuras 4A -D).

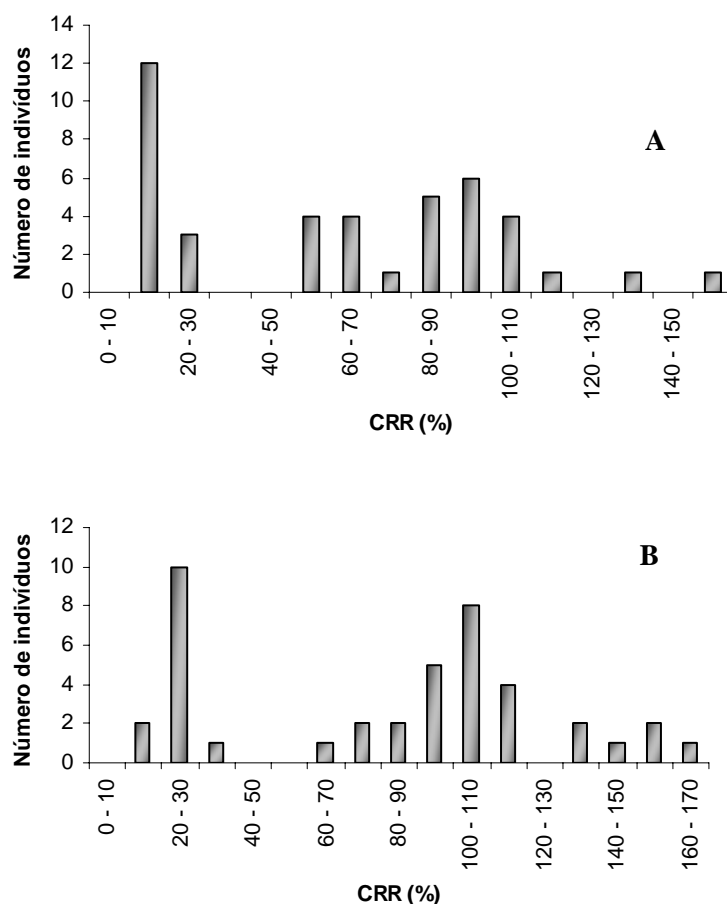
Resultados similares foram observados em raízes de ervilha (Wagatsuma et al.1995), trigo (DeLima & Copeland, 1994) e cevada (Delhaize et al., 2004). Ao contrário, as plantas tolerantes apresentaram raízes claras e maior crescimento do sistema radicular e da parte área (Figuras 4B e C). Constatou-se também que as plantas transgênicas T<sub>1</sub> apresentaram maior crescimento de raízes laterais quando comparadas com plantas da linhagem tolerante SC566-14 (Figura 4D). Em arroz (Sasaki et al., 2004), e em cevada (Delhaize et al., 2004) observou-se que plantas transgênicas expressando o gene *ALMT1*, apresentaram exsudação de malato, ativado por Al, no ápice da raiz. Como mencionado anteriormente neste trabalho, o malato é um ácido orgânico que, exsudado pela raiz, quela o íon Al<sup>+3</sup>, impedindo a entrada do mesmo na planta. Desse modo, estes resultados sugerem que as plantas transformadas de sorgo, com o gene *ALMT1*, o mesmo utilizado por Sasaki et al. (2004) e Delhaize et al. (2004), estejam exsudando malato no ápice da raiz e, com isso, apresentaram maior crescimento de raiz, do que das plantas parental não transformadas.

As Figuras 5A e B mostram que a frequência da média dos valores do crescimento radicular relativo (CRR) apresentou distribuição bimodal (duas modas) com interrupção nas classes de CRR 30%-50% e 40%-60%, respectivamente. A análise do  $\chi^2$  concorda com a segregação Mendelina 3 (tolerante Al): 1(sensível Al), usando a classe CRR 40%-50% como limiar, indicou

que a distribuição da frequência da segregação é influenciada por um gene dominante simples ( $P[\chi^2 \geq 2,57] = 0.11$  para ALMT1-S1 e  $P[\chi^2 \geq 0.098] = 0.32$  para ALMT1-S2). Esses resultados confirmam as análises de PCR para o gene *ALMT1* na progênie  $T_1$  dos eventos transgênicos, indicando, portanto, que parentais ALMT1-S1 e ALMT1-S2 apresentam o gene de tolerância ao alumínio do trigo *ALMT1*.



**FIGURA 4** A) Plântulas de sorgo não transformadas crescidas em solução nutritiva suplementada com  $148 \mu\text{M}$  de Al durante 4 dias; B) plântulas transgênicas  $T_1$  crescidas em solução nutritiva com  $148 \mu\text{M}$  de Al durante 4 dias; C) raiz de plântulas crescidas em meio com Al, C: plantas controle – CMSXS 102B; T: plantas transgênicas; D) plântulas  $T_1$  transgênicas, linhagem SC566-14 (tolerante) e CMSXS 102B (sensível) crescidas em solução nutritiva com Al.



**FIGURA 5.** Distribuição de frequência para valores de CRR nas progênies: **A)** ALMTI-S1 e **B)** ALMTI-S2, cultivadas em solução nutritiva com  $148 \mu\text{M Al}^{3+}$ , durante cinco dias.

Análise de PCR foi utilizada para mostrar a presença do gene *ALMT1* na progênie das plantas transgênicas. Na Tabela 2, observe-se que a amplificação da banda de 1380 pb, correspondente para o gene *ALMT1*, foi detectada na maioria das plantas e concorda com a nota visual dada, plantas transgênicas apresentaram raiz sem danos e com maior crescimento (nota variando de 4 a 6) e não transgênicas apresentaram raiz pequena e danificada (nota de 1 a 1,5).

Em presença de Al, as plantas da linhagem SC566-14 e T<sub>1</sub> de ALMT1-S1 e ALMT1-S2 apresentaram CRR acima de 60% (69%, 64% e 82%, respectivamente)



e raízes saudáveis (Figura 4B e D). Já as plantas da linhagem parental CMSXS102B apresentaram CRR de 21% e raízes com danos morfológicos (Figuras 4A e C). Os resultados mostram que as plantas transgênicas são mais tolerantes ao alumínio do que a planta parental, comprovando o que foi observado por Sasaki et al. (2004) e Delhaize et al. (2004), ao estudarem a expressão do gene *ALMT1* em tabaco e cevada, respectivamente.

Com relação ao crescimento radicular líquido (CRL), a linhagem parental CMSXS102B apresentou inibição acentuada no crescimento da raiz (CRL de 17%). Na progênie de ALMT1-S1 e de ALMT1-S2, a inibição do crescimento radicular foi quase três vezes menor do que da linhagem parental, apresentando CRL 47,8% e 41,8%, respectivamente. Já a linhagem SC566-14 não apresentou inibição do crescimento radicular, concordando com os resultados obtidos por Caniato et al. (2007) para a mesma.

Esses resultados confirmam a sensibilidade ao Al da linhagem parental (CMSXS 102B) e a tolerância da linhagem SC566-14, além de demonstrar o aumento da tolerância ao alumínio nas plantas transgênicas, confirmando que o gene *ALMT1* foi eficientemente herdado e transferido para a progênie das plantas transgênicas ALMT1-S1 e ALMT1-S2.

**TABELA 2** Resultados das análises da nota visual (1-6) e do PCR para identificação do gene *ALMT1* (+ positivo, - negativo) na progênie das plantas transgênicas ALMT1-S1 e ALMT1-S2.

Nº das plantas T <sub>1</sub> do evento ALMT1-S1	Nota visual	Análise PCR <i>ALMT1</i>	Nº das plantas T <sub>1</sub> do evento ALMT1-S2	Nota visual	Análise PCR <i>ALMT1</i>
S1-P1	1.5	-	S2-P1	5	+
S1-P2	1.5	-	S2-P2	1	-
S1-P3	1.5	-	S2-P3	5	+
S1-P4	6	+	S2-P4	5	+
S1-P5	6		S2-P5	4	+
S1-P6	1.5	-	S2-P6	1	-
S1-P7	4	+	S2-P7	1	-
S1-P8*	6		S2-P8	1	-
S1-P9	5	+	S2-P9	5	+
S1-P10	1.5	-	S2-P10*	5	
S1-P11	1	-	S2-P11	5	+
S1-P12	1.5	-	S2-P12	4,5	+
S1-P13	4	+	S2-P13	1	-
S1-P14	1.5	-	S2-P14	3,5	+
S1-P15	6	+	S2-P15*	4	
S1-P16*	6		S2-P16*	4	
S1-P17	5	+	S2-P17*	4	
S1-P18	6	+	S2-P18	4	+
S1-P19	1.5	-	S2-P19	1	-
S1-P20	6	+	S2-P20	4	+
S1-P21	6	+	S2-P21	1	-
S1-P22*	5		S2-P22	1	-
S1-P23	1.5	-	S2-P23*	5	
S1-P24	6	+	S2-P24	1	-
S1-P25	1.5	-	S2-P25*	4	
S1-P26	6	+	S2-P26	5	+
S1-P27	6	+	S2-P27	5	+
S1-P28	5	+	S2-P28	1	-
S1-P29	6	+	S2-P29	4	+
S1-P30	5	+	S2-P30	5	+
S1-P31	4	+	S2-P31	5	+
S1-P32*	1.5		S2-P32	1	-
S1-P33	5.5	+	S2-P33	4	+
S1-P34*	5.5		S2-P34	1	-
S1-P35	5.5	+	S2-P35	5	+
S1-P36	1.5	-	S2-P36	1	-
S1-P37*	6		S2-P37	5	+
S1-P38	5	+	S2-P38	5	+
S1-P39	5	+	S2-P39*	4	
S1-P40	1.5	-	S2-P40	5	+
S1-P41*	1.5		S2-P41	4	+
S1-P42	5	+	S2-P42	4	+

\* plantas que não foi realizado o PCR, pois morreram ao serem transplantadas para o solo.

#### **4 CONCLUSÕES**

Plantas transgênicas de sorgo superexpressando o gene *ALMT1* de trigo foram mais tolerantes ao íon  $Al^{+3}$  do que o parental sensível a este íon.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, M.F.; DATTA, K.; ABRIGO, E.; VASQUEZ, A.; SENADHIRA, D.; DATTA, S.K. Production of transgenic deepwater indica rice plants expressing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA(b)* gene with enhanced resistance to yellow stem borer. **Plant Science**, v.135, p.25-30, 1998.
- BAHIELDIN, A.H.T.; MAHFOUZ, H.F.; EISSA, O.M.; SALEH, A.M.; RAMADAN, I.A.; AHMED, W.E.; DYER, H.A.; EL-ITRIBY; MADKOUR, M.A. Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the HVA1 gene for drought tolerance. **Physiology Plant**, v.123, p.421-427, 2005.
- BALCONI, C.; LANZANOVA, C.; CONTI, E.; TRIULZI, T.; FORLANI, F.; CATTANEO, M.; LUPOTTO, E. Fusarium head blight evaluation in wheat transgenic plants expressing the maize b-32 antifungal gene. **European Journal of Plant Pathology**, v.117, p.129-140, 2007.
- BANDYOPADHYAY, A.; DATTA, K.; ZHANG, J.; YANG, W.; RAYCHAUDHURI, S.; MIYAO, M.; DATTA, S.K. Enhanced photosynthesis rate in genetically engineered indica rice expressing pepc gene cloned from maize. **Plant Science**, v.172, p.1204-1209, 2007.
- BRANDÃO, R.L.; SCHARFFERT, R.E.; CARNEIRO, N.P.; CARNEIRO, A.A.; PAIVA, L.V.; COELHO, G.T.C.P. **Transformação genética do sorgo: utilizando o bombardeamento de partículas**. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2005. (Circular Técnica Embrapa Milho e Sorgo, 72).
- CANIATO, F.F.; GUIMARÃES, C.T.; SCHAFFERT, R.E.; ALVES, V.M.C.; KOCHIAN, L.V.; BORÉM, A.; KLEIN, P.E.; MAGALHÃES, J.V. Genetic diversity for aluminium tolerance in sorghum. **Theory Applied Genetic**, v.114, p.863-876, 2007.
- CASAS, A.M.; KONONOWICZ, A.K.; HAAN, T.G.; ZHANG, L.; TOMES, D.T.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Transgenic sorghum plants obtained after microprojectile bombardment of immature inflorescences. **In Vitro Cellular Dev. Biology**, v.33, p.92-100, 1997.
- CLARKSON, D.T. Metabolic aspects of aluminum toxicity and some possible mechanisms for resistance. In: RORISON, I.H. **Ecological aspects for the mineral nutrition of plants**, p.381-397, 1969.
- CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: programa para análise de genética quantitativa molecular. Software. Viçosa: UFV, 2001. Disponível em :< <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>> Acesso em: 10 jul. 2007.

De LIMA, M.L.; COPELAND, L. Changes in the ultrastructure of the root tip of wheat following exposure to aluminium. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v.21, n.1, p.85-94, 1994.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. Uptake on invironmental stress: aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v.107, n.2, p.315-321, 1995.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; HEBB, D.M.; YAMAMOTO, Y.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, H. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. **Proc. Natl. Academic Science**, v.101, p.15249-15254, 2004.

FRAGA, D.; KEENAN, E.H.; NAIR, A.; SCHOFIELD, W. The particle inflow gun can be used to co-transform Paramecium using tungsten particles. **Journal Eukaryot. Microbiology**, v.53, p.16-19, 2006.

GIRIJASHANKAR, V.; SHARMA, H.C.; SHARMA, K.K.; SWATHISREE, V.; PRASAD, L.S.; BHAT, B.V.; ROYER, M.; SECUNDO, B.S.; NARASU, M.L.; ALTOSAAR, I.; SEETHARAMA, N. Development of transgenic sorghum for insect resistance against the spotted stem borer (*Chilo partellus*). **Plant Cell Reports**, v.24, p.513–522, 2005.

GRABSKI, S.; SCHINDLER, M. Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. **Plant Physiology**, v.108, n.3, p.897-901, 1995.

HUE, N.V.; CRADDOCK, G.R.; ADAMS, F. Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v.5, p.28-34, 1986.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.46, p.237–260, 1995.

KRYSIAK, C.; MAZUS, B.; BUCHOWICZ, J. Generation of DNA double-strand breaks and inhibition of somatic embryogenesis by tungsten microparticles in wheat. **Plant Cellular Tissue Organics Culture**, v.58, p.163–170, 1999a.

KRYSIAK, C.; MAZUS, B.; BUCHOWICZ, J. Relaxation, linearization and fragmentation of supercoiled circular DNA by tungsten microprojectiles. **Transgenic Res.**, v.8, p.303–306, 1999b.

MAGALHÃES, J.V.; GARVIN, D.F.; WANG, Y.; SORRELLS, M.E.; KLEIN, P.E.; SCHAFFERT, R.E.; LI, L.; KOCHIAN, L.V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics**, Maryland, v.167, p.1905-1914, 2004.

- MAGNAVACA, R.; GARDNER, C.O.E.; CLARK, R.B. Inheritance of aluminum tolerance in maize. In: GABELMAN, H.W.; LOUGHMAN, B.C. (Ed.). **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p.201-212.
- MATSUMOTO, H.; HIRASAWA, E.; MORIMURA, S.; TAKAHASHI, E. Localization of aluminum in tea leaves. **Plant Cellular Physiology**, Kyoto, v.17, n.3, p.627-631, 1976.
- MAZUS, B.; KRYSIAK, C.; BUCHOWICZ, J. Tungsten particle-induced nicking of supercoiled plasmid DNA. **Plasmid**, v.44, p.89–93, 2000.
- 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.
- NGUYEN, V.T. ; BUROW, M. D. ; NGUYEN, H. T. ; LE B, T. ; LE, T. D. et al. Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theory Applied Genetic**, v.102, p.1002–1010, 2001.
- RYAN, P.R.; DONG, B.; WATT, M.; KATAOKA, T.; DELHAIZE, E. Strategies to isolate transporters that facilitate organic anion efflux from plant roots. **Plant Soil**, v.248, p.61–69, 2003.
- RYAN, P.R.; SKERRETT, M.; FINDLAY, G.P.; DELHAIZE, E.; TYERMAN, S.D. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. **Proc. Nat. Acad. Science**, v.94, p.6547–6552, 1997.
- SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S.J.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **Plant Journal**, v.37, p.645–653, 2004.
- SASAKI, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Lignin deposition induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 96, n.2, p.193-198, 1996.
- SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proc. Natl. Acad. Science**, v.81, p.8014-8019, 1984.
- TADESSE, Y.; SÁGI, L.; SWENNEN, R.; JACOBS, M. Optimisation of transformatio conditions and production of transgenic sorghum (*Sorghum bicolor*) via microparticle bombardment. **Plant Cellular, Tissue and Organic Culture**, Hague, v.75, p.1-18, 2003.

WAGATSUMA, T.; ISHIKAWA, S.; OBATA, H.; TAWARAYA, K.; KATOHDA, S. Plasma membrane of younger and outer cells is the primary specific site for aluminium toxicity in roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.171, n.1, p.105-112, 1995.

WENZL, P.; PATIÑO, G.M.; CHAVES, A.L.; MAYER, J.E.; RAO, I.M. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. **Plant Physiology**, v.125, n.3, p.1473-1484, 2001.

ZHANG, W.H.; RYAN, P.R.; TYERMAN, S.D. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. **Plant Physiology**, v.125, p.1459–1472, 2001.