**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Estabelecimento de protocolo de cultura de tecidos de *Sorghum bicolor*

Guilherme Kenichi Hosaka

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2014**

Guilherme Kenichi Hosaka
Biólogo

Estabelecimento de protocolo de cultura de tecidos de *Sorghum bicolor*
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Prof^ª Dr^a **HELAINÉ CARRER**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Hosaka, Guilherme Kenichi

Estabelecimento de protocolo de cultura de tecidos de *Sorghum bicolor* /
Guilherme Kenichi Hosaka. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr
6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.
73 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Sorgo 2. Reguladores de crescimento 3. Antioxidantes 4. Aminoácidos 5. "Floral Dip"
I. Título

CDD 633.174
H825e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Helaine Carrer pelo aprendizado, orientação, confiança e ensinamentos durante este período.

À técnica de laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas, MSc. Valentina de Fátima de Martin pela manutenção da ordem no laboratório e pelo suporte.

Ao técnico do laboratório de Bioquímica e Micropropagação de Plantas, Dr. Enio Tiago de Oliveira pelo conhecimento compartilhado para a manutenção e instalação dos experimentos.

À secretária do Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Bioquímica de plantas, Maria Solizete G. Silva por toda sua dedicação, disponibilidade e auxílio.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos nesses dois anos de estudo.

Aos meus pais (Tetsuya Hosaka e Marina J. M. Hosaka) e minha irmã Cintia M. Hosaka por sempre me incentivarem e me apoiarem nos momentos mais críticos.

À doutoranda Ana Paula Preczenhak pelo suporte e execução dos experimentos, além dos períodos de descontração.

À doutoranda Tânia Regina Batista, e aos estagiários Flávio dos Santos e Daniela Ferraz de Campos Silva por me auxiliarem diversas vezes nos experimentos e pela transferência de conhecimento.

Aos doutorandos Esteban Galeano e André Luiz Barboza pelo suporte conferido e pelos períodos de descontração.

Ao doutorando Geraldo Felipe Ferreira e Silva e ao mestrando Paulo Henrique Ceciliato pelo acolhimento em sua residência, pelas discussões sobre diversos assuntos e pela grande amizade desenvolvida.

À MSc. Martha Monteiro Chaddad pelo suporte, paciência e conhecimento compartilhado desde o período de estágio.

Aos membros do laboratório do professor Dr. Daniel Scherer de Moura: Juan Carlos Abad, Fausto Ortiz-Morea, Tábata Bergonci, Keini Dressano, Marina Soriano, Akemi Niitsu e Antônio de Campos Amaral pelo suporte e pelo período de descontração.

Ao MSc. Allan Thomaz de Araújo pela grande amizade, pelo suporte e incentivo concedido anteriores a este período.

E a todos aqueles que não foram citados, mas influenciaram diretamente ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

“Estudar é polir a pedra preciosa; cultivando o espírito, purificamo-lo.”

Confúcio

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 O sorgo	17
2.1.2 Importância econômica	18
2.1.3 Cultura de tecidos.....	19
2.1.4 Cultura de tecidos do sorgo	21
2.1.5 Transformação genética do sorgo	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Material vegetal e condições da casa de vegetação	25
3.2 Discos de folhas como explante	25
3.2.1 Experimento para indução de calos.....	26
3.3 Embriões imaturos como explante	32
3.3.1 Experimento para indução de calos.....	32
3.4 Classificação dos calos	34
3.5 Regeneração de plantas	35
3.6 Enraizamento de plantas.....	37
3.8 Experimento de transformação genética de <i>S. bicolor</i> com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
3.8.1 Preparação das células eletrocompetentes	37
3.8.2 Eletroporação de <i>A. tumefaciens</i>	38
3.8.3 Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Discos de folhas como explante	43
4.2 Embriões imaturos como explante	55
4.3 Experimento de transformação genética de <i>S. bicolor</i> com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64
4.3.1 Análise das plantas transgênicas	64
5 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69

RESUMO

Estabelecimento de protocolo de regeneração de *Sorghum bicolor*

O sorgo é uma planta monocotiledônea diplóide com ciclo de vida de aproximadamente quatro meses. Apresenta grande relevância na agricultura pela sua utilização tanto para a alimentação humana e de animais quanto para a produção de biocombustíveis. Recentemente, o sorgo também surge como um forte candidato como planta modelo em estudos genômicos e fisiológicos relacionados com parede celular de gramíneas C4. Porém, para a análise da função de genes nesta espécie é essencial o estabelecimento da tecnologia de transformação genética que por sua vez depende de um eficiente método de regeneração de plantas. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de cultura de tecidos utilizando discos de folhas e embriões imaturos como explantes, de modo a avaliar a redução do nível de oxidação na cultura *in vitro* pelo uso de antioxidantes e determinar as concentrações de reguladores vegetais para indução de embriogênese somática e regeneração de plantas. Em discos de folhas, os antioxidantes, PVP, ácido ascórbico e ác. cítrico foram testados na manipulação dos explantes até a inoculação em meio de cultura, porém não houve redução no nível de oxidação. Foram testados diferentes concentrações de 2,4-D para indução de calos e o uso de 1 mg L⁻¹ e 2 mg L⁻¹ apresentaram melhores respostas em embriogênese somática. Diferentes meios de cultura foram testados para obtenção de regeneração de plantas, mas a eficiência chegou somente a 1% de plantas a partir de discos de folhas. Em embriões imaturos, além dos antioxidantes PVP e ácido ascórbico, foram testados também os aminoácidos asparagina e prolina em meio de indução de calos. O uso de 2 g L⁻¹ de asparagina e 3 g L⁻¹ de prolina no meio de indução de calos e 3 mg L⁻¹ de TDZ no meio de regeneração de plantas aumentou a eficiência de obtenção de plantas para até 15%. Assim, o uso de embriões imaturos foi considerado o explante mais promissor para a cultura de tecidos de sorgo. Devido aos altos níveis de oxidação e a baixa eficiência de regeneração de plantas em cultura de tecidos, foi testado o método de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* conhecido como “Floral dip”. Esta técnica não necessita da etapa de regeneração de plantas *in vitro*. Inicialmente, resultados promissores foram obtidos, porém há a necessidade do aprimoramento da metodologia.

Palavras-chave: Sorgo; Reguladores de crescimento; Antioxidantes; Aminoácidos; “Floral Dip”

ABSTRACT

Tissue culture establishment of *Sorghum bicolor*

Sorghum is a diploid monocot plant with a short life cycle of about 4 months. This crop is important in agriculture because it can be used for animal and human feed, and as well as source of raw material for biofuel production. Recently, sorghum also emerges as a strong candidate being a model plant on genomic and physiological studies related to cell wall in C4 grasses. Nevertheless, an efficient plant regeneration method is required for the establishment of genetic transformation technique to conduct the characterization of functional genes. In this context, the objective of this work was to establish a tissue culture protocol to evaluate the oxidation level of *in vitro* culture using leaf discs and immature embryos as explants, and testing different antioxidants and hormones concentrations for somatic embryogenesis and plant regeneration. In leaf discs, PVP, ascorbic acid and citric acid antioxidants were tested when manipulating the explants until their inoculation in culture media, but these factors failed to show any reduction in oxidation. In order to obtain somatic embryogenesis different concentrations of 2,4-D were tested for callus induction, 1,0 and 2,0 mg L⁻¹ showed the best results. Several plant regeneration medium were tested however, only up to 1% of regeneration was achieved using leaf discs. In immature embryos, besides PVP and ascorbic acid antioxidants also asparagine and proline amino acids were tested in the callus induction media. The use of 2 g L⁻¹ asparagine and 3 g L⁻¹ proline in callus induction media and 3 mg L⁻¹ TDZ in the regeneration media improved shoot regeneration efficiency up to 15%. Thus, the use of immature embryos was considered as a better option as explant for tissue culture of sorghum. Due to high production of oxidation and low frequency of plant regeneration in tissue culture, the genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens* known as “Floral Dip” method was tested. This technique does not require *in vitro* plant regeneration. Preliminary results were obtained, but the methodology needs to be improved.

Keywords: Sorghum; Growth regulators; Amino acids; “Floral Dip”

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2-diclorofeoxiacético
ABA	Ácido abscísico
Ác.	Ácido
ANA	Ácido naftaleno acético
Asc.	Ascórbico
BAP	6-benzilaminopurina
Cít.	Cítrico
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GFP	Proteína verde fluorescente
IAA	Ácido 3-indolacético
Kb	Quilobase (=1000pb)
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morpholino) ethanesulfônico
PPM	Plant Preservative Mixture®
pb	Pares de bases
PVP	Polivinilpirrolidona 10.000
TAE	Tampão de eletroforese Tris – Acetato - EDTA
TDZ	Thidiazuron

1 INTRODUÇÃO

O sorgo (*Sorghum bicolor*) é uma espécie monocotiledônea, designada com metabolismo C4, ciclo de vida de curta duração (DOGETT, 1988) e com pouca exigência nutricional (TABOSA et al., 1999). É um dos principais cereais produzidos no mundo (FAO, 2012), sendo utilizado tanto para a alimentação humana quanto de animais (GAO et al., 2013). Existem quatro tipos de sorgo, entre eles estão o sorgo granífero, o sorgo sacarino, o sorgo forrageiro e o vassoura. O sorgo granífero é utilizado tanto para a alimentação humana quanto de animais. O sorgo sacarino é um forte candidato para a produção de biocombustíveis, devido ao acúmulo natural de açúcar em seus colmos. O sorgo forrageiro é amplamente utilizado no Brasil, por causa de sua alta produtividade e boa adequação à mecanização, servindo como alimento para animais. O sorgo vassoura é empregado como matéria prima para a produção de vassouras (SCHIMIDT, 1987).

Além de ser utilizado para a alimentação e a produção de biocombustíveis, o sorgo pode ser empregado como planta modelo, como referência para estudos de cana de açúcar, que devido à complexidade de seu genoma, estudos genéticos são extremamente laboriosos e apresentam poucos resultados consistentes (DILLON et al., 2007). Por possuir o genoma sequenciado (PATERSON et al., 2009), o sorgo pode ser utilizado como material de estudo de genes de interesse, tornando possível aprimorar características de interesse como o acúmulo de açúcar e a tolerância à seca.

Na busca de manipulação genética em sorgo é essencial um protocolo bem estabelecido na cultura de tecidos. Porém, o gênero *Sorghum* é considerado recalcitrante para a regeneração de plantas e transformação genética (RAGHUWANSHI; BIRCH, 2010). Um dos fatores que influencia diretamente na regeneração *in vitro* é a produção excessiva de compostos fenólicos, que causam severa oxidação com a possível perda do material vegetal (NGUYEN et al., 2007). A fim de reduzir a produção dos compostos fenólicos são utilizados agentes antioxidantes (NGUYEN et al., 2007). Muitos fatores influenciam na cultura de tecidos do sorgo, entre eles estão: o genótipo, a idade do explante e a composição do meio de cultura (INDRA; KRISHNAVENI, 2009).

A eficiência de transformação genética de sorgo vem apresentando notáveis avanços desde o primeiro transgênico descrito por Casas et al. (1993) obtido por biolística com eficiência de 0,286% de transformação. Mais recentemente, Liu e Godwin (2012) obtiveram 20,7% de eficiência utilizando a mesma metodologia. Métodos alternativos de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* demonstraram resultados favoráveis (GUREL et al.,

2009), mas com menores taxas de eficiência de transformação quando comparados com biolística. Contudo, estes resultados não são ainda conclusivos, principalmente quando aplicados para genótipos diferentes (SATO; CLEMENTE; DWEIKAT, 2004) e em relação ao material vegetal (explante) utilizado para a regeneração de plantas e transformação genética (LIU; GODWIN, 2012). Considerando a hipótese que a cultura de tecidos é diretamente influenciada pelo explante e o meio de cultura, é fundamental determinar a eficiência de regeneração de plantas, a qual reflete no desenvolvimento de plantas transgênicas. Assim, o objetivo deste trabalho visou estabelecer um protocolo de cultura de tecidos utilizando discos de folhas e embriões imaturos como explantes, testando antioxidantes e concentrações de reguladores de crescimento para obter alta eficiência de regeneração de plantas e assim contribuir para estabelecer uma metodologia de transformação genética servindo como suporte aos estudos de parede celular em sorgo como planta modelo de gramíneas C4.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 O sorgo

O sorgo (*Sorghum bicolor*) é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae, tribo Andropogoneae. É designado como uma planta com metabolismo C4, possuindo propagação via sementes e ciclo de vida de curta duração, aproximadamente quatro meses (DOGETT, 1988). É uma planta típica de clima quente com características xerófilas, além de não possuir muita exigência nutricional (TABOSA et al., 1999). É bastante tolerante ao déficit hídrico e a inundações podendo ser cultivado em locais próximos a rios (ROONEY et al., 2007). O sorgo é diploide ($2n = 20$) e o genoma, completamente sequenciado (PATERSON et al., 2009), é considerado relativamente pequeno: 735 Mbps (DILLON et al., 2007).

Há indícios que o homem entrou em contato o sorgo antes de 8000 antes de Cristo (a.C.) (SMITH; FREDERIKSEN, 2000), mas sua domesticação somente ocorreu na Etiópia e em países vizinhos por volta de 4000-3000 a.C.. Ao longo dos anos muitas variedades foram melhoradas dependendo do interesse do agricultor, sendo gerados vários genótipos de sorgos. Entre 1500-1000 a.C., esses genótipos foram transportados para outros países com a utilização de rotas comerciais, sendo introduzidos em outras regiões da África e da Ásia (DOGETT, 1970). Nos Estados Unidos, a cultura do sorgo foi transportada no início do ano de 1900, possuindo diversos tipos, variedades e raças, criadas a partir de melhoramento genético, barreiras geográficas e recombinações entre os diversos genótipos existentes (DILLON et al., 2007). No Brasil, acredita-se que a cultura do sorgo foi introduzida por escravos africanos na região Nordeste no sec. XIX, mas como o milho já estava estabelecido no mercado interno e era considerado um grão nobre, sua expansão comercial não ocorreu com sucesso (MORGADO, 2005). A partir da década de 1970 foi alcançada a área de plantio de 80 mil hectares, concentrada principalmente no Rio Grande do Sul e São Paulo (TABOSA et al., 1999), mas seu cultivo ainda se mantém limitado.

Existem basicamente quatro tipos de sorgo: o granífero, o sacarino, o forrageiro e o vassoura. O sorgo granífero é consumido nos países asiáticos e africanos na forma de farinha para complementar a dieta da população. Já nos países desenvolvidos essa farinha de sorgo é utilizada como substituto do milho na produção de ração de bovinos, suínos e aves. Este tipo

de sorgo também pode ser utilizado na produção de álcool, amido, cera, cerveja, óleo e entre outros. O sorgo sacarino apresenta naturalmente um acúmulo de açúcar em seus colmos, podendo ser utilizado para a produção de biocombustíveis com a utilização dos mesmos equipamentos de colheita e de fermentação da cana de açúcar. O sorgo forrageiro é o tipo de sorgo mais difundido entre os produtores brasileiros devido a sua alta produtividade, boa adequação à mecanização, qualidade para a produção de ração animal e versatilidade, podendo ser utilizado para a realização de feno, silagem e pastejo direto. O sorgo vassoura é utilizado para a produção de vassouras (SCHIMIDT, 1987).

2.1.2 Importância econômica

O sorgo é o 5º cereal mais produzido no mundo, sua produção fica somente atrás do milho, arroz, trigo e cevada. Entre os maiores produtores de sorgo estão: o México, a Nigéria e os Estados Unidos. O Brasil encontra-se na 8ª colocação (FAO, 2012).

O sorgo é utilizado tanto para alimentação humana quanto animal (GAO et al., 2013). Quando comparado com o arroz, o sorgo possui maiores níveis de componentes nutricionais, como fibra bruta, cálcio, fósforo e proteína (INDRA; KRISHNAVENI, 2009).

Com o crescimento mundial da demanda por combustíveis, aumentam as preocupações quanto à emissão de gases relacionados ao efeito estufa e às incertezas quanto à disponibilidade de recursos não renováveis. Por isso, há um grande interesse pela substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis, sendo a maior candidata a cana de açúcar (BNDES; CGEE, 2008). O Brasil é o principal produtor de cana de açúcar do mundo (FAO, 2012), destacando-se como a produção de etanol mais eficiente (DA SILVA et al., 2012). Sendo assim, o melhoramento da cultura torna-se praticamente obrigatório. Mas devido à cana de açúcar comercial ser um híbrido entre as espécies *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum* e em algumas linhagens com *S. sinense*/*S. barberi* (EDMÉ et al., 2005), seu genoma tornou-se muito complexo dificultando assim o estudo genético (DILLON et al., 2007).

A cana de açúcar e o sorgo são plantas de metabolismo C4, podem ter um ancestral comum há 5 milhões de anos (AL-JANABI et al., 1994), possuem uma similaridade de *loci* em 84% (MING et al., 1998) e devido às semelhanças genéticas são consideradas culturas próximas uma da outra. Portanto, o sorgo é a cultura mais indicada para a utilização, como modelo, em estudos genéticos para cana de açúcar (DILLON et al., 2007).

Além disso, há relatos que afirmam que o sorgo sacarino pode acumular maiores níveis de açúcar do que a cana de açúcar (JOGESWAR et al., 2007). Sendo assim, o sorgo sacarino torna-se um forte candidato para ser utilizado nas entressafras da cana de açúcar ou mesmo em sua substituição na produção de biocombustíveis.

2.1.3 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos é uma ferramenta com ampla utilização na agricultura. Para iniciá-la é necessário isolar pequenos fragmentos de um organismo vegetal, chamados explantes, que podem ser de origem caulinar, radicular, foliar ou qualquer outra parte vegetal que responda as condições do meio de cultura com o objetivo de regeneração *in vitro* (TORRES; CALDAS; AMAURI, 1999). Além disso, a regeneração das plantas é baseada na capacidade das células se proliferarem e organizarem em tecidos, podendo eventualmente regenerar em plantas completas (KERBAUY, 1999). Essa potencialidade de regeneração em um novo indivíduo multicelular dependendo dos estímulos em determinados momentos é denominada totipotência (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). No cultivo celular *in vitro* são esperadas diversas respostas em relação ao explante. Isto ocorre devido ao estado fisiológico, bioquímico e de desenvolvimento que o explante se encontra, podendo sofrer diferentes estímulos, fazendo com que somente algumas células se diferenciem em um novo indivíduo (MANTELL; MATTHEWS; MACKEE, 1994). A habilidade de uma célula ou um grupo delas responder a um estímulo visando um processo de desenvolvimento é denominada como competência (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Para obter sucesso na iniciação e regeneração da cultura *in vitro* devemos levar em consideração três fatores: o genótipo (espécie, cultivar ou variedade a ser utilizada), a fonte de explante (raiz, caule, folha, meristema, entre outros) e a condição da cultura (meio de cultura, temperatura, luminosidade e o frasco a ser utilizado) (ANDRADE, 2002). A escolha do genótipo a ser utilizado depende dos objetivos dos estudos. Variedades podem responder de maneiras diferentes às condições estabelecidas *in vitro*, no entanto, alguns autores afirmam que toda espécie e cultivar são capazes de responder às condições da cultura *in vitro*, desde que seja estabelecida uma combinação correta entre os fatores que afetam as condições de regeneração em planta (MANTELL; MATTHEWS; MACKEE, 1994). A fonte de explante influencia diretamente na regeneração *in vitro*, isto por que o estado fisiológico em que se encontra está diretamente relacionado à sua regeneração. De modo geral, tecidos jovens e em crescimento são mais utilizados na cultura de tecidos (ANDRADE, 2002). As condições de

cultura, principalmente os meio de cultura são os principais fatores para se obter a regeneração de plantas. O meio de cultura é basicamente constituído de sais minerais (macro e micronutrientes), nitrogênio reduzido, uma fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento necessários para ocorrer à divisão e manter a proliferação celular (D'ONOFRIO; MORINI, 2006). A combinação desses fatores associados a condições da cultura, como: luz (intensidade, qualidade e fotoperíodo) e frasco da cultura (tamanho e a permeabilidade a trocas gasosas) são a base da cultura de tecidos vegetais (KERBAUY, 1999).

Os explantes antes de serem inoculados em meio de cultura, devem passar por um processo de desinfestação, o qual se baseia na esterilização da superfície do explante visando eliminar os microrganismos, como bactérias e fungos (ANDRADE, 2002). Após processo de desinfestação, os tecidos vegetais são colocados em contato com o meio de cultura onde passam pelo processo de morfogênese, que é resultado da divisão e diferenciação celular podendo ser influenciada por três fatores (D'ONOFRIO; MORINI, 2006). O primeiro é o fator genético, que é determinado em sua fertilização, incorporando uma potencialidade em que os genes podem ser expressos durante seu desenvolvimento; o segundo fator, são as características desenvolvidas durante a ontogênese, onde uma vez expostos a estímulos externos, podem se manter de forma estável ou permanente; o terceiro fator são as características desenvolvidas que são influenciadas somente pelo ambiente de forma temporária (KERBAUY, 1999).

Durante a morfogênese, as células vegetais podem sofrer diversos processos, entre eles estão a embriogênese somática e a organogênese. Denomina-se embriogênese somática o processo em que células haploides ou somáticas diplóides desenvolvem-se em estruturas bipolares passando por diferentes estádios embriogênicos, podendo ser influenciadas por estímulos químicos ou ambientais para adquirir novas competências morfogênicas, sem que haja a fusão de gametas (JIMÉNEZ, 2001), como demonstrado na Figura 1. Já a organogênese caracteriza-se por dar origem a uma estrutura monopolar, apresentando ampla conexão vascular com o tecido de origem, podendo também sofrer estímulos externos, principalmente nos reguladores de crescimento, os quais são as auxinas e citocininas (ALVES; XAVIER; OTONI, 2004). Os dois processos podem ocorrer de forma direta ou indireta. Na forma direta, o material vegetal é induzido e se desenvolve diretamente do explante. Na forma indireta, há uma fase de proliferação e crescimento de calos por indução dos explantes para ocorrer o desenvolvimento desses tecidos. O calo é um grupo de células com crescimento desordenado que pode apresentar certo grau de diferenciação (ANDRADE, 2002).

oxidação-redução no meio de cultura, sendo eficientes na prevenção de oxidação do material vegetal (SATHYANARAYANA; VARGHESE, 2007). Os antioxidantes comumente utilizados na cultura de tecidos são: PVP (HAGIO, 2002), ácido ascórbico (ZHAO et al., 2000; GAO et al., 2005; ABDELWAHD et al., 2008) e ácido cítrico (LAKSHMANAN et al., 2006). Alguns aminoácidos também foram incorporados no meio de cultura, ocasionando a redução da oxidação, sendo eles asparagina e prolina (ZHAO et al., 2000; CARVALHO et al., 2004; RAGHUWANSHI; BIRCH, 2010; LIU; GODWIN, 2012).

A regeneração do sorgo ocorre em duas etapas: onde é realizada a indução de calos e a posterior transferência para o meio de regeneração de plantas (GUPTA et al., 2006). A fase de indução de calos ocorre devido à adição de diferentes concentrações de 2,4-D, sendo este um dos reguladores de crescimento mais eficientes para se obter o desenvolvimento de calos, não somente para sorgo, mas para monocotiledôneas em geral (BHASKARAN; SMITH, 1988). A regeneração de plantas pode ocorrer em meio de cultura acrescido ou não de reguladores de crescimento, entre os principais utilizados estão às auxinas e as citocininas. Nesta fase, pode ocorrer um efeito residual dos reguladores que ainda se mantiveram no material vegetal proveniente da fase de indução de calos (GUPTA et al., 2006).

2.1.5 Transformação genética do sorgo

Um protocolo de cultura de tecidos e posterior transformação genética de sorgo certamente precisam ser bem estabelecidos e atualmente apresentam-se ineficientes quando comparados com outras culturas, como arroz, milho e cevada (LIU; GODWIN, 2012). As duas técnicas mais utilizadas na transformação genética de sorgo são: a mediação via *Agrobacterium tumefaciens* (ZHAO et al., 2000; CARVALHO et al., 2004; GAO et al., 2005; NGUYEN et al., 2007; GUREL et al., 2009) e a utilização de bombardeadores de partículas (CASAS et al., 1993; GROOTBOOM et al., 2010; RAGHUWANSHI; BIRCH, 2010; LIU; GODWIN, 2012).

A *A. tumefaciens* é uma bactéria capaz de naturalmente infectar células vegetais, causando a doença da galha da coroa. Essa bactéria possui um plasmídeo de alto peso molecular, chamado Ti (indutor de Tumor), que ao entrar em contato com o tecido vegetal transfere uma sequência específica do Ti, denominado T-DNA. Este T-DNA é incorporado no genoma do tecido infectado, fazendo com que a planta comece a expressar genes que favoreçam a permanência da bactéria hospedeira. Com o desenvolvimento da biologia molecular foi possível manipular os genes contidos na região do T-DNA, deletando e

substituindo por genes de interesse, sem que sua transferência fosse comprometida (BRASILEIRO et al., 1998). Já a biolística é uma metodologia que consiste na utilização de micro projéteis em alta velocidade para introduzir ácidos nucleicos e outras moléculas em tecidos *in vivo*. Para ocorrer à introdução de material genético são utilizados diferentes sistemas para acelerar as micropartículas encobertos com sequências de ácidos nucleicos a velocidade superior a 1500 km/h. Isso faz com que essas partículas penetrem na parede e membrana celular de maneira não letal, alojando-se de forma aleatória nas organelas celulares, onde o material genético é então dissociado pela ação do líquido celular e integrado ao genoma nuclear do tecido vegetal receptor (BRASILEIRO et al., 1998).

A cultura do sorgo possui diferentes respostas diante aos meios de cultura e a transformação genética (SATO; CLEMENTE; DWEIKAT, 2004). Devido a isso, a escolha do explante, do genótipo e da técnica de transformação genética é crucial para uma transformação genética eficiente. Considerando esses fatores que influenciam na cultura de tecidos do sorgo, os explantes mais relatados foram embriões imaturos (CASAS et al., 1993; ZHAO et al., 2000; CARVALHO et al., 2004; GAO et al., 2005; NGUYEN et al., 2007; GUREL et al., 2009; GROOTBOOM et al., 2010; RAGHUWANSHI; BIRCH, 2010; LIU; GODWIN, 2012), onde utilizaram os genótipos P898012 (CASAS et al., 1993; ZHAO et al., 2000; CARVALHO et al., 2004; GUREL et al., 2009), Tx 430 (GUREL et al., 2009; LIU; GODWIN, 2012), PHI391 (ZHAO et al., 2000), Pioneer 8505 (GAO et al., 2005), Sensako 85/1191 (NGUYEN et al., 2007), 296B, C401 (GUREL et al., 2009) e Ramada (RAGHUWANSHI; BIRCH, 2010).

Casas et al. (1993) relataram o primeiro caso de transformação genética de sorgo obtendo a eficiência de 0,287% por meio de biolística. Onze anos mais tarde, Grootboom et al. (2010) obtiveram um aumento de eficiência para 0,77% utilizando a mesma técnica. Nos anos seguintes, Raghuwanshi e Birch (2010) com 0,09% e Liu e Godwin (2012) obtiveram melhores resultados com 20,7% de eficiência, sendo o maior percentual de transformação. Já utilizando a técnica mediada via *Agrobacterium tumefaciens* Zhao et al. (2000) obtiveram a eficiência de 2,1%. Seguido de Carvalho et al. (2004) com a eficiência variando de 0,8% a 3,5%; Gao et al. (2005) com 2,88% no genótipo Pioneer 8505 e 3,3% no genótipo C401; Nguyen et al. (2007) com 5% e Gurel et al. (2009) com 8,3%. Observa-se uma padronização na utilização de embriões imaturos como explante. Basicamente a asparagina e prolina são utilizados para o desenvolvimento de calos embriogênicos, acarretando a redução do nível de oxidação (ELKONIN et al., 1995 apud LIU; GODWIN, 2012). Além disso, a técnica de bombardeamento de partículas foi relatada com a melhor eficiência de transformação.

Em *Arabidopsis thaliana*, há a metodologia de transformação genética chamado de “Floral Dip”, que consiste na imersão de tecidos florais em soluções contendo *A. tumefaciens*, não necessitando da cultura de tecidos/meio de regeneração de plantas, reduzindo assim a manutenção do tecido vegetal e favorecendo a pesquisa genética desta espécie (CLOUGH; BENT, 1998). Nesta metodologia, o T-DNA é incorporado principalmente nas células do óvulo, o qual posteriormente é desenvolvido sementes com o gene de interesse (BECHTOLD et al., 2000 apud ZALE et al., 2009). Na cultura de trigo, há indícios da transformação genética utilizando o mesmo método com algumas modificações, podendo atingir até 6,8% de eficiência de transformação (ZALE et al., 2009). Esses relatos comprovam fortes evidências de que a metodologia de “Floral Dip” pode ser utilizada em diferentes espécies vegetais.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho visou estabelecer um protocolo de cultura de tecidos utilizando discos de folhas e embriões imaturos como explantes, testando antioxidantes e concentrações de reguladores de crescimento para obter alta eficiência de regeneração de plantas e assim contribuir para estabelecer uma metodologia de transformação genética servindo como suporte aos estudos de parede celular em sorgo como planta modelo de gramíneas C4.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Agrícola Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) – Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba-SP.

3.1 Material vegetal e condições da casa de vegetação

Os genótipos A9735R e híbrido 50A50 de *Sorghum bicolor* foram cedidos pelo Laboratório de Sementes do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ - USP). As sementes foram germinadas em bandejas de poliestireno com 50 células contendo substrato Spaghol® e as plantas mantidas em condições de casa de vegetação 20/28°C e 16 horas de fotoperíodo. Após duas semanas, as plantas foram transferidas para vasos individuais de 10 L e preenchidas com o substrato Spaghol®, sendo sua irrigação realizada automaticamente de acordo com o volume do vaso, de modo a manter a capacidade de campo do substrato. A nutrição foi realizada semanalmente com solução contendo sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Nos experimentos foram testados como explantes, discos de folhas e embriões imaturos.

3.2 Discos de folhas como explante

As coletas das plantas do genótipo A9735R e Híbrido 50A50 foram realizadas anteriores ao estágio de antese, com 60 a 75 dias após sua semeadura. As plantas foram cortadas nas porções apicais, em segmentos de caule de aproximadamente 20 cm, sendo retiradas de duas a três camadas de folhas. Posteriormente, os segmentos cilíndricos denominados aqui de “palmitos” (Figura 2) foram desinfestados em bandejas contendo álcool 70% (v/v), friccionando os segmentos por um minuto, este processo foi repetido três vezes. Em fluxo laminar, uma ou duas camadas de folhas externas de cada palmito foram retiradas. Com o auxílio de pinças e lâminas de bisturi esterilizados, os palmitos foram cortados transversalmente na espessura de dois mm e colocados em uma placa de Petri contendo as soluções com os compostos a serem testados (pré-tratamentos descritos a seguir). Ao final de

dois minutos, os discos foliares foram colocados em papel de filtro estéril para retirar o excesso das soluções e transferidos imediatamente para o meio de indução de calos.

Figura 2 – Palmitos de sorgo com aproximadamente 20 cm

3.2.1 Experimento para indução de calos

Experimento 1: Efeitos de diferentes concentrações de 2,4-D (auxina)

Neste experimento foi avaliado o nível de formação de calos e a oxidação. Primeiramente foi realizado o pré-tratamento, que consistiu em manter os explantes com espessura de dois mm por dois minutos em uma placa de Petri com 150 mg L^{-1} de ácido cítrico. Em sequência, os explantes foram transferidos para o meio de cultura semissólido com sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 30 g L^{-1} de sacarose, suplementado com 50 mL L^{-1} de água de coco (controle), utilizando diferentes concentrações de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D): 0,5; 1,0; 2,0 e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$. O pH foi ajustado para 5,8. O meio foi solidificado com $2,3 \text{ g L}^{-1}$ de Phytigel® e autoclavados por 20 minutos a 121°C a 1 kgf.cm^{-2} de pressão. Foram utilizados 25 explantes/meio de cultura mantidos no escuro e a avaliação quanto ao número de formação de calos e de calos oxidados foi realizada no intervalo de aproximadamente 20 dias, no mesmo período de suas subculturas.

Experimento 2: Efeito dos antioxidantes Polivinilpirrolidona (PVP) e ácido ascórbico e o biocida Plant Preservative Mixture® (PPM)

Neste experimento foi avaliado o nível de oxidação e de contaminação utilizando os antioxidantes Polivinilpirrolidona 10.000 (PVP), ác. ascórbico e o biocida de amplo espectro Plant Preservative Mixture® (PPM). Primeiramente foi realizado o pré-tratamento, que consistiu em manter os explantes com espessura de dois mm por dois minutos em uma placa de Petri contendo diferentes soluções (abaixo relacionadas). Em sequência, os explantes foram transferidos para os meios de culturas contendo sais e vitaminas MS suplementados com 50 mL L⁻¹ de água de coco, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, suplementados ou não com os antioxidantes e o biocida como mostra a figura 3. O pH foi ajustado para 5,8. O meio foi solidificado com 2,3 g L⁻¹ de Phytigel® e autoclavados por 20 min a 121°C a 1 kgf.cm⁻² de pressão.

O pré-tratamento consistiu de:

- a) Controle (água);
- b) 1 g L⁻¹ de PVP e 2 mg L⁻¹ de ác. ascórbico;
- c) 50 mL L⁻¹ de PPM.

Posteriormente os explantes foram transferidos para os meios de culturas:

- a) Controle: Meio de cultura sem antioxidante/biocida;
- b) Meio de cultura contendo 6 g L⁻¹ de PVP e 1 mg L⁻¹ de ác. ascórbico;
- c) Meio de cultura contendo 6 g L⁻¹ de PVP, 1 mg L⁻¹ de ác. ascórbico e 1 mL L⁻¹ de PPM.

A forma como o experimento foi conduzido está detalhado no fluxograma a seguir (Figura 3).

Figura 3 – Representação da realização do experimento 2 em discos de folhas como explante

Neste experimento foram utilizados aproximadamente 40 explantes/pré-tratamento/meio de cultura mantidos no escuro e a avaliação quanto ao número de calos oxidados e contaminados foi realizada no intervalo de aproximadamente 20 dias, no mesmo período de suas subculturas.

Experimento 3: Efeito dos antioxidantes PVP e ácido ascórbico

Neste experimento foi avaliado o nível de oxidação quando utilizado os antioxidantes PVP e ác. ascórbico separadamente no meio de cultura de indução de calos. Primeiramente foi realizado o pré-tratamento, que consistiu em manter os explantes com espessura de dois mm por dois minutos em uma placa de Petri contendo água estéril. Em seguida, os explantes foram transferidos para o meio de cultura semissólido. No meio de cultura semissólido foram utilizados os sais e vitaminas MS suplementado 50 mL L⁻¹ de água de coco, 30 g L⁻¹ de

sacarose, 1 mg L^{-1} de 2,4-D, com diferentes antioxidantes listados adiante. O pH foi ajustado para 5,8. O meio foi solidificado com $2,3 \text{ g L}^{-1}$ de Phytigel® e os meios autoclavados por 20 min a 121°C a 1 kgf.cm^{-2} de pressão.

O meio de cultura consistiu de:

- a) Controle: Meio de cultura sem antioxidante;
- b) Meio de cultura com 6 g L^{-1} de PVP;
- c) Meio de cultura com 1 mg L^{-1} de ác. ascórbico.

A forma como o experimento foi conduzido está detalhado no fluxograma a seguir (Figura 4).

Figura 4 – Representação da realização do experimento 3 em discos de folhas como explante

Neste experimento foram utilizados 40 explantes/meio de cultura mantidos no escuro e a avaliação quanto ao número de calos oxidados foi realizada no intervalo de aproximadamente 20 dias, no mesmo período de suas subculturas.

Experimento 4: Efeito dos antioxidantes PVP, ácido ascórbico e ácido cítrico

Neste experimento foi avaliado o nível de oxidação utilizando os antioxidantes Polivinilpirrolidona 10.000 (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico. Primeiramente foi realizado o pré-tratamento, que consistiu em manter os explantes com espessura de dois mm por dois minutos em uma placa de Petri com as diferentes soluções (pré-tratamento listados a seguir). Em sequência, os explantes foram transferidos para os meios de culturas contendo sais e vitaminas MS suplementados com 50 mL L⁻¹ de água de coco, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, com diferentes antioxidantes. O pH foi ajustado para 5,8. O meio foi solidificado com 2,3 g L⁻¹ de Phytigel® e autoclavados por 20 min a 121°C a 1 kgf.cm⁻² de pressão.

O pré-tratamento consistiu de:

- a) Controle (água);
- b) 1 g L⁻¹ de PVP;
- c) 2 g L⁻¹ de ácido ascórbico;
- d) 150 mg L⁻¹ de ácido cítrico;
- e) 1 g L⁻¹ de PVP e 2 g L⁻¹ de ác. ascórbico;
- f) 1 g L⁻¹ de PVP e 150 mg L⁻¹ de ác. cítrico.

Posteriormente os explantes foram transferidos para os meios de culturas:

- a) Controle: Meio de cultura sem antioxidante;
- b) Meio de cultura com 6 g L⁻¹ de PVP;
- c) Meio de cultura com 1 mg L⁻¹ de ác. ascórbico;
- d) Meio de cultura com 150 mg L⁻¹ de ác. cítrico;
- e) Meio de cultura com 6 g L⁻¹ de PVP e 1 mg L⁻¹ de ác. ascórbico;
- f) Meio de cultura com 6 g L⁻¹ de PVP e 150 mg L⁻¹ de ác. cítrico.

A forma como o experimento foi conduzido está detalhado no fluxograma a seguir (Figura 5).

Figura 5 – Representação da realização do experimento 4 em discos de folhas como explante

Neste experimento foram utilizados aproximadamente 33 explantes/pré-tratamento/meio de cultura mantidos no escuro e suas avaliações quanto ao número de calos oxidados foram realizadas no intervalo de aproximadamente 20 dias.

3.3 Embriões imaturos como explante

Para a obtenção de sementes, as inflorescências do genótipo A9735R foram encobertas com sacos de papel no estágio de pré-antese para garantir a autofecundação e suas sementes foram coletadas com 11 a 14 dias após a polinização.

Na câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas com álcool 70% (v/v) por dois minutos, seguido de hipoclorito de sódio (solução comercial) 50% (v/v) por 30 min e três lavagens com água destilada esterilizada. Os embriões imaturos foram isolados (Figura 6) em uma placa de Petri contendo água deionizada estéril, sendo estes transferidos imediatamente para o meio de indução de calos.

Figura 6 – Embrião imaturo isolados do genótipo A9735R

3.3.1 Experimento para indução de calos

Experimento 1: Efeito dos antioxidantes PVP e ácido ascórbico

Neste experimento foi avaliado o nível de oxidação quando utilizados os antioxidantes PVP e ácido ascórbico. O meio de cultura semissólido continha os sais e vitaminas MS suplementado com água de coco 50 mL L^{-1} , 30 g L^{-1} de sacarose, 1 mg L^{-1} de 2,4-D, testando-se os tratamentos:

- 1) Controle (sem antioxidantes);
- 2) 6 g L⁻¹ de PVP;
- 3) 1 mg L⁻¹ de ácido ascórbico;
- 4) 6 g L⁻¹ de PVP e 1 mg L⁻¹ de ácido ascórbico.

O pH foi ajustado para 5,8. O meio foi solidificado com 2,3 g L⁻¹ de Phytigel® e autoclavados por 20 min a 121°C a 1 kgf.cm⁻² de pressão. Neste experimento foram utilizados 40 explantes/meio de cultura, suas avaliações quanto ao número de calos oxidados foram realizadas anteriores à subcultura no intervalo de aproximadamente 20 dias.

Experimento 2: Efeito dos aminoácidos asparagina e prolina

Neste experimento foi avaliado o nível de oxidação utilizando os aminoácidos asparagina e prolina. O meio de cultura semissólido continha os sais e vitaminas MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 mg L⁻¹ de tiamina HCl, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, variando as concentrações de asparagina e prolina de acordo com a Tabela 1. O pH foi ajustado para 5,8. O meio foi solidificado com 2,3 g L⁻¹ de Phytigel® e autoclavados por 20 min a 121°C a 1 kgf.cm⁻² de pressão. Neste experimento foram utilizados 40 explantes/meio de cultura, suas avaliações quanto ao número de calos oxidados foram realizadas anteriores à subcultura no intervalo de aproximadamente 20 dias.

Tabela 1 – Variação da concentração de asparagina e prolina no meio de indução de calos

Meio de cultura	Asparagina (g L ⁻¹)	Prolina (g L ⁻¹)
Controle	0,0	0,0
1	0,15	0,3
2	1,0	0,3
3	2,0	0,3
4	0,15	1,5
5	1,0	1,5
6	2,0	1,5
7	0,15	3,0
8	1,0	3,0
9	2,0	3,0

Experimento 3: Efeito de diferentes concentrações dos aminoácidos asparagina e prolina

Neste experimento foi avaliado o nível de oxidação utilizando os aminoácidos asparagina e prolina. O meio de cultura semissólido continha os sais e vitaminas MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 mg L⁻¹ de tiamina HCl, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, variando as concentrações de asparagina e prolina de acordo com a Tabela 2. O pH foi ajustado para 5,8. O meio foi solidificado com 2,3 g L⁻¹ de Phytigel® e autoclavados por 20 min a 121°C a 1 kgf.cm⁻² de pressão. As avaliações quanto ao número de calos oxidados foram realizadas anteriores à subcultura no intervalo de aproximadamente 20 dias.

Tabela 2 - Variação das diferentes concentrações de asparagina e prolina no meio de indução de calos

Meio de cultura	Asparagina (g L ⁻¹)	Prolina (g L ⁻¹)
Controle	0,0	0,0
1	2,0	0,6
2	4,0	0,6
3	2,0	3,0
4	2,0	6,0
5	4,0	6,0

3.4 Classificação dos calos

Anterior à realização das subculturas e transferência dos calos para os meios de regeneração do experimento 4 em discos de folhas e dos experimentos 1, 2 e 3 em embriões imaturos, os calos foram classificados de acordo com a sua aparência em: friável, branco, seco e mucilaginoso (Figura 7). Essa classificação foi realizada para verificar qual característica dos calos é mais favorável para ocorrer à regeneração de plantas.

Figura 7 - Classificação dos calos de sorgo quanto à aparência: a) Friável; b) Branco; c) Seco; d) Mucilaginoso

3.5 Regeneração de plantas

Para avaliar a regeneração de plantas a partir de calos foram testados diferentes meios de culturas, utilizando como meio de cultura básico os sais e vitaminas MS, 30 g L⁻¹ de sacarose, e suas variações apresentadas em: SM de Lu et al. (2009); mM11 de Raghuwanshi e Birch (2010); CPM de Raghuwanshi e Birch (2010); Pola (2011) e RM de Liu e Godwin (2012) cuja composição de cada meio é apresentada na Tabela 3. O pH foi ajustado para 5,8 e o meio solidificado com 2,3 g L⁻¹ de Phytigel®. Os reguladores de crescimento foram adicionados antes da autoclavagem conduzida por 20 min a 121°C a 1 kgf.cm⁻² de pressão.

Os experimentos de regeneração de plantas foram conduzidos na sala de crescimento (fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e intensidade luminosa de 40 µmol.cm⁻².s⁻¹).

Tabela 3 - Composição dos meios de regeneração de plantas (mg L^{-1})

Componentes	SM	CPM	mM11	Pola (2011)	RM
2,4-D	-	0,99	-	-	-
IAA	1	-	-	0,5	1
TDZ	0,1	-	1	2,5	-
ABA	0,03	-	-	-	-
ANA	-	-	-	-	-
BAP	-	0,5	3	1	1
Mioinositol	-	108,1	108	-	-
Tiamina HCl	-	796,1	0,768	-	-
Piridoxina-5-fosfato	-	1,21	1,22	-	-
CuSO_4	-	1,24	-	-	0,16
Nicotinamida	-	1,29	-	-	-
KH_2PO_4	-	1,2	-	-	-
Prolina	-	885,2	-	-	-
Asparagina	-	2000	-	-	-
MES	-	585	-	-	-

Regeneração de plantas sob o efeito de TDZ, IAA e BAP

Neste experimento foi analisada a formação de plantas utilizando como meio de cultura com os sais e vitamínicos MS, 30 g L^{-1} de sacarose, $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ de CuSO_4 , 1 g L^{-1} de prolina. Os reguladores de crescimento foram adicionados antes da autoclavagem de acordo com a Tabela 4. O pH foi ajustado para 5,8. O meio foi solidificado com $2,3 \text{ g L}^{-1}$ de Phytigel® e autoclavados por 20 min a 121°C a 1 kgf.cm^{-2} de pressão. Os tratamentos foram quantificados de números de plantas regeneradas por tratamentos expressados em dados percentuais.

Tabela 4 - Variação da concentração de TDZ, IAA e BAP (mg L^{-1}) nos meios de regeneração de plantas

Meio de cultura	TDZ	IAA	BAP
Controle	0,0	0,0	1,5
1	1,0	0,0	1,5
2	2,0	0,0	1,5
3	3,0	0,0	1,5
4	1,0	0,5	1,5
5	2,0	0,5	1,5
6	3,0	0,5	1,5

3.6 Enraizamento de plantas

Plantas obtidas nos diferentes meios de regeneração testados neste trabalho foram transferidas para o meio de enraizamento (RootM), constituído de sais e vitaminas MS, 15 g L⁻¹ de sacarose, 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolisada, 1,5 mg L⁻¹ de ANA. O pH foi ajustado para 5,8. O meio solidificado com 2,3 g L⁻¹ de Phytigel® e autoclavados por 20 min a 121°C a 1 kgf.cm⁻² de pressão (RAGHUWANSHI; BIRCH, 2010).

3.7 Delineamento estatístico

O delineamento utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado.

3.8 Experimento de transformação genética de *S. bicolor* com *Agrobacterium tumefaciens*

3.8.1 Preparação das células eletrocompetentes

Inicialmente, células desarmadas de *A. tumefaciens* da linhagem LBA 4404 foram estriadas em placas de Petri contendo meio LB (Luria-Bertani) com 7 g L⁻¹ de ágar suplementado com 300 mg L⁻¹ de estreptomicina e crescidas a 28°C por 48 h. Uma colônia isolada da placa estriada foi utilizada como pré-inóculo em 5 mL de meio LB líquido com 300 mg L⁻¹ de estreptomicina sob a agitação de 200 rpm a 28°C. Após aproximadamente 36 h, o volume total do pré-inóculo foi adicionado em 500 mL de LB com estreptomicina 300 mg L⁻¹ e mantidos a 28°C até a densidade ótica (OD₆₀₀) atingir um valor entre 0,6 e 0,8.

As células de *A. tumefaciens* foram centrifugadas por 10 min a 6000 rpm à 4 °C e o sobrenadante descartado, as células sedimentadas foram ressuspensas com 100 mL de água ultra-pura. As células foram centrifugadas por 10 min a 6000 rpm à 4 °C e o sobrenadante descartado, as células sedimentadas foram ressuspensas com 50 mL de água ultra-pura. As células foram centrifugadas novamente por 10 min a 6000 rpm à 4 °C e o sobrenadante descartado, as células sedimentadas foram ressuspensas com 10 mL de água ultra-pura. Uma última centrifugação foi realizada por 10 min a 6000 rpm à 4 °C e o sobrenadante descartado e as células sedimentadas foram ressuspensas em 2,5 mL de glicerol 10% (v/v)

gelado 4°C filtro-esterilizado. Foram feitas alíquotas de 50 µl de células e armazenadas em freezer -80°C.

3.8.2 Eletroporação de *A. tumefaciens*

O vetor pK7FWG2 (Figura 8) cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura utilizado nos experimentos contem o gene *kan*, que confere resistência a canamicina e o gene repórter *gfp* que codifica a proteína verde fluorescente, ambos controlados pelo promotor 35S. No volume de 50 µl de células LBA 4404 eletrocompetentes foram adicionados 20 ng do vetor pK7FWG2, posteriormente transferido para uma cuveta de 0,1 cm de fenda (*Bio Rad*) previamente resfriada. A introdução do vetor pK7FWG2 foi realizada utilizando o eletroporador *Gene Pulse II* (BioRad), com as condições: capacitância 25 µF, resistência 400 Ω e voltagem 2,5 kV. Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de LB líquido e transferido para um tubo de micro centrifuga de 1,5 mL e mantido sob uma agitação de 200 rpm a 28°C por 2 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 1 min, onde 800 µl do sobrenadante foram descartados e 100 µl da ressuspensão celular foi plaqueada para o meio semissólido de LB com 150 mg L⁻¹ de estreptomicina e 50 mg L⁻¹ de espectinomicina, sendo mantidas a 28 °C por 48 h. Obteve-se colônias, uma foi selecionada para crescer meio LB conforme descrito acima.

Figura 8 - Vetor de superexpressão para a fusão do gene *gfp* ao gene de interesse - pK7FWG2

3.8.3 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

Para a transformação genética, foi seguido o protocolo de Zale *et al.* (2009) com algumas modificações descritas a seguir. Uma colônia de *A.tumefaciens* da linhagem LBA 4404 contendo o vetor pK7FWG2 foi crescida em meio LB líquido contendo 150 mg L⁻¹ de estreptomicina e 50 mg L⁻¹ de espectinomicina. Quando se atingiu a OD₆₀₀ entre 0,8 e 1,2; as bactérias foram centrifugadas e diluídas em uma solução contendo metade das concentrações dos sais e vitaminas MS suplementado com 97,6 mg L⁻¹ de ácido 2-(*N*-morpholino) ethanesulfônico (MES) previamente autoclavada, até alcançar a OD₆₀₀ de 0,8; onde foram adicionados 39,24 mg L⁻¹ de acetoseringona.

Plantas do genótipo A9735R no estágio pré-antese (entre 55 e 75 dias após a germinação) foram utilizadas para a transformação. As folhas que encobriam as inflorescências foram retiradas com o auxílio de um bisturi (Figura 9a) e as inflorescências utilizadas para a transformação. Foram testados os seguintes métodos:

- 1) **Banho:** a solução de *A. tumefaciens* foi derramada sobre as inflorescências repetidas vezes por 5 min (Figura 9 b).
- 2) **Imersão:** as inflorescências foram imersas na solução de *A. tumefaciens* por 5 min. (Figura 9 c).
- 3) **Pipetagem:** as inflorescências foram molhadas com 700 µl de solução de *A. tumefaciens* aplicadas por pipetagens repetidas vezes por 5 min. (Figura 9 d).

Figura 9 - Transformação genética via *A. tumefaciens*; a) Retirada das folhas que encobriam a inflorescência; b) Método de banho; c) Método de imersão; d) Método de pipetagem

Após os métodos de transformação serem realizados, as inflorescências foram ensacadas com sacos de plásticos para manter a umidade como descrito por Zale et al. (2009). O tempo de permanência do saco plástico foi três dias. Em seguida como foi verificado que as plantas estavam em antese e as inflorescências foram encobertas com sacos de papel para garantir a autofecundação.

Desinfestação das sementes

As sementes foram consideradas maduras após 76 dias da transformação quando foram coletada e iniciada a desinfestação. A desinfestação foi realizada utilizando Tween 80® 0,1% (v/v) por 5 minutos, seguido de três enxagues com água destilada estéril. Posteriormente, as sementes foram colocadas em uma solução com 5 g L⁻¹ do antifúngico Cerconil WP® por 16 h. Em seguida, dentro do fluxo laminar, foi utilizado álcool 70% (v/v) por 5 minutos, seguido de hipoclorito de sódio (solução comercial) 25% (v/v) por 30 minutos. Onde foi feita uma lavagem com solução de 150 mg L⁻¹ de ac. cítrico e água destilada estéril. Imediatamente, as sementes foram inoculadas no meio de cultura semissólido contendo sais e

vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 30 g L⁻¹ de sacarose, com o pH ajustado para 5,8 adicionado o antibiótico, 100 mg L⁻¹ de canamicina e solidificado com 2,3g L⁻¹ de Phytigel®. E mantidos na sala de crescimento com iluminação (fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e intensidade luminosa de 40 µmol.cm⁻².s⁻¹).

Análise das plantas transgênicas

Amostras de tecidos das plantas germinadas em meio de cultura MS com 100 mg L⁻¹ do antibiótico canamicina, tiveram o DNA genômico extraído pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987) e quantificados pela comparação visual com a intensidade conhecida de λ DNA 50 e 100 ng.µl⁻¹ (Life Technologies) em gel de agarose 1%.

A presença da região do T-DNA do vetor no genoma das plantas foi verificada inicialmente pela identificação do gene *gfp* que codifica a proteína verde fluorescente no genoma das plantas candidatas. Fez-se a determinação por amplificação dos fragmentos específicos de DNA pelo método de PCR (reação em cadeia da polimerase).

Na reação de PCR foram utilizados dois pares de iniciadores (*primers*) (Tabela 5), onde o gene *aadA* (envolvido na resistência dos antibióticos estreptomicina e espectinomomicina) foi utilizado como controle da presença da bactéria, devido a este gene não ser encontrado na região do T-DNA.

A reação da PCR para detecção do transgene com o gene *aada* e *gfp* foi realizada conforme o protocolo: desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 40 ciclos: 45 segundos a 94° C para desnaturação, 30 segundos a 60° C para anelamento dos primers e 45 segundos para extensão, a extensão final a 72° C por 10 minutos.

Após a PCR fez-se a eletroforese das amostras em gel de agarose 1% com tampão TAE 1x (TAE 50x: 242 g L⁻¹ de Tris Base, 57,1 mL L⁻¹ de ácido acético, 100 mL L⁻¹ de 0.5M EDTA, pH 8).

Tabela 5 – Iniciadores utilizados para confirmação de plantas transgênicas nos experimentos de transformação genética de sorgo

Gene	Primer	Sequência
<i>aada</i>	Forward	5' GCAGTGGATGGCGGCCTGAAG 3'
	Reverse	5' GGTGATCTCGCCTTTCACGTAG 3'
<i>gfp</i>	Forward	5' AGCTGACCCTGAAGTTCATCTG 3'
	Reverse	5' GGTGTTCTGCTGGTAGTGGTC 3'

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Discos de folhas como explante

Experimento 1: Efeitos da indução de calos com diferentes concentrações de 2,4-D (auxina)

Na cultura do sorgo, a fase de indução de calos ocorre devido à adição da auxina 2,4-D no meio de cultura, o qual é um dos reguladores de crescimento mais eficientes para ocorrer o desenvolvimento de calos (BHASKARAN; SMITH, 1988). Levando isso em consideração, os genótipos A9735R e Híbrido 50A50 foram testados com diferentes concentrações de 2,4-D para verificar a melhor resposta para a formação de calos.

Neste experimento foi utilizado um total de 25 discos de folhas por tratamento (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D) e por genótipo. Na condição *in vitro*, após 20 dias da inoculação foi avaliado o número de explantes contaminados, oxidados e com formação de calos (Tabela 6). O genótipo A9735R apresentou em média perda de 24% por contaminação, 4% por oxidação e a maior formação de calos ocorreu com a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. O genótipo Híbrido 50A50 apresentou perda de 34% por contaminação, 18% por oxidação e a maior formação de calos ocorreu com a concentração 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Nesse mesmo período, os calos desenvolvidos nas concentrações de 1,0 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D demonstraram visualmente apresentar característica de calos friáveis.

Tabela 6 - Representação de contaminação, oxidação e formação de calos em discos de folhas após 20 dias da inoculação, sob condições de diferentes concentrações de 2,4-D no meio de indução de calos

Genótipo	[2,4-D]	Contaminação	Oxidação	Formação de calos	Sem formação de calos	Total de explantes
A9735R	Controle	40% (10)	4% (1)	0% (0)	56% (14)	25
	[0,5]	32% (8)	16% (4)	44% (11)	8% (2)	25
	[1,0]	40% (10)	0% (0)	60% (15)	0% (0)	25
	[2,0]	0% (0)	0% (0)	100% (25)	0% (0)	25
	[3,0]	8% (2)	0% (0)	92% (23)	0% (0)	25
	Total	24% (30)	4% (5)	59% (74)	12% (16)	125
Híbrido 50A50	Controle	40% (10)	56% (14)	0% (0)	4% (1)	25
	[0,5]	24% (6)	28% (7)	28% (7)	20% (5)	25
	[1,0]	20% (5)	0% (0)	76% (19)	4% (1)	25
	[2,0]	40% (10)	0% (0)	60% (15)	0% (0)	25
	[3,0]	44% (11)	4% (1)	48% (12)	4% (1)	25
	Total	34% (42)	18% (22)	42% (53)	6% (8)	125

Brettell, Wernicke e Thomas (1980) identificaram o aumento da indução de calos, utilizando inflorescências imaturas de sorgo como explantes, quando alteraram a concentração de 0,2 mg L⁻¹ para 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D no meio de cultura, porém também foram utilizados os reguladores de crescimento cinetina e BAP, sendo ambos alterados de 1,0 mg L⁻¹ para 0,05 mg L⁻¹. Os resultados coincidem também por Gao et al. (2005) e Raghuwanshi e Birch (2010), em embriões imaturos de sorgo, utilizando no meio de cultura a concentração 2,0 e 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente. No entanto, o meio de cultura de Raghuwanshi e Birch (2010) também continha 9,0 µg L⁻¹ de BAP.

Em contraposição, Gupta et al. (2006) relataram em *S. bicolor* (genótipo 981013), em inflorescências e embriões imaturos, que concentrações de 3,0 e 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D propiciou a oxidação de muitos explantes, não havendo o desenvolvimento de calos. Corroborando com as diferentes respostas à formação de calos quando utilizado diferentes genótipos (MA et al., 1984 apud INDRA; KRISHNAVENI, 2009).

Fez-se a subcultura e a subdivisão dos calos a cada 20 dias, onde após 120 dias no meio de cultura somente sete calos da concentração de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D do genótipo A9735R resistiram às oxidações.

Regeneração de plantas

Neste experimento os sete calos provindos da concentração 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D do genótipo A9735R foram os que resistiram às oxidações. Desse total, somente dois apresentaram característica friável e foram transferidos para o meio de regeneração CPM (RAGHUWANSHI; BIRCH, 2010) descrito no item 3.5 (Tabela 3) e após 23 dias, três plântulas foram regeneradas a partir de um destes calos (Figura 10).

Figura 10 – Plântula de sorgo do genótipo A9735R após 23 dias em meio de regeneração

Enraizamento de plantas

Após 23 dias em meio de regeneração, as três plântulas obtidas foram transferidas para o meio de enraizamento (RootM) (RAGHUWANSHI; BIRCH, 2010), onde todas as plantas apresentaram o desenvolvimento de raízes aos 42 dias (Figura 11). Estas plantas apresentaram fenótipos de plantas normais quando comparadas com plantas *ex vitro*.

Figura 11 – Plantas de sorgo do genótipo A9735R após 42 dias em meio de enraizamento

Experimento 2: Efeito dos antioxidantes PVP e Ácido Ascórbico e o biocida PPM

O genótipo A9735R demonstrou ser mais responsivo ao contato com o regulador de crescimento 2,4-D, além de apresentar menores níveis de oxidação quando comparado com o Híbrido 50A50. Considerando esses fatores, apenas o genótipo A9735R foi utilizado nos experimentos seguintes. A oxidação observada no experimento anterior demonstrou taxas entre 4% a 56%, assim buscou-se testar tratamentos com antioxidantes para reduzir as perdas. Como a contaminação foi de até 44%, fez-se a desinfestação com mais cuidado alterando o tempo em contato com o álcool 70% (v/v) e com o uso do biocida Plant Preservative Mixture® (PPM).

O composto PPM é um biocida de amplo espectro contra os contaminantes comuns na cultura *in vitro* (GURI; PATEL, 1998 apud JIMÉNEZ et al., 2006), principalmente aqueles que ocorrem posteriormente à inoculação (NIEDZ, 1998).

Neste experimento foram utilizados aproximadamente 40 discos de folhas por pré-tratamento e meio de cultura descritos no item 3.2.1 (Experimento 2). Após 19 dias foi avaliado o número de explantes contaminados, oxidados e com formação de calos (Tabela 7). Observou-se a perda de 12% por contaminação e 33% por oxidação do total de explantes. De acordo com os resultados, a utilização do biocida PPM no pré-tratamento não demonstrou reduzir o número de explantes contaminados, como também verificou-se um efeito contrário, ocorrendo o aumento do nível de contaminação quando comparado com o controle (água) como pré-tratamento de 7% para 14%. Ao nível de meio de cultura, a utilização do biocida juntamente com os antioxidantes demonstrou uma pequena redução na contaminação do material vegetal quando comparados com o controle. Diferente aos nossos resultados, Niedz (1998) relatou que a utilização do biocida PPM em meio de cultura foi eficiente no controle de microrganismos contaminantes nas culturas de *Poncirus trifoliata* e *Citrus jambhiri*.

Levando em consideração o nível de oxidação, o pré-tratamento de PVP e ác. ascórbico demonstrou uma redução do nível de oxidação com 27% de explantes oxidados quando comparado com o controle (água) com 30%. Em nível de meio de cultura, os antioxidantes PVP e ác. ascórbico, demonstraram resultados variando de 20 a 23% de explantes oxidados, os quais obtiveram menores níveis de oxidação quando comparados com o meio de cultura controle.

Tabela 7 - Representação de contaminação, oxidação e formação de calos em discos de folhas após 19 dias da inoculação, sob condições de diferentes compostos no pré-tratamento e no meio de indução de calos

Pré - tratamento	Meio de cultura	Contaminação	Oxidação	Formação de calos	Sem formação de calos	Total de explantes
Controle	Controle	10% (4)	30% (12)	58% (23)	0% (0)	39
	PVP e ác. asc.	5% (2)	23% (9)	51% (20)	21% (8)	39
	PVP e ác. asc. e PPM	5% (2)	36% (14)	51% (20)	8% (3)	39
	Total	7% (8)	30% (35)	54% (63)	9% (11)	117
PPM	Controle	20% (8)	43% (17)	38% (15)	0% (0)	40
	PVP e ác. asc.	15% (6)	20% (8)	33% (13)	33% (13)	40
	PVP e ác. asc. e PPM	8% (3)	63% (25)	28% (11)	3% (1)	40
	Total	14% (17)	42% (50)	32% (39)	12% (14)	120
PVP e Ác. asc.	Controle	20% (8)	33% (13)	33% (13)	15% (6)	40
	PVP e ác. asc.	10% (4)	20% (8)	58% (23)	13% (5)	40
	PVP e ác. asc. e PPM	15% (6)	28% (11)	48% (19)	10% (4)	40
	Total	15% (18)	27% (32)	45% (55)	13% (15)	120
Total geral		12% (43)	33% (117)	44% (157)	11% (40)	357

Hagio (2002) demonstrou resultados semelhantes utilizando como explante embriões imaturos de sorgo. Utilizando o PVP no meio de cultura, observou redução da produção de compostos fenólicos e o aumento do número plantas regeneradas. Em sementes de fava (*Vicia faba*), Abdelwahd et al. (2008) utilizaram PVP no pré-tratamento seguido de ácido ascórbico no meio de cultura, reduzindo completamente a produção de compostos fenólicos, demonstrando o aumento da frequência de regenerantes.

Fez-se a subcultura e a subdivisão dos calos a cada 20 dias, onde após 131 dias após a inoculação, transferiu-se 70 calos do experimento para os meios de regeneração.

Experimento para regeneração de plantas

Para os experimentos de regeneração foram utilizados 70 calos com característica menos oxidada provenientes dos diferentes meios de cultura, os quais foram distribuídos aleatoriamente para os meios SM (LU et al., 2009), mM11 (RAGHUWANSI; BIRCH, 2010), Pola (2011) e RM (LIU; GODWIN, 2012) descritos no item 3.4 (Tabela 3). Após 98 dias, não foi observado regeneração de plantas devido 60 calos oxidarem e 10 calos desenvolverem raízes (Figura 12). Pola, Mani e Ramana (2009) relataram que a presença da auxina ácido 3-indolacético (IAA) no meio de cultura pode estimular o desenvolvimento de raízes dos calos. A qual neste experimento, demonstrou induzir o desenvolvimento de raízes nas concentrações de 0,5 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹ de IAA.

Figura 12 – Aparência dos calos de *S. bicolor* após 98 dias em meio de regeneração: a) Calos oxidados; b) Desenvolvimento de raízes

Experimento 3: Efeito dos antioxidantes PVP e ácido ascórbico

Uma vez que a utilização conjunta dos antioxidantes PVP e ácido ascórbico no pré-tratamento e no meio de cultura não foi eficiente para reduzir a oxidação no material vegetal, foi considerado testar estes compostos separadamente. Neste experimento foram utilizados 40 discos de folhas por meio de cultura contendo PVP e ác. ascórbico descritos no item 3.2.1 (Experimento 3). Após 19 dias foi avaliado o número de explantes contaminados, oxidados e com formação de calos (Tabela 8). Observou-se a perda de 4% por contaminação e 39% por oxidação do total dos explantes. A atuação dos antioxidantes PVP e ác. ascórbico separadamente no meio de cultura demonstraram uma redução no nível de oxidação de 38% e 35%, respectivamente, quando comparados com o controle com 45%.

Tabela 8 - Representação de contaminação, oxidação e formação de calos em discos de folhas após 19 dias da inoculação, sob condições de diferentes antioxidantes no meio de indução de calos

Meio de cultura	Contaminação	Oxidação	Formação de calos	Sem formação de calos	Total de explantes
Controle	0% (0)	45% (18)	33% (13)	22% (9)	40
PVP	5% (2)	38% (14)	45% (16)	12% (8)	40
Ác. ascórbico	5% (2)	35% (15)	40% (18)	20% (5)	40
Total geral	4% (4)	39% (47)	39% (47)	18% (22)	120

Contraponto aos nossos resultados, Khosroushahi, Naderi-manesh e Simonsen (2011) demonstraram na cultura *in vitro* de caules juvenis de *Taxus brevifolia*, que a utilização de diversas concentrações (100 a 1000 mg L⁻¹) de ác. ascórbico no meio de cultura não evidenciaram diferenças na redução de oxidação.

Os 47 calos foram subcultivados e subdivididos a cada 20 dias e observou-se que ao decorrer do tempo o nível de oxidação aumentava. Sendo que ao final de 62 dias após a

inoculação, os calos deste experimento não apresentavam característica favorável para a transferência nos meios de regeneração de planta. Assim não foram realizados os experimentos de regeneração.

Experimento 4: Efeito dos antioxidantes PVP, ácido ascórbico e ácido cítrico

Os dois experimentos realizados visaram a redução da oxidação, sob o efeito de PVP e ácido ascórbico no pré-tratamento e no meio de indução de calos. Contudo, não demonstraram redução da oxidação do material vegetal. Sendo assim, para verificar se diferentes combinações de antioxidantes apresentariam redução da oxidação, além do PVP e ácido ascórbico, foi testado o ácido cítrico no pré-tratamento e no meio de cultura. Neste experimento foram utilizados aproximadamente 33 discos de folhas por pré-tratamento e meio de cultura com PVP, ác. ascórbico e ác. cítrico, descritos no item 3.2.1 (Experimento 4). Após 18 dias da inoculação foi avaliado o número de explantes contaminados e oxidados (Tabela 9). Observou-se a perda de 15% por contaminação e 12% por oxidação do total dos explantes. Entre os pré-tratamentos testados, o antioxidante PVP junto com ácido ascórbico apresentou menor nível de oxidação com 9% de oxidação dos explantes. Em nível de meio de cultura, o pré-tratamento de ác. ascórbico seguido do meio de cultura controle, o pré-tratamento de ác. cítrico seguido do meio de cultura de PVP e pré-tratamento PVP junto com ác. ascórbico seguido do meio de cultura ác. cítrico e do meio de cultura PVP junto com ác. cítrico apresentaram somente 3% de oxidação. Em alguns casos nota-se que o alto índice de contaminação pode ter influenciado nesse resultado, já que a contaminação é um dos fatores limitantes para a oxidação dos explantes.

Tabela 9 – Representação de contaminação, oxidação e formação de calos em discos de folhas após 18 dias da inoculação, sob condições de diferentes antioxidantes no pré-tratamento e no meio de indução de calos

Pré-tratamento	Meio de cultura	Contaminação	Oxidação	Formação de calos	Sem formação de calos	Total de explantes
Controle	Controle	9% (3)	12% (4)	79% (26)	0% (0)	33
	PVP	6% (2)	18% (6)	73% (24)	3% (1)	33
	Ác. asc.	15 % (5)	6% (2)	79% (26)	0% (0)	33
	Ác. cít.	12% (4)	24% (8)	64% (21)	0% (0)	33
	PVP e ác. asc.	12% (4)	30% (10)	58% (19)	0% (0)	33
	PVP e ác. cit.	15% (5)	30% (10)	55% (18)	0% (0)	33
	Total	11% (23)	20% (40)	68% (134)	1% (1)	198
PVP	Controle	0% (0)	9% (3)	91% (30)	0% (0)	33
	PVP	0% (0)	6% (2)	94% (31)	0% (0)	33
	Ác. asc.	0% (0)	6% (2)	94% (31)	0% (0)	33
	Ác. cít.	9% (3)	6% (2)	82% (27)	3% (1)	33
	PVP e ác. asc.	0% (0)	21% (7)	76% (25)	3% (1)	33
	PVP e ác. cit.	3% (1)	12% (4)	76% (25)	9% (3)	33
	Total	2% (4)	10% (20)	85% (169)	3% (5)	198
Ácido ascórbico	Controle	18% (6)	3% (1)	76% (25)	3% (1)	33
	PVP	12% (4)	18% (6)	67% (22)	3% (1)	33
	Ác. asc.	15% (5)	18% (6)	64% (21)	3% (1)	33
	Ác. cít.	18% (6)	12% (4)	64% (21)	6% (2)	33
	PVP e Ác. asc.	12% (4)	24% (8)	52% (17)	12% (4)	33
	PVP e Ác. cit.	12% (4)	27% (9)	61% (20)	0% (0)	33
	Total	15% (29)	17% (34)	64% (126)	5% (9)	198
Ácido cítrico	Controle	6% (2)	6% (2)	82% (27)	6% (2)	33
	PVP	3% (1)	3% (1)	88% (29)	6% (2)	33
	Ác. asc.	0% (0)	9% (3)	91% (30)	0% (0)	33
	Ác. cít.	6% (2)	15% (5)	73% (24)	6% (2)	33
	PVP e Ác. asc.	0% (0)	16% (5)	81% (26)	3% (1)	32
	PVP e ác. cit.	3% (1)	12% (4)	82% (27)	3% (1)	33
	Total	3% (6)	10% (20)	83% (163)	4% (8)	197
PVP e ác. asc.	Controle	42% (14)	24% (8)	30% (10)	3% (1)	33
	PVP	39% (14)	9% (3)	52% (17)	0% (0)	33
	Ác. asc.	24% (8)	9% (3)	61% (20)	6% (2)	33
	Ác. cít.	42% (14)	3% (1)	52% (17)	3% (1)	33
	PVP e ác. asc.	48% (16)	6% (2)	45% (15)	0% (0)	33
	PVP e ác. cit.	42% (14)	3% (1)	42% (14)	12% (4)	33
	Total	40% (79)	9% (18)	47% (93)	4% (8)	198
PVP e ác. cit.	Controle	0% (0)	36% (12)	64% (21)	0% (0)	33
	PVP	3% (1)	19% (6)	78% (25)	0% (0)	32
	Ác. asc.	0% (0)	9% (3)	91% (29)	0% (0)	32
	Ác. cít.	0% (0)	12% (4)	88% (29)	0% (0)	33
	PVP e ác. asc.	3% (1)	24% (8)	73% (24)	0% (0)	33
	PVP e ác. cit.	0% (0)	31% (10)	69% (22)	0% (0)	32
	Total	1% (2)	22% (43)	77% (150)	0% (0)	195
Total geral		15% (175)	12% (143)	71% (835)	3% (31)	1184

Khosroushahi, Naderi-manesh e Simonsen (2011) observaram que diversas concentrações (50 a 500 mg L⁻¹) de ác. cítrico na cultura *in vitro* de caules juvenis de *Taxus brevifolia*, não demonstraram diferenças na redução de oxidação. Porém, nossos resultados demonstraram em alguns casos, que pode ocorrer a redução da oxidação na cultura *in vitro* do sorgo.

Com o objetivo de constatar em que período os calos oxidavam menos, avaliou-se as interações ocorridas entre o tempo e a oxidação relativa até 117 dias após a inoculação, realizando subcultura e a subdivisão dos calos a cada 20 dias aproximadamente (Tabela 10). Observou-se que o nível de oxidação aumentava ao decorrer do tempo, em muitos casos a contaminação se manteve nos tratamentos, ocorrendo assim à perda dos mesmos.

Tabela 10 - Representação de oxidação de discos de folhas ao decorrer do tempo após a inoculação, sob condições de diferentes antioxidantes no pré-tratamento e no meio de indução de calos

Pré-tratamento	Meio de cultura	53 dias		81 dias		117 dias	
		Oxidação	Total	Oxidação	Total	Oxidação	Total
Controle	Controle	23% (6)	26	71% (10)	14	67% (4)	6
	PVP	72% (18)	25	27% (7)	26	100% (22)	22
	Ác. asc.	31% (8)	26	67% (32)	48	50% (11)	22
	Ác. cit	71% (15)	21	62% (13)	21	75% (6)	8
	PVP e ác. asc.	44% (8)	18	63% (20)	32	88% (6)	8
	PVP e ác. cit.	21% (4)	19	0% (0)	0	0% (0)	0
PVP	Controle	6% (2)	31	0% (0)	0	0% (0)	0
	PVP	24% (6)	25	75% (42)	56	96% (24)	25
	Ác. asc.	38% (5)	32	13% (8)	64	0% (0)	0
	Ác. cit	17% (5)	29	9% (7)	76	83% (75)	90
	PVP e ác. asc.	11% (3)	27	25% (29)	114	56% (28)	50
	PVP e ác. cit.	14% (4)	29	7% (5)	71	55% (29)	53
Ácido Ascórbico	Controle	38% (10)	26	11% (10)	94	0% (0)	0
	PVP	43% (10)	23	11% (6)	53	70% (38)	54
	Ác. asc.	41% (9)	22	32% (23)	71	63% (36)	57
	Ác. cit	39% (9)	23	25% (13)	53	60% (43)	72
	PVP e ác. asc.	48% (10)	21	60% (37)	62	79% (19)	24
	PVP e ác. cit.	100% (20)	20	0% (0)	0	0% (0)	0
Ácido Cítrico	Controle	28% (80)	29	62% (21)	34	79% (11)	14
	PVP	50% (18)	36	100% (42)	42	0% (0)	0
	Ác. asc.	17% (5)	30	38% (5)	13	50% (5)	10
	Ác. cit	57% (12)	21	47% (15)	32	67% (4)	6
	PVP e ác. asc.	48% (13)	27	23% (15)	66	74% (64)	86
	PVP e ác. cit.	61% (17)	28	60% (26)	43	0%	15
PVP e ác. asc.	Controle	82% (9)	11	0% (0)	0	0% (0)	0
	PVP	33% (6)	18	100% (54)	54	0% (0)	0
	Ác. asc.	0% (0)	24	0% (0)	0	0% (0)	0
	Ác. cit	44% (8)	18	71% (22)	31	40% (2)	5
	PVP e ác. asc.	27% (4)	15	93% (14)	15	100% (3)	3
	PVP e ác. cit.	0% (0)	14	0% (0)	0	0% (0)	0
PVP e ác. cít.	Controle	76% (16)	21	67% (2)	3	0% (0)	0
	PVP	64% (14)	22	30% (8)	27	85% (11)	13
	Ác. asc.	59% (17)	29	36% (19)	53	33% (3)	9
	Ác. cit	52% (17)	29	0% (0)	0	0% (0)	0
	PVP e ác. asc.	100% (25)	25	0% (0)	0	0% (0)	0
	PVP e ác. cit.	42% (11)	26	86% (6)	7	0% (0)	0

Os tratamentos com os antioxidantes foram avaliados de acordo com os tipos de calo formados (friável, mucilaginoso, seco, branco) (Tabela 11), sendo que a formação de calos mucilaginosos foi a mais frequente para todos os tratamentos testados, principalmente no pré-tratamento com PVP e meio de cultura com PVP junto com ác. ascórbico com média de 32 calos.

Tabela 11 – Número médio de formação de calos de acordo com sua classificação sob condições de diferentes antioxidantes no pré-tratamento e no meio de indução de calos

Pré-tratamento	Meio de cultura	Classificação			
		Friável	Seco	Branco	Mucilaginoso
Controle	Controle	0	0	1	7
	PVP	0	0	1	12
	Ác. asc.	0	0	3	14
	Ác. cít.	0	0	2	7
	PVP e ác. asc.	0	0	2	9
	PVP e ác. cít.	0	0	0	5
PVP	Controle	0	0	2	5
	PVP	0	0	4	13
	Ác. asc.	0	0	5	11
	Ác. cít.	0	2	6	26
	PVP e ác. asc.	0	1	6	32
	PVP e ác. cít.	1	1	8	26
Ác. asc.	Controle	0	1	4	6
	PVP	0	0	4	21
	Ác. asc.	0	0	2	24
	Ác. cít.	1	0	5	21
	PVP e ác. asc.	0	0	4	10
	PVP e ác. cít.	0	0	2	6
Ác. cít.	Controle	0	0	3	10
	PVP	0	0	2	17
	Ác. asc.	0	0	2	9
	Ác. cít.	0	0	2	10
	PVP e ác. asc.	1	0	5	23
	PVP e ác. cít.	0	0	1	17
PVP e Ác. asc.	Controle	0	0	0	4
	PVP	0	0	0	12
	Ác. asc.	0	0	1	4
	Ác. cít.	0	0	1	9
	PVP e ác. asc.	0	0	0	5
	PVP e ác. cít.	0	0	0	4
PVP e Ác. cít.	Controle	0	0	1	5
	PVP	0	0	3	11
	Ác. asc.	0	0	1	15
	Ác. cít.	0	0	3	6
	PVP e ác. asc.	0	0	1	6
	PVP e ác. cít.	0	0	2	7

Regeneração de plantas

Dentre os meios de regeneração de plantas SM de Lu et al. (2009); CPM e mM11 de Raghuwanshi e Birch (2010); Pola (2011); RM de Liu e Godwin (2012) descritos no item 3.5 (Tabela 3), somente o meio CPM demonstrou regenerar três plantas. Pola, Mani e Ramana, (2009) evidenciaram que no meio de regeneração de sorgo, a presença do hormônio IAA pode induzir o desenvolvimento de raízes, mas em baixas concentrações combinadas com citocininas, como BAP e TDZ, estimulam a regeneração de plantas. Deste modo, foram testados os meios 4 e 6 descritos no item 3.5 (Tabela 4), os quais demonstraram eficiência de regeneração de plantas variando de 5% a 10% em experimento utilizando embriões imaturos como explante.

Para o experimento de regeneração 174 calos com aparência mucilaginosa provenientes dos diferentes meios de cultura foram distribuídos aleatoriamente para os meios 4 e 6. Após 17 dias no meio de regeneração, foram avaliadas as características dos calos, onde 158 calos apresentaram oxidação, 15 calos desenvolveram raízes e 1 calo regenerou uma planta (Figura 13a). O meio que regenerou planta foi o meio 6 (Figura 13b), com 3 mg L⁻¹ de TDZ. O calo foi proveniente do pré-tratamento controle (água) e meio de indução de calos com ácido ascórbico.

Figura 13 – Resposta dos calos totais após 17 dias em meio de regeneração de plantas com a utilização de diferentes concentrações de TDZ: a) Porcentagem total das características dos calos; b) Plântula regenerada a partir de calos

Após 36 dias em meio de regeneração, a plântula obtida foi transferida para o meio de enraizamento (RootM) (RAGHUWANSHI; BIRCH, 2010).

Os experimentos realizados com discos de folhas como explante demonstraram a presença de contaminantes e de oxidação em sua inoculação, a fim de reduzir os agentes contaminantes foi utilizado o composto Plant Preservative Mixture® (PPM) e para redução da oxidação foi testado os antioxidantes PVP, ác. ascórbico e ác. cítrico no pré-tratamento e no meio de indução de calos. No entanto, a presença destes compostos não demonstrou reduzir o nível de contaminação e de oxidação no decorrer do tempo, ocasionando em no máximo três plantas regeneradas. Devido a esses fatores, a utilização dos discos de folhas como explante não é promissor para a cultura de tecidos de sorgo para os genótipos A9735R e Híbrido 50A50.

4.2 Embriões imaturos como explante

Experimento 1: Efeito dos antioxidantes PVP e ácido ascórbico

Experimentos utilizando embriões imaturos como explantes foram realizados para verificar se ocorre diferente resposta quando comparados com discos de folhas. Neste experimento foi utilizado um total de 40 embriões imaturos por meio de cultura contendo PVP e ác. ascórbico descritos no item 3.3.1 (Experimento 1). Após 18 dias da inoculação, observou-se que houve perda de 4% devido à presença de contaminantes e 13% por oxidação do total de explantes (Tabela 12). Entre os tratamentos testados, o meio de cultura com o antioxidante PVP demonstrou menor nível de oxidação com 8% de oxidação quando comparado com os tratamentos ác. ascórbico e PVP junto com ác. ascórbico.

Tabela 12 - Representação de contaminação, oxidação e formação de calos em embriões imaturos após 18 dias da inoculação, sob condições de diferentes oxidantes no meio de indução de calos

Meio de cultura	Contaminação	Oxidação	Formação de calos	Sem formação de calos	Total de explantes
Controle	0% (0)	10% (4)	90% (36)	0% (0)	40
PVP	10% (4)	8% (3)	75% (30)	8% (3)	40
Ác. ascórbico	5% (2)	15% (6)	80% (32)	0% (0)	40
PVP e ác. asc.	0% (0)	20% (8)	80% (32)	0% (0)	40
Total geral	4% (6)	13% (21)	81% (130)	2% (3)	160

Fez-se a subcultura e a subdivisão dos calos aproximadamente a cada 20 dias e verificou-se se o tempo em que o material vegetal permanecia em meio de cultura influenciaria no número de calos oxidados no decorrer do tempo devido à produção de compostos fenólicos, como observado em discos de folhas. Assim foi avaliada a interação

ocorrida entre o tempo e a oxidação relativa até 87 dias após a inoculação (Tabela 13) e observou-se que o nível de oxidação ficou abaixo dos 20% a partir do dia 61, porém ainda se manteve no experimento.

Tabela 13 - Representação de oxidação em embriões imaturos ao decorrer do tempo após a inoculação, sob condições de diferentes antioxidantes no meio de indução de calos

Tratamentos	41 dias		61 dias		87 dias	
	Oxidação	Total	Oxidação	Total	Oxidação	Total
Controle	25% (10)	40	6% (3)	49	15% (12)	80
PVP	42% (14)	33	16% (12)	74	11% (11)	98
Ác. asc.	24% (8)	33	4% (2)	45	12% (8)	67
PVP e ác. asc.	41% (16)	39	14% (8)	58	18% (19)	107

Com a finalidade de analisar as interações ocorridas pela classificação dos calos e a composição dos antioxidantes no meio de cultura (Tabela 14), constatou-se que houve maior formação de calos classificados como friável no meio de cultura contendo PVP, com média de 31 calos. Calos classificados como mucilaginoso obtiveram maior indução no meio controle, com média de 31, 25 calos.

Tabela 14 - Número médio de formações de calos de acordo com a classificação de calos sob condições de diferentes antioxidantes no meio de indução de calos

Tratamentos	Classificação			
	Friável	Seco	Branco	Mucilaginoso
Controle	7,75	4,25	1,75	31,25
PVP	31	3,5	1,75	13,25
Ác. asc.	7,25	2,25	1,25	29
PVP e ác. asc.	14	0,75	0,25	26

Regeneração de plantas

Para o experimento de regeneração de plantas, 165 calos com classificação friável, branca, seca e mucilaginosos provenientes dos diferentes meios de cultura foram distribuídos aleatoriamente para os meios de regeneração SM (LU et al., 2009) e mM11 (RAGHUWANSHI; BIRCH, 2010), descritos no item 3.4. No período de 46 dias após a transferência para o meio de regeneração de plantas, observou-se que do total de calos transferidos, 151 calos oxidaram, 13 calos desenvolveram raízes e 1 calo regenerou planta (Figura 14a). Houve regeneração de uma planta somente no meio mM11 (Figura 14b), sendo que os calos transferidos possuíam a característica de calos friáveis em meio de indução de

calos contendo PVP juntamente com ác. ascórbico. Neste experimento, os calos que possuíam a característica branca foram mais propensos a desenvolver raízes.

Ao contrário do esperado, os calos provenientes do meio contendo PVP e ác. ascórbico obtiveram um dos maiores níveis de oxidação, porém foi o tratamento que respondeu frente ao meio de regeneração de plantas. Isto pode ser explicado se levarmos em consideração a formação de calos friáveis, o qual o meio de indução contendo PVP e ác. ascórbico obteve uma das maiores frequências de calos com essa característica, demonstrando regenerar plantas, assim provavelmente a oxidação não interfere na indução de embriogênese somática.

Figura 14 – Regeneração de plantas com os meios de cultura testados: a) Porcentagem total da aparência dos calos após 46 dias em meio de regeneração; b) Plantas regeneradas após 71 dias em meio de regeneração mM11

Enraizamento de plantas

Após 81 dias em meio de regeneração, a única plântula obtida foi transferida para no meio de enraizamento (RootM) (RAGHUWANSHI; BIRCH, 2010). Após 50 dias em meio de enraizamento foi observado o desenvolvimento de raízes. Esta planta apresentou fenótipo de planta normal.

Experimento 2: Efeito dos aminoácidos asparagina e prolina

Os experimentos realizados para reduzir a produção de compostos fenólicos sob o efeito de PVP e ácido ascórbico no meio de cultura, não demonstraram resultados promissores por regenerar somente uma planta. Uma alternativa para tentar reduzir o nível de oxidação foi à incorporação de aminoácidos no meio de cultura, como asparagina e prolina, que favorecem o aumento de calos embriogênicos e a redução de compostos fenólicos (RAO; SREE;

KISHOR, 1995). Com base nessa informação, diferentes concentrações de asparagina e prolina foram testadas na indução de calos.

No presente estudo foram utilizados 40 embriões imaturos para cada meio de cultura de 1 a 9 descritos no item 3.3.1 (Tabela 1). Após 18 dias da inoculação, observou-se a perda de 2% devido à presença de contaminantes e 18% por oxidação do total de explantes (Tabela 15). Entre os tratamentos testados, os meios 1 e 3 demonstraram menor índice de oxidação dos explantes, ambos com 5% de oxidação. Os quais continham em sua composição as concentrações de 0,15 g L⁻¹ e 0,3 g L⁻¹; 2,0 g L⁻¹ e 0,3 g L⁻¹, de asparagina e prolina, respectivamente.

Tabela 15 - Representação de contaminação, oxidação e formação de calos em embriões imaturos após 18 dias da inoculação, sob condições de diferentes concentrações de asparagina e prolina no meio de indução de calos

Tratamento	Contaminação	Oxidação	Formação de calos	Total de explantes
Controle	12% (5)	18% (7)	70% (28)	40
1	5% (2)	5% (2)	90% (36)	40
2	2% (1)	10% (4)	88% (35)	40
3	2% (1)	5% (2)	93% (37)	40
4	0% (0)	20% (8)	80% (32)	40
5	0% (0)	20% (8)	80% (32)	40
6	0% (0)	15% (6)	85% (34)	40
7	0% (0)	38% (15)	63% (25)	40
8	2% (1)	28% (11)	70% (28)	40
9	0% (0)	20% (8)	80% (32)	40
Total	2% (10)	18% (71)	80% (319)	400

Resultados semelhantes foram observados por Liu e Godwin (2012) em embriões imaturos de sorgo, relatando a redução da produção de compostos fenólicos e o aumento da produção de calos embriogênicos com a utilização de asparagina 1 g L⁻¹ e prolina 1 g L⁻¹. Evidências também foram demonstradas por Carvalho et al. (2004), em embriões imaturos de sorgo com 2 g L⁻¹ de asparagina e 3 g L⁻¹ de prolina.

Neste experimento, foi realizada a avaliação entre a interação do tempo decorrido e a oxidação relativa até 98 dias após a inoculação. A subcultura e a subdivisão do material vegetal foram a cada 20 dias aproximadamente (Tabela 16). No decorrer do experimento observou-se que os tratamentos 7 e 8 demonstraram menores índices de oxidação, os quais apresentavam em sua composição as concentrações de asparagina e prolina nas concentrações de 0,15 g L⁻¹ e 3 g L⁻¹, 1 g L⁻¹ e 3 g L⁻¹, respectivamente.

Tabela 16 - Representação de oxidação em embriões imaturos ao decorrer do tempo após a inoculação, sob condições de diferentes concentrações de asparagina e prolina no meio de indução de calos

Tratamento	45 dias		67 dias		98 dias	
	Oxidação	Total	Oxidação	Total	Oxidação	Total
Controle	22% (6)	27	7% (10)	140	0% (1)	202
1	8% (3)	37	2% (2)	129	4% (12)	309
2	3% (1)	35	7% (12)	176	15% (47)	319
3	5% (2)	37	6% (15)	260	13% (63)	491
4	3% (1)	32	7% (11)	162	10% (34)	348
5	0% (0)	31	3% (7)	202	68% (377)	552
6	11% (4)	36	10% (7)	246	6% (21)	358
7	0% (0)	26	1% (2)	167	3% (13)	443
8	0% (0)	28	0% (0)	186	1% (5)	440
9	3% (1)	32	2% (4)	163	1% (4)	433

Ao levar em consideração as interações ocorridas pela classificação dos calos e as concentrações de asparagina e prolina no meio de cultura (Tabela 17), houve uma maior indução de calos friáveis no tratamento 6, com média de 38,5 calos. No caso dos calos classificados como mucilaginosos, o maior desenvolvimento de calos com esta característica ocorreu no meio 3, com média de 61,25 calos.

Tabela 17 - Número médio de formações de calos de acordo com a classificação de aparência sob condições de diferentes concentrações de asparagina e prolina no meio de indução de calos

Tratamento	Classificação			
	Friável	Seco	Branco	Mucilaginoso
Controle	29,75	0,25	0	14,75
1	28	0,25	0,25	18,5
2	30,5	0	0	27,5
3	18	0	0	61,25
4	26,25	0,75	1,25	25,25
5	31	0,75	0,25	32,5
6	38,5	0	0	33,5
7	34,75	0	0	19,25
8	32,5	0,75	0,25	27
9	26,25	0,75	16,75	28,25

Regeneração de plantas

Para o experimento de regeneração de plantas foram utilizados 1250 calos com a característica friável e mucilaginosa provenientes dos diferentes meios de cultura distribuídos para os meios de regeneração de 1 a 6 descritos no item 3.5 (Tabela 4). Após 30 dias em meio de regeneração, em relação ao total de calos transferidos, 1226 calos oxidaram, 15 calos desenvolveram raízes e 10 calos regeneraram plantas. Como os calos com a característica branca não foram transferidos para este experimento, houve uma redução no desenvolvimento de raízes.

Ao analisar a regeneração de plantas após 30 dias (Figura 15), observou-se que os calos provindos do meio de indução de calos 9 e 5, contendo asparagina e prolina nas concentrações respectivamente de 2 g L^{-1} e 3 g L^{-1} ; 1 g L^{-1} e $1,5 \text{ g L}^{-1}$ foram mais propensos a regenerar plantas. Sendo que o menor número de plantas regeneradas foi observado no meio de indução de calos 6 em concentrações de 2 g L^{-1} de asparagina e $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de prolina. Considerando os meios de regeneração de plantas, o meio 2 que continha 2 mg L^{-1} de TDZ regenerou mais plantas (Figura 16).

Figura 15 – Regeneração de plantas a partir de calos após 30 dias em meio de regeneração. A primeira linha representa os meios de indução de calos com variações nas concentrações de asparagina (N) e prolina (P), seguido de suas respectivas concentrações apresentadas em g L^{-1} . A segunda linha representa os meios de regeneração de plantas com variações nas concentrações de thidiazuron (T) e IAA (I) seguidos de suas respectivas concentrações apresentados em mg L^{-1} .

Figura 16 – Plântulas regeneradas a partir de calos provindos do meio de indução 9 (Tabela 1) e no meio de regeneração 2 (Tabela 4) em 48 dias em meio de regeneração

Enraizamento de plantas

Após 73 dias em meio de regeneração, as plântulas obtidas foram transferidas para o meio de enraizamento (RootM) (RAGHUWANSHI; BIRCH, 2010). Após 33 foi observado o desenvolvimento de raízes. Estas plantas apresentaram fenótipos de plantas normais.

Experimento 3: Efeito de diferentes concentrações dos aminoácidos asparagina e prolina

Ao verificar que a presença de asparagina e prolina no meio de indução de calos e posterior passagem para o meio de regeneração demonstrou aumentar o número de regenerantes. Maiores concentrações de asparagina e prolina foram testados nos meios de indução de 1 a 5 descritos no item 3.3.1 (Tabela 2) a fim de constatar uma possível melhora no nível de oxidação e consequentemente o número de regenerantes. O número de explantes utilizados para este experimento para cada tratamento está descrito de acordo com a Tabela 18. Após 28 dias da inoculação, observou-se a perda de 34% devido à oxidação dos explantes totais. O menor índice de oxidação foi observado no tratamento controle, o qual apresentou 12% de oxidação.

Tabela 18 - Representação de contaminação, oxidação e formação de calos em embriões imaturos após 28 dias da inoculação, sob condições de diferentes concentrações de asparagina e prolina no meio de indução de calos

Tratamento	Contaminação	Oxidação	Formação de calos	S/ form. calos	Total de explantes
Controle	0% (0)	12% (2)	88% (14)	0% (0)	16
1	0% (0)	38% (15)	63% (25)	0% (0)	40
2	0% (0)	23% (9)	78% (31)	0% (0)	40
3	0% (0)	35% (14)	65% (26)	0% (0)	40
4	0% (0)	45% (18)	53% (21)	3% (1)	40
5	3% (1)	38% (15)	60% (24)	0% (0)	40
Total	0% (1)	34% (73)	65% (141)	0% (1)	216

Ao decorrer do experimento foi avaliado o número de calos oxidados até o período de 107 dias após a inoculação, realizando a subcultura e a subdivisão do material vegetal a cada 20 dias aproximadamente (Tabela 19). Observou-se que há menor nível de oxidação nos dias 51 e 72, quando comparados com o dia 107. Considerando a oxidação como fator limitante do experimento, que influencia diretamente no número de regenerantes. Nota-se que a transferência dos calos para os meios de regeneração pode ocorrer no período de 51 a 72 dias, evitando assim maiores níveis de oxidação.

Tabela 19 - Representação de oxidação em embriões imaturos ao decorrer do tempo após a inoculação, sob condições de diferentes concentrações de asparagina e prolina no meio de indução de calos

Tratamento	51 dias		72 dias		107 dias	
	Oxidação	Total	Oxidação	Total	Oxidação	Total
Controle	8% (1)	13	3% (1)	32	100% (14)	14
1	25% (4)	16	4% (1)	23	48% (34)	71
2	67% (8)	12	0% (0)	20	81% (20)	27
3	28% (5)	18	25% (5)	20	0% (0)	38
4	42% (5)	12	30% (6)	20	100% (15)	15
5	75% (9)	12	20% (3)	15	57% (12)	21

Ao avaliar se diferentes concentrações de asparagina e prolina influenciavam no desenvolvimento de diferentes características de calos (Tabela 20). Observou-se que não houve desenvolvimento de calos friáveis e calos classificados como mucilaginosos foram mais expressivos no meio 3, que possui em sua composição 4 g L⁻¹ de asparagina e 0,6 g L⁻¹ de prolina, o qual apresentou média de 23,75 calos.

Tabela 20 - Número médio de formações de calos de acordo com a classificação de aparência sob condições de diferentes concentrações de asparagina e prolina no meio de indução de calos

Tratamento	Classificação		
	Branco	Seco	Mucilaginoso
Controle	0,75	0	9,5
1	6,75	0,75	21,25
2	5,5	0,75	14
3	0,75	0,25	23,75
4	1	0	11,25
5	4,75	2	10,75

Experimento para regeneração de plantas

Devido ao alto nível de oxidação de calos observado no decorrer deste experimento, ocorreu à redução do número de material vegetal disponível para a realização do experimento de regeneração de plantas. Em virtude deste acontecimento, somente seis calos com aparência mucilaginosa provindos dos diferentes meios de indução de calos foram transferidos aleatoriamente para os meios de regeneração de plantas M11, 3 e 4, descritos no item 3.5, os quais apresentaram eficiência de regeneração de plantas variando de 1% a 15%. Após 14 dias, foram constatados 100% de oxidação do material vegetal, esse nível de oxidação pode ser explicado se levarmos em consideração o alto nível de oxidação observado no dia 107.

Nos experimentos utilizando como explantes os discos de folhas e embriões imaturos observou-se uma taxa alta de oxidação devido à produção de compostos fenólicos. Esses compostos fenólicos são metabolitos secundários, precursores da formação de parede celular, os quais também são respostas contra estresses bióticos e abióticos (ARNALDOS et al., 2001). Fan et al. (2006) evidenciaram em células de raízes de milho em condições de restrição hídrica ocorre à interrupção do alongamento celular, aumentando a deposição de lignina em suas células, favorecendo sua resistência ao déficit hídrico. Como a cultura do sorgo é considerada resistente ao estresse hídrico (ROONEY et al., 2007), podemos inferir que sua produção excessiva de compostos fenólicos na cultura *in vitro* esteja relacionada a essa resistência.

Em embriões imaturos, com a utilização dos antioxidantes PVP e ácido ascórbico no meio de indução de calos, houve somente uma planta regenerada. No entanto, a utilização dos aminoácidos asparagina e prolina em concentrações descritas no item 3.3.1 (Tabela 1) demonstrou reduzir a oxidação causada pela produção excessiva de compostos fenólicos. Desta maneira, ocorreu a indução de calos friáveis e mucilaginosos, os quais quando

transferidos para os meios de regeneração descritos no item 3.5 (Tabela 4), demonstraram atingir até 15% de regeneração de plantas. Devido a esses resultados os embriões imaturos se tornam o explante mais promissor para a cultura de tecidos.

4.3 Experimento de transformação genética de *S. bicolor* com *Agrobacterium tumefaciens*

4.3.1 Análise das plantas transgênicas

Neste experimento, observaram-se altas taxa de contaminação das sementes na germinação em meio de cultura com agente seletivo (canamicina). Isto acarretou na perda parcial do experimento, sendo assim, não foi possível verificar o percentual de transformação. O qual apresentou somente 3 plantas com resultados positivos por PCR para o gene *gfp* (Figura 17). Em um segundo experimento, este problema foi resolvido utilizando o antifúngico Cerconil WP® por 16 horas, onde foram geradas no total 818 sementes, destas 557 germinaram. Entretanto não apresentou resultados positivos para o gene *gfp*.

Entretanto, os resultados obtidos também demonstram a presença da *A. tumefaciens* em contato com planta hospedeira (gene *aadA*), confirmando a presença do T-DNA (gene *gfp*) (Figura 17). Este experimento demonstrou resultados promissores com esta técnica de transformação, mas necessitam-se estudos mais profundos. Na cultura de *S. bicolor*, Liu e Godwin (2012) relataram a eficiência de transformação genética de 20,7% utilizando a técnica de biolística. Porém esta técnica necessita de um protocolo de cultura de tecidos bem estabelecido. Neste trabalho foi obtida a eficiência de regeneração de plantas no máximo 15%, o qual não é favorável para a realização de transformação genética por biolística. Deste modo, a técnica de transformação genética “Floral Dip” amplamente utilizado em *Arabidopsis thaliana* se torna uma opção alternativa, com a vantagem de não necessitar da regeneração de plantas para ser realizada. Evidências demonstram que a esta técnica de transformação genética pode ser utilizada em outras culturas, como caso do trigo, o qual demonstrou eficiência de transformação de até 6,8% (ZALE et al., 2009) e no caso do rabanete, atingindo até 1,4% (CURTIS; NAM, 2001).

Figura 17 – Gel de agarose (1%) amplificados por PCR e correspondentes aos genes *aadA* (666pb) e *gfp* (437pb). 1kb plus = 1 kb ladder plus (Invitrogen); CR- = controle da reação negativo; CR+ = controle da reação positivo; WT = selvagem

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que:

- Entre os genótipos Híbrido 50A50 e A9735R, o genótipo A9735R demonstrou menores oxidações e maior resposta ao uso do regulador de crescimento 2,4-D.
- As concentrações de 1,0 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D demonstraram induzir mais calos com a aparência friável, quando comparada com outras concentrações.
- Discos de folhas, diante de diferentes antioxidantes (PVP, ácido ascórbico, ác. cítrico) utilizados no pré-tratamento e no meio de cultura para formação de calos não demonstraram reduzir a oxidação do material vegetal ao longo do tempo.
- Em embriões imaturos, a utilização de 2 g L⁻¹ de asparagina e 3 g L⁻¹ de prolina no meio de indução de calos e 2 mg L⁻¹ de TDZ no meio de regeneração de plantas, demonstraram maior número de regenerantes, atingindo até 15% de eficiência de regeneração.
- Calos classificados como friáveis e mucilaginosos foram mais predispostos a regenerar plantas, e calos classificados como brancos evidenciaram ser mais propensos a desenvolver raízes em meio de regeneração.
- A técnica de “Floral Dip” evidencia ser um método promissor para transformação genética de sorgo.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHD, R.; HAKAM, N.; LABHILILI, M.; UDUPA, S. M. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in in vitro plantlet regeneration of faba bean. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 997–1002, 2008.
- AL-JANABI, S. M.; MCCLELLAND, M.; PETERSEN, C.; SOBRAL, B. W. Phylogenetic analysis of organellar DNA sequences in the Andropogoneae: Saccharinae. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, n. 8, p. 933–944, 1994.
- ALVES, E. DE C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 421–430, 2004.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. 1a ed. Planaltina, DF: Embrapa, 2002.
- ARNALDOS, T. L.; MUNOZ, R.; FERRER, M. A.; CALDERÓN, A. A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria xananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v. 113, n. 3, p. 315–322, 2001.
- BHASKARAN, S.; SMITH, R. Enhanced somatic embryogenesis in *Sorghum bicolor* from shoot tip culture. **In vitro cellular & developmental biology**, v. 24, n. 1, 1988.
- BNDES; CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.
- BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C.; ROMANO, E.; RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L.; BEZERRA, I. C.; BARROS, L. M. G.; MARCELLINO, L. H.; SÁ, M. F. G. DE; SANTOS GAMA, M. I. C. DOS; RIBEIRO, S. DA G.; CARNEIRO, V. T. DE C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Serviço de Produção De Informação - SPI, 1998.
- BRETTELL, R. I. S.; WERNICKE, W.; THOMAS, E. Embryogenesis from cultured immature inflorescences of *Sorghum bicolor*. **Protoplasma**, v. 104, n. 1-2, p. 141–148, 1980.
- CARVALHO, C. C. H. S.; ZEHR, U. U. B.; GUNARATNA, N.; ANDERSON, J.; KONONOWICZ, H. H.; HODGES, T. K.; AXTELL, J. D. Agrobacterium-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. **Genetics and Molecular Biology**, v. 269, n. 2, p. 259–269, 2004.
- CASAS, A. M.; KONONOWICZ, A. K.; ZEHR, U. B.; TOMES, D. T.; AXTELL, J. D.; BUTLER, 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**, v. 90, n. 23, p. 11212–6, 1993.
- CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 16, n. 6, p. 735–743, 1998.

CURTIS, I. S.; NAM, H. G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method – plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. **Transgenic research**, v. 10, n. 4, p. 363–71, 2001.

D'ONOFRIO, C.; MORINI, S. Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration in in vitro grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. **Scientia Horticulturae**, v. 107, n. 2, p. 194–199, 2006.

DILLON, S. L.; SHAPTER, F. M.; HENRY, R. J.; CORDEIRO, G.; IZQUIERDO, L.; LEE, L. S. Domestication to crop improvement: genetic resources for Sorghum and Saccharum (Andropogoneae). **Annals of botany**, v. 100, n. 5, p. 975–89, 2007.

DOGGETT, H. **Sorghum**. 1st ed. New York: Longmans, 1970.

DOGGETT, H. **Sorghum**. 2nd ed. London, New York: Longman Scientific & Technical, 1988.

DOYLE, J.; DOYLE, J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, , n. 19, p. 11–15, 1987.

EDMÉ, S. J.; MILLER, J. D.; GLAZ, B.; TAI, P. Y. P.; COMSTOCK, J. C. Genetic Contribution to Yield Gains in the Florida Sugarcane Industry across 33 Years. **Crop Science**, v. 45, n. 1, p. 92, 2005.

FAN, L.; LINKER, R.; GEPSTEIN, S.; TANIMOTO, E.; YAMAMOTO, R.; NEUMANN, P. M. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. **Plant physiology**, v. 140, n. 2, p. 603–12, 2006.

FAO. FAO. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>, 2012.

GAO, J.; XIA, B.; LUO, F.; SUN, S.; PEI, Z.; GUI, Z.; YUAN, Q.; LI, X. Marker-assisted breeding for rf1, a nuclear gene controlling A1 CMS in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Euphytica**, v. 193, n. 3, p. 383–390, 2013.

GAO, Z.; XIE, X.; LING, Y.; MUTHUKRISHNAN, S.; LIANG, G. H. Agrobacterium tumefaciens-mediated sorghum transformation using a mannose selection system. **Plant biotechnology journal**, v. 3, n. 6, p. 591–9, 2005.

GROOTBOOM, A. W.; MKHONZA, N. L.; O'KENNEDY, M. M.; CHAKAUYA, E.; KUNERT, K.; CHIKWAMBA, R. K. Biolistic Mediated Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) Transformation via Mannose and Bialaphos Based Selection Systems. **International Journal of Botany**, v. 6, n. 2, p. 89–94, 2010.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogenese somática e sementes sintéticas. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. p.533–568, 1999. Brasília, DF: Embrapa 1999.

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 Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, n. 3, p. 379–388, 2006.

GUREL, S.; GUREL, E.; KAUR, R.; WONG, J.; MENG, L.; TAN, H.-Q.; LEMAUX, P. G. Efficient, reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum using heat treatment of immature embryos. **Plant cell reports**, v. 28, n. 3, p. 429–44, 2009.

HAGIO, T. Adventitious shoot regeneration from immature embryos of sorghum. **Plant cell, Tissue and organ culture**, v. 1, n. 68, p. 65–72, 2002.

INDRA, A. P.; KRISHNAVENI, S. Effect of hormones, explants and genotypes in in vitro culturing of sorghum. **Journal of Biochemical Technology**, v. 1, n. 4, p. 96–103, 2009.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 196–223, 2001.

JIMÉNEZ, V. M.; CASTILLO, J.; TAVARES, E.; GUEVARA, E.; MONTIEL, M. In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, n. 3, p. 389–395, 2006.

JOGESWAR, G.; RANADHEER, D.; ANJIAH, V.; KAVI KISHOR, P. B. High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench from immature inflorescence explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 43, n. 2, p. 159–166, 2007.

KERBAUY, G. B. Competencia e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 2nd ed., p.519–531, 1999. Brasília: Embrapa 1999.

KHOSROUSHAHI, Y. A.; NADERI-MANESH, H.; SIMONSEN, T. H. Effect of Antioxidants and Carbohydrates in Callus Cultures of *Taxus brevifolia*: Evaluation of Browning, Callus Growth, Total Phenolics and Paclitaxel Production. **BioImpacts**, v. 1, n. 1, p. 37–45, 2011.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C. P. L.; BERDING, N.; SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant cell reports**, v. 25, n. 10, p. 1007–15, 2006.

LIU, G.; GODWIN, I. D. Highly efficient sorghum transformation. **Plant cell reports**, v. 31, n. 6, p. 999–1007, 2012.

LU, L.; WU, X.; YIN, X.; MORRAND, J.; CHEN, X.; FOLK, W. R.; ZHANG, Z. J. Development of marker-free transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using standard binary vectors with bar as a selectable marker. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, n. 1, p. 97–108, 2009.

MAHESWARI, M.; JYOTHI LAKSHMI, N.; YADAV, S. K.; VARALAXMI, Y.; VIJAYA LAKSHMI, A.; VANAJA, M.; VENKATESWARLU, B. Efficient plant regeneration from shoot apices of sorghum. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 4, p. 741–744, 2006.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MACKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Revista Brasileira de Genética, 1994.

MING, R.; LIU, S. C.; LIN, Y. R.; SILVA, J. DA; WILSON, W.; BRAGA, D.; DEYNZE, A. VAN; WENSLAFF, T. F.; WU, K. K.; MOORE, P. H.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M. E.; IRVINE, J. E.; PATERSON, A. H. Detailed alignment of saccharum and sorghum chromosomes: comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. **Genetics**, v. 150, n. 4, p. 1663–82, 1998.

MORGADO, L. Sorgho. **Espécies Vegetais Exóticas com Potencialidades para o Semi-árido Brasileiro**. 1a ed., p.251–271, 2005. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NGUYEN, T.-V.; THANH THU, T.; CLAEYS, M.; ANGENON, G. Agrobacterium-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved in vitro regeneration system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, n. 2, p. 155–164, 2007.

NIEDZ, R. P. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. **HortTechnology**, v. 8, n. 4, p. 598–601, 1998.

PATERSON, A. H.; BOWERS, J. E.; BRUGGMANN, R.; DUBCHAK, I.; GRIMWOOD, J.; GUNDLACH, H.; HABERER, G.; HELLSTEN, U.; MITROS, T.; POLIAKOV, A.; SCHMUTZ, J.; SPANNAGL, M.; TANG, H.; WANG, X.; WICKER, T.; BHARTI, A. K.; CHAPMAN, J.; FELTUS, F. A.; GOWIK, U.; GRIGORIEV, I. V.; LYONS, E.; MAHER, C. A.; MARTIS, M.; NARECHANIA, A.; OTILLAR, R. P.; PENNING, B. W.; SALAMOV, A. A.; WANG, Y.; ZHANG, L.; CARPITA, N. C.; FREELING, M.; GINGLE, A. R.; HASH, C. T.; KELLER, B.; KLEIN, P.; KRESOVICH, S.; MCCANN, M. C.; MING, R.; PETERSON, D. G.; MEHBOOB-UR-RAHMAN; WARE, D.; WESTHOFF, P.; MAYER, K. F. X.; MESSING, J.; ROKHSAR, D. S. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. **Nature**, v. 457, n. 7229, p. 551–6, 2009.

POLA, S. Leaf discs as a source material for plant tissue culture studies of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 3, n. 1, p. 70–78, 2011.

POLA, S.; MANI, N.; RAMANA, T. Mature embryo as a source material for efficient regeneration response in *Sorghum* (*Sorghum bicolor* L. Moench.). **Sjemenarstvo**, v. 26, n. 3, p. 93–104, 2009.

RAGHUWANSHI, A.; BIRCH, R. G. Genetic transformation of sweet sorghum. **Plant cell reports**, v. 29, n. 9, p. 997–1005, 2010.

RAO, A. M.; SREE, K. P.; KISHOR, P. B. Enhanced plant regeneration in grain and sweet sorghum by asparagine, proline and cefotaxime. **Plant cell reports**, v. 15, n. 1-2, p. 72–5, 1995.

ROONEY, W. L.; BLUMENTHAL, J.; BEAN, B.; MULLET, J. E. Designing sorghum as a dedicated bioenergy feedstock. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 2, p. 147–157, 2007.

SATHYANARAYANA, B. N.; VARGHESE, D. B. **Plant Tissue Culture**. New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2007.

SATO, S.; CLEMENTE, T.; DWEIKAT, I. Identification of an elite sorghum genotype with high In vitro performance capacity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 40, n. 1, p. 57–60, 2004.

SCHIMIDT, A. A. P. **Sorgo**. São Paulo - SP: Ícone, 1987.

SILVA, A. F. DA; COELHO, A. M.; MAY, A.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; SILVA, D. D. DA; KARAM, D.; LANDAU, E. C.; RIBAS, P. M.; DURÃES, F. O. M.; MANTOVANI, E. C.; FILHO, I. A. P.; CRUZ, I.; SOBRINHO, J. B. G.; WAQUIL, J. M.; COTA, L. V.; OLIVEIRA, M. F. DE; VIANA, P. A.; SCHAFFERT, R. E.; COSTA, R. V. DA; MENDES, S. M.; MIRANDA, R. A. DE. **Sistema Embrapa de Produção Agroindustrial de Sorgo Sacarino para Bioetanol Sistema BRS1G – Tecnologia Qualidade Embrapa**. Sete Lagoas, 2012.

SMITH, C. W.; FREDERIKSEN, R. A. **Sorghum: Origin, History, Technology, and Production**. Nova York: Wiley, 2000.

TABOSA, J. N.; LIMA, G. S.; LIRA, M. A.; FILHO, J. J. T.; BRITO, A. R. M. B. Programa de melhoramento de sorgo e milho em Pernambuco. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**, p. 29, 1999.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; AMAURI, B. J. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. vol. 2, 1 ed. Brasília: Embrapa, 1999.

ZALE, J. M.; AGARWAL, S.; LOAR, S.; STEBER, C. M. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant cell reports**, v. 28, n. 6, p. 903–13, 2009.

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, n. 6, p. 789–98, 2000.