



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI PRÓ-REITORIA
DE ENSINO DE GRADUAÇÃO BACHARELADO EM ENGENHARIA
AGRONOMICA CAMPUS SETE LAGOAS**

FABIANE LACERDA MORAES

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA NA
CULTURA DO SORGO**

Sete Lagoas,

MG

2023

FABIANE LACERDA MORAES

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA NA
CULTURA DO SORGO**

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Engenharia de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Agronomia.

Area de concentração: Biotecnologia Vegetal

Orientador: Prof. Nadia Nardely Durães

Parrella

Sete Lagoas,

MG2023

FABIANE LACERDA MORAES

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA NA
CULTURA DO SORGO**

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Engenharia de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Agronomia.

Sete Lagoas, 24 de Novembro 2023.

Banca avaliadora:

Dra. Andrea Almeida Carneiro

Dra. Meire de Cássia Alves

Dra. Nádya Nardely Lacerda Durães Parrella (UFSJ) Orientadora

FABIANE LACERDA MORAES

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M828e Moraes, Fabiane Lacerda.
Embrigênese somática e transformação genética na
cultura do sorgo / Fabiane Lacerda Moraes ;
orientadora Nádia Nardely Lacerda Durães Parrella ;
coorientadora Andrea Almeida Carneiro. -- Sete
Lagoas, 2023.
26 p.

Trabalho de Conclusão (Graduação - Engenharia
Agrônômica) -- Universidade Federal de São João del
Rei, 2023.

1. Calos. 2. Cultivar. 3. Regeneração Celular. 4.
Transformação Genética. I. Lacerda Durães Parrella ,
Nádia Nardely , orient. II. Almeida Carneiro,
Andrea, co-orient. III. Título.

Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.
(Augusto Branco)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	9
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
Embriogênese Somática:.....	10
Preparo da <i>Agrobacterium tumefaciens</i> – LBA 4404.....	11
Preparo dos embriões para transformação:.....	11
Transformação genética de embriões imaturos de sorgo:.....	11
Seleção e Regeneração de Plantas:.....	12
Análise Estatística:.....	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
CONCLUSÕES.....	19
REFERÊNCIAS.....	22

RESUMO

Os principais objetivos do melhoramento genético do sorgo é aumentar a sua produtividade e diminuir a incidência de doenças e pragas. A biotecnologia pode auxiliar na melhoria destas características agronômicas com a transformação genética. Desse modo, para a produção de cultivares transgênicos de sorgo é necessário um protocolo de regeneração celular. O objetivo do trabalho foi selecionar linhagens de sorgo capazes de regenerar em cultura de tecidos e testar a capacidade da *Agrobacterium tumefaciens* de infectar embriões imaturos dessas cultivares. Para o experimento de regeneração de sorgo em cultura de tecidos foram utilizadas seis linhagens de sorgo (CMSXS 101 B, CMSXS 107 B, CMSXS 112 B, CMSXS 156 B, TX 430, P898012) pertencentes a Embrapa Milho e Sorgo. O total de plântulas formadas na concentração 1,5 mg/L foi de 180, seguida da concentração de 1,0 mg/L com 176 plântulas e por último na concentração de 2,0 mg/L, 108 plântulas regeneradas. A linhagem P898012 apresentou melhor capacidade de formação de calos embriogênicos *in vitro* e melhor capacidade de regeneração das plantas nas três concentrações de 2,4-D utilizadas comparados as demais linhagens testadas. A concentração de 1,5 mg/L de 2,4 D garantiu uma boa formação de calos e um maior número de plântulas. Para a formação dos calos a concentração de 2,0 mg foi satisfatória, porém, os embriões ficaram comprometidos na maturação, no qual foram inibidos para a formação das plântulas.

Palavras-chave: calos, cultivar, regeneração celular, transformação genética.

ABSTRACT

The main objectives of sorghum genetic improvement are to increase its productivity and reduce the incidence of diseases and pests. Biotechnology can help improve these agronomic characteristics with genetic transformation. Therefore, for the production of transgenic sorghum cultivars, a cell regeneration protocol is necessary. The objective of the work was to select sorghum lines capable of regenerating in tissue culture and test the ability of *Agrobacterium tumefaciens* to infect immature embryos of these cultivars. For the sorghum regeneration experiment in tissue culture, six sorghum lines (CMSXS 101 B, CMSXS 107 B, CMSXS 112 B, CMSXS 156 B, TX 430, P898012) belonging to Embrapa Milho e Sorgo were used. The total number of seedlings formed at a concentration of 1.5 mg/L was 180, followed by a concentration of 1.0 mg/L with 176 seedlings and finally at a concentration of 2.0 mg/L, 108 seedlings regenerated. The P898012 strain presented the best capacity for formation of embryogenic callus in vitro and the best capacity for plant regeneration in the three concentrations of 2,4-D used in comparison with many strains tested. The concentration of 1.5 mg/L of 2,4-D guaranteed good callus formation and a greater number of seedlings. For the formation of callus, the concentration of 2.0 mg was guaranteed, however, the embryos were compromised in maturation, which was inhibited for the formation of seedlings.

Key words: callus, cultivar, cell regeneration, genetic transformation.

INTRODUÇÃO

A cultura do sorgo vem ganhando espaço em proporção de área plantada na agricultura desde os tempos antigos, devido às características em habilidade, rusticidade e versatilidade em adaptação no ambiente. No Brasil, o sorgo é designado para alimentação animal e produção de energia devido a grande viabilidade e potencial fisiológico das espécies.

O plantio do sorgo oferece vantagens por apresentar ciclos curtos de aproximadamente quatro meses, facilidade em operacionalização e mecanização. Além disso, o sorgo possui colmos suculentos, alta produção de massa verde, e o bagaço pode ser utilizado como fonte de energia elétrica ou etanol na industrialização (PARRELLA et al., 2010).

A constante demanda de produção agregou alguns desafios para o melhoramento do sorgo voltados para o aumento de produtividade e redução do aparecimento de doenças, pragas e plantas daninhas (FERNANDES, 2013), com intuito de tornar esta cultura mais atrativa aos empreendedores rurais (SANTOS et al, 2015).

A combinação do melhoramento genético clássico com as tecnologias de transformação genética resultou na criação de diversas espécies de plantas capazes de tolerar estresses bióticos e abióticos, as quais estão sendo comercialmente empregadas com êxito. Assim, há um vasto potencial para aperfeiçoar o cultivo do sorgo por meio da integração e expressão de genes de relevância agrônômica através da transformação genética. (BRANDÃO, 2007).

Para potencializar o crescimento das plantas, a manipulação genética tem se revelado uma ferramenta eficaz para a indução, modulação e expressão gênica. Um exemplo disso é o estudo conduzido por Cook et al., que destacou o papel de duas alquilresorcinol sintases na síntese da molécula alelopática sorgoleona, evidenciando a redução de sua expressão no sorgo. No entanto, a realização de cultura de tecidos e transformação genética no sorgo é desafiadora, sendo classificado como uma das espécies vegetais mais complexas nesse contexto. Uma transmissão genética eficiente depende essencialmente de avançadas técnicas de cultura de tecidos e de um sistema de entrega de DNA sofisticado.

O presente trabalho teve o objetivo de selecionar linhagens de sorgo capazes de formar calos regeneráveis *in vitro*, além de testar a capacidade da *Agrobacterium tumefaciens* de infectar embriões imaturos da cultivar selecionada

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nas dependências da Embrapa Milho e Sorgo, vinculada com a instituição de ensino UFSJ – Universidade Federal de São João del-Rei, de Sete Lagoas.

Genótipos utilizados e preparação dos explantes: Para o experimento de regeneração de sorgo em cultura de tecidos foram utilizadas seis linhagens de sorgo (CMSXS 101 B, CMSXS 107 B, CMSXS 112 B, CMSXS 156 B, TX 430, P898012). As linhagens TX 430 e P898012 são de domínio público e as demais linhagens pertencem ao banco de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo.

As plantas de sorgo foram cultivadas em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, com temperaturas diurnas / noturnas de 28/21° C, fotoperíodo de 16 h de luz / 8 h de escuridão. As sementes foram coletadas entre 11-14 dias após a polinização e seus embriões imaturos usados nos experimentos de regeneração de plântulas em cultura de tecidos e transformação genética.

Embriogênese Somática:

Inicialmente, foram removidas todas as sementes imaturas da panícula, as quais passaram por um processo de desinfestação utilizando álcool 70°, água sanitária 50%, e água tipo I. Após a desinfestação, as sementes imaturas foram cuidadosamente enxaguadas com água tipo I estéril em uma área de fluxo laminar. Utilizando pinça e espátula, os embriões imaturos, com tamanho aproximado de 1,0 a 1,5 mm, foram extraídos para cultivo em placas de Petri, onde foram inseridos em um meio de cultura destinado a induzir a formação de calos (CIM) contendo diferentes concentrações de 2-4 D (2,4-diclorofenoxiacético). Em seguida, as placas foram seladas e colocadas em câmaras de crescimento no escuro, mantendo uma temperatura entre 26°C a 28°C, durante um período de 30 dias, com subcultivo a cada 15 dias.

Através da utilização de uma lupa, foram analisadas as características de desenvolvimento das diversas linhagens de sorgo testadas. Após o período de 30 dias, os calos formados foram transferidos para um meio de regeneração (SM), as placas foram novamente seladas e colocadas em câmaras de crescimento a uma temperatura de 26-28 °C, desta vez na presença de luz, seguindo um fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro), ao longo de 30 dias, com subcultivo a cada 10 dias.

Os meios de cultivo utilizados no processo de regeneração in vitro das linhagens de sorgo consistiram em uma solução de sais, sacarose e 2,4-D, além de serem suplementados com antioxidantes conforme indicado na tabela 1.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura usados para a regeneração de sorgo, Sete Lagoas, 2022 adaptada.

Reagentes	Unidade / L	Indução de Calos (CIM)	Regeneração (SMS)	Enraizamento (GS)
MS saís	g	4,3	4,3	4,3
MES	g	0,5	0,5	0,5
Prolina	g	0,7	-	-
2,4-D	mg	1,0;1,5;2,0	-	-
Sacarose	g	30	30	30
Glicose	g	-	-	-
Vitamina B5 ou Gamborg(1000X)	mL	10	10	10
Ácido ascórbico	mg	-	-	-
BAP	mg	-	1	-
AIA	mg	-	1	-
IBA	mg	-	-	1
Agar	g	10	10	10
PVPP	g	10	10	-
AS 100Mm	mL	-	-	-
CuSO ₄	mg	0,16	0,16	0,16
Asparagina	g	1,0	-	-
KH ₂ SO ₄	g	1,0	-	-
Tioxin	mg	200	200	-
Glufosinato	mg	-	-	-
pH		5.8	5.8	5.8
Tempo		-	4-6 semanas	2-3 semanas
		Autoclavar	Autoclavar	Autoclavar

Preparo da *Agrobacterium tumefaciens* – LBA 4404

Retire a *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA 4404 do freezer a -80°C e faça o plaqueamento em meio YEP contendo os antibióticos apropriados. Incube a 28°C, no escuro, por um período de 2-3 dias. Selecione uma colônia isolada e faça o plaqueamento em um novo meio YEP, utilizando os mesmos antibióticos. Novamente, incube a 28°C, no escuro, por 2-3 dias.

Utilize uma alça de bactéria para inocular o meio de infecção (IM) até atingir uma densidade celular de 0.4 A₅₅₀. Incube a solução bacteriana a 100 rpm por 4 horas, mantendo a temperatura ambiente entre 22 a 23°C.

Preparo dos embriões para transformação:

O protocolo de transformação foi uma adaptação do trabalho de Zhang ZJ et al. O explante empregado consiste em embriões imaturos com um comprimento médio de aproximadamente 1 a 1,5 mm. O processo de esterilização das sementes de sorgo envolve a imersão em uma solução de 50% de água sanitária por 15 minutos, seguida por três lavagens consecutivas em água destilada estéril. Posteriormente, os embriões são isolados em grupos de 50 por vez, sendo colocados em meio de inoculação sem a presença de *Agrobacterium*.

Transformação genética de embriões imaturos de sorgo:

Remova o meio de inoculação que envolve os embriões, utilizando uma pipeta para

deixar apenas o suficiente para cobri-los. Em seguida, coloque o tubo em um banho maria a 43°C por 3 minutos, seguido por 2 minutos a 25°C. Adicione imediatamente 1 mL de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA 4404 e incube no escuro por um período de 10 minutos. Transfira os embriões para o meio de co-cultivo (CCS), garantindo que o eixo embrionário entre em contato com o meio. Mantenha as placas com os embriões a uma temperatura de 22°C, no escuro, ao longo de 3 dias.

Seleção e Regeneração de Plantas:

Mova os embriões para o meio de repouso (RS) e mantenha-os por 10 dias, realizando um subcultivo após 5 dias. Posteriormente, transfira para o meio de indução e seleção de calos (SS) por 10 dias, efetuando subcultivos sempre que compostos fenólicos surgirem no meio de cultivo. Transfira os calos embriogênicos para o meio de regeneração (SMS), onde a exposição à luz (100–150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 18:6 h) a uma temperatura de 26 °C é essencial para a indução de brotações, ao longo de 6 a 10 semanas. Realize subcultivos dos calos a cada 2 semanas, fragmentando-os em pequenos pedaços de ~3 mm e descartando áreas de coloração escura. Em meio SMS contendo 2,5 mg/L de glufosinato, observou-se que os calos não transgênicos adquiriram coloração marrom e morreram rapidamente após a exposição à luz, enquanto os calos transformados permaneceram viáveis e regeneraram brotos. Transfira as plântulas com 3 a 4 folhas para o meio de enraizamento (GS) por 2-3 semanas.

Tabela 2. Composição dos meios de cultura usados para a transformação e regeneração de sorgo, Sete Lagoas, 2022, adaptada.

Reagentes	Unidade / L	Infecção (INFS)	Co-cultivo (CCS)	Repouso (RS)	Seleção (SS)	Regeneração (SMS)	Enraizamento (GS)
MS sais	g	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
MES	g	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Prolina	g	-	0,7	1,0	1,0	-	-
2,4-D	mg	1,5	1,5	1,5	1,5	-	-
Sacarose	g	68,5	20	30	30	30	30
Glicose	g	36	10	-	-	-	-
Vitamina B5	mL	1	1	1	1	1	1
ou Gamborg(1000X)							
Ácido ascórbico	mg	-	10	-	-	-	-
BAP	mg	-	-	-	-	1	-
AIA	mg	-	-	-	-	1	-
IBA	mg	-	-	-	-	-	1
Agar	g	-	8	8	8	8	8
PVPP	g	-	10	10	10	10	10
AS 100Mm	mL	1	1	-	-	-	-
CuSO ₄	mg	-	-	0,16	0,16	0,16	0,16
Asparagina	g	-	-	1	1	-	-
KH ₂ SO ₄	g	-	-	1	1	-	-
Tioxin	mg	-	-	200	200	200	-
Glufosinato	mg	-	-	-	2,5	2,5	-
pH		5.2	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
Tempo		10 min	3 dias	10 dias	10-15 dias	4-6 semanas	2-3 semanas
		Filtrar	Autoclavar	Autoclavar	Autoclavar	Autoclavar	Autoclavar

Análise Histoquímica:

Preparar uma solução contendo o substrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucuronídeo). Incubar os embriões na solução GUS à temperatura geralmente em torno de 37°C. A presença da coloração azul indica a atividade da enzima GUS, sugerindo a expressão do gene alvo nos embriões.

Na transformação genética com GUS, as análises histoquímicas devem ser realizadas após 10 dias da transformação.

Análise Estatística:

As análises de dados experimentais de regeneração e transformação foram organizadas em Bloco Randomizado, quando o efeito do bloco não foi significativo. Cada experimento de regeneração em cultura de tecidos foi repetido três vezes, e os dados foram coletados para análise estatística. Comparações entre diferentes tratamentos de 2-4 D foram feitas pelo mesmo procedimento de diferença significativa usando ANOVA de uma via e teste t no software Sisvar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo de Elkonin et al. (1995), Kaeppler e Pedersen (1996), demonstraram um grande número de calos embriogênicos friáveis em linhagens de sorgo apresentando menos mucilagem e escurecimento de calos. Para Oberthur et al. (1983), o escurecimento nos calos e no meio de cultura estão relacionados com a produção de compostos fenólicos, pois, os compostos fenólicos são provenientes do metabolismo secundário, atribuindo um papel importante no metabolismo de inúmeras espécies de plantas como mecanismo de defesa contra insetos e microrganismos. Portanto, quando se trata do cultivo *in vitro* do sorgo, a característica do escurecimento ou a produção dos compostos fenólicos prejudicam o aparecimento dos calos, bem como no desenvolvimento da planta (KRESOVICH et al., 1987; GEORGE, 1996; ZHU et al., 1998).

Para Hu e Wang (1983), o meio CIM que contém auxina (2,5 mg L⁻¹ 2,4-D) e citocinina (0,5 mg L⁻¹ cinetina) aplicado para pesquisa de formação de calos embriogênicos, demonstrou que a combinação de reguladores contribui para o crescimento e estimula a embriogênese *in vitro*. Normalmente, para alcançar maior número de brotações são utilizadas as citocinas, pois atuam no estímulo da produção e nas taxas de multiplicação. Quando são utilizadas as auxinas, mesmo que não promovam a proliferação de brotações, ajudam no crescimento da cultura, pois estão associadas a regulação da morfogênese em conjunto com as citocinas.

De acordo com Sharma et al. (1989) demonstraram que os calos de sorgo formados em meio contendo auxinas e citocininas, apresentaram alta taxa de regeneração. Portanto, Cai e Butler (1990) defendem que concentrações baixas de auxinas e 0,5 mg L⁻¹ de citocinas já garantem regeneração de plantas de sorgo. Assim, Hagio (2002) afirma que a combinação da

auxina 2,4-D e da citocinina é expressamente importante para indução dos calos regeneráveis de sorgo, considerado como um reflexo dos conteúdos endógenos desses reguladores de crescimento. O equilíbrio do uso da citocinina e auxina é um atributo essencial na morfogênese de plantas, garantindo forte influência para a formação de raízes e brotos (CARNEIRO et al. 2019).

Nesse estudo foram realizados testes do meio MS suplementado por concentrações variadas (1,0mg/L, 1,5mg/L e 2,0mg/L) de 2,4-D com intuito de induzir os calos embriogênicos a partir do embrião imaturo do sorgo. De acordo com os resultados obtidos, todas as linhagens apresentaram a capacidade de formação dos calos embriogênicos (Figura 1)

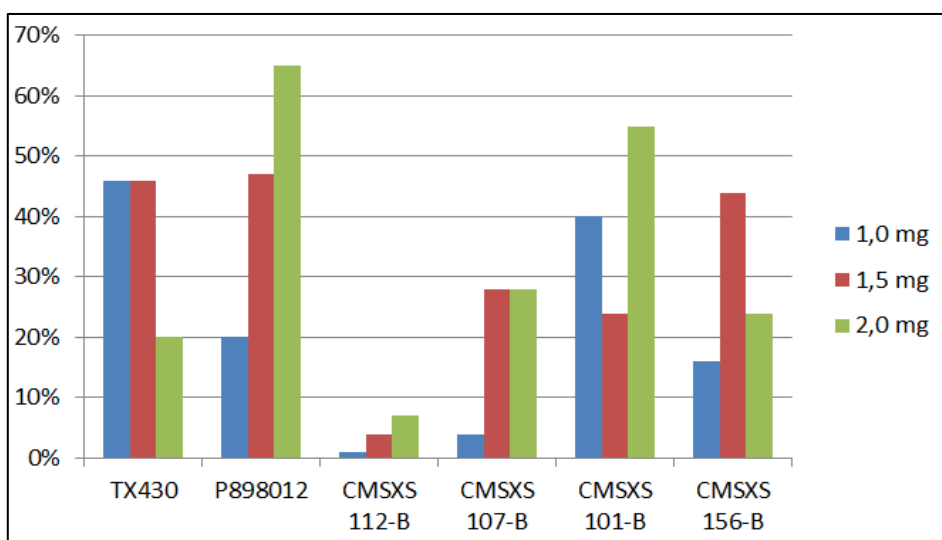


Figura 1: Porcentagem dos calos embriogênicos somáticos obtidos após o cultivo de embriões zigóticos imaturos de diferentes cultivares de *Sorghum bicolor* em meio CIM suplementado com 2,4-D.

A figura 2 mostra os embriões zigóticos, imaturos com aproximadamente 1,5 a 2 mm de comprimento, extraídos dos grãos de sorgo após 10 dias de polinização.



Figura 2. Embriões imaturos com tamanho de 1,0 – 1,5mm em meio de cultura CIM.

A figura 3 mostra um embrião zigótico com a formação de um calo embriogênico somático na superfície. A interação citocinina/auxina influencia o desenvolvimento dos calos embriogênicos e das estruturas globulares. Os embriões somáticos surgem como estruturas globulares (calos cobertos de nódulos) bem definidos com aspecto brilhante, formação de massas embriogênicas e presença de embriões somáticos em diferentes estádios de diferenciação, conforme demonstrado na figura a seguir.

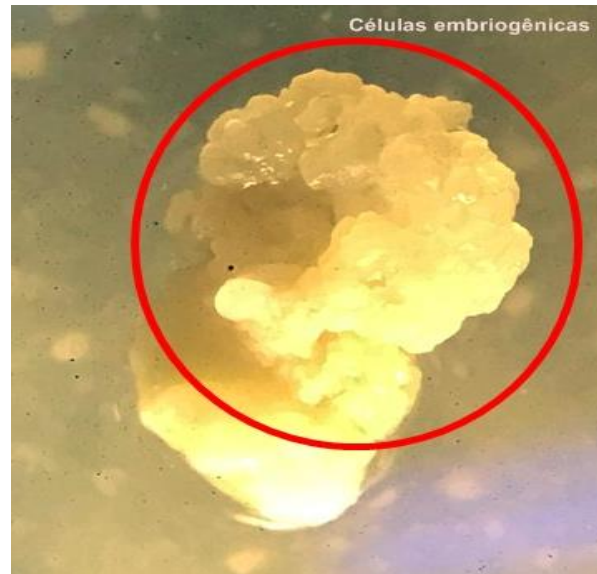


Figura 3. Calos com formação de células embriogênicas.

Legenda: Calo embriogênico formado a partir de embrião zigótico imaturo de sorgo, após 15 dias em meio CIM suplementado com 1,5mg/L de 2-4 D.

Nas transformações utilizando o protocolo de regeneração adaptado do trabalho de Zhang ZJ et al. , os embriões imaturos de sorgo das linhagens TX430 e CMSXS101B transformados via *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA 44404 contendo a construção gênica pTF102 apresentaram resposta em regeneração conforme apresentado na figura a seguir:

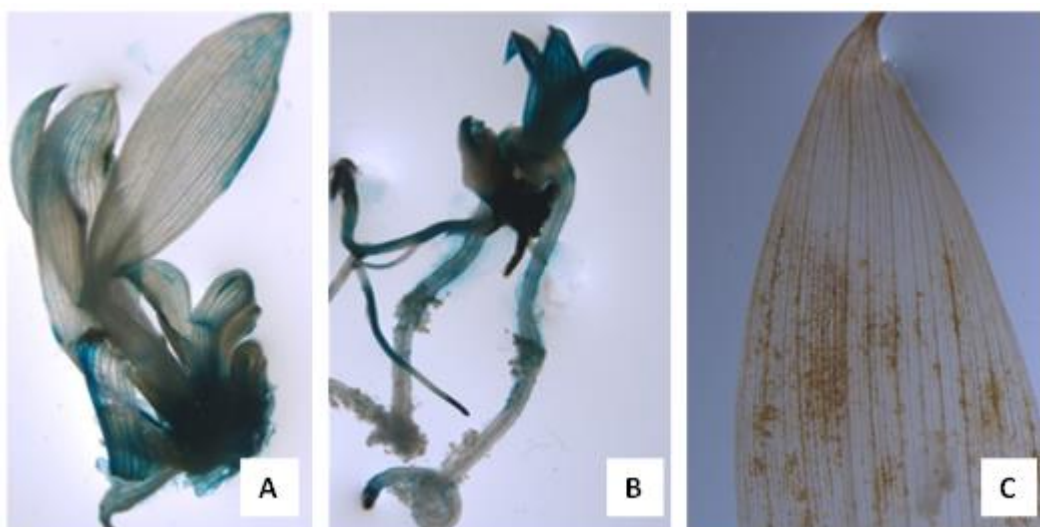


Figura 4 . Teste histoquímico de GUS.(A) planta de sorgo transgênica da linhagem Tx430 expressando a proteína GUS; (B) planta de sorgo transgênica da linhagem CMSXS101B expressando a proteína GUS;(C) planta de sorgo da linhagem não transgênica..

O cultivar de sorgo P898012 testado com acréscimo da auxina sintética 2,4 D destacou na quantidade dos calos para a concentração de 2,0 mg e 1,5 mg e uma pequena produção dos composto fenólico na cultura dos tecidos. Já o cultivar CMSXS 112-B obteve a menor resposta morfogênia dos calos para os três tratamentos a 1,0 mg, 1,5 mg e 2,0 mg. Para a concentração de 1,0 mg/L (2,4-D), o cultivar TX430 apresentou percentual maior de formação dos calos comparado aos demais cultivares, para as concentrações de 1,0 mg e 1,5 mg, apresentaram aproximadamente cinquenta por cento dos calos em ambas. Ainda, os resultados mostraram que no tratamento com a concentração de 2,0 mg/L houve maior regeneração dos calos (figura 5).

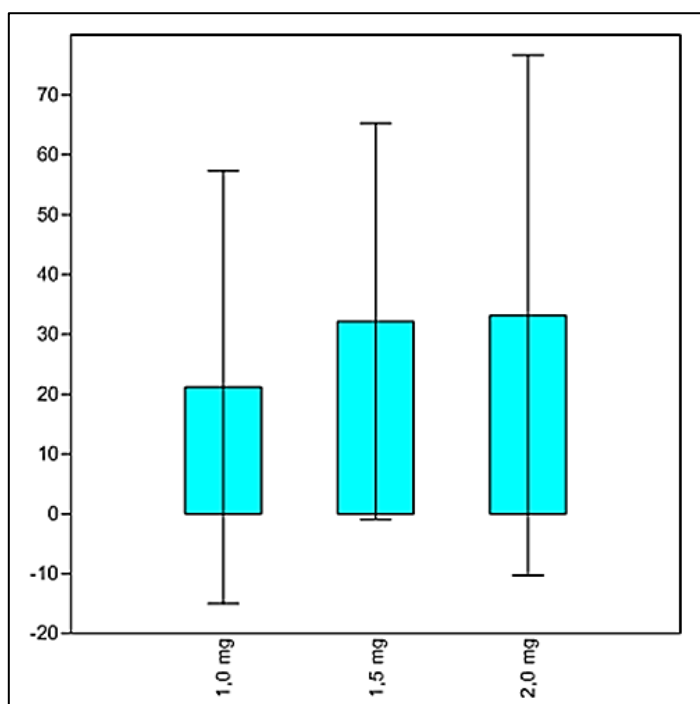


Figura 5. Porcentagem da média do número de calos referente as concentrações 1,0 mg, 1,5 mg e 2,0 do regulador 2,4-D

Segundo Cho et al. (2014), a presença do regulador 2,4-D contribui para a melhora na regeneração dos calos, pois atua como um ativador para o desenvolvimento da planta ou constituinte de enzimas.

O escurecimento dos calos da cultura de sorgo é devido aos compostos fenólicos. A explicação para esse fato acontece quando os compostos fenólicos derivam-se do metabolismo secundário, importante para o metabolismo das plantas, na defesa contra predadores e microrganismos. Todavia, no processo *in vitro*, a produção de compostos fenólicos pode ser prejudicial para a formação de calos e para o desenvolvimento do cultivar, pois o dano acontece no momento da excisão dos explantes, liberando compostos fenólicos, que atuam como precursores da síntese de lignina, quando o tecido é injuriado. Os compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, que conseqüentemente produzem substâncias tóxicas no meio, inibindo o crescimento dos explantes, como também escurecem o meio de cultura, podendo levar a morte da cultura (OBERTHUR et al.,1983; KRESOVICH et al.,1987;

GEORGE, 1996; Zhu et al., 1998; GEORGE & SHERRINGTON, 1984; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998 apud BRANDÃO, 2007).

De acordo com Gupta et al. (2006), os meios de indução de calos embriogênicos, em sais MS e N6, em uma comparação para verificar a eficiência da indução de embriões somáticos de sorgo entre 20 e 50 mm de comprimento, responderam com ótimo desempenho para a formação dos calos, e conseqüentemente, a regeneração de plantas de sorgo, avaliados em cultura de tecidos podendo superar a limitação genotípica de forma mais eficiente quando comparado na utilização de embriões imaturos.

Portanto, a composição do meio de cultura se trata de um fator importante que interfere diretamente na morfogenese *in vitro*. Alguns pesquisadores apresentaram os efeitos dos sais MS e N6, sobre a indução da embriogênese somática, concluindo a existência da forte indução do genótipo de sorgo na produção de calos e regeneração *in vitro* (LUSARDI; LUPOTTO, 1990; ELKONIN et al., 1995; Kaeppler e Pederson, 1996).

Para tanto, os calos foram transferidos para meio MS de acordo com os três tratamentos de 2,4 D, para comparativo da linhagem mais eficiente, apresentada na tabela 3:

Tabela 3. Número de plântulas regeneradas de acordo com a concentração da suplementação da auxina 2,4 D, Sete Lagoas, 2022.

Cultivar	1,0 mg/L	1,5 mg	2,0 mg
TX430	48	72	15
P898012	63	69	66
CMSXS 112-B	1	2	0
CMSXS 107-B	2	13	12
CMSXS 101-B	62	6	15
CMSXS 156-B	0	18	0

A partir dos dados obtidos em todas as linhagens, houve maior número de regeneração das plântulas no tratamento de 1,5 mg, em seguida 1,0 mg, por último 2,0 mg, conforme a figura 6 a seguir representado pelas médias dos tratamentos.

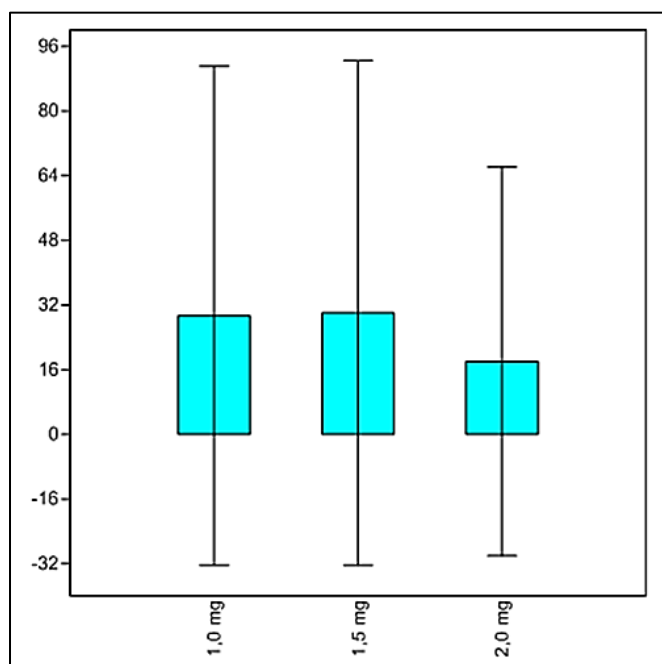


Figura 6. Média do número de plântulas formadas a partir de calos desenvolvidos em diferentes concentrações do regulador de crescimento vegetal 2,4-D.

O total de plântulas formadas na concentração 1,5 mg/L foi de 180, seguida da concentração de 1,0 mg/L com 176 plântulas e por último na concentração de 2,0 mg/L apresentou 108 plântulas regeneradas. A linhagem P898012 apresentou melhor capacidade de formação de calos embriogênicos *in vitro* e melhor capacidade de regeneração das plantas; nas três concentrações (2,4-D) comparados as demais linhagens apresentadas. Acredita-se que linhagem apresentou boa adaptação agrônômica, no qual torna uma opção importante para transformação genética por meio da *Agrobactéria tumefaciens* (SOUZA et al., 2016).

Alguns pesquisadores apresentam que os períodos de estresse durante o cultivo *in vitro* pode auxiliar o aumento nas taxas de indução, maturação e germinação dos embriões somáticos. Portanto, cada genótipo necessita de uma condição distinta para a indução dos calos, bem como no processo de regeneração das plantas. Desse modo, investir em condições de cultivo é um fator de fundamental importância. O processo de maturação é uma fase bastante importante para o desenvolvimento do embrião, pois é a fase onde ocorrem inúmeras alterações morfológicas e bioquímicas como: deposição de materiais armazenados, interrupção da germinação, tolerância a dissecação entre outros (THOMAS, 1993; MCKERSIE e BROWN, 1996).

Existem inúmeros casos onde o cultivo de embriões somáticos não se desenvolvem normalmente, além de não germinarem e não converterem em plantas normais, bem como existem outros em que a maturação e o desenvolvimento do embrião são interrompidos pela germinação precocemente, resultando, conseqüentemente, em plantas mal formadas. Assim, para sanar tais problemas são suplementados os meios de cultura com fitorreguladores que

auxiliam nas últimas fases de desenvolvimento do embrião (CARVALHO et al. 2006).

Nas figuras 7 apresentaram a formação das plântulas após o estágio de maturação e ao final do estágio de regeneração.



Figura 7. a) Células em diferenciação para a formação de plântulas, b) Plântula de sorgo pronta para o transplantio.

De acordo com os dados apresentados, a concentração de 1,5 mg/L da suplementação de 2,4 D garantiu uma boa formação de calos e um maior número de plântulas. Para a formação dos calos a concentração de 2,0 mg foi satisfatória, porém, os embriões ficaram comprometidos na maturação, no qual foram inibidos para a formação das plântulas. Dentre as linhagens apresentadas a P898012 se destacou pela melhor adaptabilidade no protocolo de regeneração.

CONCLUSÕES

A linhagem P898012 se destacou entre as demais linhagens de sorgo no desenvolvimento dos calos nas concentrações de 1,5 mg e 2,0 mg, já a TX430 se destacou entre as demais linhagens na concentração de 1,0 mg para a formação dos calos.

Nas fases de formação das plântulas, as médias apresentadas nos três tratamentos se sobressaíram as concentrações de 1,5 mg e em seguida 1,0 mg, ou seja, as plantas cuja suplementação de 2,0 mg de 2,4 D acelerou o crescimento, como também contribuiu para escurecimento na maturação dos embriões proveniente da formação dos compostos fenólicos, que conseqüentemente inibiram o desenvolvimento das plântulas.

Sendo assim, a recomendação da suplementação da auxina de 2,4 D na concentração de 1,5 mg, apresenta formação de calos satisfatória com alto desenvolvimento de plântulas, podendo ser utilizadas para transformação genética.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus, pois sem Ele nada seria possível!

Aos meus pais, Dalva Lacerda e Lairton Moraes, dedico meu reconhecimento por estarem ao meu lado em todos os momentos. Nunca me permitiram desanimar ou desistir, mesmo diante dos desafios mais difíceis.

À Universidade Federal de São João Del Rei, meu sincero agradecimento pelo ensino e pelos profissionais que moldaram minha trajetória acadêmica. Uma Dra. Nádia Nardely, minha orientadora, merece minha profunda gratidão, assim como o Prof. Dr. Édio Luiz da Costa, cuja contribuição foi fundamental para minha formação profissional.

À Embrapa Milho e Sorgo, agradeço pela potencialidade de oportunidade de estágio, que enriqueceu ainda mais meu desenvolvimento profissional. Ao Núcleo de Biologia Aplicada, em especial ao Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos, agradeço pelo acolhimento e pela oportunidade de aprender com excelência na condução de experimentos. Meus agradecimentos também aos amigos feitos lá, Rayanne, Gleyce e Kamila, pelos ensinamentos compartilhados.

À orientadora Andrea Almeida Carneiro, minha gratidão pela oportunidade de aprender e desenvolver projetos no programa de biotecnologia/melhoramento vegetal. À Dra. Maria José Vilaça de Vasconcelos, agradeço por abrir as portas da pesquisa para mim.

Aos amigos da Universidade, que sempre estiveram presentes nos momentos difíceis, dando apoio e incentivando-me a dar o meu melhor. Em especial, aos ex-moradores da República Agronospira (Alef Vilela, Daniel Barbosa e Raphael Hosken), às amigas Amanda Cristina, Ana Carolina Ribeiro, Ana Carolina Bertolino, Arielle Cassie, Renata Helena e Fabiana Neves, agradeço pela companhia ao longo desses anos de graduação, mesmo à distância.

A Evelin Lessa por ser minha amiga e parceira de graduação e estágio obrigatório, voce me mostrou que tudo pode ser mais leve e me fez enxergar o potencial que existe em mim.

A Gabriela Louise por fazer o impossível para me ajudar no periodo remoto, voce é luz, toda gratidão.

A Daniela Machado, minha amiga de infância e hoje comadre, por sonhar comigo e estar presente em todos os momentos, o nosso sonho esta se tornando realidade !

Aos amigos que fiz no Projeto Harvest 2022 – Igor Porto, Cristhian Araujo, Pedro Reisser, Andriago Xavier, Lusirlandio Souza, Natanael Sapelli, Nayara Sinotti e Gabriela Honorato por me ensinarem tanto e não me deixarem desistir do meu sonho, voces foram peças essenciais na minha pequena formação profissional.

E por fim, mas não menos importante, agradeço ao RTV Soja João Moreira por me mostrar o quanto sou capaz e me lembrar diariamente que tudo tem seu tempo , voce é minha referência de profissional.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. C. et al. Fatores que Influenciam a Transformação Genética de Milho (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*. Sete Lagoas :Embrapa Milho e Sorgo, 2015.40 p.
- COOK, D.; RIMANDO, A.M.; CLEMENTE, T.E.; SCHRODER, J.; DAYAN, F.E.; NANAYAKKARA, D.; PAN, Z.; NOONAN, B.P.; FISHBEIN, M.; ABE, I.; et al. Alkylresorcinol synthases expressed in *Sorghum bicolor* root hairs play an essential role in the biosynthesis of the allelopathic benzoquinone soroleone. *Plant Cell* 2010, 22, 867–887
- ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *eucalyptus grandis* x *e. urophylla*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.
- DO PT, LEE H,MOOKKAN M, FOLK WR, ZHANG ZJ. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor*) employing standard binary vectors and bar gene as a selectable marker. *Plant Cell Rep* (2016)
- BATISTA, T. R. Organogênese e embriogênese somática de híbrido de *eucalyptus grandis* x *eucalyptus urophylla*. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras. Lavras.
- BARTOS, P. M. C. Histologia de calos provenientes da embriogênese somática de *Coffea arabica* L. – Embrapa Café. In: VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. 4., 2011. Araxá. Anais. Araxá: SPCB, 2011.
- BAUNGRATZ, K. L. Transformação genética da soja pela técnica de biobalística. 2013. 39f. Trabalho de Conclusão de curso (Graduação em Tecnologia em Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná. Palotina.
- BERED, F. et al. Avaliação de embriogênese somática em cultivares de aveia (*Avena sativa* L.). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 26, n. 3, p. 371-375, 1996.
- BUZZELLO, G. L. Uso de reguladores no controle do crescimento e no desempenho agrônomo da cultura da soja cultivar cd 214 rr. 2010. 177f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco.
- BRANDÃO, R. L. Transformação Genética de *Sorghum bicolor* (L. Moech) visando tolerância ao AL+3. 2007. 127f. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras.
- CAI, T.; BUTLER L. G. Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several high-tannin sorghums. *Plant Cellular Tissue and Organic Culture*, v. 20, n. 2, p. 101-110, 1990.
- CARNEIRO, A. A. et al. Embriogênese Somática e Regeneração de Plantas de *Sorghum Bicolor* a Partir de Cultura de Inflorescência Madura. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento* 201. Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 23 p . 2019.
- CARVALHO, J. M. F. C. et al. Embriogênese Somática. Embrapa Algodão. Documentos, 152. Campina Grande. 35p. 2006.
- COSTA, V. P. V. Cultivares de milho e sorgo para a produção de forragem em dois níveis de investimento na região de Sete Lagoas Minas Gerais. 2019. 39f. Trabalho de conclusão de curso

(Graduação em Agronomia). Universidade Federal de São João Del Rei. Sete Lagoas.

CHO, M. J.; WU, E.; KWAN, J.; YU, M.; BANH, J.; LINN, W.; ANAND, A.; LI, Z.; TERONDE, S.; REGISTER III, J. C.; JONES T. J.; ZHAO Z. Y. Agrobacterium-mediated high-frequency transformation of an elite commercial maize (*Zea mays* L.) inbred line. *Plant Cell Rep*, 2014. v.33, p.1767–1777.

DO, P. T. et al. Rapid and efficient Agrobacterium-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor*) employing standard binary vectors and bar gene as a selectable marker. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 13p. 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00299-016-2019-6>>. Acesso em: 24/02/2023.

DUARTE, J. O. Mercado e Comercialização: A produção de sorgo granífero no Brasil. Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de Produção, 2 ISSN 1679-012X Versão Eletrônica - 6ª edição. Set./2010. 13p.

DUNSTAN, D.I.; SHORT, K.C.; THOMAS, E. The anatomy of secondary morphogenesis in cultured scutellum tissue of *Sorghum bicolor*. *Protoplasma*, 1978. v.97, p.251–260.

EBERT, A.; TAYLOR, F.; BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cellular Tissue and Organic Culture*, v. 33, n. 2, p. 157-162, 1993.

EMBRAPA (a). Forrageiras - espécies para a Região Sul do Brasil. Embrapa clima temperado. Transferência e tecnologia/Forrageiras. (s.d.). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/clima-temperado/forrageiras>>. Acesso em: 05/09/2023.

EMBRAPA (b). Cultivo do Sorgo. Ecofisiologia. Embrapa Milho e Sorgo Sistema de Produção, 2, 8ª edição. ISSN 1679-012X. Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao16_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_76293187_sistemaProducaoId=3809&p_r_p_-996514994_topicoId=3532>. Acesso em: 10/06/2019.

EMBRAPA (c). Introdução e desenvolvimento de linhagens de sorgo com machoesterilidade citoplasmática (linhagens a e b). p.234-235 (s.d.). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48671/1/Introducao-desenvolvimento.pdf>>. Acesso em: 05/09/2023.

ELKONIN, L. A.; LOPUSHANSKAYA, R. F.; PAKHOMOVA, N. V. Initiation and maintenance of friable, embryogenic callus of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) by amino acids. *Maydica*, v. 40, n. 2, p. 153-157, 1995.

ELKONIN, L. A.; PAKHOMOVA, N. V. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. *Plant Cellular Tissue and Organic Culture*, v. 61, n. 2, p. 115-123, 2000.

FRAME, B. R. et al. Agrobacterium tumefaciens-Mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiology*, Bethesda, 2002. v. 129, p. 13-22.

FEITOSA, L. S. Influência de reguladores de crescimento no estabelecimento in vitro e indução de calos em pinhão-manso. 2011. 45f. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas) – Universidade Federal do Sergipe. São Cristóvão.

FERNANDES, P. G. Avaliação agrônômica de dois cultivares de Sorgo Sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) em Sete Lagoas – MG. Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Rio de Janeiro, 2013.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim. Bioph. Acta*, 2015. v.1849, p.385-402.

GELVIN, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. Dordrecht: The Backgroups, 2008. v. 1.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture: practice. 2. ed. Edington: Exegetics, 1361p., 1996.

GELVIN, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “genejockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.

GUO, M.; BIAN, X.; WU, X. WU, M. Agrobacterium-mediated genetic transformation: history and progress. In: ALVAREZ, M. A. (Ed.). Genetic transformation. Rijeka: InTech, 2011. p. 3-28.

GUPTA, S.; KHANNA, V. K.; SINGH, R.; GARG, G. K. Strategies for overcoming genotypic limitations of in vitro regeneration and determination of genetic components of variability of plant regeneration traits in sorghum. *Plant Cellular Tiss Organic Culture*, v. 86, n. 3, p. 379-388, 2006.

HAGIO, T. Adventitious shoot regeneration from immature embryos of sorghum. *Plant Cell, Tissue and Organic Culture*, v. 68, n. 1, p. 65-72, 2002.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. Handbook of plant cell cultures. New York: Macmillan, v. 1, p. 177-227. 1983.

KAEPPLER, H. F.; PEDERSEN, J. F. Media effects on phenotype of callus cultures initiated from photoperiod-insensitive, elite inbred sorghum lines. *Maydica*, v. 41, n. 2, p. 83-89, 1996
KIRCHNER, J. H. et al. Funções de produção e eficiência no uso da água em sorgo forrageiro irrigado. *Rev. Bras. Cienc. Agrar.*, Recife, v.14, n.2, e5646, 2019.

KRESOVICH, S.; MCGEE, R. E.; PANELLA, L.; REILLEY, A. A.; MILLER, F. R. Application of cell and tissue culture techniques for the genetic improvement of sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench: progress and potential. *Advances in Agronomy*, v. 41, p. 147-170, 1987.

LACERDA, A.L.S. Plantas Transgênicas. 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/transgenicos/index.htm>. Acesso em: 27/9/2023.

LAMB, C. R. C. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 37, n. 2, p. 123-130, fev. 2002.

LANZA, A. L. L. Avaliação forrageira do sorgo biomassa (brs 716) em diferentes épocas de

corte e estratégias de adubação em cobertura. 2017. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de São João del-Rei. Sete Lagoas.

LEE, L.-Y.; GELVIN, S. B. T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology*, Washington, v. 146, p. 325-332, 2008.

LEITE, T. H.; CARNEIRO, A. A. Transformação Genética de Milho via *Agrobacterium tumefaciens*. Embrapa milho e sorgo. 2013. 8p. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/962137/1/Transformacaoogenetica1.pdf>>. Acesso em: 05/09/2023.

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, Hugo A. et al. Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. *Frontiers in plant Science.*, 2019. doi:10.3389/fpls.2019.00077. v.10, 15p.
MORAES, F. L. et al. Regeneração in vitro de cultivares de *Sorghum bicolor* via embriogênese somática. In: XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo. 5., 2016. Bento Gonçalves. Anais. Bento Gonçalves: CNMS, 2016.

MOREIRA, C. D. A. et al. A. Germinação de gramíneas forrageiras em função da inoculação de bactérias diazotróficas. *Scientific Electronic Archives*, v. 6, p. 90-96, 2014. Disponível em: <<http://www.revista.seasinop.com.br/index.php?journal=SE&page=article&op=view&path%5B%5D=99>>. Acesso em: 05/09/2023.

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

NESTER, E. *Agrobacterium: the natural genetic engineer 100 years later*. 2008. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Agrobacterium.aspx>>. Acesso em: 22/02/2023.

NIC-CAN, G. I., Avilez-Montalvo, J. R., Avilez-Montalvo, R. N., Márquez-López, R. E., Mellado-Mojica, E., Galaz-Ávalos, R. M., et al. (2016). “The relationship between stress and somatic embryogenesis,” in *Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications*, eds V. M. Loyola-Vargas and N. OchoaAlejo (Cham: Springer), 151–170. doi: 10.1007/978-3-319-33705-0_9
NORDESTERURAL. A produção de sorgo no Brasil. 17 junho 2016. Copyright 2019 Nordeste Rural. Disponível em: <<https://nordesterural.com.br/a-producao-de-sorgo-no-brasil/#>>. Acesso em: 05/09/2023.

OBERTHUR, E.; NICHOLSON R. L.; BUTLER, L. G. Presence of polyphenolic materials, including condensed tannins in sorghum callus. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 660-662, 1983.

OLIVEIRA, V. D. S. et al. Efeito da irrigação na produção e qualidade de pastagens durante o período da seca. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.26, n. 1, p. 1-10, 2016. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rcemv/article/view/35675/40086>>. Acesso em: 05/09/2023.

PARRELLA, R. A. C.; MENEZES, C. B.; RODRIGUES, J. A. S.; TARDIN, F. D.; SCHAFFERT, R. E. *Sorgo do plantio à colheita*. Viçosa: Editora UFV, 2014. 275p.
PARRELLA, R. A. C. et al. Desempenho de cultivares de sorgo sacarino em diferentes ambientes visando a produção de etanol. In: XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Resumos, 2010, Goiânia.

RADMANN, E. B et al. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento in vitro de

porta-enxertos de macieira 'm-9'. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 624-628, Dezembro 2002.

SANTOS, R.F. et al. Sorgo sacarino na produção de agroenergia. Revista Brasileira de Energias Renováveis, v.4, p. 01- 12, 2015.

SHARMA, V.; KOTHARI, S. L.; CHANDRA, N. In vitro regeneration, field transfer of plantlets and growth to maturity of plants of *Sorghum bicolor* (L.). Moench. Current Science, v. 58, n. 10, p. 586-588, 1989.

SOUZA, R. A. V. et al. Influência do tipo e da concentração de auxina na formação de calos embriogênicos de linhagem de milho tropical. In: XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo. 4., 2016. Bento Gonçalves. Anais. Bento Gonçalves: CNMS, 2016.

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

VALADARES, W. et al. Regeneração in vitro de cultivares de sorghum bicolor via embriogênese somática. Universidade Federal de São João Del Rey. Sete Lagoas. 2016. 10p. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1060977/1/Regeneracaoinvitro.pdf>>. Acesso em: 05/09/2023.

VIEIRA, R. L. et al. Morfogênese de plantas de alho in vitro: papel dos reguladores de crescimento na indução e desenvolvimento de bulbos. Ciência Rural, Santa Maria, v.44, n.3, p.439-445, mar, 2014.

WU, E. L. B. et al. Optimized Agrobacterium-mediated sorghum transformation protocol and molecular data of transgenic sorghum plants. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, v. 50, p:9–18. 2014. ZAMBRYSKI, P. Basic processes underlying Agrobacteriummediated DNA transfer to plant cells. Annual Review of Genetics, Palo Alto, v. 22, p. 1-30, 1988.

ZUPAN, J.; ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from Agrobacterium to the plant cell. Plant Physiology, Washington, v. 107, p. 1041-1047, 1995.

ZHU, H.; MUHUKRISHNAN, S.; KRISHNAVENI, S.; WILDE, G.; JEOUNG, J. M.; LIANG, G. H. Biolistic transformation of sorghum using a rice chitinase gene. Journal of Genetics & Breeding, v. 52, p. 243-252, 199