

Sete Lagoas, MG / Dezembro, 2024

## Transformação genética de sorgo mediada por *agrobacterium tumefaciens* utilizando o sistema repórter RUBY

Andréa Almeida Carneiro<sup>(1)</sup>, Meire de Cássia Alves<sup>(2)</sup> e Newton Portilho Carneiro<sup>(1)</sup><sup>(1)</sup>Pesquisadores, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, <sup>(2)</sup>Analista, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

**Embrapa Milho e Sorgo**  
Rodovia MG 424, KM 65  
Caixa Postal 151  
35701-098 Sete Lagoas, MG  
[www.embrapa.br/milho-e-sorgo](http://www.embrapa.br/milho-e-sorgo)  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

Comitê Local de Publicações

Presidente

Maria Marta Pastina

Secretário-executivo

Antônio Carlos de Oliveira

Membros

Cláudia Teixeira Guimarães,

Mônica Matoso Campanha,

Roberto dos Santos Trindade e

Maria Cristina Dias Paes

Edição executiva

Márcio Augusto Pereira do

Nascimento

Revisão de texto

Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica

Rosângela Lacerda de Castro

(CRB-6/2749)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Márcio Augusto Pereira do

Nascimento

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

**Resumo** – O sorgo (*Sorghum bicolor*) é o quinto cereal mais cultivado globalmente, com aplicações em ração animal, forragem e bioetanol. Sua resistência a condições adversas o torna uma opção promissora para enfrentar os impactos das mudanças climáticas. No entanto, a transformação genética do sorgo apresenta desafios devido à sua natureza recalcitrante e à necessidade de protocolos otimizados. Entre os métodos mais comuns estão o bombardeio de partículas e a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, sendo este último mais eficaz, mas necessitando de melhorias para diferentes linhagens. Neste estudo, foi utilizado o sistema repórter RUBY, baseado na via metabólica das betalainas, para monitorar a infecção de embriões imaturos de sete linhagens de sorgo. O sistema RUBY proporciona uma visualização rápida e econômica da expressão gênica, sem a necessidade de equipamentos especializados. A infecção de embriões mediada por *A. tumefaciens* EHA101 foi eficaz em várias linhagens, com destaque para a linhagem pública P898012 e para as linhagens da Embrapa ATF10B, ATF14B, que apresentaram 86%, 67% e 63% de sucesso, respectivamente. Os resultados mostraram que o sistema RUBY facilitou a seleção de genótipos com maior potencial para transformação, destacando-se como uma ferramenta promissora para o melhoramento genético do sorgo.

**Termos para indexação:** *Agrobacterium*, gene repórter; Sistema Ruby; transformação genética, *Sorghum bicolor*.

## Genetic transformation of *Sorghum bicolor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: innovation with the RUBY reporter system

**Abstract** – Sorghum (*Sorghum bicolor*) is the fifth most widely cultivated cereal globally, with applications in animal feed, forage, and bioethanol production. Its resistance to adverse conditions makes it a promising option to address the impacts of climate change. However, the genetic transformation of sorghum presents challenges due to its recalcitrant nature and the need for optimized protocols. Among the most common methods are particle bombardment and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, with the latter being more effective but requiring improvements for different lines. In this study, the RUBY reporter system, based on the betalain metabolic pathway, was used to monitor the infection of immature embryos from seven sorghum lines. The RUBY system provides a fast and cost-effective way to visualize gene expression without the need for specialized equipment. *A. tumefaciens* EHA101-mediated infection was effective in several lines, with the public line P898012 and Embrapa lines ATF10B and ATF14B showing 86%, 67%, and 63% success, respectively. The results demonstrated that the RUBY system facilitated the selection of genotypes with higher transformation potential, emerging as a promising tool for genetic improvement of sorghum.

**Index terms:** *Agrobacterium*, gene reporter, Ruby System, genetic transformation, *Sorghum bicolor*.

### Introdução

O sorgo (*Sorghum bicolor*) é o quinto cereal mais cultivado mundialmente e possui uma ampla gama de aplicações, incluindo ração animal, forragem e produção de bioetanol (Huang, 2018; Khalifa; Eltahir, 2023). Sua notável tolerância a condições adversas, como seca, alagamentos e salinidade, torna-o uma alternativa promissora para enfrentar os desafios impostos pelas mudanças climáticas (Hadebe et al., 2017). O sorgo é uma planta diploide, com um genoma relativamente pequeno (~730 Mbp), o que facilita os estudos genéticos e genômicos em comparação com culturas poliploides, como a cana-de-açúcar. Além disso, apresenta uma ampla variabilidade genética, tanto em espécies cultivadas quanto selvagens, sendo um valioso recurso para estudos de engenharia genética visando aprimorar características, como produtividade e resistência a

estresses bióticos e abióticos, entre outras (Paterson et al., 2009).

As técnicas modernas de melhoramento têm evoluído para incorporar os avanços biotecnológicos, aumentando a eficiência e a precisão dos programas de melhoramento. Apesar das vantagens genéticas do sorgo, a transformação dessa planta enfrenta desafios significativos. Os métodos mais comuns para a transformação do sorgo são o bombardeio de partículas e a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. O bombardeio de partículas, também conhecido como biobalística, consiste na inserção física de DNA em células ou tecidos por meio da aceleração de partículas, como ouro ou tungstênio, revestidas com DNA (Sanford et al., 1987). Um problema recorrente desse método é a integração aleatória de múltiplas cópias do transgene no genoma, o que pode levar a rearranjos e silenciamento do transgene (revisado por Kohli et al., 2003). Em contraste, a transformação mediada por *A. tumefaciens* tende a gerar eventos com inserção única ou de baixo número de cópias de transgenes, apresentando a vantagem adicional de resultar em menor rearranjo do DNA integrado (Gelvin, 2003). No entanto, como o sorgo não é um hospedeiro natural para essa bactéria, a otimização dos protocolos para diferentes linhagens é essencial. O primeiro relato de transformação estável de sorgo utilizando *A. tumefaciens* foi descrito por Zhao et al. (2000), com melhorias subsequentes nos protocolos sendo documentadas em estudos posteriores (Gurel et al., 2009; Wu et al., 2014; Do et al., 2016).

A otimização dos protocolos de regeneração e de transformação é crucial para a compreensão da função genética e a melhoria das características agronômicas do sorgo. Nesse contexto, os genes repórter desempenham um papel fundamental na avaliação e no aprimoramento dos métodos de transformação. Entre os genes repórter mais utilizados, destacam-se a proteína fluorescente verde (GFP) (Chalfie et al., 1994) e a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) (Jefferson et al., 1987). Embora a GFP seja eficaz para o monitoramento da expressão gênica, sua visualização requer equipamentos capazes de detectar diferentes comprimentos de onda da luz. O gene repórter GUS também é utilizado, com sucesso, para monitorar padrões de expressão gênica. No entanto, a coloração GUS é invasiva e frequentemente requer a eliminação das plantas, além de exigir a adição de substratos caros, como o X-Gluc. Além disso, o uso do GUS não é ideal para condições

estéreis, como culturas de tecido, pois a adição de substratos aumenta o risco de contaminação por microrganismos.

Recentemente, uma nova abordagem surgiu com o desenvolvimento do sistema repórter baseado na via metabólica das betalaínas, descrito por He et al. (2020). O sistema RUBY, desenvolvido por esses pesquisadores, emprega três genes da via metabólica das betalaínas (CYP76AD1, DODA e Glucosyltransferase), que são responsáveis pela conversão do aminoácido tirosina em betalaína. Esses genes, conectados pelo peptídeo 2A e controlados por um único promotor, codificam as enzimas necessárias para a biossíntese de betalaína, resultando em uma cor vermelha brilhante visível a olho nu. Esse sistema representa uma inovação significativa, pois permite a visualização contínua da expressão gênica ao longo do ciclo de vida da planta sem a necessidade de substratos ou equipamentos caros.

Neste estudo, detalhamos a transformação genética de embriões imaturos de sorgo mediada por *A. tumefaciens* e usamos o sistema repórter RUBY para demonstrar a viabilidade da sua utilização para monitorar a transformação de diferentes linhagens de sorgo, pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo e da linhagem pública P898012. A abordagem proposta visa não apenas melhorar a eficiência dos protocolos de transformação, mas também fornecer uma ferramenta prática e econômica para o monitoramento da expressão gênica no sorgo.

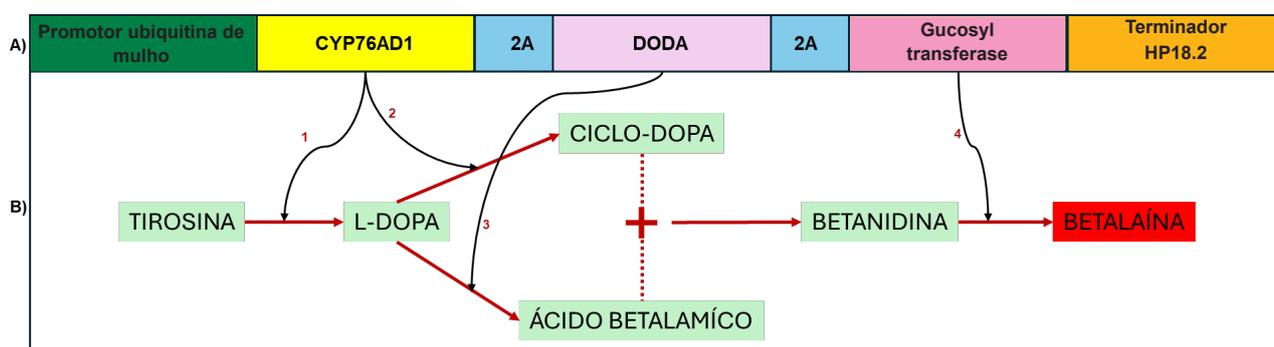
## Material e métodos

### Cultivo de plantas de sorgo

Plantas de sorgo das linhagens SC566, ATF10B, ATF14B, SC283, BTX623, SC566-NIL (BR012\_SbMATE\_SC566), pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo e da linhagem pública P898012, foram cultivadas em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, Brasil, e sob condições controladas com temperaturas diurnas e noturnas de 30 °C e 24 °C, respectivamente, e fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas escuro. As plantas foram irrigadas e fertilizadas conforme necessário. Sementes imaturas foram coletadas de panículas de sorgo entre 11 dias e 14 dias após a polinização, quando o embrião imaturo de sorgo estava com aproximadamente 1,5 a 2 mm de comprimento.

### Construção gênica

Para a transformação das linhagens de sorgo, foi utilizada a estirpe EHA101 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo UBQ:RUBY (Figura 1). Esse plasmídeo foi gentilmente fornecido por Yunde Zhao (Addgene plasmídeo #160909). Ele contém os três genes biossintéticos da via metabólica das betalaínas (CYP76AD1, DODA e Glucosyltransferase) fundidos em uma única região codante. Entre os genes, foram inseridas sequências que codificam peptídeos 2A. O sistema repórter RUBY está sob o controle do promotor de ubiquitina de milho (ZmUBI) e do terminador transcripcional HSP18.2 de *Arabidopsis* (He et al., 2020).



**Figura 1.** Sistema repórter RUBY e biossíntese de betalaína. (A) Sistema repórter RUBY: para expressar toda a via biossintética da betalaína em um único cassete, os três genes da biossíntese de betalaína foram fundidos em um único open *reading frame*, que pode ser expresso usando um único promotor (ZmUBI) e terminador (HPS18.2). Entre os genes, foram inseridas sequências que codificam peptídeos 2A. (B) Biossíntese da betalaína: a tirosina é oxidada pela CYP76AD1 (1) em L-DOPA, que pode ser convertida em CICLODOPA (2) pela CYP76AD1. Na presença da L-DOPA 4,5-dioxygenase (DODA) (3), a DOPA é oxidada e circularizada em ácido betalâmico. A CICLODOPA se condensa com o ácido betalâmico, numa reação não enzimática, para produzir betanidina. A glucosilação da betanidina (4) gera a betalaína de cor vermelha.

Ilustração: Andréa A. Carneiro.

Fonte: Adaptado de He et al. (2016).

### Preparo do inóculo de *Agrobacterium tumefaciens* para transformação de embriões imaturos de sorgo

O estoque de *Agrobacterium tumefaciens* foi retirado do freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sob condições estéreis, a capela de fluxo laminar, a bactéria foi estriada em uma placa de Petri contendo meio YEP sólido, suplementado com  $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  de canamicina e  $30\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  de rifampicina. Em seguida, a placa foi vedada com parafilm e incubada a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 a 3 dias para permitir o crescimento das colônias bacterianas. Após a formação de colônias isoladas, a placa foi armazenada na geladeira a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sendo considerada uma “placa mensal”, que pode ser utilizada em procedimentos de transformação por até 30 dias.

No dia anterior à transformação genética, foi preparada uma placa de trabalho a partir da placa mensal. Em condições estéreis, uma colônia bacteriana isolada foi selecionada utilizando uma alça de platina e estriada em uma nova placa de Petri contendo meio YEP sólido suplementado com os antibióticos apropriados. Em seguida, a placa foi vedada com parafilm e incubada a  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante a noite (~20 horas), permitindo o crescimento das colônias bacterianas.

### Procedimento de transformação genética de embriões imaturos de sorgo

O processo de transformação genética de sorgo foi baseado nos experimentos de Do et al. (2016). A constituição dos meios de cultivo utilizados para a transformação e a regeneração de plantas transformadas de sorgo está descrita na Tabela 1.

Para a transformação genética, inicialmente, foi preparada uma solução de infecção em um Erlenmeyer estéril de 125 mL, adicionando-se 50 mL de meio de infecção e 50  $\mu\text{L}$  de acetoseringona (estoque AS 100 mM). A concentração final de acetoseringona foi ajustada para 100  $\mu\text{M}$ . Essa solução foi utilizada tanto para o preparo do inóculo de *A. tumefaciens* quanto na etapa de extração dos embriões.

Para o inóculo de *A. tumefaciens*, foram aliqüotados 10 mL da solução de infecção em um tubo Falcon de 50 mL. Com o auxílio de uma alça de platina estéril, loops de células de *A. tumefaciens* da placa de trabalho foram inoculados na solução contida no tubo Falcon até atingir uma densidade óptica (O.D.550) entre 0,3 e 0,4. Em seguida, o tubo foi incubado horizontalmente sob agitação de 100 rpm a  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 horas.

**Tabela 1.** Reagentes e meios de cultivo utilizados para a transformação genética de sorgo.

Reagentes	Unidade / l	Infecção (INFS)	Cocultivo (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	1	(-)	(-)
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 ou Gamborg (1000X)	ml	1	1	1	1	1	1
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 (Estoque 100 Mm)	ml	1	1	(-)	(-)	(-)	(-)
CuSO <sub>4</sub>	mg	(-)	(-)	0,16	0,16	0,16	0,16
Asparagina	g	(-)	(-)	1	1	(-)	(-)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g	(-)	(-)	1	1	(-)	(-)
Tioxin ou Cefotaxime	mg	(-)	(-)	200	200	200	(-)
Agente seletivo	mg	(-)	(-)	(-)	Conforme necessário	Conforme necessário	(-)
pH		5.2	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
Tempo		10 min. Filtrar	3 dias Autoclavar	10 dias Autoclavar	10–15 dias Autoclavar	4–6 semanas Autoclavar	2–3 semanas Autoclavar

(-): Informação não aplicável.

(INFS): Meio de infecção de sorgo.

Parte do meio de infecção contendo acetoseringona foi alíquotado (1,0 mL) em microtubos de 2,0 mL, os quais foram acondicionados em geladeira até o momento da coleta dos embriões imaturos. O restante do meio de infecção foi armazenado em geladeira para ser utilizado na lavagem dos embriões durante o processo de extração.

### **Preparo dos embriões de sorgo para transformação genética**

O preparo adequado dos embriões de sorgo é essencial para garantir a eficácia da transformação genética. O processo envolve a desinfestação das sementes e a extração dos embriões imaturos da semente, e deve ser realizado com cuidado para evitar contaminações e assegurar o sucesso dos experimentos subsequentes.

Para a desinfestação das sementes de sorgo, uma solução desinfetante de hipoclorito de sódio comercial a 50%, acrescida de duas gotas de detergente comercial por litro de solução, foi transferida para um bquer de 250 mL, garantindo volume suficiente para cobrir as sementes. O bquer foi colocado no agitador magnético, e a solução foi agitada com as sementes por 30 minutos, garantindo uma interação uniforme entre o agente esterilizante e as sementes.

Após agitação, as sementes foram lavadas quatro vezes com água destilada autoclavada, de forma a remover quaisquer resíduos de hipoclorito e detergente. Por fim, as sementes lavadas foram armazenadas em um ambiente controlado dentro da câmara de fluxo laminar até o momento da extração dos embriões imaturos.

### **Transformação genética dos embriões imaturos de sorgo**

Os procedimentos de extração de embriões imaturos de sorgo e de transformação genética foram iniciados após um período de 2 horas de ativação da *Agrobacterium tumefaciens*. Na câmara de fluxo laminar, os embriões imaturos foram excisados do interior das sementes, utilizando-se uma espátula e uma pinça estéreis. Os explantes foram colocados em microtubos contendo 1,0 mL de meio de infecção previamente preparado e armazenado em geladeira, sendo coletados 50 embriões para cada microtubo. Em seguida, o meio de infecção foi descartado e 1,0 mL de novo meio de infecção foi adicionado a cada microtubo.

Um tratamento térmico dos embriões de sorgo foi realizado após a remoção do meio de infecção. Para esse tratamento, o microtubo com os embriões foi colocado em banho-maria a 43 °C por 3 minutos, seguido de um banho-maria a 25 °C por 2 minutos. Após o tratamento térmico, foi adicionado 1,0 mL da solução de infecção contendo *Agrobacterium*. O microtubo foi invertido suavemente 20 vezes para garantir a mistura homogênea da solução bacteriana com os embriões, e então foi acondicionado em posição horizontal e em ambiente escuro por 10 minutos. Em seguida, o conteúdo do microtubo foi transferido para uma placa de Petri contendo meio de cocultivo, e o excesso de *Agrobacterium* foi retirado com o auxílio de uma pipeta P1000. Os embriões foram posicionados com o eixo embrionário voltado para o meio. As placas foram então incubadas em uma estufa a 22 °C por 7 dias, período durante o qual a *Agrobacterium* transferiu o material genético para as células dos embriões de sorgo, caracterizando a etapa de cocultivo.

### **Seleção de células transformadas e regeneração das plantas de sorgo**

Após o período de cocultivo, os embriões infectados foram transferidos para o meio de repouso de sorgo (RS), sendo colocados 20 embriões em cada placa contendo o meio. Esse meio continha antibiótico para eliminar a *Agrobacterium tumefaciens* e promover o desenvolvimento inicial dos embriões. As placas foram incubadas em ambiente escuro a 27 °C dentro da sala de crescimento por 5 dias. Após esse período, os embriões foram transferidos para um novo meio RS, onde permaneceram por mais 5 dias. Durante esse tempo, os embriões imaturos começaram a formar calos embriogênicos.

Para a seleção das células transformadas, foi utilizado o sistema repórter RUBY, que permite a detecção das células transformadas pela produção de betalaína, um composto de cor vermelha. As células que apresentavam essa coloração indicavam sucesso na transformação genética.

Os calos transformados foram então transferidos para meio de regeneração (meio SMS) para induzir a regeneração das plantas. Os calos foram quebrados em fragmentos menores, com cerca de 5 mm, e as regiões escuras foram descartadas. Esses fragmentos foram incubados em ambiente iluminado, a 27 °C, para estimular a formação de brotações.

Quando as brotações começaram a se desenvolver, as plântulas foram transferidas para

frascos contendo meio de germinação (meio GS). Após o período de germinação, as plântulas foram aclimatadas em casa de vegetação, um estágio final que prepara as plantas para a transição ao ambiente externo, garantindo sobrevivência e crescimento adequados.

## Resultados e discussão

A integração de biotecnologia com métodos tradicionais de melhoramento genético pode auxiliar no aprimoramento das características agronômicas do sorgo. No entanto, como evidenciado em estudos anteriores (Casas et al., 1993; Zhao et al., 2000; Grootboom et al., 2010), o sorgo é considerado uma cultura recalcitrante para a transformação genética, o que apresenta desafios significativos para a engenharia genética dessa planta.

Conhecer a suscetibilidade dos genótipos e explantes à transformação mediada por *Agrobacterium* é crucial para o desenvolvimento de

estratégias eficazes para culturas recalcitrantes. Um requisito essencial para a criação de um protocolo de transformação genética para qualquer espécie é a capacidade de distinguir de forma confiável os tecidos transformados dos não transformados, e um marcador visível pode ser extremamente útil. Também de grande importância é verificar de maneira eficiente e rápida se a estirpe de *A. tumefaciens* utilizada é capaz de infectar o genótipo de sorgo de interesse, uma vez que a interação *Agrobacterium*/planta é genótipo dependente.

Neste estudo, investigamos o potencial de transformação de sete genótipos de sorgo por *Agrobacterium tumefaciens*. Foram utilizadas as linhagens SC566, ATF10B, ATF14B, SC283, BTX623, SC566-NIL (BR012\_SbMATE\_SC566), pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo, e a linhagem pública P898012. Os embriões zigóticos imaturos desses genótipos foram infectados com *A. tumefaciens* EHA101 portadora do vetor binário contendo o sistema RUBY como gene repórter.

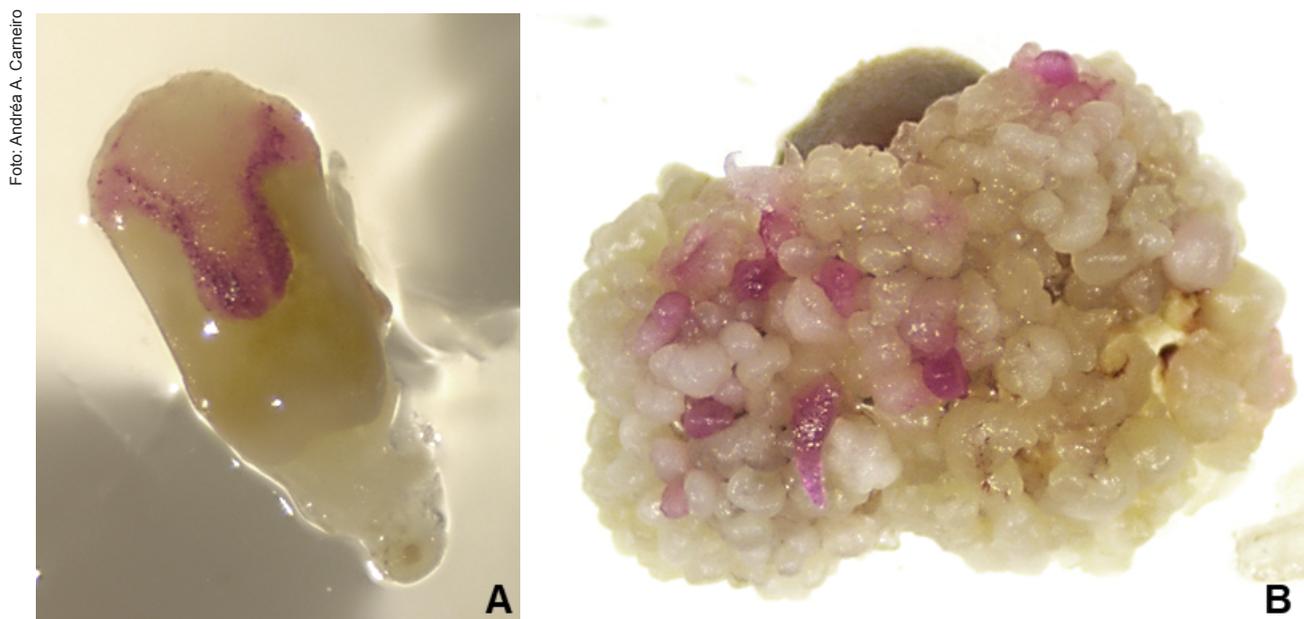


Foto: Andréa A. Carneiro

**Figura 2.** Expressão transitente e estável do sistema repórter RUBY em sorgo. Expressão transitente em embriões imaturos de sorgo 3 dias após a infecção com *A. tumefaciens* contendo o sistema repórter RUBY controlado pelo promotor ZmUBI (A). Calo após 4 semanas em meio de cultivo. Regiões vermelhas expressando a betalaína de maneira estável (B).

A expressão transiente da construção gênica ZmUBI::RUBY, 5 dias após a infecção dos embriões imaturos por *A. tumefaciens*, levou à produção de betalaína nos embriões de sorgo. Embriões infectados pela *A. tumefaciens* são facilmente identificados pela cor vermelha da betalaína (Figura 2). A linhagem que apresentou o maior número de embriões infectados foi a P898012, com 86%, seguida das linhagens ATF10B (67%), ATF14B (63%), SC283 (43%), SC566 (14%) e BTX623 (3%). A linhagem SC566-NIL não foi infectada pela *A. tumefaciens* EHA101 (Tabela 2).

A transformação do sorgo pode levar de 10 semanas a 15 semanas, desde a infecção até a regeneração das plantas transgênicas. Para avaliar a eficiência da infecção por *Agrobacterium*, seria necessário aguardar a formação das plantas e realizar análises moleculares para confirmar a transgenia. Com o sistema repórter RUBY, no entanto, é possível obter resultados em apenas 5 dias e identificar as melhores combinações de linhagens de sorgo e *Agrobacterium*. Este estudo mostrou que a cepa *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 foi eficaz na infecção das linhagens P898012, ATF10B e ATF14B, sugerindo ser

**Tabela 2.** Transformação genética de embriões imaturos de sorgo com o sistema repórter RUBY.

Cultivar	Número de embriões utilizados	Médias transformadas (%)	Desvio padrão (%)
<b>P898012</b>	150	86	4,58
<b>ATF10B</b>	150	66,67	5,03
<b>ATF14B</b>	150	63,33	9,09
<b>SC283</b>	150	43,33	5,03
<b>SC566</b>	150	14	4
<b>BTX623</b>	150	3,33	3,05
<b>SC566_NIL</b>	150	0	0

uma das melhores opções para gerar plantas transgênicas de sorgo.

Quatro semanas após a infecção, foi observado que a maioria da expressão inicial da betalaína (transiente) desapareceu e apenas calos transformados de modo estável se desenvolveram. A expressão do sistema repórter RUBY tornou os calos transformados visivelmente vermelhos (Figuras 3A, 3B e 3C), facilitando a distinção entre transformados e não transformados. Calos com diferentes tonalidades de vermelhos se desenvolveram, provavelmente por diferenças do local de integração do T-DNA, que gerou diferentes eventos de transformação.

Plantas de sorgo expressando betalaína foram regeneradas após 10 semanas em cultura de tecidos. As plantas de sorgo contendo a construção ZmUBI::RUBY produziram uma quantidade

suficiente de betalaína para se tornarem visualmente evidentes, o que está em consonância com relatos anteriores de que o promotor da ubiquitina de milho é constitutivamente ativo, resultando em coloração vermelha em todos os tecidos ao longo do ciclo de vida da planta (Figura 3D).

A utilização do RUBY oferece vantagens significativas sobre os repórteres existentes, uma vez que não requer equipamentos especializados ou substratos caros para sua detecção. O sistema RUBY, portanto, representa uma alternativa econômica e conveniente para o monitoramento da expressão gênica e da transformação de plantas. Neste trabalho, o sistema repórter RUBY foi utilizado com sucesso para selecionar alguns dos melhores genótipos de sorgo, pertencentes à Embrapa Milho e Sorgo, que podem ser utilizados na transformação mediada por *A. tumefaciens* EHA101.



**Figura 3.** Expressão do sistema repórter RUBY. Calos após 4 semanas em cultura de tecidos (A, B e C). Planta de sorgo regenerada expressando o sistema repórter RUBY controlado pelo promotor da ubiquitina de milho (ZmUBI) (D).

## Conclusões

A utilização do sistema repórter RUBY facilitou a identificação e a seleção de genótipos de sorgo com maior potencial para transformação. O sistema RUBY proporcionou uma ferramenta prática e econômica para monitorar a expressão gênica, permitindo resultados rápidos em apenas 5 dias, ao invés de esperar semanas ou meses para confirmações moleculares. Esse avanço é particularmente valioso para acelerar os programas de melhoramento e garantir o sucesso da engenharia genética em linhagens específicas de sorgo. Os resultados indicam que as linhagens P898012, ATF10B e ATF14B são promissoras para futuras transformações, destacando-se como opções viáveis para programas de melhoramento genético. Assim, o sistema RUBY não só facilita o processo de transformação, mas também abre

novas possibilidades para o aprimoramento de características agrônômicas essenciais, contribuindo para a sustentabilidade e a adaptação do sorgo às condições climáticas adversas.

## Referências

- 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. 11212-11216, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11212>.

- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 802-805, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.8303295>.
- DO, P. T.; LEE, H.; MOOKKAN, M.; FOLK, W. R.; ZHANG, Z. J. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor*) employing standard binary vectors and *bar* gene as a selectable marker. **Plant Cell Reports**, v. 35, p. 2065-2076, 2016. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00299-016-2019-6>.
- GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003>.
- 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. DOI: <https://doi.org/10.3923/ijb.2010.89.94>.
- 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, p. 429-444, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0655-1>.
- HADEBE, S. T.; MODI, A. T.; MABHAUDHI, T. Drought tolerance and water use of cereal crops: a focus on sorghum as a food security crop in Sub-Saharan Africa. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 203, n. 3, p. 177-191, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jac.12191>.
- HE, Y.; ZHANG, T.; SUN, H.; ZHAN, H.; ZHAO, Y. A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation. **Horticulture Research**, v. 7, article 152, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00390-1>.
- HUANG, R.-D. Research progress on plant tolerance to soil salinity and alkalinity in sorghum. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 4, p. 739-746, 2018. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61728-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61728-3).
- JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, v. 6, n. 3, p. 3901-3907, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x>.
- KHALIFA, M.; ELTAHIR, E. A. B. Assessment of global sorghum production, tolerance, and climate risk. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, 1184373, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1184373>.
- KOHLI, A.; TWYMAN, R. M.; ABRANCHES, R.; WEGEL, E.; STOGER, E.; CHRISTOU, P. Transgene integration, organization and interaction in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 2, p. 247-258, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1023941407376>.
- 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.; RAHMAN, M. U.; 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, p. 551-556, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature07723>.
- SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 27-37, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1080/02726358708904533>.
- WU, E.; LENDERTS, B.; GLASSMAN, K.; BEREZOWSKA-KANIEWSKA, M.; CHRISTENSEN, H.; ASMUS, T.; ZHEN, S.; CHU, U.; CHO, M.-J.; ZHAO, Z.-Y. Optimized *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation protocol and molecular data of transgenic sorghum plants. **Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 50, n. 1, p. 9-18, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9583-z>.
- 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. 789-798, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1026507517182>.



*Ministério da  
Agricultura e Pecuária*