

# EFEITO DO BALANÇO HORMONAL DO MEIO DE CULTURA E DAS CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS DA SEMENTE NA INDUÇÃO DE CALOS EM ARROZ CV. BRS "TAIM"

EFFECT OF CULTURE MEDIA HORMONAL BALANCE IN THE INDUCTION OF RICE CALLUS FROM MATURE SEEDS WITH DIFFERENT PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

DODE, Luciana B.<sup>1</sup>; BRAGA, Eugênia J. B.<sup>2</sup>; GONÇALVES, Fabiane S. M.<sup>3</sup>; OLIVEIRA, Leila A. A.<sup>3</sup>; MAGALHÃES JR. Ariano M. de<sup>4</sup>; FRANCO, Daniel<sup>4</sup>; PETERS, José A.<sup>1</sup>

## RESUMO

Este estudo foi conduzido com o objetivo de investigar fatores envolvidos com o estabelecimento de cultivos *in vitro* de arroz a partir de sementes maduras da cv. BRS 7 "TAIM". O efeito de diferentes combinações de reguladores de crescimento em meio MS e da qualidade fisiológica da semente na indução de calos foi estudado. Sementes incubadas em meio MS acrescido apenas de 2,4-D apresentaram a maior frequência de indução e maior peso de calos. Concluiu-se que as respostas da cv. BRS 7 "TAIM" dependem do balanço hormonal do meio de indução e que sementes com elevada qualidade fisiológica devem ser utilizadas para o estabelecimento de sistemas de cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, meio de cultivo, qualidade fisiológica.

## INTRODUÇÃO

Explorar a totipotência celular de forma eficiente é fundamental para a aplicação da cultura de tecidos em auxílio ao melhoramento de plantas (BHASKARAN & SMITH, 1990). Ainda que em arroz seja observada uma considerável plasticidade no estabelecimento de culturas *in vitro* e na regeneração de plantas a partir de inúmeros tecidos ou células, existem consideráveis diferenças relacionadas com capacidade morfogênica entre explantes e/ou genótipos (DORNELES & PETERS, 1993; PENG & HODGES, 1989; MIKAMI & KINOSHITA, 1988). Diferenças genéticas entre genótipos das subespécies Japônica e Índica podem ser facilmente observadas no estabelecimento de cultivos *in vitro* e na regeneração de plantas. Consequentemente, genótipos responsivos tem sido mais amplamente utilizados em estudos para obtenção de haplóides, híbridos somáticos, variantes somaclonais e para a transformação genética (KHANNA & RAINA, 1998). Os fatores que geram estas diferenças ainda não tiveram suas bases genéticas completamente elucidadas (PENG & HODGES, 1989; ABE & FUTSHUARA, 1986; 1991; TAKEUCHI et al., 1997; KURODA et al., 1998). A disponibilidade de material para cultivos *in vitro* é um pré-requisito para a implantação de uma rotina de trabalho visando a efetiva aplicação de técnicas de cultura de

tecidos em programas de melhoramento genético. O uso de sementes maduras de arroz tem se mostrado efetivo para indução de calos e suspensões celulares e posterior regeneração de plantas férteis em inúmeros genótipos (LI et al., 1993; JAIN et al.; 1996; DODE, 1999). Sistemas de cultivo *in vitro* estabelecidos a partir de sementes maduras apresentam vantagens por dispensarem instalações sofisticadas para manutenção de plantas e serem disponíveis durante todo o ano. Alterações na composição dos meios de indução e regeneração no que se refere a composição básica de sais, carboidratos, potencial osmótico e reguladores de crescimento, bem como as condições fisiológicas e o tipo de explante utilizado, vêm sendo investigadas (KHANNA & RAINA, 1998; AL-KHARI et al., 1996).

Neste sentido, buscou-se avaliar a eficiência de um sistema de cultivo estabelecido *in vitro*, a partir de sementes maduras da cultivar BRS 7 "TAIM" em diferentes condições fisiológicas, com diferentes balanços de auxina/citocinina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de arroz irrigado, da cultivar BRS 7 "TAIM" foram envelhecidas artificialmente pelo processo de envelhecimento precoce a uma temperatura de 42°C e umidade relativa de 100% por períodos de 0, 48, 96, 144 ou 192 horas. As sementes foram secas em estufa, a uma temperatura de 37°C para a uniformização do teor de umidade e avaliadas quanto a qualidade fisiológica e vigor através do teste padrão de germinação (BRASIL, 1992) e através da média de plântulas normais obtidas na primeira contagem do teste de germinação, respectivamente (POPINIGIS, 1977). Posteriormente, para o estabelecimento do sistema de cultivo *in vitro*, as sementes foram descascadas manualmente e desinfestadas superficialmente com etanol 70%, por 2 minutos, e solução de hipoclorito de sódio (1,5%), por 30 minutos sob agitação. Após três lavagens com água destilada esterilizada, as sementes foram distribuídas com o embrião em contato com o meio, em frascos de vidro contendo 30 ml dos meios para indução de calo (Tabela 1). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, esquema fatorial 3 x 5, sendo estudados três

<sup>1</sup> Engº Agrº, Dr., Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Instituto de Biologia, UFPel, C.P. 354, Pelotas/RS, CEP 96001-970

<sup>2</sup> Bióloga, Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, UFPel, Bolsista CNPq

<sup>3</sup> Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas, UFPel, Bolsista PIBIC, CNPq

<sup>4</sup> Engº Agrº, M.Sc., Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS

(Recebido para publicação em 09/05/2001)

tipos de meio e cinco períodos de envelhecimento das sementes. Após um período de incubação de sete dias no escuro, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , o número de calos formados e o peso dos calos obtidos foi avaliado. Para a variável número de calos, foram analisadas seis repetições, sendo cada repetição composta por um frasco contendo cinco sementes uniformemente distribuídas, totalizando 30 sementes por tratamento. Para a variável peso de calos, foram analisadas três repetições. Cada repetição constituiu a média do peso de cinco calos aleatoriamente separados do endosperma da semente, para cada um dos tratamentos. As médias obtidas para ambas as variáveis, foram comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 1 – Meios de cultura utilizados para indução de calos a partir de sementes de arroz cv. BRS 7 –“Taim”.

Meio	Composição
A	MS+2,5 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D+3% sacarose + 7g agar
B	MS+2,5 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D + 0,2mg.L <sup>-1</sup> cinetina+3% sacarose+ 7g agar
C	MS+2,5 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D+ 1mg.L <sup>-1</sup> cinetina+ 1mg.L <sup>-1</sup> ANA+1mg.L <sup>-1</sup> BAP+3% sacarose+ 7g agar

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após sete dias de estabelecimento dos cultivos *in vitro*, foram observados calos formados a partir do escutelo. Os resultados das médias obtidas para as variáveis número de calos e peso de calos encontram-se nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. A análise de variância mostrou significância para os fatores meio de indução e período de envelhecimento para a variável número de calos, embora a interação não tenha sido significativa. O melhor meio considerado para indução de calos foi o acrescido apenas de 2,4-D (meio A), seguido pelos meios B e C, apresentando respectivamente 3,43; 2,73 e 1,93 calos. MIKAMI & KINOSHITA (1988) avaliaram a indução de calos em 108 genótipos e observaram elevados percentuais de indução em meio MS contendo 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Similarmente, AL-KHARI et al. (1996), observaram também elevados níveis de indução de calos em meios MS e N6 (MURASHIGE & SKOOG, 1962; CHU et al., 1975) contendo diferentes concentrações de 2,4-D, cinetina e carboidratos.

Tabela 2 - Número de calos induzidos a partir de sementes maduras de arroz cv. BRS 7 “TAIM” submetidas a diferentes períodos de deterioração, em três meios de indução com diferentes balanços hormonais.

TEMPO** (h)	Número médio de calos			
	Meios de Indução*			Média
	A	B	C	
0	4,67 a A	3,66 a A B	2,17 a b B	3,50 a
48	4,17 a A	3,33 a A B	2,00 a b B	3,16 a b
96	3,33 a A	2,17 abA	2,00 a bA	2,50 b
144	4,17 a A	3,67 a A	2,83 a A	3,55 a
192	0,83 bA	0,89 b A	0,66 bA	0,77 c
Média	3,43 A	2,73 B	1,93 C	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey;

\* – Composição dos meios de cultura: A – MS + 2,5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 3% sacarose + 7 g.L<sup>-1</sup> agar ; B – MS + 2,5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,2 mg. L<sup>-1</sup> cinetina + 3% sacarose + 7 g.L<sup>-1</sup> agar; C – MS + 2,5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg. L<sup>-1</sup> cinetina + 1 mg. L<sup>-1</sup> BAP + 1 mg. L<sup>-1</sup> ANA + 3% sacarose + 7 g.L<sup>-1</sup> agar;

\*\* - Período de deterioração das sementes através do teste de envelhecimento precoce.

Tabela 3 - Peso médio de calos induzidos a partir de sementes maduras de arroz cv. BRS 7 “TAIM” submetidas a diferentes períodos de deterioração, em três meios de indução com diferentes balanços hormonais.

TEMPO** (h)	Peso médio de 5 calos (mg)			
	Meios de Indução*			Média
	A	B	C	
0	52,67 aA	46,33 aA	20,00 aA	39,67 a b
48	72,33 aA	45,33 aAB	21,33 a B	46,33 a
96	48,33 aA	22,67 aA	18,67 aA	29,89 a b
144	61,67 aA	51,00 aAB	17,67 a B	43,44 a
192	45,00 aA	34,67 aAB	7,33 a B	29,00 b
Média	56,00 A	40,00 B	17,00 C	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey;

\* - Composição dos meios de cultura: A - MS + 2,5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 3% sacarose + 7 g.L<sup>-1</sup> agar ; B - MS + 2,5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,2 mg. L<sup>-1</sup> cinetina + 3% sacarose + 7 g.L<sup>-1</sup> agar; C - MS + 2,5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg. L<sup>-1</sup> cinetina + 1 mg. L<sup>-1</sup> BAP + 1 mg. L<sup>-1</sup> ANA + 3% sacarose + 7 g.L<sup>-1</sup> agar;

\*\* - Período de deterioração das sementes através do teste de envelhecimento precoce.

Observou-se que a amplitude de variação no número médio de calos obtidos nos diferentes meios foi afetada pela qualidade fisiológica da semente. Ainda que não tenham sido

observadas relações lineares e/ou diretas, a partir de sementes incubadas em meio contendo apenas 2,4D, foram induzidos calos em maior número. Este resultado evidencia

que para lotes com qualidade fisiológica média ou elevada (períodos de envelhecimento de até 144 horas), o meio de indução contendo apenas 2,4-D para promover a indução de um maior número de calos a partir de sementes de BRS 7 "TAIM". Quando analisado o efeito dos diferentes períodos de envelhecimento e do estado fisiológico das sementes na indução de calos também foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 2). Sementes submetidas a um tratamento de envelhecimento longo (192 horas) apresentaram reduzido número médio de calos 0,77 calos. Este valor, bastante inferior aos observados nos demais períodos de envelhecimento (0, 48, 96 e 144 horas), diferiu significativamente dos tratamentos 0 e 144 horas, independentemente do meio de indução utilizado. Autores tem procurado elucidar as alterações que ocorrem durante o processo de deterioração das sementes sendo que a desnaturação de proteínas, redução nos níveis de carboidratos totais, desestabilização na síntese de RNA e proteínas são freqüentemente citadas. Anormalidades observadas na velocidade de desenvolvimento e/ou morfologia, devem-se a fatores celulares importantes tais como: desestruturação das membranas e morte parcial ou total de tecidos em diferentes regiões da semente (MATTHEWS, 1985).

Buscando-se maiores subsídios para identificar o efeito da qualidade fisiológica da semente no estabelecimento de sistemas de cultivo *in vitro* a partir de sementes de BRS 7 "TAIM", o peso médio dos calos foi analisado. Observou-se que o efeito da composição do meio de indução e o período de deterioração foram significativos sem contudo haver interação entre eles. O meio A, contendo apenas 2,4-D promoveu um maior desenvolvimento nos calos, independentemente do estado fisiológico da semente, sendo que nos tratamentos de envelhecimento de 48, 144 e 192h o valor obtido neste meio diferenciou-se significativamente do obtido no meio C (Tabela 3).

MAHESWARAM & SREE-RANGASAMY (1986) também citaram diferenças entre a capacidade de indução de calos e regeneração de plantas em diferentes genótipos e constataram que há interação entre genótipos, meio basal, regulador de crescimento e suas combinações, sendo que a adição de 0,5mg.L<sup>-1</sup> de cinetina beneficiou a indução de calos e a regeneração de plantas nos genótipos estudados. Para a cultivar BRS 7 "TAIM", pertencente ao grupo índica de classificação, nas condições deste estudo, os resultados obtidos para o número ou peso de calos induzidos a partir de sementes não foi beneficiado pela adição de cinetina. Cabe salientar que materiais do grupo índica comportam-se de forma mais recalcitrante ao cultivo "in vitro" que aqueles do grupo japônica.

Vários autores obtiveram a indução e proliferação de calos a partir de sementes de arroz em meio MS contendo apenas 2,4-D como regulador de crescimento sendo que calos derivados de sementes maduras, com potencial regenerativo de cultivares preferencialmente japônicas foram utilizados em estudos de transformação (DODE, 1999). SIVAMANI et al. (1996) obtiveram calos derivados de sementes e selecionaram apenas os com potencial regenerativo utilizando para proliferação meio contendo 2,4-D, cinetina, BAP e ANA. Já AL-KHARI et al. (1996) observaram diferenças significativas na capacidade de proliferação de calos entre genótipos e que estas diferenças podem ser afetadas pelos constituintes do meio de cultura. Estes autores citam ainda que o efeito da adição de citocininas no meio de indução/proliferação e o crescimento dos calos variou com o genótipo e houve também interação com outros

constituintes do meio sendo que o potencial regenerativo dos calos obtidos em meio contendo citocinina foi pouco alterado.

Comparando-se os resultados da freqüência média de indução de calos com os percentuais observados para germinação e vigor (parâmetros utilizados para avaliação da qualidade fisiológica de sementes), observou-se que a resposta na indução e peso dos calos não acompanha em todos os períodos de envelhecimento o comportamento da germinação e vigor (Tabela 4). A qualidade fisiológica da semente é um componente amplamente estudado, sendo um processo dinâmico e complexo, resultando da interação de fatores genéticos e ambientais. (HEYDECKER, 1969; CHING, 1973).

Tabela 4 – Efeito da deterioração por envelhecimento precoce na qualidade fisiológica e indução de calos de arroz a partir de sementes maduras de BRS 7 "TAIM".

Período (h)*	Germinação (%)	Vigor (%)	% de calos **
0	90	83	70
48	83	75	63
96	82	73	50
144	73	54	71
192	18	10	15

\*Períodos de envelhecimento a 42°C e 100% de umidade relativa;

\*\* Freqüência média de calos induzidos a partir de sementes maduras em três meios contendo diferentes balanços hormonais.

Diversas características da semente são influenciadas pela deterioração, destacando-se pela importância, a germinação e o vigor. A avaliação de sementes para fins comerciais é baseada fundamentalmente no teste de germinação que é facilmente reproduzível (AOSA, 1983). Este teste demonstra a aptidão de um lote de sementes em produzir plantas normais sob condições favoráveis de cultivo. O resultado do teste corresponde a percentagem de sementes que produziram plântulas normais dentro das condições preestabelecidas para cada espécie (BRASIL, 1992). O teste de vigor através da avaliação do número de plântulas normais observadas na primeira contagem do teste de germinação é um método utilizado para avaliar a qualidade fisiológica de lotes de sementes de arroz. A deterioração das sementes através do envelhecimento precoce submetendo-se sementes do mesmo lote a diferentes períodos de exposição a temperaturas adversas promoveu alterações fisiológicas identificáveis através do teste de germinação e vigor. Contudo diferenças observadas entre os percentuais obtidos indicam que fatores que não estejam diretamente envolvidos com o processo de germinação e ou vigor também são afetados e/ou alterados durante a deterioração das sementes, influenciando as condições ótimas para a indução de calos a partir de sementes maduras de arroz.

## CONCLUSÕES

O estabelecimento de cultivos *in vitro* a partir de sementes maduras de BRS 7 "TAIM" é mais eficiente quando são utilizados lotes de sementes com elevado percentual de germinação e vigor.

O meio de indução contendo apenas 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D promove melhores resultados para indução e desenvolvimento de calos.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Embrapa Clima Temperado pelo material genético utilizado neste estudo.

## ABSTRACT

*This study was carried out to investigate factors involved in the establishment of in vitro culture systems for rice using mature seeds of the cv. BRS 7 "TAIM". The effects of different growth regulator combinations in MS media and seed physiological quality in callus induction were evaluated. Seeds incubated in MS media containing only 2,4-D showed the highest induction frequency as well as the highest weight of callus. It was concluded that the cv. BRS 7 "TAIM" response depends on hormonal balance of the induction media and that seeds with good physiological conditions should be used for establishing in vitro culture systems.*

*Key words: Oryza sativa, culture, physiological quality.*

## REFERÊNCIAS

- ABE, T.; FUTSHUARA, Y. Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 72, p.3-10, 1986.
- ABE, T.; FUTSHUARA, Y. Diallel analysis of callus growth and plant regeneration in rice seed-callus. **Japanese Journal of Genetics**, Tokyo, v. 66, p. 129-140, 1991.
- AL-KHARY, J.M.; SHAMBLIM, C.E.; McNEW, R.W. et al. Callus induction and plant regeneration of U.S. rice genotypes as affected by medium constituents. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, New York, v. 32, p. 227-232, 1996.
- AOSA- **Seed Vigour Testing Handbook**. Association of Official Seed Analysts, Zurich, 88p.1983
- BHASKARAM, S.; SMITH, R. Regeneration in Cereal Tissue Culture: A Review. **Crop Science**, Madison, v. 30, p.1328-1336, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, 365p. 1992.
- CHING, T.M. Biochemical aspects of seed vigor. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.1, p.73-78, 1973.
- CHU, C.C.; WANG,C.C.; SUN,S.S. et al. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, Peking, v.18, p.659-668, 1975.
- DODE, L. B. **Genetic modification on rice starch biosynthesis**. Pelotas, 1999. 101p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Federal de Pelotas.
- DORNELLES, L.T.; PETERS, J.A. Regeneração de plantas a partir de panículas imaturas de arroz (*Oryza sativa* L.). **Acta Botânica Brasileira**, Brasília, v.6, n.2, p.97-104, 1993.
- HEYDECKER, W. The vigor of seeds- a review. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen, v.34, n.2, p.201-219, 1969.
- JAIN, R.K.; JAIN, S.; WANG, B. et al.. Optimization of biolistic method for transient gene expression and production of agronomically useful transgenic Basmati rice plants. **Plant Cell Reports**, New York, v.15, p.963-968, 1996.
- KHANNA, H.K.; RAINA, S.K. Genotype x culture media interaction effects on regeneration response of three indica rice cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague-Holanda, v.52, p. 145-153, 1998.
- KURODA, S.; KATO, H.; IKEDA, R. Heterosis and combining ability for callus growth rate in rice. **Crop Science**, Madison, v.38, p. 933-936. 1998.
- LI, L.; QU, R.; KOCHKO, A. et al.. An improved rice transformation system using the biolistic method. **Plant Cell Reports**, New York, v.12, p. 250-255, 1993.
- MAHESWARAM, M.; SREERANGASAMY, S.R. Influence of genotype and culture media on callus induction and plant regeneration in *Oryza* species. **Journal of Genetics & Breeding**, Roma, v. 43, p. 165-170, 1986.
- MATTHEWS, S. Physiology of seed ageing. **Outlook on Agriculture**, Elmsford-NY, v.14, n.2, p.89-94, 1985.
- MIKAMI, T.; KINOSHITA, T. Genotypic effects on the callus formation from different explants of rice, *Oryza sativa* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague-Holanda, v.12, p. 311-314, 1988.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- PENG, J.; HODGES, T.K. Genetic analysis of plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.) **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, New York, v.25, n.1, p. 91-94, 1989.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. AGIPLAN, Brasília 1977, 289p.
- SIVAMANI, E.; SHEN, P.; OPALKA; N. et al. Selection of large quantities of embryogenic calli from indica rice seeds for production of fertile transgenic plants using the biolistic method. **Plant Cell Reports**, New York, v.15, p. 322-327, 1996.
- TAKEUCHI, Y.; ABE, T.; SASAHARA, T. Genetic analysis of plant regeneration from seed-derived calli in rice (*Oryza sativa* L.). **Crop Science**, Madison, v.37, p. 963-965, 1997.