



## GERMINAÇÃO IN VITRO E INDUÇÃO DE CALOS EM SEMENTES DE ARROZ ( *Oryza sativa* )

**FERREIRA, Liana Viviam<sup>1</sup>.; COSTA, Liege Camargo da<sup>2</sup>.; SANTOS, Ana Carla Martins Maruri dos<sup>3</sup>.; MOREIRA, Roseane Maidana<sup>4</sup>.; GASPARETTO, Lúcia de Fátima Diniz<sup>5</sup>.**

1 Graduanda em Ciências Biológicas, INTEC/URCAMP. [lianavferreira@gmail.com](mailto:lianavferreira@gmail.com)

2 Eng. Agr. Dr<sup>a</sup>. INTEC/URCAMP

3 Graduanda em Ciências Biológicas, INTEC/URCAMP

4 Graduanda em Ciências Biológicas, INTEC/URCAMP

5 Graduanda em Ciências Biológicas, INTEC/URCAMP

### 1. INTRODUÇÃO

O arroz é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. É considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial. É alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas e, segundo estimativas, até 2050, haverá uma demanda para atender ao dobro desta população. O arroz é um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína per capita necessária ao homem, sendo uma cultura extremamente versátil, que se adapta a diferentes condições de solo e clima. É considerada a espécie que apresenta maior potencial para o combate a fome no mundo, o que determina a necessidade de maiores estudos no que diz respeito ao melhoramento genético desta cultura (EMBRAPA, 2005).

A frequência de regeneração de plantas “in vitro” é dependente dos genótipos utilizados, bem como da sua interação com as condições de cultivo (OZAWA et al., 2003). No caso do arroz, existem poucos genótipos de origem tropical com características desejáveis e protocolo definido para a produção de calos embriogênicos friáveis com alta capacidade de regeneração *in vitro*.

A capacidade de regeneração do arroz depende do genótipo e de sua interação com as condições de cultivo (AL-KHAYRI et al., 1996; ZHANG & HATTORI, 1996). O principal fator que limita o uso das técnicas de cultivo “in vitro” em arroz é a etapa de regeneração, necessitando de profundos estudos para aprimorar a eficiência do processo (MAGALHÃES JR. et al., 1998).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a germinação in vitro e indução de calos em sementes de arroz de cultivares comerciais da Região da Campanha, RS.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Instituto Biotecnológico de Reprodução Vegetal - Intec/Urcamp em Bagé/RS no mês de julho de 2009. Foram utilizadas sementes de arroz de seis cultivares comercialmente plantadas na região de Bagé, RS, 1) BRS Taim, 2) BR IRGA 417, 3) BR IRGA 422, 4) BR IRGA 424, 5) Querência e 6) Qualimax 13.

As sementes foram descascadas e lavadas com água destilada acrescida de uma gota de detergente neutro por um minuto, logo após foram imersas em solução de álcool 70% por dois minutos, ficando sob agitação no agitador magnético seguidas de três lavagens em água destilada esterilizada, para retirada do excesso da solução desinfetante, realizado em câmara de fluxo laminar.

Após a desinfestação as sementes foram inoculadas em meio de cultura contendo sais de MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de  $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, 30 g.L de sacarose e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Ao meio de cultura MS foi adicionado duas concentrações de fito hormônio indutor de calos ( $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D) e uma parte sem a adição de fito-hormônio. Em cada constituição foram inoculadas as sementes de cada cultivar, perfazendo 18 tratamentos, sendo a combinação entre os três meios de cultura e seis cultivares. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições de dois frascos, cada frasco contendo dez sementes. Após a inoculação das sementes in vitro, os frascos foram mantidos no escuro por um período de 30 dias, à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após este período, foram avaliados a porcentagem de germinação das sementes, a germinação total de sementes por tratamento, a porcentagem de contaminação e de calos formados. Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias de tratamento forma comparadas pelo Teste de Scott Knott em nível de 5% de probabilidade de erro.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Elevado índice de germinação das sementes de arroz in vitro pode ser observado (Tabela 1). Somente nos tratamentos contendo  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D nas cultivares BR IRGA 424 e Qualimax a porcentagem de germinação não foi total. Em relação à germinação total das sementes por tratamento, aquelas inoculadas em meio sem fito hormônio indutor de calos apresentaram semelhança e elevado número de sementes germinadas, diferente do observado com as mesmas cultivares em meios contendo  $2,0$  e  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D no meio de cultura. Em geral, baixos índices de germinação total foram observados nas cultivares quando inoculadas em meio contendo  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D. Embora tenha sido realizado tratamento de desinfestação das sementes antes da inoculação para a germinação in vitro, média a elevada porcentagem de contaminação foi observada em alguns tratamentos. Foi observado também que, a contaminação foi superior em determinadas cultivares, por exemplo, C1 (BRS Taim = 100% de contaminação), C2 (BR IRGA417=83,33% de contaminação) e C4 (BR IRGA424 = 94,4% de contaminação) repetindo-se a alta incidência de fungos contaminantes independente do meio de cultivo utilizado, podendo estar associada à própria amostra de sementes utilizada, já que as amostras foram procedentes de diferentes produtores e áreas de cultivo do município. A Tabela 1 mostra diferenças entre cultivares na porcentagem de calos induzidos. O meio de cultura MS acrescido de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D foi a composição

mais eficiente para a indução de calos embriogênicos nas cultivares comerciais utilizadas neste estudo, exceto para a cultivar BRS Taim, a qual não apresentou formação de calos em nenhuma das concentrações de meio de cultura utilizados. Dode et al. (2003), estudando a indução de calos em sementes de arroz, observaram alto índice de formação de calos em sementes da cultivar BRS Taim em meio contendo 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, entretanto tratavam-se de lotes de sementes com média a elevada qualidade fisiológica de sementes, ou seja, amostras que passaram por períodos de envelhecimento de até 144 horas, diferentemente das condições deste estudo, onde somente foi realizado o descasque seguido do tratamento para desinfestação superficial. Além da qualidade fisiológica da semente, a interação entre genótipos e o meio de cultura em suas combinações, podem beneficiar a indução de calos bem como a regeneração das plantas in vitro (AL-KHARI et al., 1996; MAHESWARAM & SREE-RANGASAMY, 1986).

Em geral, a utilização de 2,4-D na concentração de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> promoveu uma formação média de 61% de calos comparado a 22% quando utilizado na dosagem superior. As cultivares C2 = BR IRGA417 e C5 = Querência apresentaram alto potencial para formação de calos e somente a cultivar BR IRGA422 apresentou alto potencial na presença de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, respectivamente.

Tabela 1 – Germinação (%), germinação total, contaminação (%) e formação de calos (%) em sementes de arroz inoculadas em meio de cultivo para indução de calos. Bagé, 2009.

Tratamentos	Germ. (%)	Germinação total	Contaminação (%)	Calos (%)
MS – C1 <sup>1</sup>	100,0 a*	17,7 a	100,0 a	0,0 d
MS – C2	100,0 a	17,0 a	66,7 abc	0,0 d
MS – C3	100,0 a	14,0 abc	33,3 bc	0,0 d
MS – C4	100,0 a	15,0 ab	83,3 ab	0,0 d
MS – C5	100,0 a	18,0 a	33,3 bc	0,0 d
MS – C6	100,0 a	18,0 a	16,7 c	0,0 d
MS+2,0mg.L <sup>-1</sup> – C1	100,0 a	9,7 cdef	100,0 a	0,0 d
MS+2,0mg.L <sup>-1</sup> – C2	100,0 a	13,3 abc	100,0 a	100,0 a
MS+2,0mg.L <sup>-1</sup> – C3	100,0 a	9,7 cdef	66,7 abc	66,7 abc
MS+2,0mg.L <sup>-1</sup> – C4	100,0 a	5,7 fgh	100,0 a	50,0 bcd
MS+2,0mg.L <sup>-1</sup> – C5	100,0 a	12,0 bcd	66,7 abc	83,3 ab
MS+2,0mg.L <sup>-1</sup> – C6	100,0 a	13,3 abc	66,7 abc	66,7abc
MS+4,0mg.L <sup>-1</sup> – C1	100,0 a	8,0 defg	100,0 a	0,0 d
MS+4,0mg.L <sup>-1</sup> – C2	100,0 a	9,0 cdefg	83,3 ab	0,0 d
MS+4,0mg.L <sup>-1</sup> – C3	100,0 a	11,0 bcde	83,3 ab	100,0 a
MS+4,0mg.L <sup>-1</sup> – C4	50,0 b	2,0 h	100,0 a	0,0 d
MS+4,0mg.L <sup>-1</sup> – C5	100,0 a	6,3 efg	100,0 a	33,3 cd
MS+4,0mg.L <sup>-1</sup> – C6	83,3 a	4,7 gh	100,0 a	0,0 d
CV%	14,13	14,85	27,66	13,7

\* Médias de tratamento seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo Teste de Scott Knott em nível de 5% de probabilidade de erro.

<sup>1</sup> Cultivares: 1) BRS Taim, 2) BR IRGA 417, 3) BR IRGA 422, 4) BR IRGA 424, 5) Querência e 6) Qualimax 13.

#### 4. CONCLUSÕES

O meio de cultura com 2mg de 2,4-D apresentou maior eficiência na formação de calos principalmente na cultivar Irga 417 com 100% de calos formados. Já o meio de cultura com 4mg de 2,4-D inibiu a germinação e a formação de calos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KHAYRI, J.M.; SHAMBLIN, C.E.; McNEW, R.W.; et al.. Callus induction and plant regeneration of U.S. rice genotypes as effected by medium constituents. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, New York, v.32, p. 227-232, 1996.

DODE, L.B.; BRAGA, E. J. B.; GONÇALVES, F. S. M. et al. Efeito do balanço hormonal do meio de cultura e das condições fisiológicas da semente na indução de calos em arroz cv. BRS Taim. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 113-116, abr-jun, 2003.

EMBRAPA - Embrapa Clima Temperado. **Sistemas de Produção**, 3. ISSN 1806-9207. Versão Eletrônica Nov./2005. Disponível em <<http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoBrasil/cap01.htm>> Acesso em 12/ 08/ 09.

MAGALHÃES, JR., A.M. de; TERRES, A.L.; FAGUNDES, P.R.R.; et al.. Cultura de anteras no melhoramento genético de arroz irrigado. **Agropecuária Clima Temperado**, Pelotas, v.2, p. 183-191, 1998.

MAHESWARAM, M.; SREE-RANGASAMY, S. R. Influence os genotype and culture media on callus induction and plant regeneration in *Oryza* species. **Journal of Genetics & Breeding**, Roma, v. 43, p. 165-170, 1986.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.; A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

OZAWA, K.; KAWAHIGASHI, H.; KAYANO, T. et al.. Enhancement of regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) calli by interation of the geneinvolved in regeneration ability of the callus. **Plant Science**, Oxford, v. 165, p. 395-402, 2003.

ZHANG L.; HATTORI K. Genetic analysis of regeneration ability in rice seed callus.**Genes & Genetic Systems**, v. 71. n. 5, p. 379-384, 1996.