

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2,4 D NA INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE SEMENTES PARA DIFERENTES CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

TATIANE CASARIN¹; CARLA FERREIRA SILVEIRA²; PAULO EDUARDO ROCHA EBERHARDT; ARIANO MARTINS DE MAGALHÃES JÚNIOR; LUCIANA BICCA DODE²; LUCIANO SILVA PINTO³

¹ Universidade Federal de Pelotas – casarintatiane@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – carla.quimica@gmail.com; lucianabicca@gmail.com; pauloeduardorochoaeberhardt@yahoo.com

³ Embrapa Clima Temperado - ariano.martins@embrapa.br

⁴ Universidade Federal de Pelotas – ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das mais importantes espécies cultivadas no mundo, fazendo parte da alimentação diária de metade da população mundial (SCHMIDT, 2009). Produzido em todos os continentes, tem na Ásia a maior concentração de cultivo, com destaque para a China e Índia, responsáveis por 30,2% e 21,3%, respectivamente (INSTITUTO CEPA/SC, 2010).

O Brasil destaca-se como o nono maior produtor no mundo, sendo colhido cerca de 12.000 mil toneladas na safra 2012/1013, além disso, é o maior produtor fora do continente asiático, e responsável por cerca de 2% da produção mundial total e de 50% da produção da América Latina. O maior estado produtor do Brasil é o Rio Grande do Sul com 1.066,6 mil hectares, representando 44,6% da área nacional cultivada, e respondendo por 67,0% da produção brasileira (CONAB, 2013).

O cultivo *in vitro* de tecidos vegetais é uma importante ferramenta auxiliar do melhoramento genético podendo ser utilizado para a ampliação da variabilidade genética vegetal. Protocolos de regeneração de plantas cultivadas *in vitro* são necessários para o sucesso da transformação genética, para cultura de anteras e sistemas de mutação e seleção *in vitro* da cultura. O processo morfogênico capaz de promover a organogênese indireta pode ser iniciado com a indução de calos a partir de sementes maduras. Diferenças no potencial regenerativo entre diferentes tipos de calos são frequentemente observados. Dessa forma, este processo é um pré-requisito para o sucesso da biotecnologia do arroz (WANI et al, 2011).

Os diferentes tipos de calos podem ser caracterizados através da morfologia e potencial regenerativo. O calo considerado embriogênico é aquele em que se formam pequenos embriões somáticos capazes de regenerarem plantas completas. O calo organogênico apresenta pontos verdes que correspondem a centros meristemáticos capazes de regenerarem plantas pelo processo de organogênese. E por fim, o calo aquoso é formado por um tecido esponjoso, branco translúcido e sem consistência, e, portanto não apresenta capacidade de regenerar plantas (NABORS et al. 1983). Na teoria, toda semente capaz de germinar pode ser utilizada, entretanto, a resposta das sementes à indução de calos é altamente dependente do genótipo de arroz (BEVITORI, 2013).

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo estabelecer a concentração ideal do regulador de crescimento Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) para indução de calos a partir de sementes maduras cultivadas *in vitro* de duas diferentes cultivares de arroz irrigado, BRS PAMPA e IRGA 428.

2. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Proteômica, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico, da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizados duas diferentes cultivares de arroz irrigado, BRS Pampa e IRGA 428.

As sementes foram descascadas manualmente e desinfestadas por imersão em solução de álcool 70% (v/v) sob agitação leve, durante 2 minutos, seguida de lavagem com água destilada estéril, e imersão em solução de hipoclorito de sódio 3% (v/v) sob agitação leve, durante 25 minutos. Após enxágue com água destilada estéril, as sementes foram secas em papel filtro estéril e então inoculadas no meio de cultivo para indução de calos.

Foi utilizado o meio Murashige & Skoong (MS) acrescido de 3% (p/v) de sacarose, 7 g.L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações do regulador de crescimento ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D). Os tratamentos constaram de um grupo controle, sem adição do regulador de crescimento; tratamento 1, com a adição de 2 mg.L⁻¹ de 2,4D; tratamento 2, contendo 2,5 mg.L⁻¹ de 2,4D; e tratamento 3, acrescido de 3 mg.L⁻¹ do regulador de crescimento. Os cultivos foram mantidos em estufa BOD a 28°C, no escuro.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo que para cada genótipo foram utilizadas 8 repetições, contendo 10 sementes cada uma. Após 7 dias, foi avaliada a frequência de formação de calos. Os dados foram submetidos à análise variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, com 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da indução de calos das cultivares BRS Pampa e IRGA 428 podem ser visualizados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Após ser realizada análise de variância, observaram-se diferenças significativas entre os tratamentos para dois dos genótipos utilizados.

Para a cultivar IRGA 428 a dose com melhor frequência de indução de calos (56%) foi o tratamento 3 que foi significativamente superior aos tratamentos 1 (38%) e 2 (42%), os quais por sua vez não apresentaram diferença entre si. Dado este divergente de LIBIN et al (2012) que relatou que doses superiores a 2 mg.L⁻¹ seriam prejudiciais ao desenvolvimento dos calos.

Tabela 1: Frequência (%) de indução de calos em sementes de arroz cv IRGA 428.

Tratamento	Frequência
0 mg.L ⁻¹ 2,4D	0 c
2 mg.L ⁻¹ 2,4D	38 b
2,5 mg.L ⁻¹ 2,4D	42 b
3 mg.L ⁻¹ 2,4D	56 a
C.V	20, 87%

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott p<0,5.

Para a cultivar BRS Pampa, os tratamentos 2 e 3 foram significativamente superiores ao tratamento 1, sem apresentar diferença significativa entre si. Assim, os resultados obtidos divergem de dados apresentados por PANDEY et al (1994) que ao testar diferentes níveis de 2,4D acrescido aos meios de cultivo, observaram que a concentração de 2 mg.L⁻¹ resultou na melhor resposta para a formação de calos e se aproximam dos resultados obtidos por ISLAM et. al (2005), onde tratamentos contendo 2,5 mg.L⁻¹ 2,4D foram significativamente mais eficientes que doses inferiores, atingindo 100% de indução em diferentes variedades de arroz, ambos referidos a variedades índicas.

Tabela 2: Frequência (%) de indução de calos em sementes de arroz cv BRS Pampa.

Tratamento	Frequência
0 mg.L ⁻¹ 2,4D	0 c
2 mg.L ⁻¹ 2,4D	40 b
2,5 mg.L ⁻¹ 2,4D	48 a
3 mg.L ⁻¹ 2,4D	51 a
C.V.	17,59%

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott $p < 0,5$.

A resposta ao ácido 2,4 diclorofenoxiacético é altamente variável e genótipo específica, como é possível observar através dos resultados obtidos e dos dados da literatura. Apesar de não ter sido possível determinar a dose ideal para uma das cultivares, os resultados permitem inferir da capacidade deste material em formar calos, não apresentando um caráter de recalcitrância como descrito por HIEI & KOMARI (2008), para algumas variedades indicas.

Para ambas as cultivares os explantes incubados nos tratamentos controles, sem adição de regulador de crescimento, não formaram calos.

4. CONCLUSÕES

Foi possível concluir que, nas condições deste estudo, a concentração de 2,4D mais eficiente na indução de calos a partir de sementes maduras de arroz para a cultivar IRGA 428 foi 3 mg.L⁻¹. Para a cultivar BRS Pampa não houve diferença significativa entre os tratamentos contendo 2,5 mg.L⁻¹ e 3 mg.L⁻¹ de 2,4D, no entanto, a dose de 3 mg.L⁻¹, apresentou maior percentual absoluto, podendo ser indicada para ambas cultivares.

5. AGRADECIMENTOS

CNPq, Capes e Embrapa Clima Temperado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEVITORI, R. **Cultivo in vitro do arroz (*Oryza sativa* L.): conceitos básicos e protocolo.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013. 68 p.
- CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, V.1, N.2, p.18-24. 2001.
- CONAB, **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 12/13 – Décimo Segundo Levantamento – Setembro/2013.** Companhia nacional de abastecimento – Brasília: Conab. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em outubro de 2013.
- HIEI, Y.; KOMARI, T. Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 5, p. 824–834, 2008.
- INSTITUTO CEPA/EPAGRI: **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina.** v. 31. p. 82-97. Florianópolis, 2010.
- ISLAM, M. M.; AHMED, M.; MAHALDAR, D. *In Vitro* Callus Induction and Plant Regeneration in Seed Explants of Rice (*Oryza Sativa* L.). **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 72-75, 2005.
- LIBIN, A.; KING, P. J. H.; ONG, K. H.; CHUBO, J. K.; SIPEN P. Callus induction and plant regeneration of Sarawak rice (*Oryza sativa* L.) variety Biris. **African Journal of Agricultural Research.** v. 7, n. 30, p. 4260-4265, 2012.
- NABORS, M.W.; HEYSER, J. W.; DYKES, T. A.; DEMOTT, K. J.. Long-duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue culture. **Planta**, Berlin, v. 157, n. 3, p. 385- 391, 1983.
- PANDEY, S. K.; RAMESH, B; GUPTA, P. K. Study on effect of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.) **Indian f. Genet.**, v. 54, n. 3, p. 293-299, 1994.
- WANI, S. H.; SANGHERA, G. S.; GOSAL, S. S. An efficient and reproducible method for regeneration of whole plants from mature seeds of a high yielding Indica rice (*Oryza sativa* L.) variety PAU 201. **New Biotechnology.** v. 28, n. 4, p. 418-422, 2011.