

EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA REGENERAÇÃO DE CALOS DE ARROZ CULTIVAR PUITÁ INTA CL

Tatiane Casarin¹; Carla Ferreira Silveira²; Guilherme Cardoso²; Luciana Bicca Dode³; Luciano da Silva Pinto³

Palavras-chave: organogênese indireta, maltose, sacarose, frutose.

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura de grande importância socioeconômica, devido principalmente ao fato de ser componente essencial a dieta básica de mais da metade da população mundial, sendo necessária a constante busca de novas tecnologias que possibilitem acréscimos de produção e expansão dos setores produtivos (ROTILL et al., 2010). Atualmente, é o segundo cereal mais produzido no mundo. O Brasil é o primeiro país fora da Ásia em consumo e produção de arroz e o Rio Grande do Sul é o principal produtor de arroz irrigado do país (CONAB, 2011).

Nesse sentido, programas de melhoramento genético vêm trabalhando para a introdução de novas características, como resistência/tolerância a insetos, doenças e herbicidas, possibilitando assim maior produtividade para a cultura. Busca-se ainda o desenvolvimento de diferentes cultivares adaptadas às diferentes regiões e condições climáticas.

Uma das principais dificuldades para a obtenção de plantas geneticamente modificadas são as etapas de regeneração dos explantes, podendo ser exploradas as etapas de embriogênese, organogênese direta e indireta. Em cereais, a indução de calos pode gerar estruturas com diferentes características morfológicas e no potencial de regeneração de plantas (NABORS et al., 1983).

O calo denominado embriogênico apresenta a formação de pequenos embriões somáticos capazes de regenerarem plantas completas, com raiz e parte aérea, visto que os mesmos são bipolares. O calo organogênico apresenta pontos verdes que correspondem a centros meristemáticos capazes de regenerarem plantas pelo processo de organogênese, a partir de órgãos. O calo aquoso é formado por um tecido esponjoso, branco translúcido e sem consistência, provavelmente sem capacidade de regenerar plantas (NABORS et al., 1983; RASHID & QUARASHI, 1989).

Em condições de cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carbono a qual deve ser fornecida no meio de cultura utilizado. A melhor fonte depende principalmente da espécie vegetal, podendo variar dentro desta entre diferentes genótipos, e da fase do processo de micropropagação (Nicoloso et al., 2003).

A cultivar PUITÁ INTA-CL foi desenvolvida pela Estação Experimental Agropecuária de Concepción del Uruguay (Argentina) com a colaboração do Instituto de Genética "Ewald Favret". Esta apresenta resistência ao herbicida do grupo das imidazolinonas, gerada mediante a indução de mutações, através da tecnologia Clearfield®, tendo bom potencial produtivo com qualidade de grãos.

Dessa forma, objetivou-se determinar a fonte de carbono mais eficiente para induzir a regeneração de plantas via organogênese indireta a partir de sementes para esta cultivar.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pertencente ao

¹ Estudante de Graduação em Biotecnologia, CDTec/UFPel, Campus Universitário s/n, casarintatiane@gmail.com.

² Estudante de Doutorado em Biotecnologia, CDTec/UFPel.

³ Professor, CDTec/UFPel.

Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), RS.

Foram utilizadas sementes da cultivar de arroz comercial Puita Inta CL, particularmente recomendado para o controle de Arroz Vermelho. Para a obtenção de explantes, as sementes foram descascadas manualmente e desinfestadas superficialmente por imersão em álcool 70% (v/v) durante 2 minutos, seguida de lavagens com água destilada estéril, imersão em hipoclorito de sódio 3% (v/v) durante 25 minutos e lavadas abundantemente com água destilada estéril. Antes da inoculação no meio de cultivo, as sementes foram secas em papel filtro estéril. Para a indução de calos, sementes foram inoculadas em meio Murashige & Skoog (MS) acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ ágar. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e da autoclavagem. Foi adicionado, ao meio de cultivo, o regulador de crescimento ácido 2,4-diclorofenóxi-acético (2,4D) na concentração de 2 mg.L⁻¹. Os explantes foram mantidos no escuro, à temperatura de 28 ± 1°C. Após sete dias os calos foram cortados e transferidos para o mesmo meio e mantidos sob as mesmas condições de cultivo.

Após aproximadamente 30 dias em meio para indução de calos, os explantes foram transferidos para três diferentes tratamentos, visando à obtenção de plântulas. Os tratamentos consistiram em três diferentes fontes de carbono (sacarose, frutose, e maltose), sempre na concentração de 30 g.L⁻¹, adicionados ao meio MS. Para todos os tratamentos foram utilizados os reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA), nas concentrações de 2 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ respectivamente. O material vegetal foi transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16h. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento. A parcela experimental consistiu de placas de petri contendo aproximadamente 20 mL de meio MS, solidificado com de 7 g.L⁻¹ de ágar, e cinco explantes.

Aos 14 dias de cultivo, os explantes foram repicados para meio fresco. As avaliações quanto ao número de calos organogênicos (NCO) foram realizadas após 14 e 21 dias, quando também foi avaliado o número médio de brotos (por calo) maiores que 0,1 cm (NBC >0,1). Os dados foram submetidos à análise estatística e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de setores embriogênicos e número de brotações por explante foi influenciado pela fonte de carboidratos (Tabela 1).

Tabela 1. Desempenho de morfogênese indireta *in vitro* de arroz cv Puita Inta CL quanto ao número médio de calos organogênicos (NCO) e número médio de brotos (por calo) maiores que 0,1 cm (NBC >0,1).

Fonte de Carbono	NCO 14d	NCO 21d	NBC > 0,1
Frutose	0.68a	0.92a	0.61b
Maltose	0.56ab	0.92a	1.17a
Sacarose	0.48b	0.64b	0.62b

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey p<0,5

Foi possível observar que inicialmente, aos 14 dias (14d) de cultivo, os tratamentos não diferiram quanto a indução de setores organogênicos. Entretanto, aos 21 dias (21d) os tratamentos contendo frutose e maltose tiveram efeito superior ao do tratamento contendo sacarose. Quanto ao número médio de brotos por explante ($NBC > 0,1$), o tratamento contendo maltose se mostrou significativamente superior aos demais.

Glicídios são uma fonte importante de energia e carbono, e atua como um agente osmótico no meio e constitui o esqueleto de todos os compostos orgânicos. A suplementação aos meios de cultivo *in vitro* de arroz geralmente se dá pela adição de açúcar na forma de sacarose, universalmente utilizada pela maioria dos meios de cultura de tecidos também de outras espécies. Certos genótipos de arroz, como foi possível observar na cultivar Puita INTA CL, respondem melhor a formação de calos e/ou regeneração de brotos quando o meio é suplementado com maltose (BEVITORI, 2013). Sahoo et al. (2011) desenvolveram protocolos de regeneração eficientes para diferentes genótipos-elite de arroz utilizando maltose como fonte de carbono, obtendo altas taxas de frequência de regeneração (acima de 92% para a formação de calos não transformados e 59% para os calos transformados) para as quatro cultivares testadas.

A maltose tem sido descrita como uma fonte de carbono bastante eficiente na indução de processos organogênicos em diversas espécies. Por exemplo, no estímulo à embriogênese somática a partir de calos embriogênicos de citros; em outras espécies, a maltose aumenta o número de embriões somáticos e melhora sua morfologia e viabilidade. Já em coníferas, a maltose provou ser superior à sacarose para formação de embriões maduros (CASTRO et al., 2010); sendo citada ainda por Gauchan (2012), como melhor suplementação para indução de raiz e da parte aérea do milho.

CONCLUSÃO

Nas condições desse estudo, foi possível concluir que a maltose foi a fonte de carbono mais eficiente na indução de regeneração de calos obtidos de sementes maduras de arroz (*Oryza sativa* L) cv Puita Inta CL.

AGRADECIMENTOS

Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Terras Baixas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, agosto 2011 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2011.

NICOLOSO, F. T. et al. Efeito de Doses e Fontes de Carboidratos no Crescimento de Plantas de Ginseng Brasileiro [Pfaffia Glomerata (Spreng.) Pedersen] Cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. V.27, n.1, p.84-90, jan./fev., 2003.

ROTILI, E. A. **Eficiência e resposta quanto ao uso de nitrogênio e fósforo de cultivares de arroz** em solos de várzea irrigada e terras altas no sul do estado de Tocantins. 2009. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Tocantins - UFT, Campus de Gurupi, 2009.

RASCHID, H.; QURAIISHI. A. High frequency embryogenic callus induction and its regeneration in three wheat cvs. In: MUJEEB KAZI and L.A. STTEM, technical eds. **Review of Advances in Plant Biotechnology**, 1985-88. CIMMYT and IRRI p205-215. 1989.

NABORS, M.W.; et al. Long-duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue culture. **Planta**, 157(3):385- 391, 1983.

SEMENTES LANNES. **Puitá INTA CL**. São Gabriel, 2013. Disponível em: <http://www.sementeslannes.com.br/puita-inta-cl/>. Acesso em: 17/04/2013.

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.

SAHOO, K. K. et al. An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars. **Plant Methods**. 2011, 7:49.

CASTRO, L. M. et al. Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce. **Ciência Rural**, Santa Maria. Vol.40 no.8 Aug. 2010.

GAUCHAN, D. P. Effect of Different Sugars on Shoot Regeneration of Maize (*Zea mays* L.). **Kathmandu University Journal Of Science**, Engineering And Technology Vol. 8, No. 1, Pp 119-124. February, 2012.