

EFEITO DE HIGROMICINA NO CRESCIMENTO DE CALOS E NA REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ EM CULTURA DE TECIDOS

Tescenco, F. A. Epagri, Estação Experimental de Itajaí, Caixa Postal 277, 88301-970 – Itajaí.
Email: tescenco@epagri.ctc-sc.br

A escolha do tipo e da concentração correta de antibiótico no meio de cultura é essencial em experimentos de transformação, nos quais o antibiótico serve como agente seletivo que permitirá que apenas células transformadas sobrevivam. A higromicina tem sido utilizada extensivamente em experimentos deste tipo, já que muitos dos vetores para transformação contêm o gene *hpt* (hygromycin phosphotransferase), também conhecido como *hph* ou *aphIV*. Esse gene foi inicialmente encontrado na bactéria *Escherichia coli*, tendo sido posteriormente utilizado em vetores de transformação.

A higromicina é um antibiótico do grupo dos amino-glicosídeos, atuando em células eucarióticas e procaríóticas. Em arroz, concentrações variando de 50 mg mL⁻¹ até 100 mg mL⁻¹ tem sido reportadas na literatura. Alguns dos pontos a serem estudados para a escolha da concentração adequada do antibiótico incluem: (i) diferenças apresentadas por cultivares ou ecótipos de uma mesma espécie; (ii) diferenças entre diferentes tipos de explantes de uma mesma planta; (iii) as respostas nas diversas fases da cultura de tecidos; e (iv) outros efeitos do antibiótico sobre os explantes, como por exemplo atuar como regulador de crescimento?

Alguns desses aspectos foram abordados em experimentos de transformação genética de arroz e de outras espécies. Assim, observou-se que baixas concentrações de kanamicina no meio (200 mg L⁻¹) foram suficientes para inibir a divisão de protoplastos, mas doses tão altas quanto 500 mg L⁻¹ não foram suficientes para impedir o desenvolvimento de calos. Há também evidências indicando que a kanamicina pode exocar efeitos indesejáveis na regeneração de plantas de arroz. Para evitar esse tipo de reação, a higromicina pode ser utilizada em lugar da kanamicina, já que ela não interfere na regeneração. Em trevo vermelho, o crescimento de calos foi afetado em doses baixas de kanamicina (5 mg mL⁻¹), sendo que doses de 25 mg mL⁻¹ foram suficientes para provocar total inibição do crescimento de calos. O antibiótico paromomicina tem-se mostrado superior a outros amino-glicosídeos para a seleção de plantas transgênicas expressando o gene *nrpII*, tendo sido utilizado em citros, girassol, aveia e fumo. Tem sido demonstrado, no entanto, que este antibiótico, em concentrações sub-letais, pode agir como regulador de crescimento, e que a resistência a kanamicina é extremamente variável de experimento para experimento com a mesma espécie (macieira), variando de 10 mg mL⁻¹ até 100 mg mL⁻¹.

Para elucidar algumas dessas dúvidas, conduziu-se o presente experimento no Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Louisiana (Baton Rouge), em 1997, testando os efeitos de diferentes concentrações de higromicina no crescimento de calos e na regeneração de plantas de arroz. Foram utilizadas duas cultivares de arroz: Epagri 109 (grupo *indica*) e Taipei 309 (grupo *japonica*), e quatro concentrações de higromicina B (Calbiochem, La Jolla, Califórnia): 20, 40, 60 e 80 mg L⁻¹, além da testemunha sem o antibiótico. O meio OC foi utilizado, com os seguintes reguladores de crescimento: 2 mg L⁻¹ 2,4-D (indução de calos) ou 0,05 mg L⁻¹ zeatina ribosídica trans-isômero, mais 1 mg L⁻¹ IAA (regeneração de plantas).

As sementes descascadas foram desinfetadas com álcool e hipoclorito de sódio, colocadas em placas de Petri contendo o meio de cultura para indução de calos, e mantidas a 28 °C por 16 dias. Os calos que se formaram a partir dos embriões, entre o mesocótilo e a radícula, foram removidos, transferidos para novas placas, e mantidos nas mesmas condições por quatro dias, para permitir o seu desenvolvimento. Os calos foram então transferidos para placas contendo o mesmo meio de cultura adicionado de higromicina e mantidos nas mesmas condições descritas, por duas semanas, sendo então transferidos para meio de regeneração e

mantidos sob fotoperíodo de 16 horas ($25 \mu\text{E m}^{-2} \text{seg}^{-1}$) a 28°C . O material não necrosado e de boa qualidade era transferido para novo meio de cultura a cada duas semanas, para avaliar o potencial de formação de plantas nos diferentes tratamentos. A cada transferência, eram anotados o peso inicial de calos e o peso de calos efetivamente transferidos para o novo meio. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso com três repetições e duas subunidades por repetição, cada uma composta por uma placa de Petri contendo seis calos. Os dados foram analisados por análise de variância.

Os resultados indicam efeitos significativos para concentração de higromicina, cultivar, e para a interação concentração x cultivar, para ambas variáveis, em todas as datas de avaliação. Os calos formados a partir de sementes da cultivar Taipei 309 foram em geral mais pesados do que os originados a partir de Epagri 109 (Tabela 1). O aumento na concentração de higromicina afetou o peso inicial de calos e o peso de calos transferidos nas duas cultivares, sendo o decréscimo mais acentuado com o passar do tempo; no entanto, os efeitos foram menos pronunciados e mais erráticos para a cultivar Taipei 309.

Ao final da sexta semana em meio de regeneração, uma porcentagem muito pequena do peso inicial dos calos foi transferida para novo meio. Para os tratamentos que receberam 20 mg L^{-1} de higromicina, cerca de 12% foram transferidos, ao passo que nos tratamentos que receberam doses mais elevadas apenas 1% a 5% dos calos foram transferidos. Ao final da oitava semana, apenas tratamentos que não receberam higromicina apresentavam calos vivos, sendo estes transferidos para novo meio para estimar a capacidade de regeneração de plantas das duas cultivares. Os resultados desta avaliação demonstram que a cultivar Epagri 109 produziu um número significativamente maior de plantas por calo (21,6) do que a cultivar Taipei 309 (3,7).

De um modo geral, os resultados apontam para um declínio acentuado no peso de calos e na regeneração de plantas quando a concentração de higromicina passou de zero para 20 mg L^{-1} , o que foi seguido por um platô, indicando que a dose mais baixa de higromicina utilizada foi suficiente para inibir totalmente o crescimento de calos e a regeneração de plantas nesta espécie. Outros experimentos reportados na literatura apontam para o uso de doses variando de 50 mg L^{-1} a 100 mg L^{-1} , no entanto pode-se observar que mesmo 20 mg L^{-1} de higromicina podem ser suficientes. Neste experimento, calos derivados de sementes maduras foram transferidos para meio de regeneração contendo o antibiótico 20 dias após a indução; alguns autores sugerem um período de uma a três semanas em meio de regeneração sem antibiótico, para facilitar o desenvolvimento de plantas, após o qual o antibiótico poderia ser adicionado. É possível que os resultados obtidos no presente experimento fossem menos pronunciados tivesse tal período de crescimento sido permitido. Também convém ressaltar que pode haver respostas diferentes para um grupo mais amplo de cultivares de arroz. Em outras espécies, por exemplo a macieira, alguns genótipos mostraram resistência 38 vezes superior a paromomicina, 2,5 vezes a gentamicina, e 3,8 vezes a neomicina, indicando a necessidade de testes específicos para cada cultivar ou genótipo de uma mesma cultura.

Tabela 1- Peso inicial dos calos e peso de calos transferidos para novo meio de cultura (mg por seis calos) para material derivado do escutelo de sementes maduras cultivado em meio de cultura CC suplementado com várias concentrações de higromicina (mg L⁻¹)

Variável	Efeito	Data de avaliação		
		13 de junho	27 de junho	14 de julho
Peso inicial dos calos	Concentração de higromicina			
	0	1518,8 a †	5786,4 a	7405,9 a
	20	1010,9 b	2308,5 b	3361,8 b
	40	788,7 bc	1781,3 bc	1684,5 c
	60	698,5 c	1070,0 bc	811,3 cd
	80	598,5 c	793,6 c	546,0 d
	Cultivar			
	Taipei 309	1380,89 a	3717,9 a	4108,2 a
	Epagri 109	477,56 b	956,0 b	1330,6 b
Calos transferidos	Concentração de higromicina			
	0	1432,9 a	5661,4 a	6726,3 a
	20	920,0 b	2131,1 b	833,1 b
	40	654,5 c	1526,0 bc	310,1 c
	60	509,2 cd	804,0 c	152,5 c
	80	361,5 d	630,9 c	74,1 c
	Cultivar			
	Taipei 309	1218,0 a	3500,3 a	2222,5 a
	Epagri 109	343,1 b	774,6 b	925,3 b

† Médias com a mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% pelo teste de Duncan.