

EFEITO DA 6-BENZILAMINOPURINA E HIGROMICINA B NA REGENERAÇÃO DE MESOCÓTILOS DAS CULTIVARES DE ARROZ PUITÁ INTA CL E IRGA 426

JULIANA OLIVEIRA DE CARVALHO; FRANCINE RODRIGUES PEDRA²;
RAFAELA SILVA FORMOSO²; LUCIANA BICCA DODE²; LUCIANO DA SILVA
PINTO³

¹Universidade Federal de Pelotas (IB-PPG-Fisiologia Vegetal) - ju.olic@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (IB- Graduação em Biologia) - francinepedra@outlook.com.br

²Universidade Federal de Pelotas (CDTec-PPG Biotec/BioPro-Lab) - rafaelasformoso@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (CDTec/Biotecnologia Vegetal-Lab) - lucianabicca@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas (CDTec/BioPro-Lab) - ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Com o advento do melhoramento vegetal, a taxa de progresso genético das variedades de arroz foi intensamente acelerada (BRESEGUELLO; COELHO, 2013) resultando em aumentos significativos no potencial de rendimento. Entretanto, a produtividade de algumas cultivares ainda é limitada devido à baixa resistência/tolerância a estresses bióticos e abióticos. Para contornar essas dificuldades, a associação de técnicas bioquímicas e cultura de tecidos *in vitro* viabiliza a manipulação genética de plantas, possibilitando a produção de novos genótipos resistentes (SILVA et al., 2004). Porém, para a aplicação dessas tecnologias, é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos eficientes de regeneração de plantas (DANG; WEI, 2009).

A morfogênese, caracterizada pela emergência e formação de novos órgãos é influenciada diretamente pelo genótipo, pelo tipo e condições fisiológicas dos explantes, assim como a relação entre reguladores de crescimento e explantes (LIU; PIJUT, 2008). Explantes de arroz oriundos da região basal e meristemática de sementes recém germinadas são os mais utilizados, pois a obtenção dos mesmos não depende do ciclo da planta. Segundo REY et al. (2009; 2010) a utilização do mesocótilo como explante do arroz apresenta algumas vantagens, pois sua regeneração ocorre em curto intervalo de tempo, proporcionando uma rápida obtenção de plantas.

Entre os diferentes tipos de agentes de seleção disponíveis para a identificação de plantas potencialmente transformadas, encontra-se a higromicina B, um antibiótico de seleção amplamente utilizado na cultura do arroz (BOROVINSKAYA et al., 2008). As baixas concentrações do antibiótico são capazes de eliminar completamente células e até mesmo explantes em condições *in vitro*, facilitando a identificação de explantes transformados geneticamente (DEKEYSER et al., 1989; ZHUO et al., 2009).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo de regeneração direta de mesocótilos de arroz obtidos de sementes recém germinadas e avaliar a sensibilidade do explante de arroz ao agente de seleção higromicina B.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Botânica, no Instituto de Biologia, vinculado ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas.

Como materiais vegetais foram utilizadas as cultivares de arroz IRGA 426 e Puitá INTA CL. As sementes destas cultivares foram desinfestadas com álcool

70%, durante 1 minuto, solução de hipoclorito de cálcio 3% por 20 minutos, seguido de três lavagens em água destilada estéril. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semi-sólido (7 g L⁻¹) suplementado com 2 mg L⁻¹ de ácido α -naftalenoacético (ANA) e mantidas no escuro, à temperatura de 25^o \pm 1 ^oC, por 4 dias. Após a germinação, as plântulas foram seccionadas, isolando-se os mesocótilos, utilizando-os como explantes.

Para o experimento de regeneração os explantes foram inoculados em meio MS contendo inositol (100 mg L⁻¹), ágar (7 g L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹) e 6-benzilaminopurina (BAP) (0, 2, 3, 4 e 5 mg L⁻¹). O pH dos meios foi ajustado para 5,8 e esterelizado. Posteriormente, os explantes foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 \pm 1 ^oC, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 42 μ mol m⁻² s⁻¹. Trinta e quarenta e cinco dias após a inoculação foram realizadas avaliações, sendo determinado o número de brotações por explante (NB) e número de explantes oxidados (NBO) aos 45 dias de cultivo.

Em seguida, montou-se o segundo experimento, no qual as brotações sadias providas do experimento de regeneração foram passadas para meio MS, suplementado com inositol (100 mg L⁻¹), ágar (7 g L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹) e higromicina B (0, 10, 20, 30 e 40 mg L⁻¹). Os explantes foram mantidos nas mesmas condições citadas acima. Após quinze dias avaliou-se o número médio de brotações oxidadas (NBO) a fim de se observar o efeito das concentrações de higromicina B sobre as brotações.

Em ambos experimentos foi empregado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 (cultivares) x 5 (doses de BAP ou higromicina B) com trinta repetições. A análise dos dados foi realizada com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011) e do software Excel[®].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos (Tabela 1 e Figura 1) é possível observar que o acréscimo da concentração de BAP no meio de cultivo ocasionou um aumento significativo na formação de brotações aos 30 e 45 dias, tanto na cultivar IRGA 426 quanto na Puitá INTA CL. O mesmo resultado foi constatado nos estudos realizados por REY et al. (2009) com as cultivares BRS Taim e Querência, onde a concentração do regulador de crescimento que propiciou maior indução de brotações também foi a de 5 mg L⁻¹ de BAP.

TABELA 1. Número médio de brotações (NB) por explante de arroz aos 30 e 45 dias de cultivo e número médio de brotações oxidadas (NBO) por explantes providas do mesocótilo aos 45 dias de cultivo das cultivares IRGA 426 e PUITÁ INTA CL submetidas a diferentes concentrações de BAP. Pelotas, 2017.

BAP (mg L ⁻¹)	NB aos 30 dias		NB aos 45 dias		NBO aos 45 dias	
	IRGA 426	Puitá INTA CL	IRGA 426	Puitá INTA CL	IRGA 426	Puitá INTA CL
0	0,50 Da*	0,46 Ea	1,70 Da	1,43 Ea	0,00 Ca	0,06 Da
2	2,63 Ca	2,16 Db	4,40 Ca	3,93 Da	0,10 Ca	0,40 CDa
3	4,06 Ba	3,10 Cb	6,16 Ba	5,80 Ca	0,10 Cb	1,03 Ca
4	5,86 Aa	4,83 Bb	8,06 Aa	7,86 Ba	1,40 Bb	2,33 Ba
5	6,26 Aa	6,33 Aa	8,60 Ab	9,53 Aa	2,36 Ab	3,96 Aa

*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p \leq 0,05). Letras maiúsculas indicam a significância das diferenças entre os tratamentos e letras minúsculas indicam a significância das diferenças entre as cultivares.

O NB aos 30 dias nas doses de 2, 3 e 4mg L⁻¹ apresentaram diferenças significativas entre as cultivares IRGA 426 e Puitá INTA CL. Entretanto, aos 45 dias os mesmos tratamentos não apresentaram diferença significativa entre as cultivares, indicando uma plasticidade na regeneração dos mesocótilos, uma vez que existem diferenças na capacidade morfogênica entre explantes e genótipos (DORNELES; PETERS, 1993).

Assim como o NB, verificou-se também um aumento no NBO conforme o incremento das doses de BAP em ambas as cultivares, sendo a cultivar Puitá INTA CL a que apresentou maior NBO com 3, 4 e 5 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 1). Segundo GRATTAPAGLIA; MACHADO (1998), a adição de reguladores de crescimento, como o BAP, em meios nutritivos tem o objetivo principal de suprir possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes. Entretanto, este efeito só ocorre até determinada concentração, podendo gerar um efeito tóxico, levando a oxidação dos explantes e redução do alongamento dos mesmos.

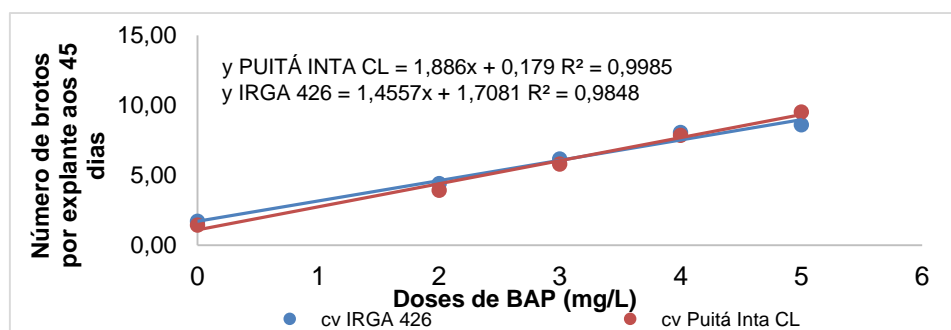


FIGURA 1. Número médio de brotações (NB) por explante providas do mesocótilo das cultivares IRGA 426 e PUITÁ INTA CL em função das diferentes concentrações de BAP. Pelotas, 2017.

Quanto aos resultados obtidos no experimento com diferentes concentrações de higromicina B, verificou-se que a 20 mg L⁻¹ de higromicina B mais de 50% dos brotos das duas cultivares encontravam-se necrosados e que conforme as doses do antibiótico foram aumentadas a taxa de brotos necrosados chegou a 90% e 93% nas cultivares IRGA 426 e Puitá INTA CL, respectivamente.

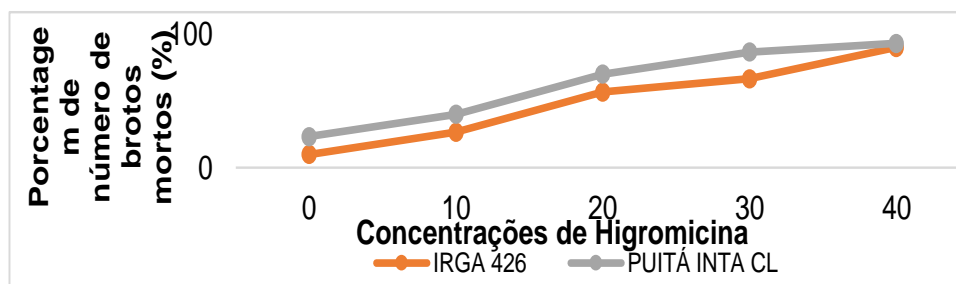


FIGURA 2. Taxa de porcentagem de brotos necrosados das das cultivares IRGA 426 e PUITÁ INTA CL em função das diferentes concentrações de higromicina B. Pelotas, 2017.

4. CONCLUSÕES

O BAP é eficiente na regeneração de brotações providas do mesocótilo das cultivares IRGA 426 e Puitá INTA CL, entretanto sua crescente concentração

induz a brotações oxidadas. A higromicina B pode ser utilizada como agente de seleção nas duas cultivares estudadas a partir da concentração de 20 mg L⁻¹.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOROVINSKAYA, M. A.; SHOJI, S.; FREDRICK, K.; CATE, J. H. D. Structural basis for hygromycin B inhibition of proteína biosynthesis. **RNA**, v. 14, p. 1590-1599, 2008)

BRESEGUELLO, F.; COELHO, A. S. G. Traditional and modern plant breeding methods with examples in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8277-8286, 2013.

DANG, W.; WEI, Z. M. Hight frequency plant regeneration from the cotyledonary node of common bean. **Biologia Plantarum**, v. 53, p. 312-316, 2009.

DEKEYSER, R.; CLAES, B.; MARICHAL, M.; MONTAGU, M. V.; CAPLAN, A. Evaluation of selectable markers for rice transformation. **Plant Physiology**, v. 90, p. 217-233, 1998.

DORNELLES, L. T.; PETERS, J. A. Regeneração de plantas a partir de panículas imaturas de arroz (*Oryza sativa* L.). **Acta Botânica Brasílica**, Brasília, v. 6, n. 2, p. 97-104, 1993.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI\Embrapa CNPH, 1998. v.1. p.183-260.

LIU, X.; PIJUT, P. M. Plant regeneration from in vitro leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*). **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v. 94, p. 113-123, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. **Physiological Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.

REY, M. S.; PINHO, D. S.; VIEIRA, A. P.; BRAGA, E. J. B.; PIEROBOM, C. R.; PETERS, J. A. Regeneração *in vitro* de mesocótilos de arroz (*Oriza sativa* L.). **R. Bras. Agrocência**, v. 15, n. 1-4, p. 23-29, 2009.

REY, M. S.; PINHO, D. S.; VIEIRA, A. P.; BRAGA, E. J. B.; PIEROBOM, C. R.; PETERS, J. A. Organogênese direta de mesocótilos de arroz (*Oriza sativa* L.). **Acta Scientiarium Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 521-526, 2010.

ZHUO, Q., PIAO, J-H., TIAN, Y., XU, J.; YANG, X-G. Large-scale purification and acute toxicity of hygromycin B phosphotransferase. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 22, p. 22-27, 2009.