

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIGROMICINA NA SELEÇÃO *IN VITRO* DE ARROZ CV. BRS PAMPEIRA

Lara Leite Rosler¹; Ana Caroline Basniak Konkol²; Camila Pegoraro³; Luciano Carlos da Maia⁴; Antonio Costa de Oliveira⁵

¹Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas – laraleiterosler@gmail.com

²PPG em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas – anacarolinebkonkol@gmail.com

³Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Pelotas – pegorarocamilanp@gmail.com

⁴Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Pelotas – lucianoc.maia@gmail.com

⁵Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Pelotas – acostol@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais consumidos mundialmente e está presente diariamente na alimentação humana, desempenhando um papel fundamental na segurança alimentar global (SOSBAI, 2022). Apresentando teor elevado de carboidratos de fácil digestão, é consumido por pelo menos metade da população mundial (OLIVEIRA, 2021). Em 2022, a produção global foi de aproximadamente 787 milhões de toneladas (FAO, 2023), evidenciando a importância socioeconômica da cultura. Nesse sentido, o melhoramento genético de arroz busca atender à crescente demanda por meio do aumento da produtividade, da tolerância a estresses bióticos e abióticos e da adaptabilidade a diferentes condições ambientais, assegurando a manutenção da produção (BORÉM et al., 2021).

Com os avanços biotecnológicos, destaca-se a transformação genética, que consiste na introdução controlada de ácidos nucleicos em um genoma receptor, geralmente mediada por vetores plasmidiais de *Agrobacterium tumefaciens* (FALEIRO et al., 2009). No interior do plasmídeo encontra-se a construção que a ser transferida à planta, contendo material genético exógeno, promotores, bordas e o gene de seleção na planta. Geralmente, como agente seletivo, utiliza-se o gene que codifica a fosfotransferase de higromicina B (*hph*), o qual confere resistência ao antibiótico higromicina, permitindo a identificação dos explantes geneticamente transformados (ZHENG, Z. et al., 1991). Entretanto, apenas a presença do gene não garante a eliminação dos explantes não transformados. Por isso, é necessário determinar a concentração ideal do agente seletivo, visto que essa pode variar conforme a espécie (ZURAIDA, 2013), da subespécie e até mesmo o genótipo (SULTANA, 2015). Apesar de existirem diversos estudos utilizando a cultivar Nipponbare (*O. sativa* subsp. *japonica*) (NISHIMURA et al., 2006; SAIKA & TOKI, 2009; WAN et al., 2009), referência mundial no arroz, há poucos trabalhos voltados para cultivares da subespécie *indica*, especialmente para materiais brasileiros. Desta forma, este estudo teve como objetivo identificar a concentração ótima do agente seletivo higromicina para eliminar explantes do genótipo BRS Pampeira (*Oryza sativa* L. subsp. *indica*), avaliando seu efeito ao longo de diferentes períodos de exposição.

2. METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do trabalho, foi utilizada a cultivar de arroz (*Oryza sativa* L. subsp. *indica*) BRS Pampeira. Sementes da cultivar foram descascadas e desinfetadas com hipoclorito de sódio 10% durante 20 minutos em cabine de fluxo laminar. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas com água Milli-Q, secas

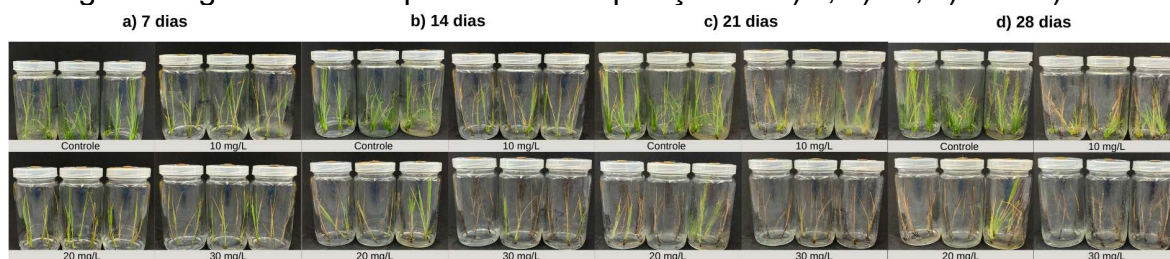
em papel estéril e dispostas em frascos de vidro para cultivo in vitro contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e 2 mg/L de fitormônio sintético ácido 1-naftalenoacético (ANA). Os frascos foram incubados por 5 dias em estufa do tipo BOD a 25°C em fase escura. Após esse período, na fase de ponto de agulha, foram obtidos mesocótilos de 0,5 a 1,0 cm de comprimento em cabine de fluxo laminar com auxílio de lupa, bisturi e pinça. Os explantes foram acondicionados em frascos contendo meio MS e 3 mg/L de fitormônio sintético 6-benzilaminopurina (BAP) por 14 dias para recuperação em sala de crescimento, com fotoperíodo controlado de 16 horas a 25°C. Posteriormente, os explantes foram transferidos para o meio de seleção contendo meio MS, 3 mg/L de BAP e higromicina a fim de avaliar o efeito letal do antibiótico ao longo de 28 dias.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4×4, com três repetições. Cada repetição foi representada por um frasco contendo cinco explantes. O fator A corresponde às doses de higromicina, com quatro níveis: 0, 10, 20 e 30 mg/L. O fator B refere-se ao período de exposição, também com quatro níveis: 7, 14, 21 e 28 dias. A variável analisada foi a taxa de sobrevivência (%) em cada tratamento e assim foi definida a concentração letal e o tempo de exposição para a cultivar BRS Pampeira. Os dados foram transformados em $\arcsen\sqrt{x}$ e submetidos à análise de variância no software R 4.4.2 utilizando o pacote car. Sendo significativa a interação entre fatores, foi realizada a análise de regressão no mesmo software.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise visual dos explantes (Figura 1), foi observado que a higromicina ocasiona sintomas de amarelamento das folhas ao longo do período de exposição. Em 7 dias (Figura 1a), sinais de amarelamento foram perceptíveis nas doses mais altas; em 14 dias (Figura 1b), os explantes apresentaram intensificação dos sintomas e alguns morreram na dose de 30 mg/L. Após 21 dias (Figura 1c), foi verificada uma maior taxa de mortalidade nas doses de 30 e 20 mg/L. Por fim, em 28 dias (Figura 1d), foi registrado 100% de mortalidade na dose de 30 mg/L e quase total na dose de 20 mg/L, restando apenas alguns sobreviventes.

Figura 1 - Explantes da cultivar BRS Pampeira submetidos às doses de 0, 10, 20 e 30 mg/L de higromicina nos períodos de exposição de a) 7, b) 14, c) 21 e d) 28 dias.



A partir da análise de variância (ANOVA), verificou-se, ao nível de 1% de significância, efeito significativo do fator doses, período de exposição (dias) e da interação entre ambos (Tabela 1).

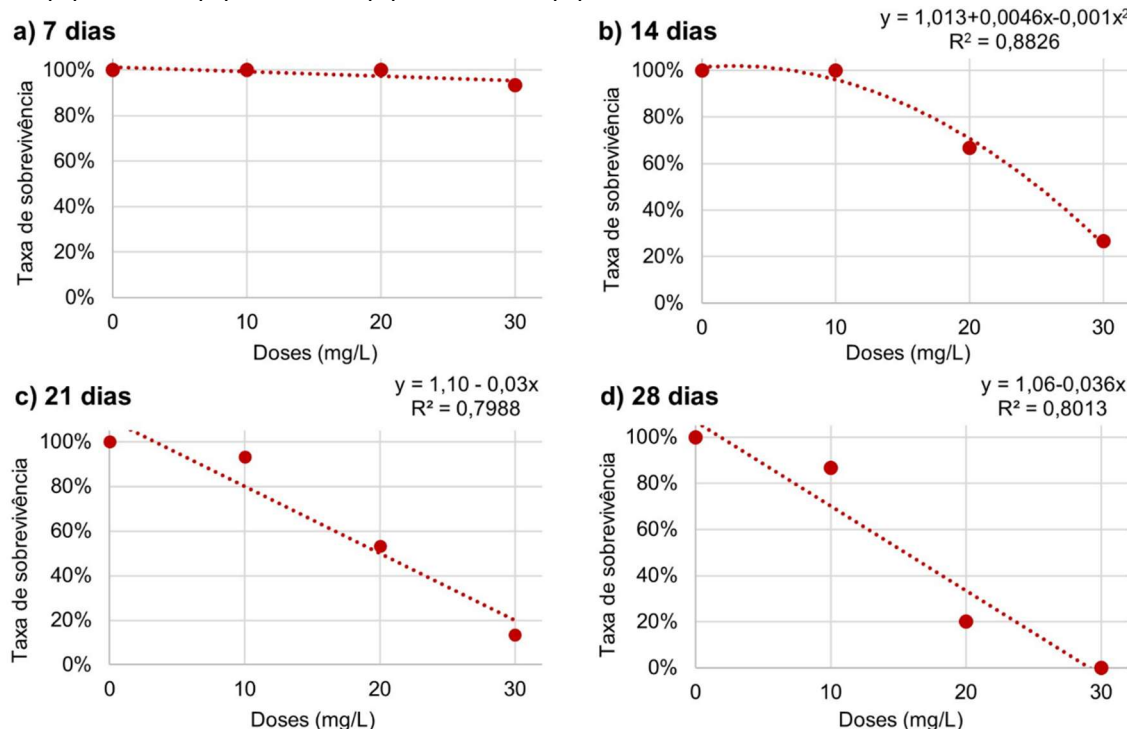
Tabela 1 – Análise de variância da taxa de sobrevivência (%) de explantes da cultivar BRS Pampeira sob diferentes doses de higromicina e períodos de exposição.

Fonte de variação	GL	Taxa de sobrevivência (QM)	F
Dose	3	2,71	47,53**
Período de exposição	3	1,12	19,6**
Dose x período	9	0,32	5,65**
Resíduo	32	0,06	-
Total	47	CV (%)	21,21

GL: graus de liberdade; QM: quadrados médios; F: valor de F calculado. **significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

Como a interação entre dose e período de exposição foi significativa, procedeu-se à análise de regressão fixando o período de exposição e analisando a variável resposta nas diferentes doses (Figura 2). Aos 7 dias (Figura 2a), não foi observada mortalidade nas diferentes doses de higromicina o que refletiu na regressão não significativa e indicou ausência de relação entre as variáveis nesse período. Após 14 dias de exposição (Figura 2b), a taxa de sobrevivência se manteve inalterada para 0 e 10 mg/L, mas decresceu de forma acentuada nas doses de 20 e 30 mg/L. Para 21 (Figura 2c) e 28 dias (Figura 2d), observou-se declínio linear da sobrevivência, sendo a maior mortalidade registrada para a dose de 30 mg/L.

Figura 2– Regressão da taxa de sobrevivência (%) de explantes da cultivar BRS Pampeira submetidos a diferentes doses de higromicina nos períodos de exposição de (a) 7 dias, (b) 14 dias, (c) 21 dias e (d) 28 dias.



De forma geral, os resultados demonstraram que a taxa de sobrevivência dos explantes foi influenciada de maneira significativa tanto pela dose, como pelo período de exposição à higromicina. As doses mais elevadas aceleram a mortalidade dos tecidos ao longo do tempo e as menores doses mantiveram a viabilidade. A partir deste comportamento confirma-se que a resposta ao agente seletivo é dependente da interação entre dose e tempo de exposição.

4. CONCLUSÕES

O agente seletivo higromicina apresenta efeito progressivo e dependente da dose e do período de exposição sobre explantes da cultivar BRS Pampeira. As doses de 20 e 30 mg/L reduziram a viabilidade dos tecidos, sendo observada mortalidade completa com 28 dias na dose de 30 mg/L. Esses resultados fornecem informações valiosas para a definição de protocolos de seleção de plantas geneticamente transformadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORÉM, Aluízio; MIRANDA, V. Glauco; FRITSCHÉ-NETO, Roberto. **Melhoramento de Plantas**. 6 ed. Viçosa: Editora UFV, 2021.
- FALEIRO, Fábio Gelape; Solange Rocha Monteiro de ANDRADE. **Biotechnologia, transgênicos e biossegurança**. Planaltina/DF: Embrapa, 2009. cap. 1, p. 17-29. ISBN 978-85-7075-050-1
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **FAOSTAT: Statistical Database**. Roma, 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 6 ago. 2025.
- MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, 1962.
- NISHIMURA, A.; AICHI, I.; MATSUOKA, M. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2796–2802, 2006.
- OLIVEIRA, Maurício de. **Arroz: um alimento de verdade: fonte de nutrientes, aliado da saúde**. 1. ed. Porto Alegre/RS: Ideograf, 2021. 95p. ISBN 978-65-86327-29-8.
- SAIKA, H.; TOKI, S. Visual selection allows immediate identification of transgenic rice calli efficiently accumulating transgene products. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 619–626, 2009.
- SOSBAI - SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO (Restinga Seca, RS). **ARROZ IRRIGADO: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil**. 33. ed. Restinga Seca, RS: SOSBAI, 2022. 200 p. ISBN 978-85-69582-03-8.
- SULTANA, S.; HO, C.; NAMASIVAYAM, P.; NAPIS, S. Genotypic Differences in Response to Hygromycin Effect on Untransformed Calli Death and Rice Germination. **Bangladesh Rice Journal**, v. 18, p. 38-43, 2014
- ZHENG, Zhenwei *et al.* Hygromycin Resistance Gene Cassettes for Vector Construction and Selection of Transformed Rice Protoplasts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p. 832–835, 17 jun. 1991.
- ZURAIDA AR, RAHINIZA K, ZULKIFLI AS, ALIZAH Z, ZAMRI Z, AZIZ A. 2013. Hygromycin as selective marker in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of indica rice MR 219. **Journal of tropical agriculture and food science** 41(1):71-79.
- WAN, Shuyan *et al.* Activation tagging, an efficient tool for functional analysis of the rice genome. **Plant molecular biology**, v. 69, n. 1, p. 69-80, 2009.