

## EFEITOS DA INTERAÇÃO DE AUXINAS E SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* NA INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES DE ARROZ

### EFFECT OF INTERATION AUXINS AND CROP SYSTEM *IN VITRO* IN THE INDUCTION OF CALLUS FROM EMBRYOS OF RICE

Marilda Borin da Cunha<sup>1</sup>

Juçara Terezinha Paranhos<sup>2</sup>  
Elci Terezinha Henz Franco<sup>4</sup>

Liane Terezinha Dorneles<sup>3</sup>

#### RESUMO

Estudou-se a indução de calos a partir de embriões maduros de arroz (*Oryza sativa* L.), cultivar BR-IRGA 414, cultivados em meio MS completo com diferentes concentrações de ANA e 2,4-D (0,5; 1,0; 5,0 e 10,0mg/l), acrescida ou não de cinetina (0,2mg/l), na presença e ausência de luz, os quais constituíram-se nos tratamentos. Nos dois estudos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições e os tratamentos arranjados num trifatorial. Tanto ANA como 2,4-D foram efetivos na formação de calos. Não houve influência dos tratamentos adicionais no efeito das concentrações de ANA sobre o acúmulo da massa dos calos, embora tenha ocorrido aumento de 358% na massa quando se testou cinetina no escuro. Para 2,4-D, a massa dos calos decresceu com a presença de cinetina e luz.

**Palavras-chave:** embriões, auxina, cinetina, luz, calos.

#### SUMMARY

A medium for callus development was studied for growing mature embryos of rice (*Oryza sativa* L.), variety BR-IRGA 414, in medium MS with different concentration of synthetic auxins, NAA and 2.4-D (0.5; 1.0; 5.0 e 10.0mg/l). Each concentration had additional treatments including presence and absence of cinetin (0.2mg/l) and of light (cold-white bulb, 4000 lux intensity). The experimental design was completely randomized with three factor and five replications. The addition of auxins was effective in callus formation but with NAA was not observed positive effects of cinetin and light on callus weight. However, where cinetin was added in dark condition callus weight increased 358%. With 2.4-D, callus weight decreased in presence of light and cinetin.

<sup>1</sup>Biólogo, aluno do Curso de Especialização em Biologia - Departamento de Biologia - Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). 97119-900 - Santa Maria, RS.

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Bolsista RHAECNPq. Departamento de Biologia, UFSM.

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Bolsista RHAECNPq, Departamento de Fitotecnia, UFSM.

<sup>4</sup>Biólogo, M.Sc., Professor Assistente, Departamento de Biologia, UFSM.

**Key words:** embryos, auxins, cinetin, callus, light.

## INTRODUÇÃO

O arroz é uma das mais importantes culturas de subsistência no mundo, justificando a crescente necessidade de obtenção de genótipos mais produtivos através do melhoramento de plantas. A cultura de células de tecidos *in vitro* apresenta-se como alternativa viável, pois proporciona o aumento das bases genéticas de forma a garantir o surgimento de novos genótipos, enriquecendo-os em relação a resistência à moléstias e pragas, tolerância a íons tóxicos e temperaturas extremas (ILLG & SIQUEIRA, 1984).

Nesta técnica a pesquisa específica de genótipos está relacionada mais diretamente com a produção de calos morfogenéticos e sua posterior regeneração, tendo os mesmos grande valor para seleção de materiais (MIKAMI & KINOSHITA, 1988).

Para DODDS & ROBERTS (1986) embriões são uma interessante fonte de explante para indução e crescimento de calos, envolvendo uma complexa relação entre o explante, composição do meio e condições ambientais durante o período de cultivo. Conforme MATZK (1991), a diferenciação do embrião é dependente do uso e da concentração das auxinas sintéticas, pois estas substituem a regulação da embriogênese pelo endosperma.

O objetivo deste estudo foi determinar a melhor dose dos reguladores de crescimento ANA e 2,4-D, acrescida ou não de cinetina, na presença ou ausência de luz, na indução de calos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção de calos, utilizou-se embriões maduros de arroz, cultivar BR IRGA 414.

Em câmara asséptica, os embriões foram removidos de sementes desinfestadas em etanol 70% por um minuto e hipoclorito de sódio 2,0%, por vinte minutos, e após lavadas com água estéril por duas vezes.

Os explantes de 2 a 3mm foram inoculados em frascos (60mm x 20mm) com 3ml de meio completo de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 3% de sacarose. Foram testadas diferentes doses das auxinas ANA e 2,4-D (0,5; 5,0 e 10,0mg/l) acrescidas ou não de 0,2mg/l de cinetina. O pH do meio foi ajustado para 5,9 + 0,1 com KOH 0,1N antes da adição de 8g/l de ágar. O meio foi esterilizado em auto-

clave a 120°C, 1,5atm por 15 minutos. Cada frasco recebeu um explante.

Após inoculados, os explantes foram transferidos para câmara de crescimento onde permaneceram por um período de 30 dias em dois sistemas de cultivo: presença e ausência de luz (lâmpara branca-fria), com intensidade luminosa de 4000 lux sob 16 horas de fotoperíodo e temperatura de 25 + 1°C, quando então, determinou-se a massa dos calos em balança com precisão de 0,01mg.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, cujos tratamentos, tanto para o estudo de ANA como para 2,4-D, constituíram-se nas doses das auxinas; com e sem cinetina; na presença e ausência de luz, constituindo um trifatorial, com cinco repetições (cinco frascos por tratamento). Em cada estudo, a massa dos calos foi submetida à análise da variância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Indução de calos com o regulador de crescimento ANA

Como a análise dos dados demonstrou não haver interação entre as doses de ANA e os demais tratamentos, com e sem cinetina; presença e ausência de luz, estudou-se separadamente seus efeitos no acúmulo da massa dos calos. Observou-se tendência em aumentar a massa dos calos com o aumento das doses do regulador de crescimento ANA; as massas foram 26,68; 48,39; 46,38 e 63,89mg, respectivamente, nas doses de 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0mg/l. Resultados semelhantes foram verificados por HUANG et al. (1986) em estudos realizados com arroz.

Conforme GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), a atividade das auxinas manifesta-se basicamente como estimulante do alongamento celular, podendo também exercer certa atividade sobre a divisão celular. Para esses autores, a quantidade de tecidos calosos formada está relacionada com o tipo de auxina e a concentração aplicada, sendo que as concentrações mais elevadas causam maior crescimento do calo. Entretanto, AMEMIYA et al. (1956) constataram diminuição do crescimento dos calos derivados de embriões de arroz com o aumento da concentração de auxinas no meio.

Os efeitos do uso ou não de cinetina no meio, associada a presença e ausência de luz na produção da massa dos calos (Tabela 1), indicam não haver diferença significativa entre a utilização e a não utilização desse regulador de crescimento na presença de luz.

Tabela 1 - Médias da massa dos calos obtidas com o uso ou não de cinetina, na presença e ausência de luz. Santa Maria, RS. 1991.

TRATAMENTOS		MASSA DOS CALOS (mg)
Luz	Com cinetina	77,04a
	Sem cinetina	42,02a
Escuro	Com cinetina	108,53a
	Sem cinetina	024,77 b

Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste Duncan a 5% de probabilidade, em cada grupo.

Porém, quando se testou no escuro, a adição de cinetina aumentou a massa dos calos em 358%. Entretanto, com a adição de cinetina no meio de cultura, este aumento não significativo foi de apenas 40% no escuro em relação a inoculação com a presença de luz. Isto talvez esteja relacionado com o alto índice de oxidação dos tecidos provocado pela luz, a qual diminui a atividade metabólica das células, impedindo a expressão do potencial total na divisão celular (BIDWELL, 1974).

CHU et al. (1975) verificaram maior indução de calos quando associaram auxinas e citocininas ao meio nutritivo. Isso também foi observado por NIIZEKI & OONO (1968), em arroz cultivado *in vitro*, onde constataram ainda que esses fitormônios, quando utilizados separadamente, não formaram calos.

#### Indução de calos com o regulador de crescimento 2,4-D:

Os dados da massa dos calos obtidas em função das diferentes doses de 2,4-D, cultivados no escuro e na luz encontram-se na Figura 1. Observa-se decréscimo na massa dos calos cultivados no escuro, com o aumento das doses, contrastando desta forma, com os resultados obtidos nas mesmas doses, em presença de luz, os quais mostram tendência em aumentar esse acúmulo.

Estes dados demonstram que a luz pode afetar o crescimento. Segundo GALSTON & DAVIES (1969) a luz aumenta a permeabilidade das membranas, controlando desta forma, a quantidade de hormônio presente no tecido, através da regulação de seu transporte ou sua inativação. BIDWELL (1974) sugere que a luz proporciona aumento da absorção de oxigênio e da utilização de ATP, o que, provavelmente, ocasionaria decréscimo no conteúdo de carboidratos das células do calo.

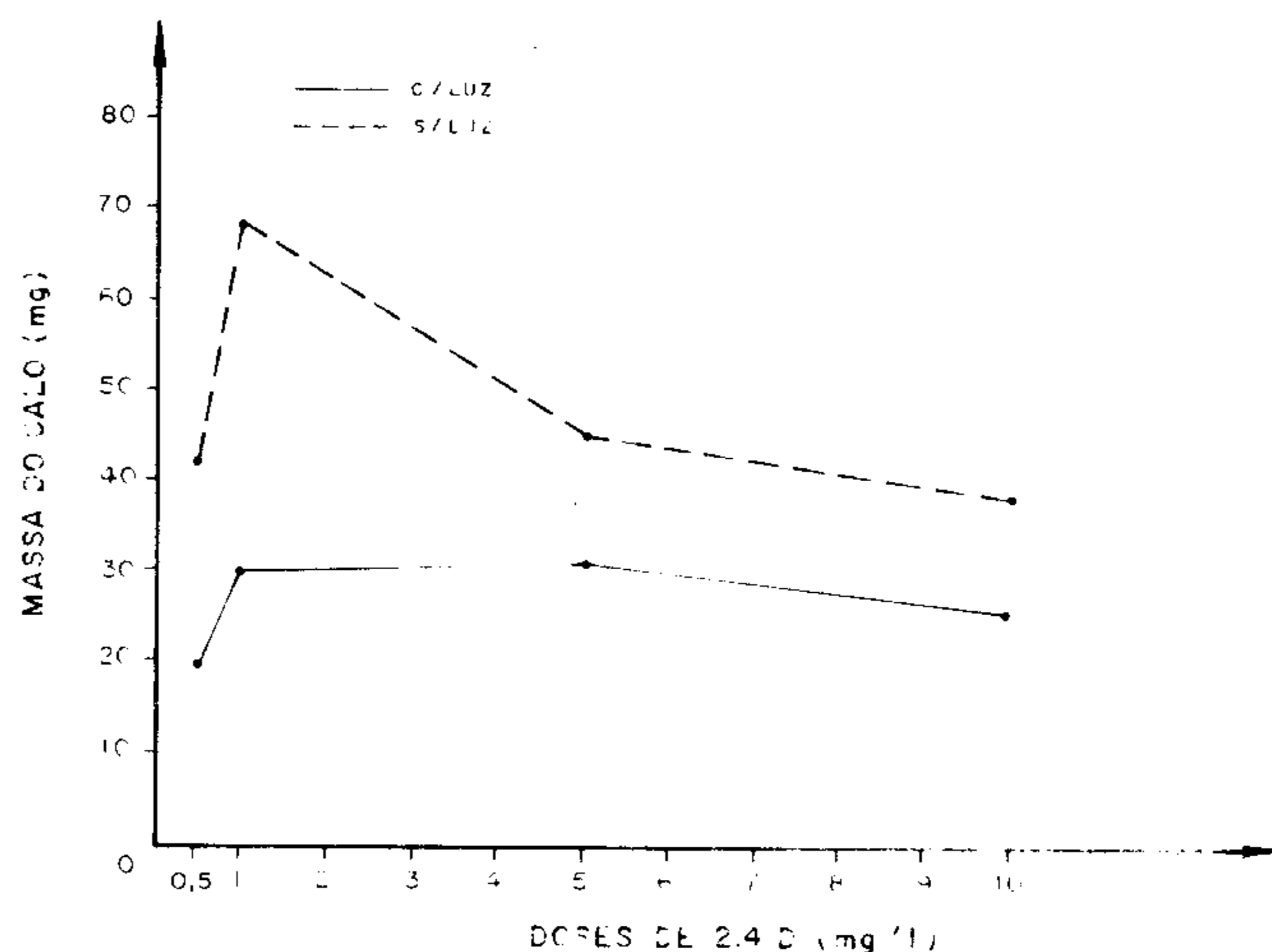


Figura 1 - Massa do calo de arroz a partir de embriões maduros nas diferentes concentrações de 2,4-D na presença e ausência de luz.

A Figura 2 mostra os dados da massa dos calos obtidos quando se combinou diferentes doses de 2,4-D, com e sem cinetina.

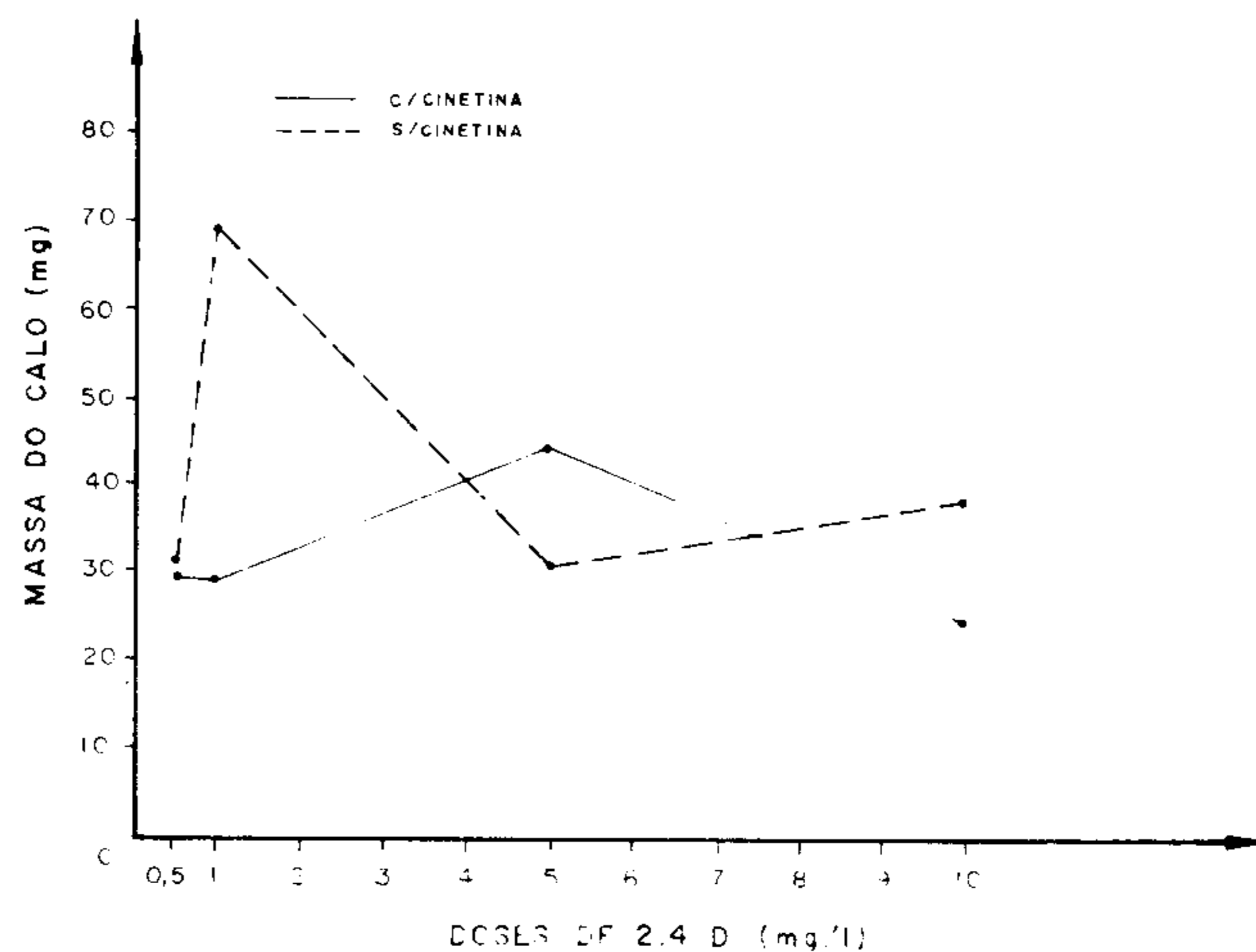


Figura 2 - Massa do calo de arroz a partir de embriões maduros nas diferentes concentrações de 2,4-D na presença e ausência de cinetina.

Na presença de cinetina, a maior massa dos calos ocorreu com a dose de 5,0mg/l de 2,4-D, ao contrário do observado quando não se utilizou cinetina. Nesta condição, o maior valor foi obtido na dose de 1,0mg/l, demonstrando assim que a cinetina diminui a desdiferenciação das células, sendo negativa no incremento da massa do calo. Isto de certa forma

explicaria o fato de que, em todas as doses de 2,4-D, sem cinetina, houve maior acúmulo de massa do que quando comparada com o uso deste regulador de crescimento. Provavelmente a citocinina atuaria de forma a diminuir o efeito da auxina na desdiferenciação dos tecidos.

Segundo HUANG et al. (1986), o efeito da cinetina sobre a diferenciação de calos pode ser benéfica ou inibitória, dependendo do tipo e concentração das auxinas no meio de cultura. Conforme os autores, a presença de 1,0 a 2,0mg/l de cinetina adicionada ao meio contendo 4mg/l de 2,4-D promoveu satisfatoriamente a indução e a diferenciação dos calos.

Entretanto, para PALNI et al. (1988), as citocininas exógenas demonstraram elevar o nível de auxinas nos tecidos, influenciando a sua síntese por afetar a produção de enzimas que oxidam o AIA e reduzir a formação de aminoácidos conjugados a ela. O maior nível de auxinas estimula o crescimento das células pelo aumento de RNA e, conseqüentemente, a síntese protéica, resultando o incremento da massa do calo.

## CONCLUSÕES

- Na luz e no escuro, o aumento da dose do regulador de crescimento ANA aumenta o acúmulo de massa dos calos;
- No escuro, a presença de cinetina, no meio contendo ANA, aumenta a massa dos calos;
- Para o 2,4-D, o maior acúmulo da massa dos calos ocorre nas menores doses, quando cultivados no escuro. Em presença de luz, o aumento da dose proporciona maior acúmulo de massa;
- A ausência de cinetina no meio de cultura, contendo 2,4-D, proporciona maior crescimento dos calos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMEMIYA, A., AKEMINE, H., TORIYAMA, K. Cultural conditions and growth of imature embryo in rice plant. Studies on the embryo culture in rice plant I. **Bull Natl Inst Agri Sci**, v. 6, p. 37-40, 1956.
- BIDWELL, R.G.S. **Plant physiology**. London: Collier Macmillan Publishers, 1974. 643 p.
- CHU, C.C., WANG, C.C., SUM, C.S., et al. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientific Sinica**, v. 18, n. 5, p. 659-668, 1975.
- DODDS, J.H., ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.
- GALSTON, A.W., DAVIES, P.J. Hormonal regulation in higher Plants. **Science**, v. 163, p. 1288-1297, 1969.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT P/EMBRAPA-CNPQ, 1990. Microprogação: p. 99-169.
- HUANG, C.R., WU, I.H., CHEN, C.C. Effects of plant growth substances on callus formation and plant regeneration in another culture of rice. **Rice Genet Symposium** Department of Botany Nacional Taiwan University. Taipei. Taiwan, China, v. 27, n. 31, p. 763-771, 1986.
- ILLG, R.D., SIQUEIRA, W.J. Variabilidade genética induzida através da cultura de tecidos. In: COLÓQUIO SOBRE CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO DE PLANTAS, 1984. Piracicaba, SP. **Anais.. Piracicaba**, 1984.
- MATZK, F. A novel approach to differentiated embryos in the absence of endosperm. **Sexual Plant Reproduction**, v. 4, p. 88-94, 1991.
- MIKAMI, T., KINOSHITA, T. Genotypic effects an the callus formation from different explants of rice, *Oryza sativa* L., **Plant cell tissue an organ culture**, v. 2, p. 311-314, 1988.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium of rapid growth and bioassay with tabaco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 437-497, 1962.
- NIIZEKI, H., OONO, K. Indution of haploid rice plant from anther culture. **Proc Japan Acad**, v. 44, p. 554-557, 1968.
- PALNI, L.M.S., BURCH, L., HORGAN, R. The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. **Planta**, v. 174, p. 213-234, 1988.