

NOTA CIENTÍFICA

CRIOPRESERVAÇÃO DE CALOS DE ARROZ

CRYOPRESERVATION OF RICE CALLUS

Helen Lúcia da Cruz MIRANDA ¹

Vera Lucia BOBROWSKI ²

Luciana Bicca DODE ³

Geri Eduardo MENEGHELLO ⁴

RESUMO

A criopreservação é uma técnica que mantém germoplasma por longo prazo. Objetivou-se verificar o efeito da criopreservação em nitrogênio líquido na regeneração de calos de arroz induzidos a partir de sementes maduras e avaliar o uso do glicerol como agente crioprotetor. Sementes de arroz BRS-7 TAIM, foram descascadas e desinfestadas, distribuídas em frascos contendo meio MS 2,5 mg dm⁻³ de 2,4 D para indução de calos e mantidos a temperatura de ±25 °C no escuro. Após doze dias os calos foram criopreservados em nitrogênio líquido por uma hora, descongelados a 37° C e inoculados no meio de cultivo para proliferação. Utilizou-se cinquenta calos por tratamento: Testemunha, Testemunha criopreservada, Glicerol 500 g dm⁻³ e Glicerol 500 g dm⁻³ criopreservado. A avaliação foi realizada aos trinta dias observando-se o tamanho e coloração dos calos. Transferiu-se o material para meio de regeneração MS 10 mg dm⁻³ sacarose, 0,5 mg dm⁻³ de ANA e 2,0 mg dm⁻³ de BAP e incubou-se em fotoperíodo de 16 h. Avaliou-se a regeneração aos trinta e quarenta e cinco dias de incubação, os parâmetros foram: crescimento dos calos, número de gemas/calos, número de calos com broto e número de brotos/calos. Na proliferação os calos da Testemunha criopreservado oxidaram, porém, na regeneração, aos trinta dias, apresentaram maior tamanho e número de gemas, e aos quarenta e cinco dias maior número de brotos que os demais tratamentos. Conclui-se que a criopreservação pode ser empregada em calos de sementes de arroz, não afetando sua capacidade regenerativa.

Palavras-chave: Calos; regeneração; *Oryza sativa*.

ABSTRACT

Cryopreservation is a technique that allows maintaining long-term germoplasma using ultra-reduced temperature. The objective of this study was to evaluate the regeneration seed's callus of rice cryopreserved. Seeds of rice BRS-7 TAIM, were peeled and desinfested for establishment in vitro, distributed in flasks containing MS (Murashige & Skoog, 1962) 2,5 mg dm⁻³ of 2,4 D for induction of callus and maintained the temperature of ±25 °C in the darkness. After twelve days the calluses were cryopreserved in liquid nitrogen for one hour, thawed 37° C and put back in the middle of cultivation for proliferation. It was used fifty callus by treatment: Test, Test cryopreserved, Glycerol 500 g dm⁻³ and Glycerol 500 g dm⁻³ cryopreserved. The evaluation of the proliferation was accomplished to the thirty days being observed the size and coloration of the callus. The material was transferred for middle of regeneration MS 10 mg dm⁻³ sucrose, 0,5 mg dm⁻³ of ANA and 2,0 mg dm⁻³ of BAP and it was incubated in fotoperíodo of 16 h. The evaluation of the regeneration was accomplished to the thirty and forty five days of incubation, the parameters were: growth of the callus, sprout and callus number, number of callus with sprout and sprout/callus number. In the proliferation the callus of the treatment Test cryopreserved rusted, however it was observed in the regeneration, to the thirty days, that the same ones presented such adult and number of sprout, and to the forty five days adult number of sprouts than the other treatments. It is ended that the cryopreservation technique can be used in callus of seeds of rice, not affecting the regenerative capacity.

Key-words: Callus; regeneration; *Oryza sativa*.

¹ Bióloga. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes (PPGCTS). Dpto. de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) – Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Campus Universitário. Caixa Postal 354. CEP 96010-900. Pelotas – RS, Brasil. E-mail: helenlc@gmail.com

² Eng. Agr. Dra. Profa. do Instituto de Biologia IB-UFPEL. Campus Universitário. Caixa Postal 354. CEP 96010-900. Pelotas – RS, Brasil. E-mail: vera.bobrowski@pq.cnpq.br

³ Eng. Agr. Dra. Profa. da Universidade Católica de Pelotas. Rua Félix da Cunha, 412. CEP 96100-000. Pelotas – RS, Brasil. E-mail: lucianabicca@terra.com.br

⁴ Eng. Agr. Dr. PPGCTS. Dpto. de Fitotecnia, FAEM-UFPEL. Campus Universitário. Caixa Postal 354. CEP 96010-900. Pelotas – RS, Brasil. E-mail: gmeneghello@gmail.com. Autor para correspondência.

INTRODUÇÃO

A conservação *in situ* e *ex situ* do germoplasma de raças locais, cultivares domésticos e parentes silvestres de espécies agrônomicas tem sido proposta como medida de prevenção a erosão genética (Bajaj, 1995). A diversidade contida em um germoplasma ou induzida através de mutações deve ser protegida de eventuais perdas para garantir que a variabilidade possa ser utilizada na busca por características agronomicamente desejáveis (Vieira, 2000).

A criopreservação é uma técnica que permite manter o germoplasma a longo prazo sob temperatura ultra-reduzida (nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou na fase de vapor a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nessa temperatura, a movimentação de moléculas é drasticamente reduzida e não há fase líquida na célula (Vasco, 2003).

A conservação do material biológico é assegurada na criopreservação, pois nessas temperaturas muito baixas o metabolismo celular fica tão reduzido que a deterioração biológica é minimizada. Os riscos de perda do material biológico são menores e os custos mais baixos em relação a conservação *in vitro* (Santos, 2000).

A utilização de sementes maduras de arroz tem se mostrado eficiente para indução de calos e suspensões celulares e posterior regeneração de plantas férteis em inúmeros genótipos (Dode, 1999).

A maior parte dos sistemas experimentais utilizados para a criopreservação, como calos, contém altos teores de água intracelular a qual pode congelar-se e formar cristais de gelo o que pode causar rupturas nas membranas e destruição das células (Santos, 2000).

Indução *in vitro* de variabilidade em cereais tem produzido um grande número de somaclones, híbridos somáticos e variantes de interesse agrônomico. O armazenamento por longo tempo e de forma estável destes variantes genéticos requer eficiente e confiável método de conservação (Moukadiri et al., 1999).

A indução de variabilidade através de agentes mutagênicos ou cultivo *in vitro*, potencialmente pode gerar um grande número de eventos (um para cada material submetido ao agente mutagênico), tornando-se uma das limitações desta técnica para a avaliação e manutenção destes materiais sem perda de variabilidade (Moukadiri et al., 1999; Olivares-Fuster et al., 2000).

A conservação destes variantes genéticos de maneira estável é por um longo período através da criopreservação requer o desenvolvimento ou ajuste de metodologias de criopreservação diferenciadas para cada espécie. Essa técnica progrediu muito nos últimos dez anos e protocolos já foram desenvolvidos para várias espécies de plantas (Santos, 2000).

O uso de agentes crioprotetores tem sido testado em diferentes plantas, a utilização de

soluções concentradas de crioprotetores como o glicerol causa a desidratação do tecido diminuindo a água livre existente na célula (Santos, 2001).

Em cereais diferentes artigos tem relatado o uso de criopreservação para calos e suspensões celulares utilizando uma mistura de crioprotetores e congelamento lento. Isto requer uma prévia otimização destes fatores e do processo de cultivo pós congelamento para cada tipo de explante e genótipo (Granapragasam & Vasil, 1992; Bajaj, 1995).

Este estudo teve como objetivo verificar o efeito da criopreservação em nitrogênio líquido na regeneração destes calos e avaliar o uso do glicerol como agente crioprotetor para calos de arroz induzidos a partir de sementes maduras.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia Celular, do Departamento de Zoologia e Genética, Instituto de Biologia – UFPel, utilizando sementes de arroz cv. BRS-7 TAIM cedidas pela EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS.

Sementes de arroz da cultivar BRS-7 TAIM, foram descascadas manualmente e submetidas a desinfestação com etanol $700\text{ cm}^3\text{ dm}^{-3}$ por 2 min sob agitação e solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5%) a $500\text{ cm}^3\text{ dm}^{-3}$ por 20 min, também sob agitação, após as sementes foram lavadas três vezes com água destilada esterilizada para o estabelecimento *in vitro*. As sementes foram distribuídas em frascos contendo MS (Murashige & Skoog, 1962) com $2,5\text{ mg dm}^{-3}$ de 2,4 D para a indução de calos e mantidas a temperatura de $25\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ no escuro. Após doze dias os calos excisados foram submetidos a criopreservação em nitrogênio líquido, onde permaneceram imersos durante uma hora, terminado o tempo de criopreservação os calos foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados em banho maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Utilizou-se cinquenta calos por tratamento: Testemunha (constituída por calos não tratados e não criopreservados) - T, Testemunha criopreservada (calos não tratados e criopreservados) - TC, Glicerol 500 g dm^{-3} (calos mergulhados em Glicerol e não criopreservados) - G e Glicerol 500 g dm^{-3} criopreservado (calos mergulhados em Glicerol e criopreservados) - GC. Os calos foram lavados em água destilada e esterilizada e distribuídos em frascos contendo meio de cultivo MS suplementado com $2,5\text{ mg dm}^{-3}$ de 2,4 D para proliferação e mantidos no escuro sob temperatura de $25\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ em sala de crescimento. A avaliação da proliferação foi realizada aos 30 dias observando-se o tamanho e coloração dos calos. Transferiu-se o material para meio de regeneração MS contendo 10 mg dm^{-3} de sacarose, $0,5\text{ mg dm}^{-3}$ de ANA e $2,0\text{ mg dm}^{-3}$ de BAP e após o material foi incubado em câmara de crescimento a temperatura de $25\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, intensidade de fluxo luminoso de $28\text{ mmol m}^{-2}\text{ s}^{-1}\text{ m}^{-1}$, e fotoperíodo de 16 h. As avaliações

foram realizadas aos 30 e 45 dias de incubação. Os parâmetros observados foram: número de calos regenerantes, tamanho dos calos, número de gemas por calo, número de calos com broto e número de brotos por calo.

Foram analisadas três repetições, sendo avaliado em cada repetição composta por um frasco contendo cinco sementes uniformemente distribuídas, totalizando 15 sementes por tratamento. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado. As médias obtidas todas variáveis, com exceção de tamanho dos calos, foram comparadas através do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fase de proliferação observou-se maior oxidação nos calos do tratamento sem glicerol e criopreservado, nos demais tratamentos os calos apresentaram coloração parda e tamanho pequeno, como a quantidade de calos foi pequena, não são apresentados os dados, apenas justificando o motivo provável de sua ocorrência. Observou-se que na avaliação da regeneração, aos 30 dias (Tabela 1) os mesmos apresentaram maior tamanho, regeneração e número de gemas, e aos 45 dias maior número de brotos que os demais tratamentos (Tabela 2).

TABELA 1 – Regeneração de calos de arroz aos 30 dias, após submissão a quatro diferentes tratamentos.

Tratamentos*	Nº de calos	Tamanho de calos	Calos regenerantes (%)	Nº gemas/calos
T	60	Pequenos	0 c	0 b
TC	52	Pequenos e oxidados ou grandes e amarelados	0,8 a	2,2 a
G	56	Pequenos	0,035 b	2 a
GC	50	Pequenos	0 c	0 b
CV (%)			29,35	16,22

* T - Testemunha; TC - Testemunha criopreservada; G - Glicerol 500 g dm⁻³; GC - Glicerol 500 g dm⁻³ criopreservado. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

TABELA 2 – Regeneração de calos de arroz aos 45 dias, após submissão a quatro diferentes tratamentos.

Tratamentos*	Calos regenerantes (%)	Nº de gemas/calos	Nº de calos c/ broto	Nº de brotos/ calo
T	0 c	0 b	0 b	0 b
TC	0,8 a	2,8 a	4 a	2 a
G	0,035 b	2 a	0 b	0 c
GC	0 c	0 b	0 b	0 c
CV (%)			15,12	10,22

* Testemunha- T, Testemunha criopreservada- TC, Glicerol 500 g dm⁻³ - G e Glicerol 500 g dm⁻³ criopreservado- GC. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

O tratamento Testemunha criopreservado (sem glicerol) mostrou a maior regeneração, o que pode ser uma resposta a situação de estresse ao qual foi submetido. Withers (1979) identificou vários aspectos da fase de descongelamento que podem influenciar a recuperação das células, incluindo a lavagem e a composição do meio de cultivo. Embora a lavagem das células depois do descongelamento remova crioprotetores potencialmente tóxicos, pode causar efeito adverso na viabilidade das suspensões celulares.

Os calos de arroz induzidos a partir de sementes maduras são compostos por conjunto de células capazes de responder rapidamente ao estímulo do 2,4 D, formando massas de diferentes graus de compactação e friabilidade.

Em alguns calos nos tratamentos com Glicerol apresentaram oxidação, que pode estar relacionada à resposta das células externas do calo ao crioprotetor que, contudo, não atinge o centro da massa em desenvolvimento.

Neste estudo evidenciou-se que não é necessário o uso de crioprotetores para

criopreservação de calos de arroz, fato observado também por Lynch et al. (1994) que detiveram 20 a 40% de sobrevivência e crescimento dos calos criopreservados sem o uso de crioprotetores. Os crioprotetores podem ser tóxicos ou podem causar estresse osmótico levando à morte as células ou modificando a sua resposta morfogênica em cultura (Sakai, 1995), o que coincide com as respostas observadas neste estudo. Os calos criopreservados com o uso do glicerol como crioprotetor não apresentaram resultados satisfatórios.

Os calos apresentaram aspecto esbranquiçado, exceto aqueles congelados sem glicerol, que apresentaram coloração amarelada. Lynch et al. (1994) cita que uma aparência muito branca em células descongeladas de arroz cv. Taipei 305 é sintomático de frio injúria, desplasmólise e estresse de oxidação. Também pode ser considerada a perda de fatores condicionantes pela célula, os quais são necessários como suporte inicial da divisão celular (Bergmann, 1977).

Lynch et al. (1994) relatam que a eficiência da recuperação das células criopreservadas, após estabelecidos os parâmetros necessários, pode variar dentro de uma cultivar. O processo de regeneração de plantas a partir de calos depende do correto balanço entre reguladores de crescimento e a concentração endógena de fitohormônios.

CONCLUSÕES

A criopreservação de calos de arroz mantém as células vivas, permitindo a posterior regeneração de plantas *in vitro*.

A criopreservação de calos de arroz pode ser realizada sem o uso de crioprotetores.

REFERÊNCIAS

1. BAJAJ, Y. P. S. Criopreservation of germoplasm of cereals (wheat, rice, maize). In: BAJAJ, Y. P. S. (ED.). **Criopreservation of germoplasm. I.** NEW YORK: SPRINGER-VERLAG, 1995. P. 217-231.
2. BERGMANN, L. Plating of plant cells. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M. H. (Ed.). **Plant tissue culture and its biotechnological applications.** New York: Springer-Verlag, 1977. p. 213-225.
3. DODE, L. B. **Genetic modification on rice starch biosynthesis.** 1999. 101 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.
4. GRANAPRAGASAM, S.; VASIL T. K. Cryopreservation of immature embryos, embryogenic callus and cell suspension cultures of gramineous species. **Plant Science**, v. 83, n. 2, 205-215, 1992.
5. LYNCH, P. T. et al. Rice cell cryopreservation: the influence of culture methods and the embryogenic potential of cell suspensions on post-thaw recovery. **Plant Science**, v. 98, n. 2, p. 185-192, 1994.
6. MOUKADIRI, O.; LOPES, C. R.; CORNEJO, M. J. Physiological and genomic variations in rice cells recovered from direct immersion and storage in liquid nitrogen. **Physiologia Plantarum**, v. 105, n. 3, p. 442-449, 1999.
7. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n. 3, p. 473-497, 1962.
8. OLIVARES- FUSTER, O. et al. Cryopreserved callus, a source of protoplasts for citrus improvement. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 75, n. 6, p. 635-640, 2000.
9. SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 32, Cryopreservation of plant germplasm I.** New York: Springer-Verlag, 1995. p. 53-69.
10. SANTOS, I. R. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, n. 20, p. 60-65, 2001.
11. SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, ed. especial, p. 70-84, 2000.
12. VASCO, H. C. **Métodos de melhoramento genético** Viçosa, 2002. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/MELHOR/MHR015.htm>>. Acesso em: 12 out. 2003.
13. VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, p. 18-20, 2000.
14. WITHERS, L. A. Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota* L.). **Plant Physiology**, v. 63, n. 3, p. 460-467, 1979.

Recebido em 19/03/2008

Aceito em 06/01/2009