



AMANDA LIMA VILELA

**PLANT TISSUE CULTURE APPLIED TO PLANT
IMPROVEMENT OF UPLAND RICE**

**LAVRAS – MG
2025**

AMANDA LIMA VILELA

**PLANT TISSUE CULTURE APPLIED TO PLANT IMPROVEMENT OF UPLAND
RICE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador

Profa. Dra. Flávia Barbosa Silva Botelho
Coorientadora

Prof. Dr. Filipe Almendagna Rodrigues
Coorientador

**LAVRAS – MG
2025**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Lima Vilela, Amanda.

Plant tissue culture applied to plant improvement of
upland rice / Amanda Lima Vilela. - 2025.

82 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual

Coorientadora: Flávia Barbosa Silva Botelho

Coorientador: Filipe Almendagna Rodrigues

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2025.

Bibliografia.

1. Oryza sativa. 2. Cultura de Tecidos Vegetais. 3. Melhoramento de plantas. I.
Pasqual, Moacir. II. Barbosa Silva Botelho, Flávia. III. Almendagna Rodrigues,
Filipe. IV. Universidade Federal de Lavras. V. Título.

AMANDA LIMA VILELA

**PLANT TISSUE CULTURE APPLIED TO PLANT IMPROVEMENT OF UPLAND
RICE**

**CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS APLICADA AO MELHORAMENTO VEGETAL
DE ARROZ DE TERRAS ALTAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2025

Dra. Flávia Barbosa Silva Botelho	UFLA
Dra. Joyce Dória Rodrigues Carvalho	UFLA
Dra. Franscinely Aparecida de Assis	UNICERRADO
Dra. Claudineia Ferreira Nunes	UFMG

Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador

LAVRAS – MG

2025

À Deus e à minha família.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pelas bênçãos que me concedeu durante essa caminhada. Por ter me dado forças, coragem e persistência quando eu imaginei que não seria capaz. Por me tornar resiliente e me dar sabedoria para lidar com todos os obstáculos encontrados pelo caminho.

Ao meu marido e maior incentivador Renan, por ter caminhado comigo o tempo todo, sendo proteção, amparo, companheiro, por sonhar meus sonhos, me acompanhar em meu doutorado no exterior, me encorajar quando eu pensava que não ia conseguir, por equilibrar os pratos da vida acadêmica junto comigo.

Aos meus pais Edmilson e Ana que me ensinaram os valores da vida e os princípios da dignidade, sempre me dando suporte, apoiando e incentivando nos estudos, por sempre estarem presente, serem meu conforto e segurança.

Ao meu irmão Breno e amigo fiel por seus mais preciosos conselhos, conversas e cuidados, sempre presente e confiando em mim.

Ao meu filho Lucca, que embora ainda esteja a caminho, me trouxe luz, inspiração e perseverança para continuar superando os desafios. Se tornou a razão pela qual busco o melhor de mim e espero que, um dia, possa olhar para essas páginas e entender o quanto já significou em minha jornada, mesmo ainda em meu ventre.

À toda minha família e amigos, que me apoiaram e estiveram presentes em todas as formas de cuidado e oração.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos, em especial Tai e Moacir, que foram refúgio em dias de desânimo, alegrando meus dias de trabalho, desejando o meu melhor e me apoiando.

Aos colegas e amigos, Dionata e Arsênio, por toda ajuda e ensinamentos sobre a cultura do arroz. Eles foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Às técnicas e amigas, Anita e Camila, pelos ensinamentos, conversas durante o café e almoço, pelo cuidado, carinho e atenção.

Aos alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Cultura de Tecidos, pela ajuda para realização dos experimentos.

Ao Professor Filipe, por acreditar que eu seria capaz, me ajudar de todas as formas e não me deixar desistir.

À Pós-doutoranda, Dra. Carol, pela parceria, amizade e troca. Sou grata pelo auxílio e conselhos desde o primeiro dia que nos conhecemos.

Ao Professor e Orientador Moacir Pasqual, pelos ensinamentos e inspiração. É de fato uma honra ter tido a oportunidade de conviver e trabalhar com uma pessoa de tamanha excelência.

À Professora Flávia, por acreditar em mim, no meu trabalho e na minha pesquisa. Pelas palavras de conforto, carinho e segurança quando mais precisei.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia/Agronomia, pela oportunidade de me qualificar. Sou muito grata por concluir minha Graduação, Mestrado e Doutorado nesta Universidade reconhecida pelo seu ensino de qualidade.

À Marli, pelo carinho, empenho e cuidado com meus processos durante toda minha jornada acadêmica.

Ao Professor Imtiyaz Khanday, pelo acolhimento e ensinamentos durante meu período de intercâmbio acadêmico nos Estados Unidos.

À University of California - Davis, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos profissionais.

Aos amigos do Plant Reproductive Building, Regan, Julie, Arnaldo, Nadia, Pedro, por serem companheiros para todos os momentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A cultura do arroz é essencial para a segurança alimentar e a economia de países em desenvolvimento. Dada sua relevância, avanços biotecnológicos, como a aplicação da cultura de tecidos, têm desempenhado papel crucial no melhoramento dessa cultura. Essa técnica permite o desenvolvimento de variedades geneticamente estáveis e adaptadas a condições adversas, como salinidade, seca e estresse térmico, além de garantir plantas livres de doenças e produzir metabólitos secundários de interesse farmacêutico. Estudos foram realizados para otimizar etapas críticas da cultura de tecidos no arroz, como a indução de calos, regeneração e aclimatização de plantas regeneradas das cultivares BRS Soberana e Douradão. Os experimentos avaliaram fatores como doses de prolina e nitrogênio, visando protocolos eficientes para superar desafios relacionados à variabilidade genotípica nas respostas ao meio de cultura. Esses avanços contribuem não apenas para o aumento da produtividade e qualidade do arroz, mas também para a adaptação da cultura às mudanças climáticas e às demandas do setor agrícola.

Palavras-chave: *Oryza sativa*. Biotecnologia agrícola. Indução de calos. Regeneração de plantas. Aclimatização.

ABSTRACT

Rice cultivation is essential for food security and the economy of developing countries. Given its relevance, biotechnological advancements, such as the application of tissue culture, have played a crucial role in improving this crop. This technique enables the development of genetically stable varieties adapted to adverse conditions, such as salinity, drought, and thermal stress, while ensuring disease-free plants and the production of secondary metabolites of pharmaceutical interest. Studies have been conducted to optimize critical steps in rice tissue culture, including callus induction, plant regeneration, and acclimatization of regenerated plants from the BRS Soberana and Douradão cultivars. Experiments evaluated factors such as proline and nitrogen doses, aiming to establish efficient protocols to overcome challenges related to genotypic variability in responses to the culture medium. These advancements contribute not only to increased productivity and rice quality but also to the crop's adaptation to climate changes and the demands of the agricultural sector.

Keywords: *Oryza sativa*. Agricultural biotechnology. Callus induction. Plant regeneration. Acclimatization.

IMPACTOS SOCIAIS, TECNOLÓGICOS, ECONÔMICOS E CULTURAIS

O melhoramento genético do arroz tem implicações diretas na segurança alimentar, especialmente em países em desenvolvimento. A criação de variedades mais resistentes a condições adversas, como seca e salinidade, garante maior estabilidade na produção e pode beneficiar populações vulneráveis, reduzindo a fome. Além disso, a disseminação dessas tecnologias proporciona oportunidades de capacitação técnica e inclusão social em comunidades agrícolas, contribuindo para o empoderamento rural e a redução da pobreza. Dessa forma, agricultores têm a chance de melhorar sua qualidade de vida e a sustentabilidade de suas práticas.

Técnicas como transformação gênica e micropropagação não apenas possibilitam o desenvolvimento de variedades mais adaptadas às mudanças climáticas, mas também abrem caminho para soluções mais sustentáveis. Além disso, o conhecimento gerado no estudo do arroz pode ser aplicado a outras culturas, ampliando o impacto da inovação científica. A adoção de variedades melhoradas de arroz pode reduzir custos de produção e aumentar a competitividade do Brasil no mercado global. Com maior produtividade e resistência, os agricultores podem atender à crescente demanda interna e explorar novos mercados de exportação. Esses avanços também estimulam investimentos em biotecnologia e agricultura de precisão, setores que geram emprego e impulsionam o desenvolvimento econômico. Dessa forma, o impacto econômico transcende o setor agrícola, fortalecendo a economia nacional como um todo.

A aplicação da cultura de tecidos vegetais ao melhoramento do arroz oferece uma abordagem inovadora e transformadora, com impactos positivos em diversas dimensões. Essa área de pesquisa não apenas promove avanços científicos e tecnológicos, mas também fortalece a segurança alimentar, contribui para a sustentabilidade, dinamiza a economia e valoriza aspectos culturais. Assim, a biotecnologia aplicada ao arroz destaca-se como pilar estratégico para enfrentar os desafios do futuro na agricultura global.

SOCIAL, TECHNOLOGICAL, ECONOMIC AND CULTURAL IMPACTS

The genetic improvement of rice has direct implications for food security, especially in developing countries. The creation of varieties more resistant to adverse conditions, such as drought and salinity, ensures greater production stability and can benefit vulnerable populations by reducing hunger. Furthermore, the dissemination of these technologies provides opportunities for technical training and social inclusion in agricultural communities, contributing to rural empowerment and poverty reduction. In this way, farmers have the chance to improve their quality of life and the sustainability of their practices.

Techniques such as genetic transformation and micropropagation not only enable the development of varieties better adapted to climate change but also pave the way for more sustainable solutions. Moreover, the knowledge generated from rice studies can be applied to other crops, expanding the impact of scientific innovation. The adoption of improved rice varieties can reduce production costs and increase Brazil's competitiveness in the global market. With higher productivity and resilience, farmers can meet the growing domestic demand and explore new export markets. These advancements also stimulate investments in biotechnology and precision agriculture, sectors that generate jobs and drive economic development. Thus, the economic impact transcends the agricultural sector, strengthening the national economy as a whole.

The application of plant tissue culture to rice improvement offers an innovative and transformative approach with positive impacts across various dimensions. This research area not only fosters scientific and technological advancements but also strengthens food security, contributes to sustainability, boosts the economy, and enhances cultural values. Therefore, biotechnology applied to rice stands out as a strategic pillar for addressing future challenges in global agriculture.

SUMÁRIO

CHAPTER I: CURRENT TOPICS IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY AND THEIR APPLICATIONS IN RICE CULTIVATION	14
1. INTRODUCTION.....	16
2. BIOTECHNOLOGICAL TECHNIQUES AND THEIR APPLICATIONS TO RICE CULTIVATION	17
2.1. Plant tissue culture applied to rice cultivation	17
2.1.1. Callus Induction and Plant Regeneration	17
2.1.2. <i>In vitro</i> stress induction	19
2.1.3. <i>In vitro</i> hybridization.....	21
2.1.4. Somaclonal variation.....	22
2.1.5. Plant growth-promoting microorganisms (PGPMs).....	23
2.1.6. Nanotechnology.....	25
3. FUTURE PERSPECTIVES FOR THE USE OF BIOTECHNOLOGICAL TECHNIQUES AND TOOLS IN RICE CULTIVATION	27
4. FINAL CONSIDERATIONS	28
REFERENCES	29
CAPÍTULO II: INDUÇÃO DE CALOS, REGENERAÇÃO DE PLANTAS E ACLIMATIZAÇÃO DE CULTIVARES DE ARROZ BRS SOBERANA E DOURADÃO.	35
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.1. Curva de crescimento de calos das cultivares de arroz elite Douradão e Soberana em meio MS.....	38
2.1.1. Indução de calos.....	38
2.1.2. Obtenção do peso dos calos e análise estatística	38

2.2.	Influência do nível de prolina na indução de calos embriogênicos, regeneração de plantas e aclimatização de arroz soberana e douradão	39
2.2.1.	Obtenção dos calos	39
2.2.2.	Regeneração de plantas.....	39
2.2.3.	Caracterização anatômica das células embriogênica e não embriogênica	40
2.2.4.	Análise citoquímica	40
2.2.5.	Individualização dos brotos	41
2.2.6.	Citometria de fluxo para avaliar a estabilidade genética dos calos e dos brotos regenerados	42
2.2.7.	Aclimatização	43
2.3.	Avaliação do efeito de diferentes doses de Nitrogênio na aclimatização de plantas	43
3.	RESULTADOS	44
3.1.	Curva de crescimento de calos das cultivares de arroz elite Douradão e Soberana em meio MS	44
3.2.	Influência do nível de prolina na indução de calos embriogênicos, regeneração de plantas e aclimatização de arroz BRS Soberana e Douradão	47
3.2.1.	Indução de calos.....	47
3.2.2.	Seleção dos calos embriogênicos.....	48
3.2.3.	Citometria de fluxo dos calos.....	53
3.2.4.	Regeneração de brotos	55
3.2.5.	Individualização e avaliação morfológica dos brotos regenerados	56
3.2.6.	Citometria de fluxo dos brotos regenerados	57
3.2.7.	Aclimatização dos brotos regenerados	58
3.3.	Efeito de diferentes doses de Nitrogênio na produtividade de plantas aclimatizadas	60
3.3.1.	Plantas aclimatizadas de cultivar BRS Soberana.....	60

3.3.2.	Plantas aclimatizadas de cultivar Douradão.....	61
3.3.2.1.	Altura de planta.....	61
3.3.2.2.	Número de perfilhos.....	62
3.3.2.3.	Número de panícula por planta.....	63
3.3.2.4.	Número total de grãos por planta.....	64
3.3.2.5.	Esterilidade (%).....	65
3.3.2.6.	Razão entre peso fresco e peso seco (PF/PS).....	67
3.3.2.7.	Acúmulo de biomassa (IBS).....	68
4.	DISCUSSÃO.....	69
4.1.	Curva de crescimento de calos das cultivares de arroz elite Douradão e Soberana em meio MS.....	69
4.2.	Influência do nível de prolina na indução de calos embriogênicos, regeneração de plantas e aclimatização de arroz BRS Soberana e Douradão.....	71
4.3.	Efeito de diferentes doses de Nitrogênio na produtividade de plantas aclimatizadas.....	75
5.	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78

CHAPTER I LITERATURE REVIEW

TÓPICOS ATUAIS EM BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA E SUAS APLICAÇÕES NA CULTURA DO ARROZ

RESUMO

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos alimentos consumidos em larga escala por grande parte dos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e na Oceania, assim como para o Brasil, é o arroz. A cultura do arroz representa a base alimentar da população brasileira, visto que, o consumo doméstico se aproxima da produção total no país, que por sua vez, possui expectativa de chegar a 10,5 milhões de toneladas produzidas, que atenderá ao consumo interno mesmo que de forma mais arrojada. O ramo de estudo da cultura de tecidos se mostra como alternativa eficaz para o avanço da cultura do arroz, já que viabiliza a geração de novas variedades geneticamente estáveis, possibilitando o surgimento de plantas adaptadas a ambientes salinos, condições de seca e estresse por calor, além de, oportunizar a micropropagação, assegurando a obtenção de plantas clones, o estudo acerca da produção de metabólitos secundário, importante para a indústria farmacêutica e otimizar os processos de melhoramento vegetal, com a aplicação das técnicas de transformação gênica. O presente escrito busca compilar os principais avanços na área da cultura de tecidos relativos à cultura do arroz, com a premissa de que o conhecimento empregado auxilie na elucidação de questões relativas ao desenvolvimento e melhoramento da cultura no cenário atual da agricultura. Destaca-se a importância da cultura de tecidos como ferramenta essencial para o avanço no melhoramento do arroz. Além disso, a biotecnologia agrícola aplicada ao arroz visa melhorar a adaptação das culturas às variáveis climáticas e à disponibilidade de recursos, promovendo o desenvolvimento de tecnologias rentáveis e produtos de qualidade.

Palavras-chave: *Oryza sativa*. Cultura de Tecidos Vegetais. Melhoramento de plantas.

CURRENT TOPICS IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY AND THEIR APPLICATIONS IN RICE CULTIVATION

ABSTRACT

Currently, rice is one of the most widely consumed foods in many developing countries, particularly in Asia, Oceania, and Brazil. Rice cultivation forms the dietary foundation for the Brazilian population, as domestic consumption closely matches national production, which is expected to reach 10.5 million tons, meeting internal demand even under more challenging scenarios. The field of plant tissue culture has emerged as an effective alternative for significant advancements in rice cultivation. It enables the development of genetically stable varieties, fostering plants adapted to saline environments, drought conditions, and heat stress. Additionally, it facilitates micropropagation, ensuring disease-free plants, the production of secondary metabolites important for the pharmaceutical industry, and optimization of plant breeding processes through the application of gene transformation techniques. This study aims to compile the main advancements in rice tissue culture, with the premise that the knowledge applied helps elucidate issues related to crop development and improvement in the current agricultural context. The importance of tissue culture is highlighted as an essential tool for advancing rice improvement. Furthermore, agricultural biotechnology applied to rice aims to enhance crop adaptation to climate variability and resource availability, promoting the development of cost-effective technologies and high-quality products.

Keywords: *Oryza sativa*. Plant Tissue Culture. Plant Breeding.

1. INTRODUCTION

One of the most widely consumed staple foods in many developing countries—particularly in Asia and Oceania, as well as in Brazil—is rice (EMBRAPA, 2023). In Brazil, rice cultivation represents the foundation of the population’s diet, as domestic consumption closely matches the country’s total production (CONAB, 2024), which is expected to reach 10.5 million tons—enough to meet internal demand, though with tighter margins (IBGE, 2024).

The majority of rice produced in Brazil originates from lowland cultivation (flooded areas) under irrigation systems in the southern region of the country. This region alone accounts for approximately 63% of national rice stocks and cultivates around 1.3 million hectares of irrigated rice annually, making it the largest producer of polished white rice—the most consumed rice category in Brazil. Although upland (rainfed) rice cultivation has expanded in recent years, it still represents a small share when compared to the irrigated lowland system (EMBRAPA, 2021).

Nonetheless, we currently face drastic climate changes that threaten agricultural performance and, consequently, global food security (IPCC, 2023). Therefore, it is imperative to understand the mechanisms that allow crops to better adapt to unstable climatic conditions and fluctuating resource availability.

In the context of rice cultivation, it is essential to deepen the study of techniques that enable more precise investigations of the crop, as these are fundamental for the development of increasingly adaptable production systems—such as upland cultivation. The field of plant breeding seeks, above all, to enhance the contribution of upland rice production by developing cost-effective technologies that yield high-quality, market-valued products, as seen with the development of the cultivar “BRS A501 CL” (DA SILVA et al., 2021).

In this regard, plant tissue culture emerges as a powerful tool for such advancements, as it enables the generation of new, genetically stable varieties capable of thriving in saline environments, drought conditions, and heat stress. Moreover, it facilitates micropropagation, ensuring the production of clonal plants, supports the study of secondary metabolite production—important to the pharmaceutical industry—and enhances breeding processes through the application of genetic transformation techniques (THAKUR et al., 2024).

This manuscript aims to compile the main advances in tissue culture related to rice, under the premise that the knowledge presented may contribute to clarifying issues concerning the development and improvement of the crop within the current agricultural context.

2. BIOTECHNOLOGICAL TECHNIQUES AND THEIR APPLICATIONS TO RICE CULTIVATION

2.1. Plant tissue culture applied to rice cultivation

2.1.1. Callus Induction and Plant Regeneration

When it comes to agricultural biotechnology techniques applied to rice improvement, the greatest bottleneck lies in plant tissue culture. The main challenges include the induction of embryogenic calli and subsequent plant regeneration. The low capacity for indirect regeneration of calli accounts for a large proportion of the current research on rice tissue culture (SERAJ et al., 2020), requiring laborious and time-consuming studies to establish optimal and genotype-specific conditions.

The primary factor to be considered is the composition of the culture medium, which is highly specific to each genotype. It differs in the types and concentrations of growth regulators used, additional compounds, concentration of gelling agents, among other components. A study conducted by Kanathala et al. (2024) aimed to develop an efficient regeneration strategy for Indian rice (cv. MTU1010) using growth regulators such as 2,4-D, kinetin, and NAA. Additionally, the study evaluated the effect of callus dehydration on plant regeneration. MS media supplemented with 2.0 mg/L kinetin + 0.5 mg/L NAA, combined with partial callus desiccation, significantly improved plant regeneration, reaching a rate of 93%, in contrast to only 54% regeneration observed in non-dehydrated calli.

Other researchers have also focused on alternative factors that could influence callus induction and plant regeneration rates. Mohamed et al. (2021) assessed the effect of different gelling agents on these stages in two Egyptian rice cultivars and observed that gelrite and phytigel positively influenced callus induction, yielding better results than agar. Regarding shoot regeneration, however, no significant differences were found. Similarly, Saad et al. (2023)

investigated the effects of varying phytagel concentrations, as well as two carbon sources—sucrose and maltose—on callus induction and plant regeneration in Malaysian rice (cv. MR219). Their results indicated higher regeneration rates in MS medium containing 9 mg/L phytagel, supplemented with 1 mg/L BAP and 1 mg/L NAA, and 3% sucrose as the carbon source.

To date, most studies have demonstrated the efficiency of 2,4-D combined with BAP in inducing embryogenic calli in rice (YADAV et al., 2023; TARATIMA et al., 2022; ABD RAHMAN et al., 2021). For regeneration, the combination of growth regulators can vary considerably depending on the genotype, with common combinations including BAP + NAA (KANATHALA et al., 2024; SAAD et al., 2023; TARATIMA et al., 2022; SAKTHIVEL et al., 2021), 2,4-D + BAP (ABD RAHMAN et al., 2021), and BAP + kinetin (YADAV et al., 2023). Regeneration rates reported over the past four years range from 25.83% (ABD RAHMAN et al., 2021) to 93% (KANATHALA et al., 2024) in non-transgenic systems. In contrast, when *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation is involved, the regeneration rates of transformed plants vary between 12.8% (THAO et al., 2022) and 1.51% (ALI et al., 2023).

The decrease in regeneration rates in transgenic events is mainly due to the susceptibility of non-transformed plants to the selective antibiotic in the culture medium. Thus, only those plants that are both regenerated and successfully infected by the transformation agent survive the selection medium. As a result, some researchers aim to develop transformation protocols that are integrated with callus induction and plant regeneration processes. Yadav et al. (2023) proposed an effective protocol for transformation and regeneration of the MTU1010 cultivar based on hormonal variables. Similarly, Thao et al. (2022) optimized an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for indica rice (cv. Khang Dan 18 – KD18), determining the ideal hygromycin concentration for transgenic selection and achieving a high regeneration frequency of transformed plants (12%).

In addition to external factors, there are also intrinsic species-related factors that may influence the regenerative capacity of rice calli. This is demonstrated by the study of WU et al. (2022), which identified QTLs associated with regeneration capacity, with a focus on qPRR3, located on chromosome 3. The study identified three QTLs related to rice callus regeneration: one for plant regeneration rate (PRR) and two for total green plant rate (TGPR). The qPRR3 QTL, detected for both traits, plays a significant role in callus regeneration as it promotes shoot formation. This QTL explained 13.40% and 17.07% of the phenotypic variation in PRR and TGPR,

respectively. The introduction of qPRR3 into indica rice varieties may provide a new strategy for improving regeneration capacity in this subspecies.

The major challenges in regenerating indica rice varieties include their generally low regenerative capacity, the need for highly specific optimization for each variety, and the time and effort involved in protocol development. Furthermore, some studies have reported the occurrence of albino plantlets during the shoot regeneration process (SAAD et al., 2023; ABD RAHMAN et al., 2021). This phenomenon is attributed to cytogenetic variations triggered by hormonal treatments in the culture medium. Albino plants are difficult to root *in vitro* and typically do not survive the acclimatization stage (DEWIR et al., 2018).

2.1.2. *In vitro* stress induction

Abiotic factors that inhibit plant growth and development are considered stressors. In many regions, drought, salinity, and extreme temperatures are common environmental stresses that can affect arable lands, with water and salt stress being among the most prominent. These stresses result in significant economic and social problems, particularly in developing countries, and pose a critical threat to global food security in the future (DOGAN, 2020; OKORIE et al., 2019).

Water stress typically arises due to drought, extreme temperature fluctuations, soil salinity, and high light intensity (FAROOQI et al., 2020). According to Fathi and Tari (2016), water restriction primarily hinders plant growth, alters water retention capacity, and reduces water use efficiency. It can also trigger morphological, physiological, biochemical, and molecular changes in plants. Water stress affects biomass production and leads to the accumulation of reactive oxygen species (ROS), ultimately reducing grain yield (SOHAG et al., 2020).

Plants exposed to salinity exhibit symptoms similar to those under water deficit, but with the added effect of ionic cytotoxicity due to salt stress. This leads to osmotic stress and ion toxicity, which limit the plant's ability to absorb H₂O and essential ions such as K⁺ and Ca²⁺. The excessive influx of Na⁺ and Cl⁻ ions into cells causes toxic effects on cellular membranes and the cytosol (LIANG et al., 2018). During seed germination, salinity reduces water potential, food reserves, and protein content (WU et al., 2019). Furthermore, it negatively impacts transpiration, photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and stomatal conductance by degrading chlorophyll and impairing carotenoid synthesis (TSAI et al., 2019; MAHLOOJI et al., 2017).

Rice is a water-demanding crop; thus, drought and salinity are significant constraints to achieving optimal yields (MUMTAZ et al., 2020). Given the intensifying abiotic stresses driven by climate change, understanding and predicting plant responses is essential. Plant breeding has long been employed to improve crop performance, including rice. Tissue culture serves as a powerful complementary tool in this context, as it provides controlled conditions, requires limited physical space, and holds potential for screening and selecting stress-tolerant varieties more efficiently than field trials (ALI et al., 2014). *In vitro* selection of stress-tolerant lines from regenerated plants has been reported in several species, including *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr., *Bacopa monnieri* (L.) Wettst (DOGAN, 2020), and *Paulownia tomentosa* (YOUSSEF et al., 2020). Substances such as polyethylene glycol (PEG), sodium chloride (NaCl), mannitol, and sorbitol have been widely used as stress-inducing agents for *in vitro* selection in crops such as sugarcane (HARTATI et al., 2021) and rice (JOSHI et al., 2011; WANI et al., 2010).

According to Rahim et al. (2020), *in vitro* selection of stress-tolerant rice calli aims to enhance the precision of genotype screening, as callus growth conditions are not influenced by environmental variability. In their study, PEG-supplemented medium was used to assess genetic differences in callus formation capacity among rice genotypes. The genotypes Kalar and Gwll Swr exhibited poor phenotypic and biochemical performance, while Choman and Shawre showed superior results.

Oryza et al. (2020), aiming to improve salinity tolerance in two moderately susceptible rice cultivars (White Ponni and BPT-5204), applied *in vitro* ethyl methanesulfonate (EMS) mutagenesis under different concentrations of NaCl and seawater. They obtained 17.23% and 22.49% plant regeneration from calli derived from EMS-treated seeds exposed for three and five hours, respectively. Plants regenerated from calli cultured in high-salt conditions demonstrated salinity tolerance potential. Cultivar BPT-5204 accumulated more proline than White Ponni. Proline accumulation under salt stress helps maintain turgor pressure and protects plants from severe dehydration (ORYZA et al., 2020).

Yunita et al. (2020) conducted research aiming to generate drought-tolerant upland rice mutants in the Situpatenggang and Batutegi varieties using *in vitro* mutagenesis and selection. Calli were induced and exposed to gamma radiation at doses of 24.68 Gy for Situpatenggang and 22.15 Gy for Batutegi, followed by selection in PEG-supplemented medium at 24.11% for

Sitapatenggang and 25.18% for Batutegei. The mutant calli were regenerated into shoots, which were subsequently acclimatized.

Research in this area plays a key role in enabling rapid screening of stress-resistant individuals and provides valuable insights into the mechanisms of stress tolerance. These insights can aid breeders in the selection and development of tolerant genotypes. Tissue culture enables detailed studies of physiological and biochemical adaptations in plants subjected to stress, especially when combined with genetic improvement and genetic engineering, offering a roadmap for the cultivation of stress-resilient crops. Further research is still needed in this field, particularly regarding the acclimatization of stress-induced plants.

2.1.3. *In vitro* hybridization

Hybridization is a process in which protoplasts from different species are typically fused to produce hybrid plants, a technique known as somatic hybridization (or protoplast fusion) (PLANT CELL TECHNOLOGY, 2023).

Protoplasts are protoplasmic masses surrounded only by the plasma membrane, meaning they are devoid of cell walls. These structures exhibit versatile characteristics and applications in plant research across various fields, as they contain a substantial amount of genetic information and can engage in processes such as reproduction, differentiation, and, under appropriate conditions, regeneration into fully developed plants (CHEN et al., 2023; XU et al., 2022). Consequently, they serve as the foundation for transgenic plant technologies, enabling the introduction of genes into plant cells for the development of genetically modified organisms (GMOs).

Through protoplast fusion, it is possible to transfer desirable genes from one species to another, including genes related to disease resistance, nitrogen fixation, growth rate, frost resistance, drought tolerance, and herbicide resistance (KIRAN KUMAR et al., 2018). As a result, numerous studies have been conducted to evaluate the potential of somatic hybrids in various species such as rice, tomato, potato, and citrus (SINGH et al., 2020).

In rice, Kiran Kumar et al. (2018) carried out protoplast isolation and hybridization between *Myriostachya wightiana* and leaf tissue of *Oryza sativa*, cultivating the protoplasts and somatic hybrids to produce calli under varying salt concentrations. The hybrid calli showed superior growth at all NaCl concentrations, leading the authors to conclude that the hybrids exhibited enhanced tolerance to salt stress.

Kim et al. (2022), in turn, isolated protoplasts from cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.) and reed (*Phragmites communis* Trin.), aiming to obtain hybrids with high regeneration capacity. SSR (Simple Sequence Repeat) molecular marker analysis confirmed that the regenerated plants were somatic hybrids, providing valuable information for the production and characterization of intergeneric hybrids between rice and other species (KIM et al., 2022).

Some of the limitations that can be overcome through somatic hybridization include sexual incompatibility, nuclear embryogenesis, male or female sterility, and the transfer of genes conferring resistance to both biotic and abiotic stresses (BEGNA, 2020). Therefore, somatic hybridization stands as a powerful tool in plant breeding, enabling the transfer of desirable genes through protoplast fusion and facilitating the incorporation of agronomically important traits from one species to another.

2.1.4. Somaclonal Variation

Somaclonal variation occurs in plants regenerated from cell culture or callogenesis and results in phenotypic variation. It may arise from both genetic and epigenetic changes, such as retrotransposon transposition, single nucleotide polymorphisms (SNPs), and base insertions and deletions (HSIEH et al., 2023).

Genetic variability can be useful for crop improvement and adaptation to different environmental conditions, enabling the acquisition of novel agronomic traits of interest in plant breeding. This includes, for instance, the selection of disease-resistant plants, improved nutritional quality, enhanced yield, and tolerance to abiotic stress. However, a drawback of somaclonal variation is the potential risk of undesirable changes in genetically transformed plants that have undergone in vitro regeneration, leading to unfavorable phenotypic traits (FERREIRA et al., 2023).

In rice, somaclonal variation has been explored in studies aiming to understand changes in gene expression, DNA methylation, and small RNA expression, as well as to predict the types and frequency of variations in regenerated plants (WANG et al., 2022). Moreover, investigating genetic variation is important for understanding heritable changes occurring in plants regenerated from dedifferentiated cells (ICHIKAWA et al., 2023).

In the study conducted by Ichikawa et al. (2023), somaclonal variation was analyzed in rice plants regenerated from zygotes, mature embryos, and immature embryos. Plants regenerated from mature embryos showed significantly more variants than other types of progeny. Therefore, the use

of zygotes and immature embryos may help reduce somaclonal variation during genetic manipulation of rice.

Genomic variations in rice can affect phenotypes in a condition-dependent manner. Under normal growth conditions, rice tends to buffer or canalize such variations to maintain phenotypic robustness. However, under certain abiotic stress conditions, these variations may be unmasked, resulting in diverse phenotypic expressions (LI et al., 2024). According to Ferreira et al. (2023), the technique of inducing somaclonal variation has already been applied to rice for improving drought tolerance in the Thai cultivar RD6 and for assessing changes in chlorophyll fluorescence and lipid peroxidation in somaclonal lines subjected to salt stress.

A better understanding of transcription and DNA methylation patterns in calli derived from different tissues remains a challenge, requiring more detailed studies to optimize genetic manipulation strategies.

2.1.5. Plant growth-promoting microorganisms (PGPMs)

Plant growth-promoting microorganisms (PGPMs) can enhance crop productivity through various mechanisms, improving seed emergence, plant growth, and yield. These microorganisms influence plant development directly—via nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore and phytohormone production—or indirectly, through biocontrol of phytopathogens and induction of systemic resistance. They represent a promising alternative for reducing chemical inputs in agriculture (DANISH et al., 2024).

The method for assessing the benefits of PGPMs involves isolating bacteria from the surface or internal tissues of roots and leaves, evaluating their plant growth-promoting phenotypes, sequencing bacterial genomes, and finally testing their effects on the growth and development of the target plants (MAGHBOLI BALASJIN et al., 2022).

Compared to chemical fertilizers and pesticides, PGPMs offer several advantages: they support sustainable agriculture without depleting natural resources, improve the physical and chemical properties of soils, and reduce pollution of soil, air, and groundwater. Furthermore, PGPMs can increase crop productivity and control plant pathogens in an eco-friendly manner (NGALIMAT et al., 2021). For these reasons, various studies have been conducted to assess the response of rice cultivars when biotized or inoculated with PGPM-containing solutions (LI et al.,

2024; CHATHURIKA et al., 2024; ABBAS et al., 2024; SOUZA et al., 2023; RAJANI et al., 2023).

The study by Maghbolli Balasjin et al. (2022) highlights that the benefits of plant growth-promoting bacteria are not universally applicable, as different rice varieties respond differently to the same bacterial strains. This underscores the need to develop plant-strain specificity. Accordingly, the authors examined the activity of five bacterial isolates from two Asian rice varieties that showed genotype-dependent growth promotion. The most effective strains included *Pseudomonas mosselii*, *Microvirga* sp., *Paenibacillus rigui*, and *Paenibacillus graminis*.

The interaction of *Pseudomonas* spp. with upland rice cultivars, along with *Bacillus*, *Enterobacter*, and *Micrococcus* spp., was evaluated by Ouyabe et al. (2020). Their findings demonstrated positive effects on 14-day-old rice seedlings, including increased dry weight, root length, and shoot length compared to controls.

Among the PGPMs, the *Bacillus* genus has received special attention in rice research (PANDEY et al., 2024). Its main advantages include increased yield, improved tolerance to abiotic stress, and reduced disease incidence. Additionally, *Bacillus* spp. can enhance nutrient uptake and translocation, such as zinc, and activate induced systemic resistance (ISR) against pathogens (NGALIMAT et al., 2021).

The effectiveness of *Bacillus cereus* YN917 in biocontrol of rice blast and plant growth promotion was investigated by Zhou et al. (2021). The results showed significant disease severity reduction and enhanced plant growth through the production of indole-3-acetic acid, siderophores, and various enzymes.

The application of *Bacillus velezensis* BTR11 for controlling bacterial leaf blight and promoting rice plant growth was assessed by Do et al. (2023), with promising results. The strain showed strong antagonistic activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), the causal agent of the disease.

Numerous studies have focused on controlling fungal diseases in rice using PGPMs. In addition to the aforementioned species, *Bacillus licheniformis*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Aspergillus flavus*, and *Trichoderma afroharzianum* have also demonstrated antifungal activity in rice (PARVEEN et al., 2023). Another study identified bacterial strains such as *E. catenisporum*, *E. layuense*, *M. testaceum*, and *M. oryzae* as effective biocontrol agents against *Fusarium fujikuroi*, significantly reducing disease severity in infected rice plants (BOSCO et al., 2024). Danish et al.

(2024) also reported promising results in evaluating antifungal activity and growth-promoting traits of 30 beneficial bacterial strains isolated from the *Brassica campestris* rhizosphere in rice.

Another important study, conducted by Wiggins et al. (2022), explored gene expression in rice roots associated with PGPMs such as *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. Their findings revealed that 628 rice genes displayed similar differential expression patterns during association with both bacterial species, suggesting shared pathways in rice growth promotion. These patterns may help identify key genes and pathways involved in plant–microbe interactions, such as those related to flavonoid biosynthesis, defense, hormone signaling, and nitrate and sugar transport.

In addition to their role in pathogen suppression, PGPMs are known to improve plant growth under abiotic stresses, such as drought and arsenic (As) contamination (MAHREEN et al., 2023; ETESAMI et al., 2023). Mahreen et al. (2023) concluded that inoculating a consortium of *Bacillus subtilis*, *Brucella haematophilum*, and *Bacillus cereus* improved plant development under drought stress. Etesami et al. (2023) showed that arsenic-resistant, growth-promoting bacteria can reduce As toxicity and accumulation in rice.

The importance of PGPMs as mitigators of biotic and abiotic stresses is evident, offering benefits such as improved plant development and disease control. The characterization of PGPMs and their mechanisms of action for plant protection and growth promotion is typically performed in vitro using plant tissue culture techniques.

Despite the great potential for associating PGPMs with rice for improved productivity and stress response, further research is needed to fully understand plant–microbe interaction mechanisms and to develop effective formulations applicable under different environmental and soil conditions (NGALIMAT et al., 2021). One promising formulation approach is the green synthesis of nanoparticles (MANDAL & SARKAR, 2023), which improves microbial biofertilizer delivery and efficacy by ensuring sustained nutrient release and better crop performance (CHUKWUNEME et al., 2024). Although the integration of microorganisms and nanotechnology holds significant promise for sustainable agriculture, ongoing research is essential to overcome existing challenges and maximize benefits.

2.1.6. Nanotechnology

Nanotechnology has been applied in various scientific fields, including electronics, energy, medicine, and agriculture. Due to the unique properties of nanocomposites, many researchers have explored their use to enhance agricultural techniques, which has led to a growing interest in this area of research (SINGH et al., 2023). This innovation has been investigated as a sustainable alternative in agriculture, offering promising advancements in productivity while reducing contamination and improving input efficiency. The benefits include enhanced soil and plant health, increased efficiency in the delivery of nutrients and pesticides, and reduced environmental pollution. Furthermore, nanomolecules enable more efficient penetration into plant cells and targeted delivery of active ingredients (SINGH et al., 2023).

This technology can be applied to any plant species (GOHAR et al., 2024). In rice cultivation, studies have reported its effects for different purposes, such as its application in tissue culture techniques, as anti-stress and anti-pathogen agents, or even in nanoformulations with plant growth-promoting bacteria (KALBOUSH et al., 2024; WU et al., 2023; MANICKAVASAGAM et al., 2019; CHUTIPAIJIT et al., 2018).

In plant tissue culture, the use of nanoparticles is based on understanding their effects on callus induction and plant regeneration in rice explants. In a study conducted by Chutipaijit et al. (2018), carbon nanoparticles (nanocarbon) were used to induce callus formation in rice seeds. Results indicated the highest induction rate at a concentration of 5 mg/L of nanocarbon. According to the authors, the optimal nanocarbon concentration can significantly enhance the cell growth rate and plant regeneration in aromatic rice. Similarly, Manickavasagam et al. (2019) evaluated the influence of silver nanoparticles on callus induction, plant regeneration, and rhizogenesis in *Oryza sativa* cv. IR64 and concluded that supplementation with PHAgNPs improved regeneration efficiency by reducing abscisic acid, ethylene, and reactive oxygen species levels in regenerated calli.

In addition to their role in callus formation, nanoparticles can also be used for other purposes, such as seedling development (WOHLMUTH et al., 2022). Aiming to assess the effects of Fe₃O₄ nanoparticles and nano-hydroxyapatite (n-HAP) on rice seedling growth under Pb and Cd stress, Wu et al. (2023) observed that the nanoparticles immobilized Pb and Cd through complex sorption and cation exchange processes. This reduced the uptake of these metals by the plants, thereby decreasing their toxicity. However, they also noted that the use of these nanoparticles can increase Cd accumulation in rice roots.

Another promising study involving nanoparticles was conducted by Kalboush et al. (2024), who investigated the use of a bacterial nanoformulation to promote rice growth and systemic acquired resistance against sheath blight disease. The formulation proved effective in enhancing rice growth and defense enzyme production, as well as regulating defense-related gene expression. The bacterial nanoformulation uses nanoparticles to encapsulate and deliver beneficial bacteria, such as *Bacillus subtilis* or *Pseudomonas brassicacearum*. Application methods include root immersion in a concentrated nanoformulation solution or soil application (KALBOUSH et al., 2024).

One of the major challenges in using nanoformulations is maintaining bacterial cell viability. Kalboush et al. (2024) reported a reduction of 48.4% in viable cells of *B. subtilis* and 60% for *P. brassicacearum* after 18 months, depending on the type of nanocarrier used in the formulation.

Currently, studies involving nanoparticles in rice cultivation remain limited, but they consistently demonstrate encouraging results for enhancing plant development, making this a highly relevant research area for the coming years.

3. FUTURE PERSPECTIVES FOR THE USE OF BIOTECHNOLOGICAL TECHNIQUES AND TOOLS IN RICE CULTIVATION

As previously discussed, tissue culture represents an important tool for studies in rice cultivation. Advances in callus induction and plant regeneration in rice are expected to continue improving as new culture medium compositions and tissue culture protocols are established for genotypes of interest in breeding programs. The optimization of these techniques will enable the development of rice varieties with desirable traits. The technique of *in vitro* hybridization, in turn, is expected to become a more common approach for creating rice hybrids with superior characteristics, such as higher yield, improved grain quality, tolerance to abiotic stresses, and disease resistance. The combination of genomes from different cultivars in a controlled environment can accelerate the breeding process, allowing for the rapid incorporation of desirable traits.

Somaclonal variation is an important source of genetic variability. Future research should focus on understanding the mechanisms that lead to such variation and how to effectively use it to develop new rice varieties with improved traits, such as pest and disease resistance and tolerance

to abiotic stresses. This is particularly important in the current context of climate instability. In this regard, a deeper understanding of plant responses to stress under *in vitro* conditions will facilitate the development of more resilient rice cultivars. The use of controlled conditions to induce stress may help select lines with increased tolerance to adverse factors such as drought and salinity.

In addition to tissue culture, other biotechnological tools include the use of plant growth-promoting microorganisms and nanotechnology, as well as the combination of both. Studying the interaction between rice plants and growth-promoting microorganisms through tissue culture is an effective strategy for understanding the plant–microbe synergy, while also optimizing time and space. This may lead to innovative strategies to improve plant performance and, consequently, increase productivity under stress conditions. Nanotechnology has the potential to revolutionize the way nutrients and pesticides are applied in rice cultivation. The use of nanomaterials for the controlled delivery of growth regulators and nutrients is expected to significantly enhance the efficiency of resource uptake and utilization, contributing to more sustainable crop production.

It is anticipated that collaboration between disciplines such as biotechnology, genetics, microbiology, and nanotechnology will become increasingly common. This multidisciplinary approach can accelerate the discovery of new strategies for rice improvement, resulting in cultivars that meet the growing demand for food production. Given the increasing pressure to produce food sustainably, biotechnological tools applied to rice cultivation should focus on reducing the use of chemical inputs and enhancing resistance to environmental stressors, ultimately contributing to global food security.

4. FINAL CONSIDERATIONS

The importance of plant tissue culture is highlighted as an essential tool for advancing rice breeding. Moreover, agricultural biotechnology applied to rice aims to improve crop adaptation to climate variability and resource availability, promoting the development of cost-effective technologies and high-quality products.

REFERENCES

- ABBAS, Syed Razi et al. Contribution of mineral mobilizing fluorescent pseudomonads in growth promotion of rice (*Oryza sativa* L.) in nutrient deficient soil. **South African Journal of Botany**, v. 166, p. 88-96, 2024.
- ABD RAHMAN, Zuraida et al. Efficient callus induction and plant regeneration of Malaysian indica rice MR219 using anther culture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, p. 101865, 2021.
- ALI, Akib; NONGPIUR, Ramsong C.; CHRUNGOO, Nikhil K. An efficient Agrobacterium-mediated transformation and regeneration protocol for aromatic black rice, *Oryza sativa* L.(cv. Chakhao Poireiton and Chakhao Amubi). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 152, n. 3, p. 619-633, 2023.
- ALI, M.N.; YEASMIN, L.; GANTAIT, S.; GOSWAMI, R.; CHAKRABORTY, S. Screening of rice landraces for salinity tolerance at seedling stage through morphological and molecular markers. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.20, p.411–423, 2014. DOI: 10.1007/s12298-014-0250-6.
- BEGNA, Temesgen. Review on somatic hybridization and its role in crop improvement. **J Biol Agric Healthc [Internet]**, v. 10, n. 11, 2020.
- BOSCO, Simone et al. Screening and characterization of bacterial and fungal endophytes as potential biocontrol agents for rice seed dressing against *Fusarium fujikuroi*. **Biological Control**, v. 196, p. 105580, 2024.
- CHATHURIKA, L. G. I. et al. Effect of Two Bacterial Isolates on Selected Improved Rice Varieties Under In Vitro and Greenhouse Condition. **Tropical Agricultural Research and Extension**, v. 27, n. 1, 2024.
- CHEN, K.; CHEN, J.; PI, X.; HUANG, L.J.; LI, N. Isolation, Purification, and Application of Protoplasts and Transient Expression Systems in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v.24, 2023. DOI: 10.3390/ijms242316892.
- CHUKWUNEME, Chinenyenwa Fortune et al. Potential innovations from the application of beneficial soil microbes to promote sustainable crop production. **Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Biologia**, v. 69, n. 1, 2024.
- CHUTIPAIJIT, Sutee; SUTJARITVORAKUL, Thanawat. Application of activated charcoal and nanocarbon to callus induction and plant regeneration in aromatic rice (*Oryza sativa* L.). **Chemical Speciation & Bioavailability**, v. 30, n. 1, p. 1-8, 2018.
- CONAB. **Análises Mensais de Produtos da Agropecuária**. 2024. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado#an%EF%BF%BDlise-mensal> >
- DA SILVA, Osmira Fatima; WANDER, Alcido Elenor. Impacto econômico da cultivar de arroz de terras altas' BRS A501 CL'. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 38, n. 2, p. 26876, 2021.

DANISH, Mohammad et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and biocontrol agents triggered plant defence responses against phytopathogenic fungi and improved rice growth. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, p. 102337, 2024.

DO, Trung Quang; NGUYEN, Tri Trong; DINH, Van Mai. Application of endophytic bacterium *Bacillus velezensis* BTR11 to control bacterial leaf blight disease and promote rice growth. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 33, n. 1, p. 97, 2023.

DOGAN, M. Effect of salt stress on in vitro organogenesis from nodal explant of *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. and *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. and their physio-morphological and biochemical responses. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.26, p.803–816, 2020. DOI: 10.1007/s12298-020-00798-y.

EMBRAPA. **Agência de Informação Embrapa**. 2021. Disponível em: <
<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/arroz/producao/sistema-de-cultivo> >

EMBRAPA. **Agência de Informação Embrapa**. 2023. Disponível em: <
<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/arroz/pre-producao/socioeconomia/mercado-comercializacao-e-consumo>>

ETESAMI, Hassan; JEONG, Byoung Ryong; RAHEB, Alireza. Arsenic (As) resistant bacteria with multiple plant growth-promoting traits: Potential to alleviate As toxicity and accumulation in rice. **Microbiological Research**, v. 272, p. 127391, 2023.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. [2024]. 2023. Disponível em: <
<https://www.fao.org/brasil/programas-e-projetos/pt/> >

FAROOQI, Z.U.R.; ZIA UR REHMAN, M.; SOHAIL, M.I.; USMAN, M.; KHALID, H.; NAZ, K. **Regulation of drought stress in plants**. [s.l.] INC, 2020. 77–104p. DOI: 10.1016/B978-0-12-818204-8.00004-7.

FATHI, A.; TARI, D.B. Effect of Drought Stress and its Mechanism in Plants. **International Journal of Life Sciences**, v.10, p.1–6, 2016. DOI: 10.3126/ijls.v10i1.14509.

FERREIRA, Mileide dos Santos et al. The role of somaclonal variation in plant genetic improvement: A systematic review. *Agronomy*, v. 13, n. 3, p. 730, 2023.

GOHAR, Faryal et al. Impact of Nanoparticles on Plant Growth, Development and Physiological Processes: A Comprehensive Review. 2024.

HARTATI, R.S.; SUHESTI, S.; WULANDARI, S.; ARDANA, I.K.; YUNITA, R. In-vitro selection of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) putative mutant for drought stress. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v.653, 2021. DOI: 10.1088/1755-1315/653/1/012135.

HSIEH, Jo-Wei Allison et al. Rice transformation treatments leave specific epigenome changes beyond tissue culture. *Plant Physiology*, v. 193, n. 2, p. 1297-1312, 2023.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2024. Disponível em: <
<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/40954-em-julho-ibge-preve-safra-de-298-0-milhoes-de-toneladas-para-2024> >

- ICHIKAWA, Masako et al. Whole-genome sequence analysis of mutations in rice plants regenerated from zygotes, mature embryos, and immature embryos. *Breeding Science*, v. 73, n. 3, p. 349-353, 2023.
- IPCC, 2023: Sumário para Formuladores de Políticas. Em: *Mudança do Clima 2021: A Base da Ciência Física. Contribuição do Grupo de Trabalho I ao Sexto Relatório de Avaliação do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas* [Masson-Delmotte, V., P.
- JOSHI, R.; SHUKLA, A.; SAIRAM, R.K. In vitro screening of rice genotypes for drought tolerance using polyethylene glycol. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.33, p.2209–2217, 2011. DOI: 10.1007/s11738-011-0760-6.
- KANATHALA, Anjana Priyadarshani et al. High Efficiency In vitro Whole Plant Regeneration via Desiccated Callus in *Oryza sativa* cv. MTU1010. *International Journal of Innovative Science and Research Technology (IJISRT) IJISRT24MAR1492*, p. 1335-1340, 2024.
- KIM, K.; HO, T.S.; HWANG, U.S. Production and characterization of somatic hybrids between rice (*Oryza sativa* L.) and reed (*Phragmites communis* Trin.) obtained by protoplast fusion. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, v.31, p.370–379, 2022. DOI: 10.1007/s13562-021-00689-7.
- KIRAN KUMAR, M.; SANDEEP, B.V.; SUDHAKAR RAO, P. Development of salt tolerant callus cultures by somatic hybridization between *Oryza sativa* and mangrove grass *Myriostachya wightiana*. *Annals of Agrarian Science*, v.16, p.396–404, 2018. DOI: 10.1016/j.aasci.2018.07.006.
- LI, Peng et al. Mechanism of microbial action of the inoculated nitrogen-fixing bacterium for growth promotion and yield enhancement in rice (*Oryza sativa* L.). *Advanced Biotechnology*, v. 2, n. 4, p. 32, 2024.
- LI, Qingyang et al. Physiological and molecular mechanisms of rice tolerance to salt and drought stress: Advances and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 17, p. 9404, 2024.
- LIANG, W.; MA, X.; WAN, P.; LIU, L. Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.495, p.286–291, 2018. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.043.
- MAGHBOLI BALASJIN, Nasim et al. Plant growth-promoting activity of bacteria isolated from Asian rice (*Oryza sativa* L.) depends on rice genotype. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 4, p. e02787-21, 2022.
- MAHLOOJI, M.; SEYED SHARIFI, R.; RAZMJOO, J.; SABZALIAN, M.R.; SEDGHI, M. Effect of salt stress on photosynthesis and physiological parameters of three contrasting barley genotypes. *Photosynthetica*, v.56, p.549–556, 2018. DOI: 10.1007/s11099-017-0699-y.
- MAHREEN, Naima et al. Mitigation of water scarcity with sustained growth of Rice by plant growth promoting bacteria. *Frontiers in Plant Science*, v. 14, p. 1081537, 2023.
- MANDAL, Mamun; SARKAR, Abhijit. Green syntheses of nanoparticles from plant growth-promoting microorganisms and their application in the agri-food industries. In: *Nanotechnology and Nanomaterials in the Agri-Food Industries*. Elsevier, 2024. p. 185-204.

- MANICKAVASAGAM, Markandan; PAVAN, Gadamchetty; VASUDEVAN, Venkatachalam. A comprehensive study of the hormetic influence of biosynthesized AgNPs on regenerating rice calli of indica cv. IR64. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8821, 2019.
- MOHAMED, Gehad M. et al. Effects of different gelling agents on the different stages of rice regeneration in two rice cultivars. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 10, p. 5738-5744, 2021.
- NGALIMAT, Mohamad Syazwan et al. Plant growth-promoting bacteria as an emerging tool to manage bacterial rice pathogens. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 682, 2021.
- OKORIE, V.O.; MPHAMBUKELI, T.N.; AMUSAN, S.O. Exploring the political economy of water and food security nexus in BRICS. **Africa Insight**, v.48, p.21–38, 2019.
- ORYZA, L.; THAMODHARAN, G.; PILLAI, M.A. Electronic Journal of Plant Breeding In vitro mutagenesis to improve salt tolerance in rice. v.11, p.638–644, 2020.
- OUYABE, Michel et al. Response of upland rice (*Oryza sativa* L.) inoculated with non-native plant growth-promoting bacteria. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 903, 2020.
- PANDEY, Neha et al. Exploring the potential of *Bacillus* for crop productivity and sustainable solution for combating rice false smut disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1405090, 2024.
- PARVEEN, Shugufta et al. Characterization of Endophytic Microorganisms of Rice (*Oryza sativa* L.) Potentials for Blast Disease Biocontrol and Plant Growth Promoting Agents. **Phyton (0031-9457)**, v. 92, n. 11, 2023.
- PLANT CELL TECHNOLOGY. **Protoplast Culture: Isolation and Culture Methods**. 2023. Disponível em: < https://plantcelltechnology.com/blogs/blog/blogprotoplast-culture-isolation-and-culture-methods?srsltid=AfmBOopvciKivUvxL5SU8qHbE2AG78o9QDPnuJVuaDLBDq0vHZU-Zk_a >
- RAHIM, D.; KALOUSEK, P.; TAHIR, N.; VYHNÁNEK, T.; TARKOWSKI, P.; TROJAN, V.; ABDULKHALEQ, D.; AMEEN, A.H.; HAVEL, L. In vitro assessment of kurdish rice genotypes in response to PEG-induced drought stress. **Applied Sciences (Switzerland)**, v.10, 2020. DOI: 10.3390/app10134471.
- RAJANI, G. et al. Effect of Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, on Germination Attributes and Seedling Growth of Rice Varieties under In vitro Conditions. **International Journal of Plant & Soil Science**, v. 35, n. 20, p. 62-71, 2023.
- SAKTHIVEL, Kausalya et al. Optimisation of plant tissue culture conditions in a popular semi-dwarf indica rice cultivar ADT 39 for effective Agrobacterium-mediated transformation. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 12, n. 3, p. 849-854, 2021.
- SERAJ, Zeba I. et al. The scope of transformation and genome editing for quantitative trait improvements in rice. In: **Advancement in Crop Improvement Techniques**. Woodhead Publishing, 2020. p. 23-43.

- SINGH, D.; EKKA, J.P.; KUMARI, P. Somatic hybridization : An effective tool for crop improvement. **Food and scientific reports**, p.21–23, 2020.
- SINGH, Satyendra Pratap et al. Nano-inputs: a next-generation solution for sustainable crop production. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 9, p. 5311-5324, 2023.
- SOHAG, A.A.M.; TAHJIB-UL-ARIF, M.; BRESTIČ, M.; AFRIN, S.; SAKIL, M.A.; HOSSAIN, M.T.; HOSSAIN, M.A.; HOSSAIN, M.A. Exogenous salicylic acid and hydrogen peroxide attenuate drought stress in rice. **Plant, Soil and Environment**, v.66, p.7–13, 2020. DOI: 10.17221/472/2019-PSE.
- SOUZA, Wanessa et al. Microbiolization with *Bacillus* sp. in irrigated rice seed positively impacts physiological and phytosanitary quality. **Revista de Ciências Agrícolas**, v. 40, n. 3, 2023.
- TARATIMA, Worasitikulya et al. Optimization of rice (*Oryza sativa* L.) 'Tubtim Chumphae', for callus induction, proliferation and plantlet regeneration. 2022.
- THAKUR, Shivani et al. A Review on Plant Tissue Culture. **Asian Journal of Biology**, v. 20, n. 2, p. 14-18, 2024.
- THAO, Bui Phuong et al. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for an indica rice variety-Khang dan 18. **Vietnam Journal of Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 53-62, 2022.
- TSAI, Y.C.; CHEN, K.C.; CHENG, T.S.; LEE, C.; LIN, S.H.; TUNG, C.W. Chlorophyll fluorescence analysis in diverse rice varieties reveals the positive correlation between the seedlings salt tolerance and photosynthetic efficiency. **BMC plant biology**, v.19, p.403, 2019. DOI: 10.1186/s12870-019-1983-8.
- WANG, Ningning et al. Modification of gene expression, DNA methylation and small RNAs expression in rice plants under in vitro culture. **Agronomy**, v. 12, n. 7, p. 1675, 2022.
- WANI, S.H.; SOFI, P.A.; GOSAL, S.S.; SINGH, N.B. In vitro screening of rice (*Oryza sativa* L) callus for drought tolerance. **Communications in Biometry and Crop Science**, v.5, p.108–115, 2010.
- WIGGINS, Grant et al. Common gene expression patterns are observed in rice roots during associations with plant growth-promoting bacteria, *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 8827, 2022.
- WOHLMUTH, Jan et al. Interaction of the nanoparticles and plants in selective growth stages—usual effects and resulting impact on usage perspectives. **Plants**, v. 11, n. 18, p. 2405, 2022.
- WU, Hanxin et al. Effects of Fe₃O₄ nanoparticles and nano hydroxyapatite on Pb and Cd stressed rice (*Oryza sativa* L.) seedling. **Chemosphere**, v. 329, p. 138686, 2023.
- WU, L.; HUO, W.; YAO, D.; LI, M. Effects of solid matrix priming (SMP) and salt stress on broccoli and cauliflower seed germination and early seedling growth. **Scientia Horticulturae**, v.255, p.161–168, 2019. DOI: 10.1016/j.scienta.2019.05.007.
- WU, M.; LIU, R.; GAO, Y.; XIONG, R.; SHI, Y.; XIANG, Y. PheASR2, a novel stress-responsive transcription factor from moso bamboo (*Phyllostachys edulis*), enhances drought

tolerance in transgenic rice via increased sensitivity to abscisic acid. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.154, p.184–194, 2020. DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.06.014.

XU, Y.; LI, R.; LUO, H.; WANG, Z.; LI, M.-W.; LAM, H.-M.; HUANG, C. Protoplasts: Small Cells with Big Roles in Plant Biology. *Trends Plant Sci.* 2022, 27, 828–829

YADAV, Pragya et al. A versatile protocol for efficient transformation and regeneration in mega indica rice cultivar MTU1010: Optimization through hormonal variables. **Methods and Protocols**, v. 6, n. 6, p. 113, 2023.

YOUSSEF, N.M.; HASHISH, K.I.; TAHA, L.S. Salinity tolerance improvement of in vitro propagated *Paulownia tomentosa* using proline. **Bulletin of the National Research Centre**, v.44, 2020. DOI: 10.1186/s42269-020-00345-5.

ZHOU, Hu et al. Efficacy of plant growth-promoting bacteria *Bacillus cereus* YN917 for biocontrol of rice blast. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 684888, 2021.

CAPÍTULO II

INDUÇÃO DE CALOS, REGENERAÇÃO DE PLANTAS E ACLIMATIZAÇÃO DE CULTIVARES DE ARROZ BRS SOBERANA E DOURADÃO

RESUMO

A cultura do arroz no Brasil é de suma importância para a segurança alimentar e a economia do país hoje. Sua produção ultrapassa 10 milhões de toneladas e sua demanda é crescente devido à relevância na dieta dos brasileiros. A aplicação da técnica de cultura de tecidos vegetais no melhoramento do arroz enfrenta desafios significativos, especialmente na indução de calos embriogênicos e subsequente regeneração de plantas e aclimatização das mesmas, como a grande variação de respostas ao meio de cultura de indução de calos dependendo do genótipo. O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de protocolos eficientes para as diferentes etapas da cultura de tecidos, desde a indução de calos até a aclimatização das plantas regeneradas de Arroz Indica cultivares BRS Soberana e Douradão. Para isso, foram realizados experimentos distintos e complementares para avaliar a curva de crescimento de calos característica das duas cultivares, a influência das diferentes doses de prolina (0, 0.5, 1.0, 1.5 e 2.0 g/L) no meio de indução de calos para obtenção de calos embriogênicos, regeneração de brotos e aclimatização das plantas regeneradas, e avaliação do efeito de diferentes doses de nitrogênio na aclimatização de plantas. Os resultados sugerem uma metodologia para indução de calos, regeneração e aclimatização de plantas regeneradas das cultivares BRS Soberana e Douradão.

Palavras-chave: Biotecnologia agrícola. *Oryza sativa*. Cultura de tecidos.

CALLUS INDUCTION, PLANT REGENERATION, AND ACCLIMATIZATION OF RICE CULTIVARS BRS SOBERANA AND DOURADÃO

ABSTRACT

Rice cultivation in Brazil is of paramount importance for the country's food security and economy. Its production exceeds 10 million tons, and demand is increasing due to its significance in the Brazilian diet. The application of plant tissue culture techniques in rice improvement faces significant challenges, particularly in the induction of embryogenic calluses, subsequent plant regeneration, and acclimatization, as there is considerable variation in callus induction responses depending on the genotype. This study aimed to develop efficient protocols for different stages of tissue culture, from callus induction to the acclimatization of regenerated plants of *Indica* rice cultivars BRS Soberana and Douradão. Distinct and complementary experiments were conducted to evaluate the callus growth curve characteristic of both cultivars, the influence of different proline concentrations (0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 g/L) in the callus induction medium for obtaining embryogenic calluses, shoot regeneration, and acclimatization of regenerated plants, and to assess the effect of varying nitrogen levels on plant acclimatization. The results suggest a methodology for callus induction, plant regeneration, and acclimatization of regenerated plants for the BRS Soberana and Douradão cultivars.

Keywords: Agricultural biotechnology. *Oryza sativa*. Plant transformation.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do arroz no Brasil é de suma importância para a segurança alimentar e a economia do país hoje. Sua produção ultrapassa 10 milhões de toneladas e sua demanda é crescente devido à relevância na dieta dos brasileiros (CONAB, 2023). A adoção de variedades melhoradas é essencial para aumentar a produtividade em um cenário de mudanças climáticas e crescente pressão por sustentabilidade (MAPA, 2022).

As cultivares de arroz BRS Soberana e Douradão são importantes cultivares para o plantio de arroz de terras altas no Brasil e são de interesse para programas de melhoramento que utilizam de técnicas de transformação e/ou edição gênica, por possuírem características benéficas para cultura e estarem aptas à recombinação de DNA para obtenção de variedades superiores.

Atualmente, as técnicas de biotecnologia agrícola têm desempenhado papel crucial no desenvolvimento de cultivares de arroz com características superiores, buscando maior produtividade a fim de atender à crescente demanda por alimentos.

No entanto, a aplicação da técnica de cultura de tecidos vegetais no melhoramento do arroz enfrenta desafios significativos, especialmente na indução de calos embriogênicos e subsequente regeneração de plantas e aclimatização das mesmas, como a grande variação de respostas ao meio de cultura de indução de calos dependendo do genótipo (KANATHALA et al., 2024), a baixa taxa de regeneração eficiente, a ocorrência de plantas albinas, variação somaclonal durante o processo de regeneração e baixa taxa de sobrevivência na aclimatização das plantas (SAAD et al., 2023; ABD RAHMAN et al., 2021).

Estes obstáculos requerem soluções personalizadas e aprofundadas, incluindo a consideração de fatores intrínsecos das plantas e otimização contínua dos protocolos para minimizar a presença de plantas que não sobrevivem à aclimatização. A necessidade de equilibrar fatores externos e internos destaca a importância de abordagens integradas e personalizadas para a regeneração de plantas de Arroz Indica elite, visando seu potencial para utilização em estudos de biologia molecular e melhoramento genético. Com isso, o objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de protocolos eficientes para as diferentes etapas da cultura de tecidos, desde a indução de calos até a aclimatização das plantas regeneradas de Arroz Indica cultivares BRS Soberana e Douradão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi composto por três experimentos distintos. Para todos eles, o processo de assepsia das sementes foi o mesmo. Para isso as sementes de arroz descascadas, cultivares Soberana e/ou Douradão, foram lavadas em água corrente, mergulhadas por 10 minutos em álcool 70%, em seguida mergulhadas por 20 minutos em hipoclorito de sódio 2,5%, e por fim, lavadas por cinco vezes consecutivas em água deionizada e autoclavada. O tempo de submersão das sementes e a concentração utilizada foram definidos em testes preliminares.

2.1. Curva de crescimento de calos das cultivares de arroz elite Douradão e Soberana em meio MS.

2.1.1. Indução de calos

Após a assepsia, as sementes, cultivares Soberana e Douradão, foram estabelecidas em tubos de vidro contendo 15 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962) com adição de 0,3 g L⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,5 g L⁻¹ de prolina, 3 g L⁻¹ de 2,4-D, 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,7. A composição do meio foi estabelecida após testes preliminares.

Uma semente foi colocada em cada tubo contendo meio de indução de calos e os tubos foram fechados com tampas de plástico translúcidas e seladas com plástico filme transparente. Para o desenvolvimento dos calos, os tubos foram colocados dentro de um armário fechado, sem iluminação interna, em sala de crescimento com temperatura de 25°C.

2.1.2. Obtenção do peso dos calos e análise estatística

Para a obtenção do peso dos calos, eles foram transferidos, dentro da câmara de fluxo, para a placa de Petri de acrílico estéril, selados com plástico filme e pesados em balança analítica de precisão. Em seguida, a placa e o plástico utilizados foram pesados separadamente na mesma balança para subtrair do peso total. O mesmo calo era colocado de volta ao mesmo tubo com meio para continuar desenvolvendo até a pesagem seguinte, repetindo o procedimento descrito.

O experimento foi composto por cinco repetições, contendo quatro tubos para cada cultivar, totalizando 40 tubos com uma semente em cada. Os dados foram analisados no Software RStudio para curva de crescimento (growthcurver) e análise de variância.

2.2. Influência do nível de prolina na indução de calos embriogênicos, regeneração de plantas e aclimatização de arroz soberana e douradão

2.2.1. Obtenção dos calos

Para a obtenção dos calos foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 2.1.1, com modificações nos níveis de prolina, a qual foi utilizada em quatro diferentes concentrações para diferenciação dos tratamentos, sendo eles (T1) 0,0 g L⁻¹, (T2) 0,5 g L⁻¹, (T3) 1,0 g L⁻¹ e (T4) 1,5 g L⁻¹.

Sete sementes foram colocadas em cada frasco contendo meio de indução de calos e os frascos foram tampados com tampas de plástico translúcidas e seladas com plástico filme transparente. Para o desenvolvimento dos calos, os frascos foram colocados dentro de um armário fechado, sem iluminação interna, em sala de crescimento com temperatura de 25°C.

A cada sete dias o número de explantes que induziram calos foram contabilizados para obter a porcentagem de calos para cada tratamento. A análise de variância foi conduzida no software RStudio e os testes de comparação de médias foram realizados pelo método de Tukey, com significância estatística avaliada ao nível de 5% de probabilidade.

2.2.2. Regeneração de plantas

Após seis semanas em meio de indução, os calos embriogênicos foram individualizados levando em consideração suas características físicas. Os calos embriogênicos de arroz possuem em torno de 0,5 cm de diâmetro, são compactos e esféricos (SAKR and SAYED, 2018).

Após serem individualizados, foram estabelecidos em meio MS contendo 1 mg L⁻¹ de ANA, 2,5 mg L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7, para a regeneração de plantas *in vitro*. Cada calo embriogênico foi colocado em tubo de vidro contendo 15 ml de meio para regeneração e colocados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h e temperatura controlada de 25°C.

Os dados para número de calos embriogênicos obtidos para cada tratamento foram analisados pelo software RStudio para obtenção da Análise de Variância, teste de normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk) e o teste de comparação de médias pelo método de Tukey, com significância estatística avaliada ao nível de 5% de probabilidade.

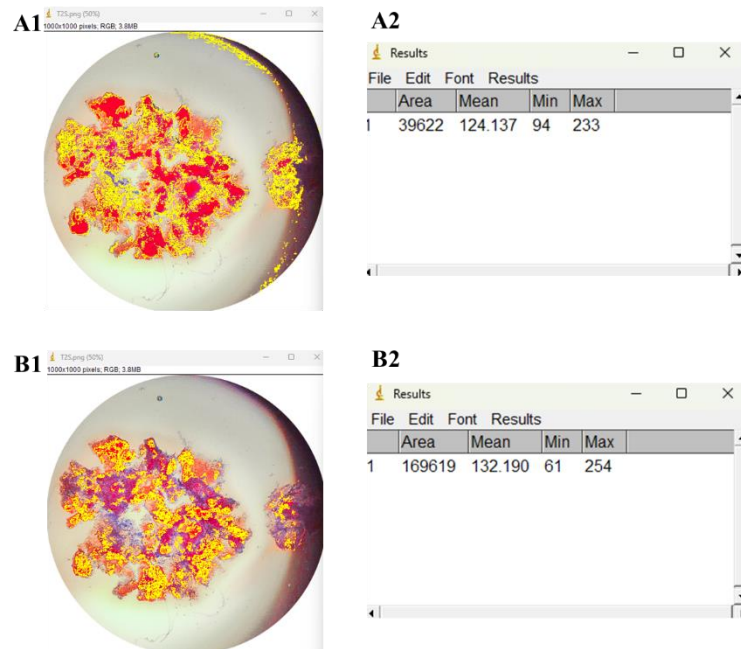
2.2.3. Caracterização anatômica das células embriogênica e não embriogênica

Os calos induzidos em meio contendo 0.5 g/L de prolina foram coletados e colocados em etanol 70% para realização das análises anatômicas no Laboratório de Anatomia Vegetal no Departamento de Biologia na Universidade Federal de Lavras (UFLA). Para isso, foram realizadas a desidratação em etanol 70, 80, 90 e 100% do material vegetal, que em seguida foi imerso em solução de pré-infiltração, composta por etanol 100% e resina base (1:1) por 24 horas. Para a polimerização, foi utilizado o kit historesina segundo recomendações do fabricante (hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg, Alemanha). Secções transversais foram realizadas em micrótomo rotativo semiautomático, sendo, em seguida, coradas em solução azul de toluidina 1% (m/v) (O'BRIEN et al., 1964) e as lâminas foram montadas em Permount® e, então, observadas em microscópio óptico de luz para análise qualitativa das células embriogênicas e não embriogênicas.

2.2.4. Análise citoquímica

Para a realização do teste com carmim visando à confirmação do potencial embriogênico, utilizou-se 50 mg de calos com quatro semanas de cultivo em meio de indução. Foram adicionadas 25 µL de corante azul de Evans (0,1%) (peso/volume) por 2 a 3 minutos na lâmina. Após este período, retirou-se o excesso do mesmo e adicionou-se de 25 µL de corante carmim acético (2%) (peso/volume) pelo mesmo período de tempo. Retirou-se o excesso do corante, adicionando-se, em seguida, uma a duas gotas de glicerina. As amostras foram cobertas com lamínula, e em seguida, as lâminas prontas foram submetidas a leves batidas com bastão de vidro, visando espalhar o material na lâmina. A seguir, as amostras foram fotografadas em microscópio óptico de luz Olympus BX 50 e analisadas pelo software ImageJ para a obtenção de azul e vermelho.

Figura 1. Representação da análise realizada pelo software ImageJ. A1: Seleção da coloração azul na imagem da amostra fotografada em microscópio óptico de luz. A2: Obtenção da área selecionada. B1: Seleção da coloração vermelha na imagem da amostra fotografada em microscópio óptico de luz. B2: Obtenção da área selecionada.



A figura 1 mostra a seleção dos pixels azuis e vermelhos, pelo software ImageJ, das amostras fotografadas em microscópio óptico de luz para a obtenção da porcentagem de células azuis e vermelhas, considerando a área selecionada na imagem, sendo Área 1 (A2) + Área 2 (B2) = 100% para obter a porcentagem de pixels vermelhos e a porcentagem de pixels azuis.

Em seguida, as porcentagens foram analisadas pelo software RStudio, obtendo a análise de variância, normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk) e teste Tukey de comparação de médias, com significância estatística avaliada ao nível de 5% de probabilidade.

2.2.5. Individualização dos brotos

Após sete semanas de desenvolvimento dos calos embriogênicos em meio de regeneração de plantas, os brotos foram individualizados e subcultivados em meio de cultura MS contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7, para que continuassem desenvolvendo até a aclimatização. Foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h e temperatura controlada de 25°C.

Os brotos foram contabilizados e os dados foram analisados pelo software RStudio, obtendo a Análise de Variância, normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk) e teste Tukey de comparação de médias, com significância estatística avaliada ao nível de 5% de probabilidade. Os resíduos para este parâmetro não seguem distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, portanto foi realizada a transformação logarítmica com valor mínimo de $\sqrt{0.5}$ para a variável número de brotos regenerados, ajustando os dados para os modelos estatísticos utilizados.

A transformação pode ser representada pela seguinte fórmula:

$$Brotos2 = \log(Brotos + \sqrt{0.5})$$

Para a avaliação das características morfológica dos brotos, os dados obtidos para número de folhas, número de raiz, comprimento de parte aérea e comprimento de raiz foram analisados pelo software RStudio, realizando a análise de variância, verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e teste Tukey de comparação de médias, com significância estatística avaliada ao nível de 5% de probabilidade.

2.2.6. Citometria de fluxo para avaliar a estabilidade genética dos calos e dos brotos regenerados

As amostras de calos e dos brotos regenerados foram submetidas à análise de citometria de fluxo, para verificar a estabilidade genética dos calos. Para a determinação do conteúdo de DNA, as amostras foram trituradas em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 para a liberação dos núcleos. A suspensão de núcleos foi filtrada através de malha de 50 μ m. Os núcleos foram corados com 25 μ l de solução de iodeto de propídeo, em cada amostra. As amostras foram analisadas imediatamente após o preparo. A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson).

O índice de DNA foi obtido pela comparação do conteúdo de DNA das amostras de calos em brotos regenerados com o conteúdo de DNA da amostra do controle tomada como referência pela fórmula:

$$DI = \frac{\text{Intensidade média de fluorescência da população de interesse}}{\text{Intensidade média de fluorescência da população de referência (diploide)}}$$

Interpretação do índice de DNA:

DI igual ou próximo de 1,0: Indica que a população celular tem conteúdo diploide normal.

DI maior que 1,0: Sugere uma população com conteúdo de DNA aumentado, indicando possível aneuploidia ou poliploidia.

DI menor ou próximo de 0.5: Pode ocorrer em células haploides ou em condições específicas de perda de DNA.

Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância, teste de normalidade dos resíduos Shapiro-Wilk e teste Tukey para comparação das médias com significância estatística avaliada ao nível de 5% de probabilidade, pelo software RStudio.

2.2.7. Aclimatização

As plantas regeneradas e individualizadas (item 2.2.5) foram levadas para a aclimatização em vasos com área de 0,040 m² cada. Antes do transplante das plantas, os recipientes foram lavados em água corrente e submersos em água com hipoclorito de sódio a 2,5% por 20 minutos. Após esse período, os vasos foram enxaguados.

Cada vaso foi preenchido com mistura composta de 50% do substrato comercial Carolina Soil® e 50% SV Substrato Vegetal®. Após o enchimento, os vasos foram umedecidos com água e levados para a casa de vegetação com tela sombrite e irrigação programada para ser acionada quando a temperatura interna atingisse 29°C. As plantas, provenientes de calos, foram transplantadas para os vasos, sendo três plantas por vaso.

A porcentagem de plantas que sobreviveram à aclimatização até o trigésimo quinto dia foram avaliadas através do software RStudio, realizando-se a Análise de Variância, verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste Tukey para comparação das médias, com significância estatística avaliada ao nível de 5% de probabilidade.

2.3. Avaliação do efeito de diferentes doses de Nitrogênio na aclimatização de plantas

Após 35 dias de aclimatização, os vasos do experimento anterior foram transferidos para outra casa de vegetação, onde foram colocados em bandejas com água, e realizada a primeira adubação de cobertura, quando as plantas estavam no estágio vegetativo (V3).

Os tratamentos consistiram em cinco doses diferentes de nitrogênio (N), para a adubação nitrogenada utilizou-se a ureia contendo 45% de N. A adubação foi dividida em duas partes, sendo

que 67% das doses aplicadas em V3 e o restante (33%) na fase reprodutiva de emborrachamento (R2) (Ogoshi et al., 2020). A tabela 1 detalha os tratamentos e doses aplicadas.

Tabela 1. Proporção da quantidade da adubação com uréia de acordo com as doses de nitrogênio recomendada.

Tratamento (dose)	kg ha ⁻¹ de N recomendado	Adubação com ureia (kg ha ⁻¹)
0	0	0
1	60	133.33
2	120	266.67
3	180	400.00
4	200	444.44

Devido ao aparecimento de sintomas de deficiência de potássio (K), aos 51 dias de aclimatização, foi realizada adubação com cloreto de potássio, com 60% de K₂O, na dose de 166,67 kg ha⁻¹, correspondendo a 100 kg ha⁻¹ de K (Nelvia et al., 2023). Cada vaso recebeu o total de 0,68 gramas do adubo.

Após o ciclo completo de desenvolvimento, os dados para as características altura de planta, número de perfilhos, número de panículas por planta, número total de grãos por planta, porcentagem de grãos estéreis, razão entre peso fresco e peso seco, e índice de acúmulo de biomassa foram obtidos e avaliados através do software RStudio, realizando-se a análise de variância, verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste Tukey para comparação das médias, com significância estatística avaliada ao nível de 5% de probabilidade.

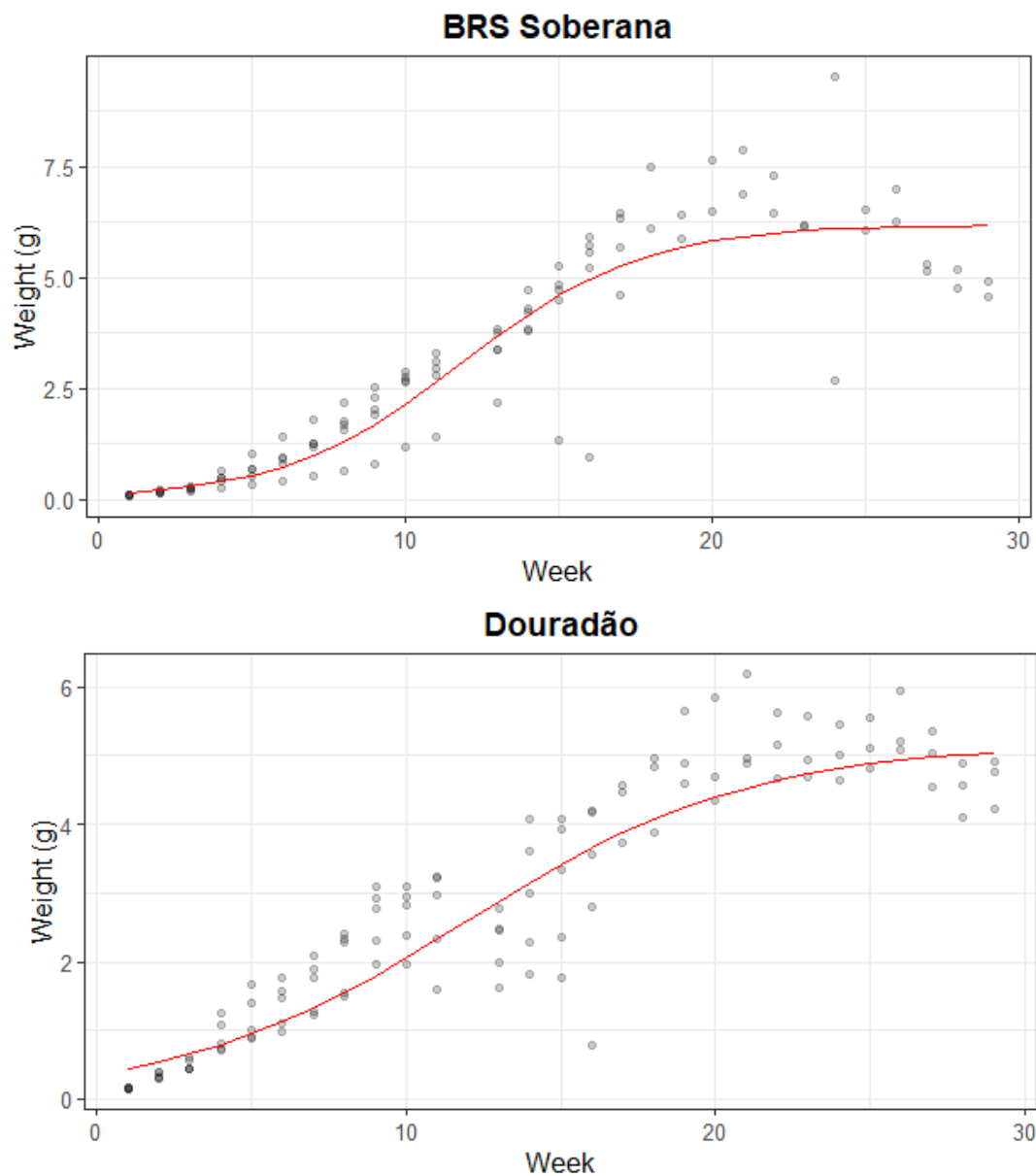
3. RESULTADOS

3.1. Curva de crescimento de calos das cultivares de arroz elite Douradão e Soberana em meio MS

Para a obtenção da curva de crescimento de calos para as cultivares de arroz BRS Soberana e Douradão, os explantes foram estabelecidos em meio MS (Murashige and Skoog, 1962) acrescido de 0.3 g L⁻¹ de caseína hidrolisada 0,5 g L⁻¹ de prolina, 3 g L⁻¹ de 2,4D, 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g

L⁻¹ de ágar, devido aos resultados obtidos em testes iniciais realizados com diferentes formulações, no qual este meio demonstrou maior capacidade de induzir calos nas cultivares estudadas, com melhores respostas em termos de porcentagem e homogeneidade de calos. As pesagens dos calos frescos foram realizadas semanalmente durante 30 semanas e a evolução do peso ao longo do tempo foi representada graficamente com os pontos observados e a curva ajustada pelo modelo logístico. A previsão de peso foi calculada para cada semana e incorporada ao gráfico, conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2. Gráfico da curva de crescimento dos calos frescos, cultivar de arroz BRS Soberana e Douradão, em meio MS contendo 0, 3 g de caseína hidrolisada, 0, 5 g L⁻¹ de prolina, 3 g L⁻¹ de 2,4D, 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar ao longo de 30 semanas, com o peso dos calos (gramas) representado no eixo vertical e o tempo (semanas) no eixo horizontal.



BRS Soberana: K (peso máximo esperado): 6,187g; N0 (peso inicial): 0,107g, r (taxa de crescimento): 0,34, Erro padrão residual: 0,967.

Douradão: K: 5,168; N0: 0,368; r: 0,215; Erro padrão residual:0,665

As curvas apresentam um padrão sigmóide, típico de crescimento biológico, tanto para BRS Soberana quanto para Douradão apresentando características semelhantes, com a fase inicial de crescimento lento (fase lag) entre a semana zero e a semana cinco. Observa-se nesse período o aumento gradativo do peso dos calos, refletindo o período de adaptação dos calos às condições

experimentais. Em seguida, a curva exibe o crescimento acelerado (fase logarítmica), observada a partir da quinta semana até a vigésima semana para BRS Soberana e a partir da sexta semana até a décima oitava semana para Douradão, onde o crescimento dos calos acelera significativamente, alcançando seu pico de maior incremento.

Após a vigésima semana para BRS Soberana e após a décima oitava semana para Douradão, o peso dos calos apresentou pouca variação, indicando que o crescimento atingiu o platô, demarcando a fase estacionária, de estabilização. Os pontos cinzas ao longo da curva indicam os dados individuais obtidos, mostrando a variabilidade entre as amostras em cada semana, e a linha vermelha representa o ajuste do modelo de crescimento aos dados.

O aspecto e coloração dos calos durante as fases lag, log e estacionária variaram com o período de crescimento e desenvolvimento dos mesmos. As sementes de arroz desenvolvem a plúmula na primeira semana e em seguida as primeiras células desorganizadas começam a surgir próximo a onde está localizado o embrião maduro da semente. A coloração bege clara prevalece até o início da fase estacionária, se tornando bege escuro na vigésima segunda semana em diante.

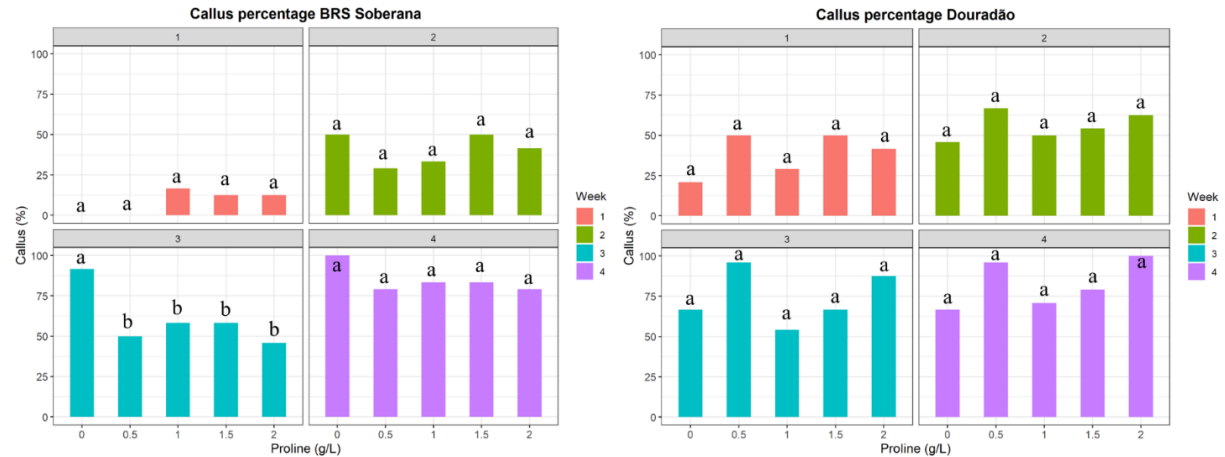
A transferência dos calos embriogênicos para o meio de regeneração no próximo experimento foi realizada após completar quatro semanas de desenvolvimento em meio de indução de calos, durante a fase Lag. Esta estratégia foi fundamentada nos resultados obtidos para a curva de crescimento de calos para as cultivares BRS Soberana e Douradão.

3.2. Influência do nível de prolina na indução de calos embriogênicos, regeneração de plantas e aclimatização de arroz BRS Soberana e Douradão

3.2.1. Indução de calos

As sementes de arroz das cultivares BRS Soberana e Douradão foram desinfestadas, seguindo o protocolo de assepsia e estabelecidas em frascos contendo meio de cultura para indução dos calos, em ambiente completamente escuro, submetidas a cinco diferentes tratamentos (doses de prolina). Durante quatro semanas, os explantes foram avaliados para obtenção da porcentagem de calos a cada sete dias. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística para obtenção dos gráficos (Figura 3).

Figura 3. Gráficos da porcentagem de calos em explantes de sementes de arroz BRS Soberana e Douradão estabelecidas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de prolina (T1- 0, 0.5 g/L, T2- 1.0 g/L, T3- 1.5 g/L e T4- 2.0 g/L) a cada sete dias, durante quatro semanas de desenvolvimento.

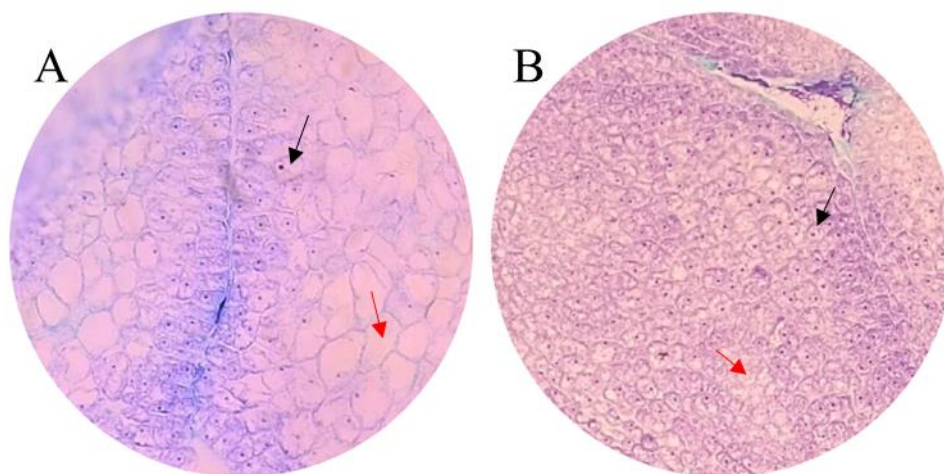


O efeito da prolina para indução de calos varia entre as cultivares (Figura 3). Para BRS Soberana, a ausência de prolina (0 g/L) na terceira semana resultou em maior indução de calos, e para Douradão, a concentração de 2 g/L de prolina foi mais eficiente na terceira semana. Ao acompanhar ao longo do tempo, podemos observar que na quarta semana as diferenças entre os tratamentos desaparecem, sugerindo que o efeito da prolina é mais relevante nas fases iniciais de indução.

3.2.2. Seleção dos calos embriogênicos

Após quatro semanas de crescimento dos calos em meio de indução, foi realizada a seleção dos calos embriogênicos, através da análise visual das características morfológicas específicas. Os calos embriogênicos de arroz foram diferenciados dos calos não embriogênicos observando seu aspecto compacto e nodular, sua cor esbranquiçada e baixa ou nenhuma formação de mucilagem. Na figura 4 estão apresentados os cortes para calos de explantes de BRS Soberana e Douradão em meio de cultura de indução contendo 0.5 g/L de prolina e ilustra células embriogênicas e não embriogênicas observadas na mesma amostra de calo para cada cultivar.

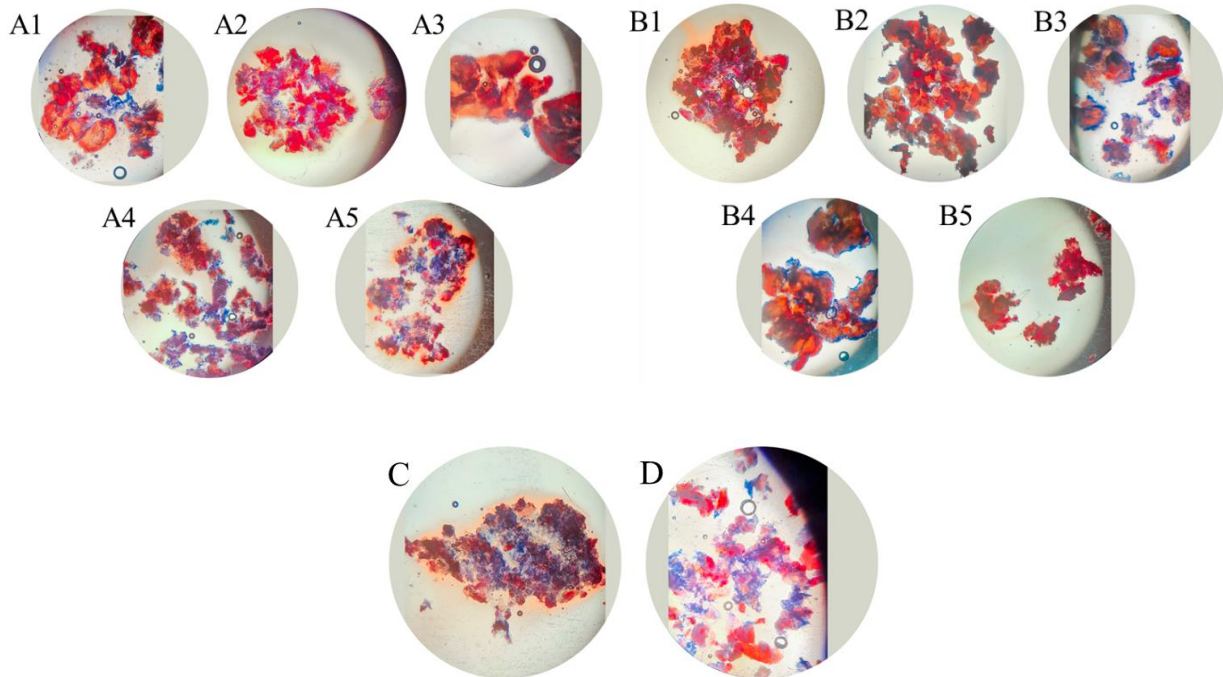
Figura 4. Imagens de cortes de calos oriundos de explantes de sementes de arroz cultivares BRS Soberana (A) e Douradão (B) para caracterização da anatomia das células, observados em aumento de 40X no microscópio óptico. Setas vermelhas apontam células com características não embriogênicas e células pretas apontam células com características embriogênicas.



A imagem da anatomia dos calos (figura 4) proporciona a análise visual da diferença entre as células embriogênicas e não embriogênicas. É possível observar o núcleo evidente em diversas células, enquanto em outras o núcleo não está claramente visível, essa é uma das principais características para avaliação e diferenciação entre células embriogênicas ou não, sendo indicativo do potencial regenerativo do calo.

Os calos embriogênicos e não embriogênicos foram selecionados de acordo com suas características morfológicas para a realização da análise citoquímica, sendo possível diferenciar as células embriogênicas das células sem potencial embriogênico com base em sua coloração vermelha ou azul, respectivamente (figura 5).

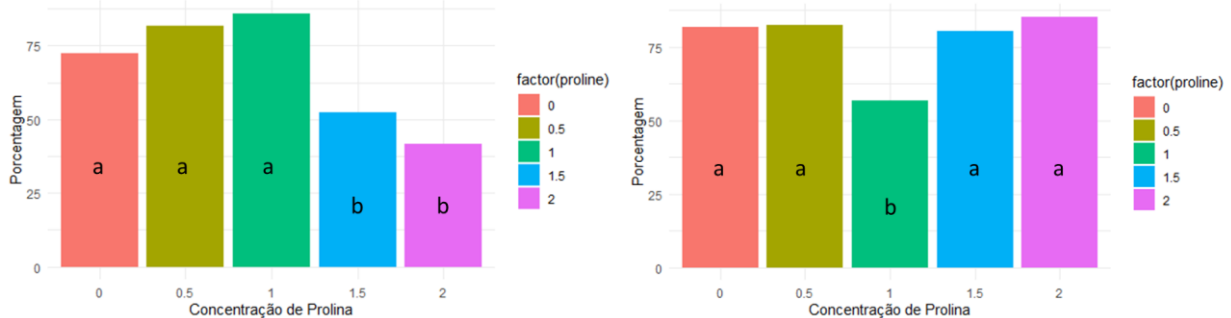
Figura 5. Imagens de calos embriogênicos de explantes de arroz cultivar BRS Soberana (A) e Douradão (B) desenvolvidos em meio de cultura MS acrescido de 0 (1), 0.5 g/L (2), 1.0 g/L (3), 1.5 g/L (4) e 2.0 g/L (5) de prolina e de calos não embriogênicos de explantes de arroz cultivar BRS Soberana (C) e Douradão (D) desenvolvidos em meio de cultura MS acrescido de 0.5 g/L de prolina, obtidas por meio de microscopia óptica com 40x de aumento.



Nas imagens da figura 5 as amostras representativas de cada tratamento demonstram as colorações das células após o protocolo para a avaliação citoquímica. A figura 5 exibe imagens para a representação de amostras coletadas de massa de calo não embriogênico (C e D), onde é possível notar a grande quantidade de células tingidas em azul, especialmente na figura 5C, da espécie BRS Soberana, a qual houve diferenciação morfológica mais evidente no momento da individualização dos calos embriogênicos e não embriogênico, proporcionando a seleção mais adequada.

A porcentagem de células vermelhas foi mensurada de acordo com a porcentagem de pixels correspondentes à área vermelha da imagem avaliada no Software ImageJ para cada repetição das amostras de calos desenvolvidos em meio de cultura com diferentes doses de prolina para cada cultivar. Os gráficos representam a comparação das médias obtidas para a porcentagem de calos embriogênicos (Figura 6).

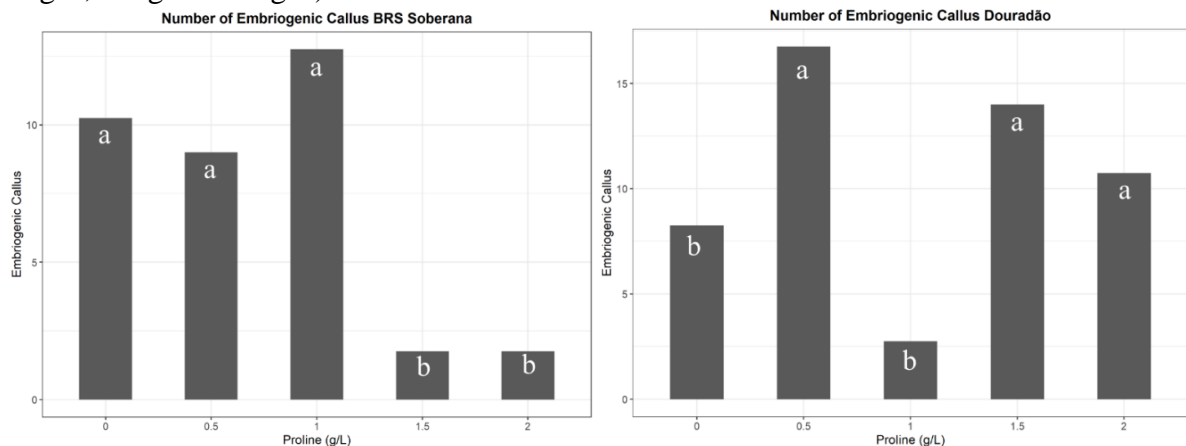
Figura 6. Gráfico da porcentagem de calos embriogênicos de explantes de arroz cultivar BRS Soberana (à esquerda) e Douradão (à direita) desenvolvidos em meio de cultura MS acrescido de 0, 0,5 g/L, 1,0 g/L, 1,5 g/L e 2,0 g/L de prolina.



Os tratamentos com 0 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L de prolina resultaram na maior quantidade de células embriogênicas para BRS Soberana, enquanto para Douradão a maior quantidade de células embriogênicas foi observada nos tratamentos com 0, 0,5 g/L, 1,5 g/L e 2 g/L de prolina (Figura 6).

Após a indução de calos por quatro semanas em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de prolina, foi realizada a contagem dos calos embriogênicos e os dados foram submetidos à análise de variância para a obtenção das comparações das médias observadas. A figura 7 representa o gráfico de comparação de médias para o número de calos embriogênicos.

Figura 7. Gráficos de comparação de médias do número de calos embriogênicos obtidos dos explantes de sementes de arroz BRS Soberana e Douradão após quatro semanas de desenvolvimento, em meio de cultura contendo diferentes concentrações de prolina (0, 0,5 g/L, 1,0 g/L, 1,5 g/L e 2,0 g/L).



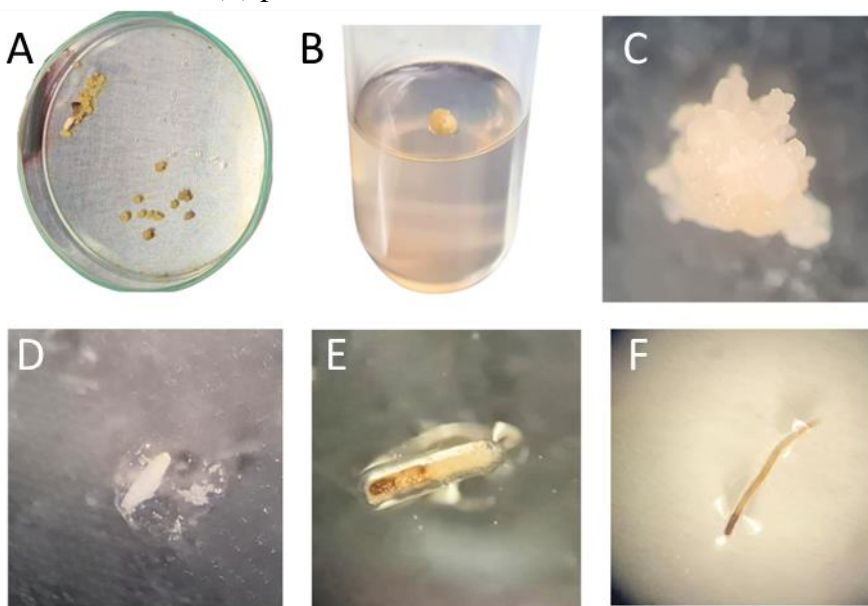
Os gráficos apresentados para número de calos embriogênicos (Figura 7) seguem os mesmos padrões dos gráficos obtidos para porcentagem de células embriogênicas (Figura 6), mostrando que os tratamentos com 0 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L de prolina resultaram na maior quantidade de calos embriogênicos para BRS Soberana, enquanto para Douradão a maior quantidade de calos

embriogênicos foi observada nos tratamentos com 0,5 g/L, 1,5 g/L e 2 g/L de prolina. Para Douradão, a ausência de prolina pode reduzir a formação de calos embriogênicos, mas o contrário acontece para cultivar BRS Soberana, na qual concentrações mais baixas ou ausência de prolina são mais favoráveis à formação de calos embriogênicos, enquanto concentrações altas minimizam este resultado.

Avaliando a influência da prolina na indução de calos e posteriormente a obtenção do número de calos embriogênicos após quatro semanas de crescimento dos calos em meio de indução, o aumento de calos não se correlaciona diretamente com o número de calos embriogênicos. Para BRS Soberana, por exemplo, embora 1,5 g/L e 2 g/L de prolina no meio tenham promovido alta indução de calos na quarta semana, sem diferenças significativas entre os demais tratamentos, o número de calos embriogênicos foi baixo, indicando que a prolina em altas concentrações pode ser prejudicial para a embriogênese. Já para Douradão, embora 0 g/L e 1 g/L de prolina não resultem em diferenças significativas para indução, esses níveis resultaram em menor número de calos embriogênicos. Portanto, a prolina pode influenciar tanto a indução quanto a qualidade dos calos, mas a resposta depende do tempo de desenvolvimento, da cultivar e da concentração utilizada.

A figura 8 apresenta as imagens obtidas para ilustrar as etapas de separação dos calos com características para potencial embriogênico daqueles não embriogênicos (Figura 8A) e individualização do calo embriogênico e estabelecimento em meio de regeneração (Figura 8B). Além disso, foi possível obter algumas imagens de microscopia óptica do embriogênico com estruturas características de embrião somático (Figura 8C), o embrião individualizado (Figura 8D) e desenvolvendo a radícula após três (Figura 8E) dias e após dez dias (Figura 8F).

Figura 8. Imagens obtidas da etapa de separação dos calos embriogênicos e não embriogênicos (A), calo embriogênico individualizado (B), imagem microscópica de calo embriogênico (C), embrião somático individualizado (D), desenvolvimento de radícula do embrião somático após três dias de desenvolvimento (E) o desenvolvimento de radícula do embrião somático após dez dias de desenvolvimento (F) para cultivar BRS Soberana.



3.2.3. Citometria de fluxo dos calos

Para verificar o conteúdo e o índice de DNA dos calos, foi realizada a citometria de fluxo em calos de explantes estabelecidos em meio de cultura MS com adição de diferentes concentrações de prolina para as cultivares de arroz BRS Soberana e Douradão, utilizando plantas já desenvolvidas em meio MS básico, sem adição de reguladores, como controle (figuras 9 e 10).

Figura 9. Gráficos das médias de conteúdo de DNA e índice de DNA para calos de explantes de arroz BRS Soberana induzidos em meio de cultura com 0 (T1), 0.5 g/L (T2), 1.0 g/L (T3), 1.5 g/L (T4) e 2.0 g/L (T5) de prolina e da planta desenvolvida em meio de cultura MS sem prolina e sem reguladores de crescimento (PSControl).

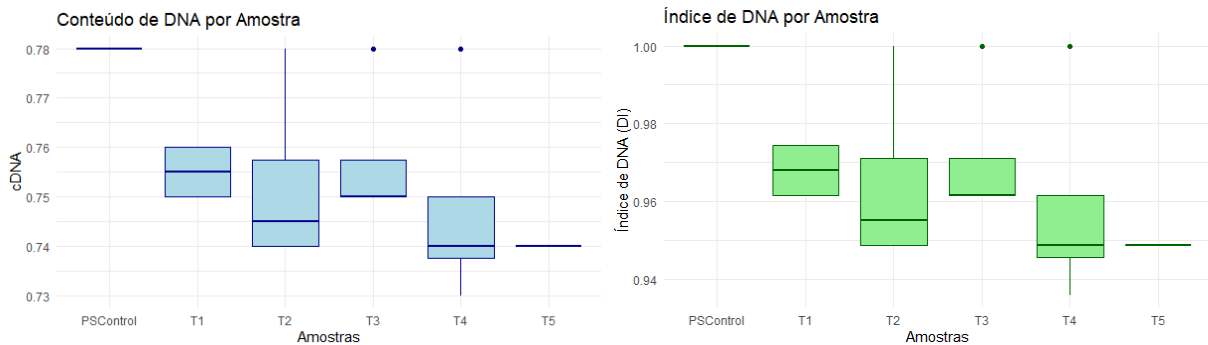
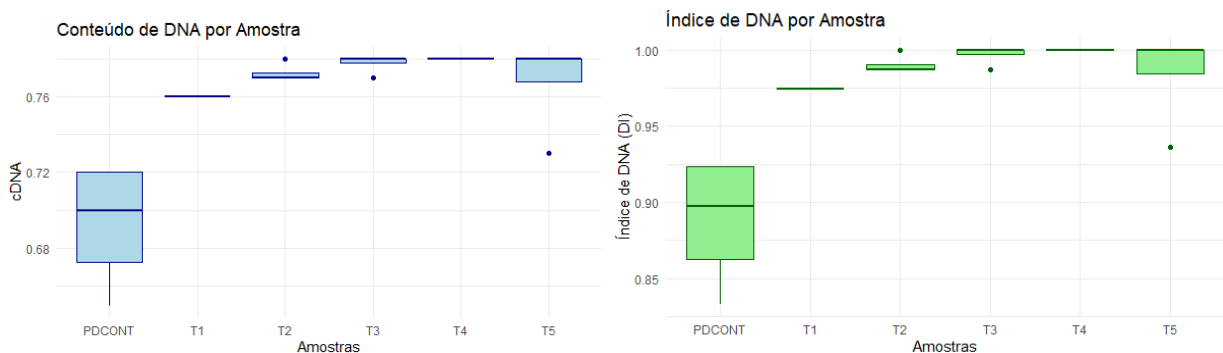


Figura 10. Gráficos das médias de conteúdo de DNA e índice de DNA para calos de explantes de arroz Douradão induzidos em meio de cultura com 0 (T1), 0.5 g/L (T2), 1.0 g/L (T3), 1.5 g/L (T4) e 2.0 g/L (T5) de prolina e da planta desenvolvida em meio de cultura MS sem prolina e sem reguladores de crescimento (PSControl).

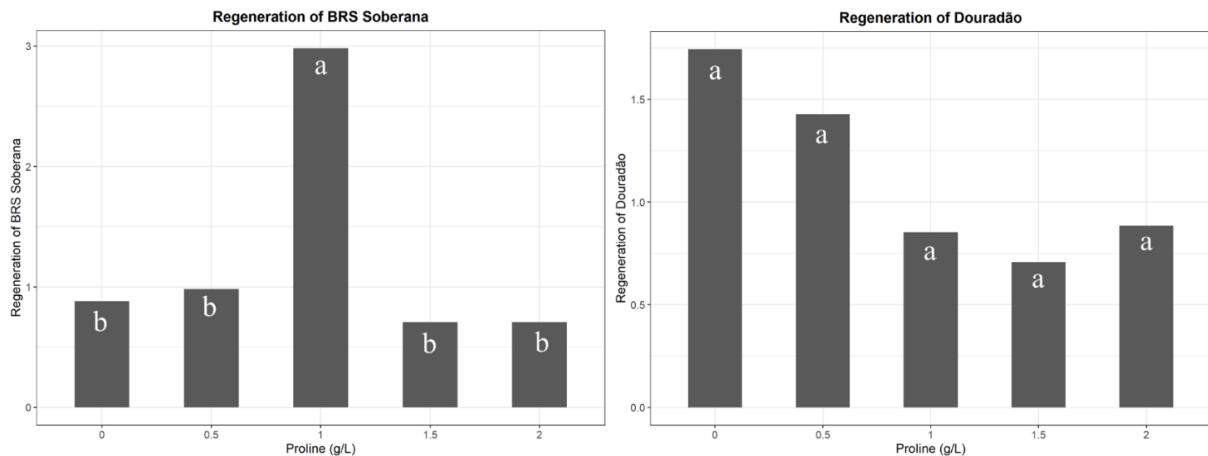


A média do conteúdo de DNA e o índice de DNA para os calos de explantes de arroz BRS Soberana e Douradão sob diferentes concentrações de prolina no meio de cultura podem ser observados nas figuras 11 e 12. Os controles apresentam o conteúdo de DNA de uma planta diplóide e todas as amostras observadas mostram valores próximos ao controle, sugerindo que esses tratamentos mantêm a diploidia com pouca ou nenhuma variação somaclonal. Os valores obtidos para o índice de DNA confirmam isso, pois todas as amostras apresentaram valores acima de 0.5 e próximos a 1, sugerindo que os calos são geneticamente estáveis em relação ao controle.

3.2.4. Regeneração de brotos

Os calos embriogênicos selecionados foram transferidos para o meio de cultura de regeneração para o desenvolvimento de brotos. Após sete semanas, os brotos foram contabilizados e os dados foram submetidos à análise de variância para a obtenção dos gráficos (Figura 11) e comparação das médias.

Figura 11. Gráficos do número de brotos regenerados de calos embriogênicos induzidos em meio de cultura contendo diferentes doses de prolina (0, 0.5 g/L, 1.0 g/L, 1.5 g/L e 2.0 g/L), após sete semanas de desenvolvimento em meio de regeneração, das cultivares de arroz BRS Soberana e Douradão.



Os dados observados para o número de brotos regenerados apresentaram valores iguais a zero em muitas observações, podendo causar problemas em modelos estatísticos. Para resolver esse problema a transformação logarítmica com valor mínimo (raiz quadrada de 0,5) foi realizada para a variável “Número de brotos regenerados” para evitar o logaritmo zero, com a finalidade de normalizar os dados. Dessa forma, a transformação aplicada visou garantir que as análises subsequentes fossem realizadas com dados adequadamente ajustados para os modelos estatísticos utilizados.

A transformação pode ser representada pela seguinte fórmula:

$$Brotos2 = \log(Brotos + \sqrt{0.5})$$

Os resultados para a cultivar BRS Soberana mostram que a concentração de 1 g/L de prolina em meio de indução teve efeito residual favorável no meio de regeneração, apresentando maior número de brotos. Esse resultado também indica que o conjunto da composição do meio de indução de calos contendo 1 g/L de prolina mais o meio de regeneração utilizado na fase seguinte foi

eficiente. Já para a cultivar Douradão, a quantidade de brotos regenerados foi baixa independente da concentração de prolina acrescentada ao meio de indução, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos.

3.2.5. Individualização e avaliação morfométrica dos brotos regenerados

Os brotos obtidos foram individualizados e transferidos para tubos contendo meio MS, acrescido de 30 g/L de sacarose e 6 g/L de ágar para que continuassem se desenvolvendo. Após 20 dias, foram feitas as avaliações morfométricas das plantas para efeito de comparação estatística.

Tabela 2. Tabela de médias de altura, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz, número de raiz e número de folhas dos brotos regenerados de calos induzidos em meio de cultura contendo diferentes concentrações de prolina (0, 0.5 g/L, 1.5 g/L e 2.0 g/L) das as cultivares BRS Soberana e Douradão, após vinte dias de desenvolvimento em meio MS.

Prolin e (g/L)	Comp. de PA		Comp. de raiz		Num. de raiz		Num. de folhas	
	Dour	BRS Sob	Dour	BRS Sob	Dour	BRS Sob	Dour	BRS Sob
0	10.20 a	7.93 b	3.47 a	4.27 a	4.00 a	4.00 a	2.00 a	2.00 a
0.5	7.59 a	14.23 a	1.87 a	2.53 a	4.00 a	4.00 a	3.00 a	3.00 a
1	11.20 a	13.42 a	1.93 a	2.29 a	3.00 a	4.00 a	2.00 a	3.00 a
2	3.90 b	NA	1.67 a	NA	5.00 a	NA	3.00 a	NA

O número de brotos regenerados dos tratamentos contendo 1,5 g/L e 2,0 g/L de prolina para BRS Soberana não foi suficiente para a avaliação estatística das características morfométricas. O mesmo aconteceu para o tratamento contendo 1,5 g/L de prolina para cultivar Douradão. Os dados de morfometria fornecem a análise quantitativa das diferenças das respostas das cultivares BRS Soberana e Douradão ao efeito residual das diferentes concentrações de prolina acrescentadas ao meio de indução.

A análise estatística mostra diferença significativa somente para o comprimento de parte aérea da planta de arroz tanto para BRS Soberana quanto para Douradão, mostrando menor comprimento de parte aérea para dose de 2,0 g/L de prolina para a cultivar Douradão e para dose 0 de prolina para a cultivar BRS Soberana. Para comprimento de raiz, número de raiz, e número de folhas, não houve diferença significativa entre os dados obtidos. Os resultados destacam que concentrações de prolina devem ser ajustadas de acordo com a cultivar e o objetivo.

3.2.6. Citometria de fluxo dos brotos regenerados

Para verificar a ocorrência de variação somaclonal das plantas regeneradas, foi realizada a citometria de fluxo para avaliar o conteúdo e o índice de DNA (Figura 12 e 13).

Figura 12. Gráficos das médias de conteúdo de DNA e Índice de DNA plantas regeneradas de calos de explantes de arroz BRS Soberana induzidos em meio de cultura com 1.0 g/L de prolina (T3) e da planta desenvolvida em meio de cultura MS sem prolina e sem reguladores de crescimento (PSControl).

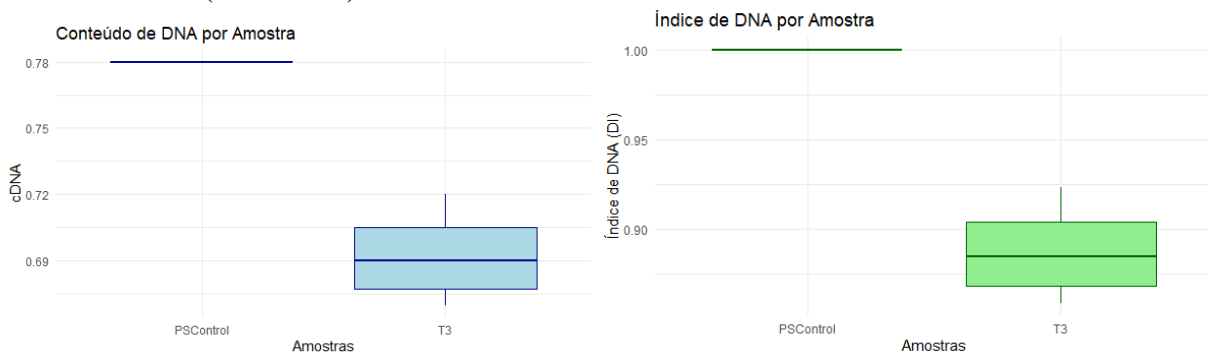
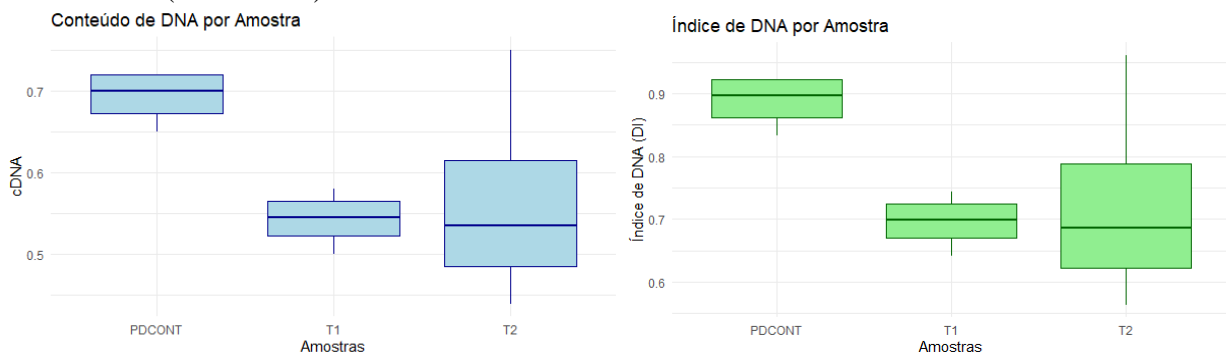


Figura 13. Gráficos das médias de conteúdo de DNA e Índice de DNA para plantas regeneradas de calos de explantes de arroz Douradão induzidos em meio de cultura com 0 (T1) e 0.5 g/L (T2) de prolina e da planta desenvolvida em meio de cultura MS sem prolina e sem reguladores de crescimento (PDCONT).



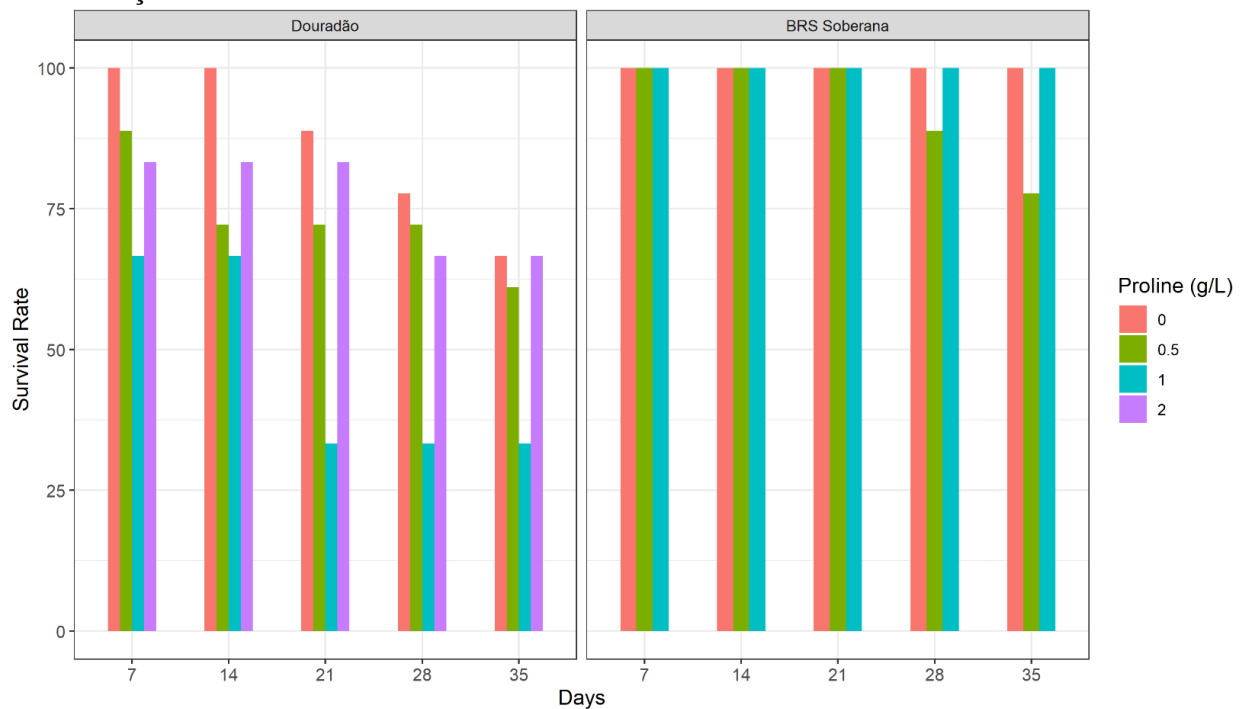
Os gráficos das figuras 12 e 13 apresentam a média do conteúdo de DNA e o índice de DNA para as plantas regeneradas de arroz BRS Soberana e Douradão sob diferentes concentrações de prolina no meio de cultura de indução dos calos. Os controles apresentam conteúdo de DNA de uma planta diploide. Para as amostras de plantas regeneradas de calos de explantes de BRS Soberana o conteúdo de DNA e o índice de DNA não apontam a possibilidade de variação genética, com valores próximos ao do controle e próximos a 1, respectivamente. Para as amostras de plantas regeneradas de Douradão, os valores de conteúdo de DNA são baixos em relação ao controle,

resultando em índice de DNA próximo de 0.5, podendo indicar variação somaclonal e/ou alteração na ploidia da planta, que deve ser melhor investigada.

3.2.7. Aclimatização dos brotos regenerados

Após avaliação morfométrica dos brotos, as plantas desenvolvidas *in vitro* foram, então, transferidas para vasos contendo substrato em casa de vegetação para a fase de aclimatização. A contagem das plantas sobreviventes foi realizada após 35 dias de desenvolvimento e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação das médias (Figura 14).

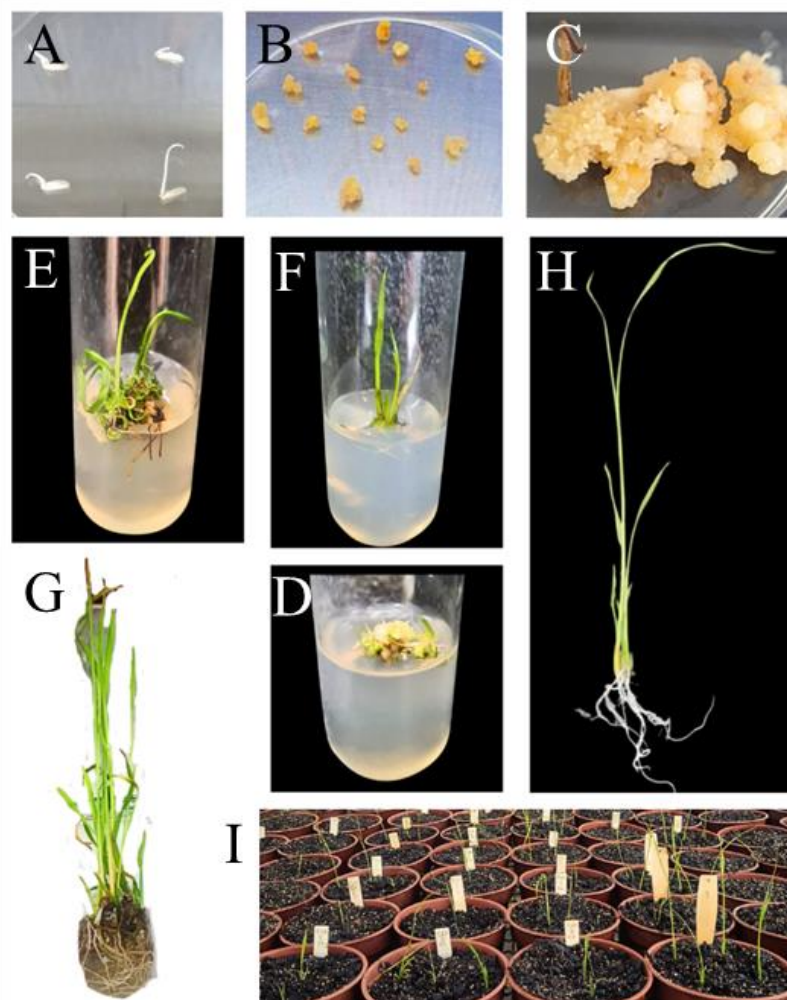
Figura 14: Gráficos de comparação de médias para taxa de sobrevivência à aclimatização das plantas regeneradas de calos induzidos em meio de cultura contendo diferentes concentrações de prolina (0, 0.5 g/L, 1.5 g/L e 2.0 g/L) das as cultivares BRS Soberana e Douradão, após 35 dias de aclimatização.



De acordo com os dados obtidos de taxa de sobrevivência na fase de aclimatização representados na figura 14, somente houve diferença significativa a partir do dia 21 de aclimatização para a dose de 1 g/L de prolina para a cultivar Douradão, resultando em menor taxa de sobrevivência. Por outro lado, a cultivar BRS Soberana manteve altas taxas de sobrevivência consistentes e elevadas durante todo o período de aclimatização, independentemente da dose de prolina utilizada no meio de indução.

A figura 15 ilustra o ciclo desde a indução de calos até a aclimatização de plantas de arroz BRS Soberana, representando as várias etapas desse processo importante para a cultura de tecidos vegetais realizadas no presente experimento.

Figura 15. Imagens das etapas de indução de calos à aclimatização de arroz cultivar BRS Soberana. A: sementes de arroz com crescimento da plúmula após uma semana de estabelecimento em meio de indução de calos; B: calos embriogênicos; C: calo embriogênico com estruturas características de embrião somático; D: início da regeneração em calos após 21 dias em meio de regeneração; E: Brotos regenerados após 35 dias de desenvolvimento em meio de regeneração; F: Broto individualizado após 49 dias de desenvolvimento em meio de regeneração; G: Enraizamento dos brotos após 20 dias de desenvolvimento; H: Broto individualizado para aclimatização e I: fase de aclimatização das plantas regeneradas em casa de vegetação.



Na primeira etapa, observou-se a protrusão da plúmula antes da indução dos calos (Figura 15A), em seguida, os calos com características embriogênicas foram individualizados (Figura 15B e 15C). O calo embriogênico é estabelecido em meio de regeneração (Figura 15D) para desenvolvimento de brotos (Figura 15E). Os brotos foram individualizados delicadamente para transferência para meio MS básico para desenvolverem raiz (Figura 15F). A regeneração de plantas foi conduzida de modo a gerar indivíduos completos (Figura 15G) que cresceram e se desenvolveram para que fossem levados à aclimatização (Figura 15H). Em seguida, foram transferidos para os vasos com substrato para a etapa final onde as plantas regeneradas, que estavam em condições controladas de laboratório, são gradualmente adaptadas a condições externas (Figura 15I).

3.3.Efeito de diferentes doses de Nitrogênio na produtividade de plantas aclimatizadas

3.3.1. Plantas aclimatizadas de cultivar BRS Soberana

As características agronômicas, como altura, número de perfilho, número de panículas, número total de grãos por planta, porcentagem de grãos estéreis, razão entre peso seco e peso fresco e índice de biomassa acumulada das plantas regeneradas de calos desenvolvidos em meio de cultura contendo $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de prolina e aclimatizadas com diferentes doses de nitrogênio (N) em casa de vegetação pode ser visualizada na Tabela 3.

Tabela 3. Tabela de médias das variáveis altura de planta (cm), número de perfilho, número de panículas, número total de grãos, porcentagem de grãos estéreis, razão entre peso fresco e peso seco e acúmulo de biomassa (%IBS) em diferentes doses de nitrogênio na aclimatização das plantas regeneradas de calos de BRS Soberana desenvolvidos em meio contendo 1,0 g/L de prolina.

Dose de N	Características Agronômicas						
	Altura	N perfilho	N panículas	N grãos	% grãos estéreis	PF/PS	IBS
0	76,00	5	5	115	41,03	3,40	29,53
1	83,83	6	6	131	54,09	3,53	28,54
2	76,00	6	6	135	55,90	3,65	27,42
3	72,50	5	5	104	62,31	3,69	27,36
4	72,33	6	6	105	74,13	3,67	27,26
CV (%)	15,93	48,37	49,10	72,59	39,21	8,8	8,25

As diferentes doses de nitrogênio não afetaram significativamente nenhuma das características avaliadas para a cultivar BRS Soberana.

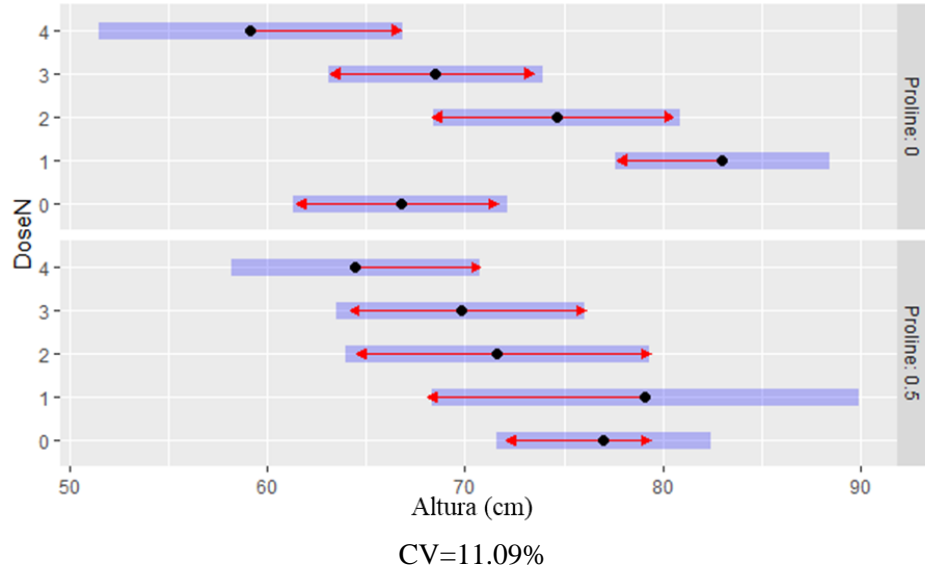
3.3.2. Plantas aclimatizadas de cultivar Douradão

Já para a cultivar Douradão avaliou-se o efeito das diferentes doses de nitrogênio em plantas aclimatizadas obtidas de calos induzidos em meio de cultura sem prolina ou contendo 0,5 g/L de prolina. Portanto, foi possível observar a interação significativa entre os fatores dose de nitrogênio e presença de prolina para as características: altura, número de panículas por planta, número total de grãos, PF/PS e IBS. Para as demais características (número de perfilhos e % de grãos estéreis) a interação não foi significativa, mas houve diferença estatística entre as médias avaliadas para cada fator isolado.

3.3.2.1. Altura de planta

Os dados obtidos para a cultivar Douradão para a variável altura de planta, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), e o gráfico de comparação de médias está representado na Figura 16.

Figura 16. Gráfico de comparação de médias da interação dos fatores dose de nitrogênio (0, 1, 2, 3 e 4) e concentração de prolina no meio de indução de calos (0 e 0.5g/L) para os dados de altura, das plantas regeneradas e aclimatizadas da cultivar Douradão.

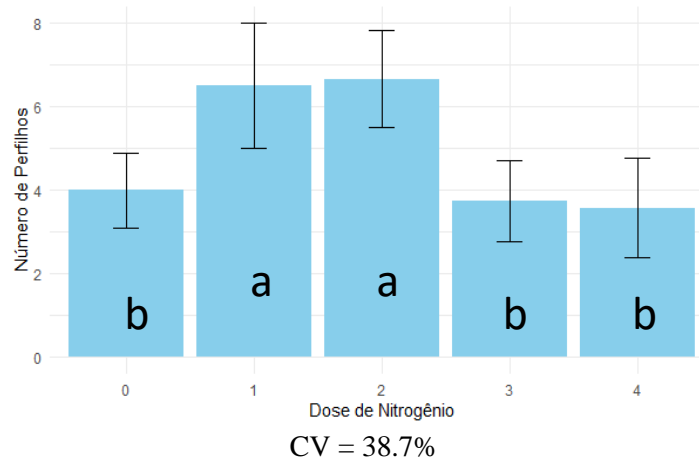


O gráfico representa a interação significativa entre os fatores dose de nitrogênio na aclimatização e concentração de prolina no meio de indução de calos para a característica altura de planta de arroz aclimatizada. Enquanto a maior média de altura foi atribuída às plantas aclimatizadas em dose 0 e 1 de N para plantas regeneradas de calos em meio com 0.5 g/L de prolina, sem prolina as plantas aclimatizadas em dose 1 de N apresentaram maior média. As menores médias foram encontradas para dose de N de 0 e 3 em plantas que vieram de meio de indução sem prolina, enquanto para as plantas que vieram de calos desenvolvidos em meio de indução com prolina, a menor média foi obtida para as plantas aclimatizadas em dose 4. Isso define a interação entre os fatores, onde existe a variação do efeito da adubação nitrogenada dependendo da concentração de prolina no meio de indução dos calos que regeneraram as plantas aclimatizadas.

3.3.2.2. Número de perfilhos

Os dados obtidos para o número médio de perfilhos por planta foi submetido a ANOVA e o resultado da comparação de médias está representado na figura 17.

Figura 17. Gráfico de comparação de médias obtidas para o número de perfilhos das plantas regeneradas e aclimatizadas, cultivar Douradão, sob diferentes doses de nitrogênio (0, 1, 2, 3 e 4).



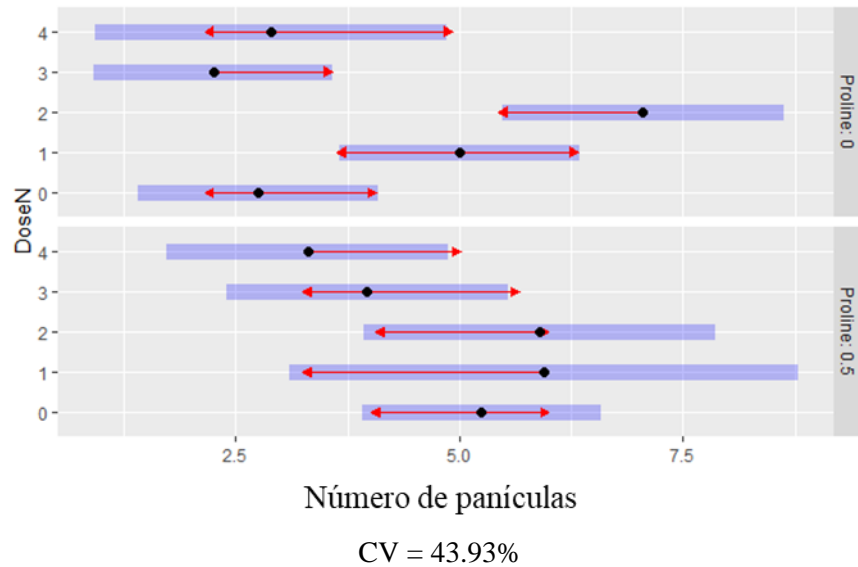
O gráfico da figura 17 mostra que o número de perfilhos varia com as doses de nitrogênio aplicada na aclimatização. As doses 1 e 2 apresentaram maiores médias, indicando que essas doses promovem maior perfilhamento das plantas. Já para as doses 0, 3 e 4, o perfilhamento foi menor, apresentando médias menores.

De acordo com a ANOVA (Anexo), a presença de prolina no meio de indução não influencia no número de perfilhos, não apresentando diferenças significativas entre as médias das plantas regeneradas e aclimatizadas. De acordo com a figura 17, a escolha da dose adequada de nitrogênio é essencial para otimizar o perfilhamento e, conseqüentemente, o potencial produtivo das plantas de arroz aclimatizadas. Observa-se que doses intermediárias de nitrogênio são mais favoráveis ao perfilhamento.

3.3.2.3. Número de panícula por planta

Os resultados para o número de panículas por planta de arroz da cultivar Douradão aclimatizadas em diferentes doses de nitrogênio, com e sem prolina no meio de indução de calos estão representados no gráfico da figura 18.

Figura 18. Gráfico de comparação de médias da interação dos fatores dose de nitrogênio (0, 1, 2, 3 e 4) e concentração de prolina no meio de indução de calos (0 e 0.5g/L) para os dados de número de panícula por planta regenerada e aclimatizada, cultivar Douradão.

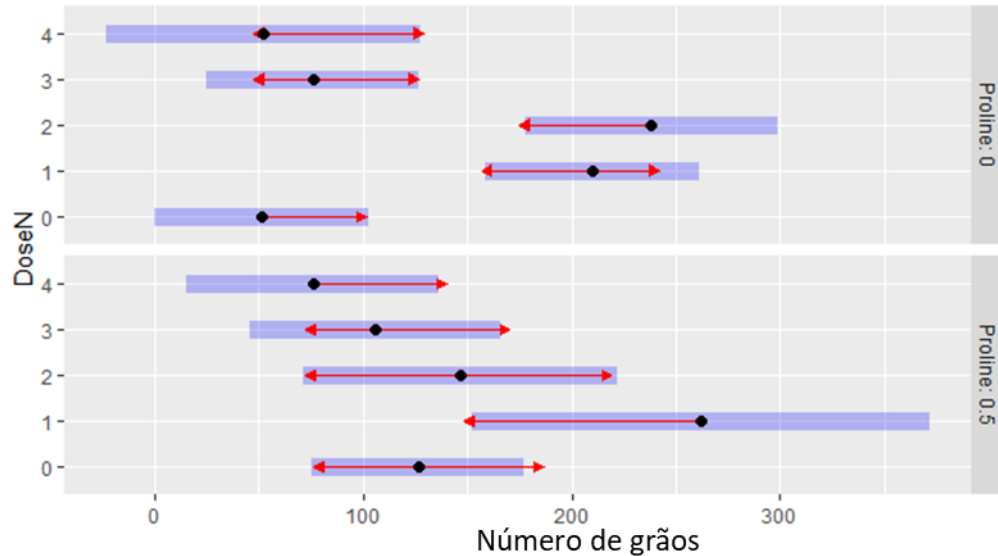


O gráfico mostra a interação significativa entre os dois fatores avaliados. Em meio sem prolina, o número médio de panículas foi menor para as doses de 0 e 3 de N, enquanto doses 1, 2 e 4 de N propiciaram maior número de panículas por planta. Já para as plantas regeneradas de calos desenvolvidos em meio de indução com 0,5g/L de prolina, a dose 2 apresentou médias menores e as doses 0, 1, 3 e 4 apresentaram maiores médias para número de panículas. A prolina acrescentada ao meio de indução foi favorável para maximizar o número de panículas em plantas aclimatizadas sem adubação nitrogenada ou adubadas com as doses 1 e 3, a dose 4 apresentou menores médias tanto para plantas regeneradas de calos induzidos em meio sem prolina quanto para aquelas regeneradas de calos induzidos em meio com prolina.

3.3.2.4. Número total de grãos por planta

Os resultados da comparação de médias para o número de grãos por planta, cultivar Douradão, aclimatizadas e adubadas com diferentes doses de nitrogênio, com e sem prolina no meio de indução de calos, estão representados no gráfico da figura 19.

Figura 19. Gráfico de comparação de médias da interação dos fatores dose de nitrogênio (0, 1, 2, 3 e 4) e concentração de prolina no meio de indução de calos (0 e 0.5g/L) para os dados de número de grãos por planta regenerada e aclimatizada, cultivar Douradão.



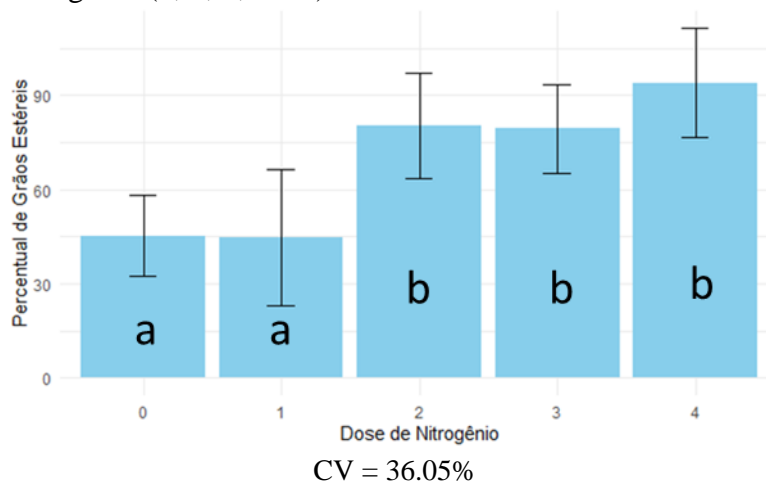
CV = 63.58%

Em meio de indução sem prolina, as plantas regeneradas e aclimatizadas apresentaram produção baixa de grãos quando submetidas à dose 0, 3 e 4 de nitrogênio na adubação, com aumento significativo da produção quando adubados com as doses 1 e 2. Já para o meio com 0,5 g/L de prolina na indução dos calos, a maior produção de grãos foi ocasionada pela adubação com a dose 1 de nitrogênio. Para o efeito do nitrogênio em relação a ausência ou presença de prolina no meio de indução, as doses 0, 1 e 4 apresentaram menor produção de grãos em plantas regeneradas de calos induzidos em meio de cultura sem prolina, enquanto para a dose 2 o meio com prolina na indução de calos proporcionou menor média de número de grãos em plantas aclimatizadas.

3.3.2.5. Esterilidade (%)

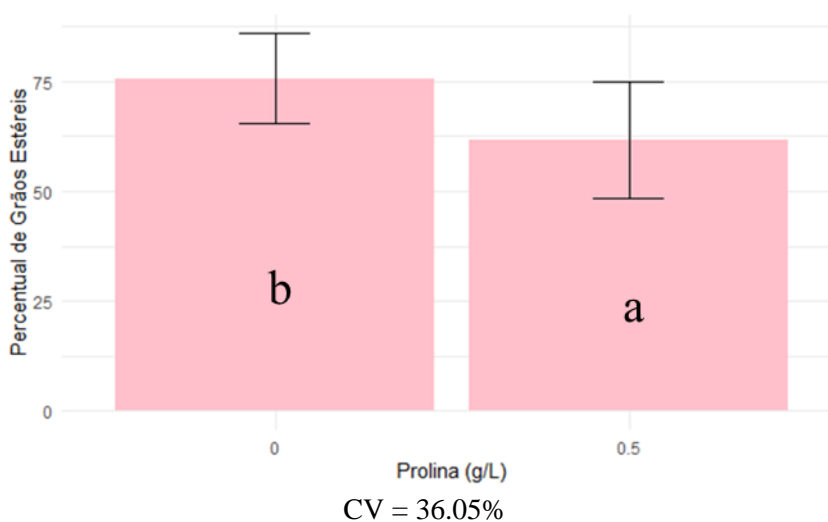
As comparações das médias para porcentagem de grãos estéreis em plantas regeneradas de calos induzidos em meio de cultura com e sem prolina e aclimatizadas em diferentes doses de nitrogênio estão representadas pelos gráficos das figuras 20 e 21, para o fator dose de nitrogênio e concentração de prolina respectivamente.

Figura 20. Gráfico de comparação de médias obtidas para porcentagem de grãos estéreis das plantas regeneradas e aclimatizadas, cultivar Douradão, sob diferentes doses de nitrogênio (0, 1, 2, 3 e 4).



O gráfico da figura 20 mostra o aumento da esterilidade de grãos a medida que a dose de nitrogênio aumenta na adubação de plantas de arroz aclimatizadas, indicando que as doses 0 e 1 de N é mais eficaz no enchimento de grãos na aclimatização de plantas regeneradas de calos, por causarem baixa esterilidade de grãos na cultivar Douradão.

Figura 21. Gráfico de comparação de médias obtidas para a porcentagem de grãos estéreis das plantas regeneradas de calos desenvolvidos em meio de cultura contendo 0 e 0.5g/L de prolina, cultivar Douradão.



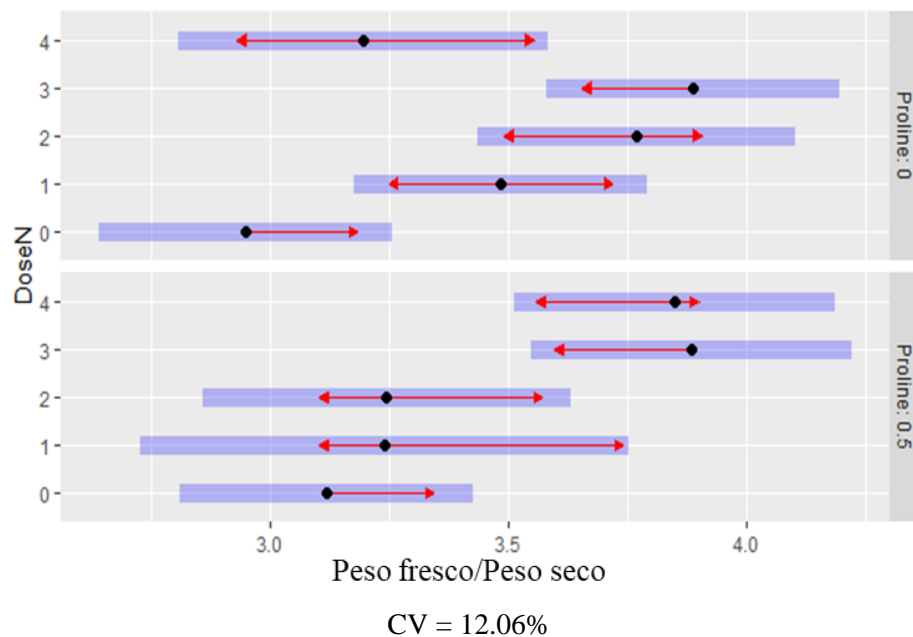
Os resultados apresentados pelo gráfico da figura 21 indicam que o efeito residual da prolina pode ser eficaz para propiciar menor esterilidade na aclimatização de plantas regeneradas.

Observa-se que a prolina pode compensar o efeito negativo de doses mais altas de nitrogênio na adubação das plantas aclimatizadas pois reduz o percentual de esterilidade em qualquer dose aplicada e a ausência do efeito residual da prolina acentua os efeitos negativos do manejo inadequado de nitrogênio.

3.3.2.6. Razão entre peso fresco e peso seco (PF/PS)

A comparação das médias da razão entre peso fresco e peso seco de plantas regeneradas de calos induzidos em meio com e sem prolina, aclimatizadas sob diferentes doses de nitrogênio estão representadas pelo gráfico da figura 22.

Figura 22. Gráfico de comparação de médias da interação dos fatores dose de nitrogênio (0, 1, 2, 3 e 4) e concentração de prolina no meio de indução de calos (0 e 0.5g/L) para os dados de razão entre peso seco e peso fresco das plantas regeneradas e aclimatizadas, cultivar Douradão.

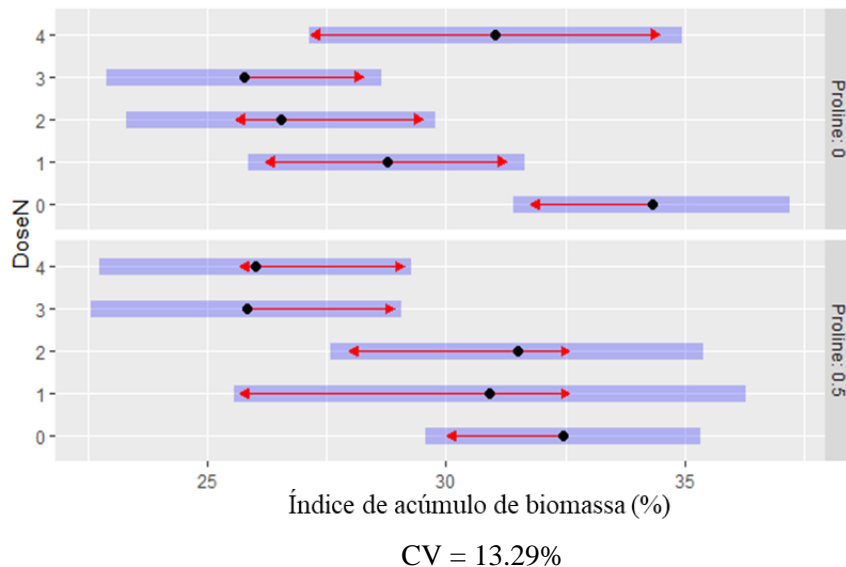


O gráfico representa a interação entre os fatores onde o efeito da dose de nitrogênio aplicada na aclimatização depende da concentração de prolina adicionada ao meio de cultura de indução dos calos de onde as plantas aclimatizadas se regeneraram. Para os tratamentos sem prolina, as plantas adubadas com doses 0 e 4 apresentaram menor acúmulo de água, enquanto para os tratamentos com prolina, a dose 0 ocasionou menor acúmulo, com maior acúmulo de água nas doses 3 e 4.

3.3.2.7. Acúmulo de biomassa (IBS)

A figura 23 mostra o gráfico de comparação de médias da interação dos fatores para o índice de acúmulo de biomassa (IBS) das plantas regeneradas de calos induzidos em meio sem e com 0,5g/L de prolina, aclimatizadas sob diferentes doses de nitrogênio.

Figura 23. Gráfico de comparação de médias da interação dos fatores dose de nitrogênio (0, 1, 2, 3 e 4) e concentração de prolina no meio de indução de calos (0 e 0.5g/L) para os dados de acúmulo de biomassa (%) das plantas regeneradas e aclimatizadas, cultivar Douradão.



Observa-se pelo gráfico que as plantas regeneradas de calos induzidos em meio de cultura com prolina, submetidas às doses 0, 1 e 2 de nitrogênio na aclimatização, acumularam mais biomassa que as demais plantas sob as doses 3 e 4 de nitrogênio. Já para as plantas regeneradas de calos induzidos em meio de cultura sem prolina, sentiram mais o efeito das diferentes doses de nitrogênio na aclimatização, apresentando maior acúmulo de biomassa na dose 0 e menor acúmulo nas doses 2 e 3. Para a dose 2, o efeito residual da prolina proporcionou maior acúmulo de massa e para a dose 4, o acúmulo foi maior em plantas regeneradas de calos induzidos em meio de cultura sem prolina.

4. DISCUSSÃO

4.1. Curva de crescimento de calos das cultivares de arroz elite Douradão e Soberana em meio MS.

O crescimento de calos é um parâmetro fundamental na cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Diversas pesquisas são realizadas a fim de identificar fatores que influenciam na indução de calos em arroz, como composição do meio, características genéticas, concentração e qualidade de reguladores de crescimento, entre outros (BINTE MOSTAFIZ and WAGIRAN, 2018). Em estudos preliminares a este, foi realizado o experimento para avaliar a indução de calos em diferentes composições de meio de cultura para quatro cultivares de arroz, incluindo BRS Soberana e Douradão, Os resultados mostram que o meio MS contendo 0.3 g L^{-1} de caseína hidrolisada $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de prolina, 3 g L^{-1} de 2,4D, 30 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar foi eficiente para a indução de calos em sementes de arroz mantidas em ambiente com ausência de luz.

Entender o comportamento do crescimento dos calos de sementes de arroz em meio MS é importante para identificar as fases características da curva de crescimento biológico e determinar o período ideal de transferência para fases subsequentes à indução de calos. Na curva de crescimento de calos, a fase de Latência (Lag Phase) é o período inicial em que o peso dos calos aumenta lentamente. Os calos estão se adaptando às condições ambientais e metabólicas, com atividade de crescimento reduzida. Nesta fase, as células dos explantes sofrem desdiferenciação e se aclimatizam ao meio de cultura, com absorção inicial de nutrientes e respostas hormonais (BOJKO et al., 2024).

O período pode variar dependendo do tipo de explante, composição do meio e condições do ambiente. Já a Fase Logarítmica (Log Phase) é o período de crescimento acelerado e constante, com taxa de crescimento próxima ao máximo. Essa fase é crucial para o crescimento, marcada por alta atividade metabólica, divisão celular e acúmulo de biomassa. Por fim, a Fase Estacionária (Plateau Phase) é o período em que o crescimento desacelera e atinge o platô, com peso dos calos se estabilizando em torno do valor máximo. O ambiente ou recursos disponíveis limitam o crescimento adicional, e o metabolismo se equilibra com a manutenção celular (BOJKO et al., 2024).

As fases típicas da curva de crescimento estão diretamente relacionadas ao genótipo da espécie (CARVALHO FILHO et al., 2023; SILVA et al., 2021) e é possível observar diferentes

aspectos entre o comportamento do crescimento de calos das cultivares de arroz de terras altas BRS Soberana e Douradão. De acordo com os dados, a taxa de crescimento para BRS Soberana foi maior que para Douradão, indicando que ela possui maior eficiência metabólica e melhor resposta ao meio de indução de calos.

A cultivar BRS Soberana também apresentou maior peso máximo dos calos, indicando que o meio de indução sustenta mais o crescimento dos seus calos em comparação aos da cultivar Douradão. Além disso, de acordo com o período em que as cultivares demarcam suas fases, a cultivar BRS Soberana pode se destacar como mais vigorosa, por ter a fase lag mais curta e atingir a fase de estabilização duas semanas mais tarde que a cultivar Douradão. Essas diferenças no comportamento dos calos em meio de indução podem ser influenciadas pelas características genéticas e metabólicas de cada cultivar e às respostas aos reguladores de crescimento (LI et al., 2021).

As características morfológicas dos calos, incluindo cor e textura são importantes parâmetros para obter previsões de sua habilidade regenerativa. Os calos com coloração mais esbranquiçada são preferencialmente escolhidos para regeneração de plantas (SHARMA et al., 2026). A partir da fase estacionária os calos começam a apresentar coloração bege escura/marrom, indicando o início da oxidação das células (VIJAYALAKSHMI; SHOURIE, 2016). As características observadas nas curvas de crescimento podem ser usadas para ajustar protocolos de embriogênese e regeneração, e selecionar cultivares mais eficientes para indução de calos e regeneração de plantas, com maior biomassa e resposta ao meio de cultura para estudos de transformação genética e desenvolvimento de linhagens melhoradas.

Diante disso, é possível prever o período de transferência dos calos embriogênicos de meio de indução para o meio de regeneração. De acordo com estudos realizados por Yue et al. (2022) mostram que em *Agapanthus praecox* esta transferência deve ser realizada durante a fase Lag, pois as rotas metabólicas e os sinais hormonais desencadeados durante esta fase é crucial para a transição das células com potencial embriogênico. Além disso, estudos demonstram que reguladores de crescimento específicos e composição nutritiva do meio durante a fase lag de crescimento dos calos, podem propiciar o aumento do potencial embriogênico das células, como demonstrado com a espécie de gabioba, *Campomanesia adamantium*, em estudos realizados por Rossato et al. (2019).

É importante mencionar que em estudos realizados com a espécie do algodão foi observado que a expressão dos genes durante a fase Lag está relacionada ao potencial embriogênico das células (WEN et al., 2020), portanto, o presente estudo adequou o momento de transição do meio de indução de calos para o meio de regeneração à quarta semana de crescimento, antes de iniciar o crescimento rápido da fase log, garantindo que os recursos do meio de regeneração sejam direcionados para a regeneração das plantas ao invés de sustentar o crescimento de massa celular desnecessário. Esse manejo otimiza a eficiência do processo e aumenta a probabilidade de regeneração bem-sucedida.

4.2. Influência do nível de prolina na indução de calos embriogênicos, regeneração de plantas e aclimatização de arroz BRS Soberana e Douradão

O tempo é um fator crucial para o aumento da percentagem de calos e as cultivares reagem de forma distintas ao efeito da prolina, reforçando a genótipo-dependência existente na maioria dos estudos realizados em cultura de tecidos vegetais. Pawar et al. (2015) concluiu que a prolina aumenta significativamente a indução dos calos em arroz e subsequente regeneração de brotos em meio de cultura MS contendo 2.0 mg/L de 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), prolina na concentração de 0.5 g/L e 0.5 g/L de glutamina, em quatro genótipos de arroz. A prolina pode ter o papel de proteção contra estresse que pode favorecer o crescimento e desenvolvimento de massa de células (ADRESS et al., 2024), no entanto, no presente estudo, a prolina não se destacou como eficiente no aumento da porcentagem de calos, mas foi possível observar seu efeito residual nas etapas subsequentes.

Para a fase de regeneração de brotos, é fundamental que os calos embriogênicos sejam individualizados e transferidos para o meio de regeneração. É possível diferenciá-los por suas características morfológicas, como coloração bege clara, esféricos, com diâmetro aproximado de 0.5 mm e compactos, enquanto os calos não embriogênicos desmancham em pequenos aglomerados de células com mucilagem característica, de coloração bege (SAKR and SAYED, 2018). A histologia das células embriogênicas são caracterizadas como globulares com citoplasma denso e núcleo evidente, indicando alta divisão celular (IJAZ et al., 2019). As características observadas para as amostras de calos de explantes de BRS Soberana e Douradão corroboram com esses autores.

A análise citoquímica também é uma ferramenta fundamental para diferenciar células com potencial embriogênico daquelas sem potencial embriogênico, utilizando os corantes Carmim Acético e Azul de Evans para colorir as células reagentes (LOPES, et al., 2016). Para a avaliação realizada no presente estudo, a presença de células embriogênicas é confirmada pela reação ao carmim acético, o que é um resultado favorável para o sucesso na fase de regeneração de plantas.

A quantidade de calos embriogênicos obtidos em explantes de arroz pode variar dependendo do tipo de explante e reguladores de crescimento utilizados, além de variar de acordo com o genótipo. Akay e Kurt (2018), obtiveram um total 4049 calos embriogênicos em sete tipos de explantes de seis cultivares de arroz, uma média de 19 calos embriogênicos por explante em meio nutritivo LS contendo 2.5 mg/L de 2,4D, 3% de açúcar, 0.76% de ágar (pH 5.8). Os resultados obtidos no presente estudo apresentaram média de 15 calos embriogênicos por tratamento utilizando a semente madura como explante, considerando o meio com maior número médio de calos embriogênicos, aproximando dos resultados obtidos por Akay e Kurt (2018).

A diferenciação de células vegetais básicas em células não embriogênicas ou embriogênicas é influenciada por diversos fatores como sinais internos e regulação hormonal (GODEL-JEDRYCHOWSKA et al., 2020). Por isso, mesmo com um bom protocolo para indução de calos, com obtenção de grande massa de células, a diferenciação para calos embriogênicos pode não acontecer se estas células não receberem os sinais necessários. Apesar das diversas pesquisas na área, as rotas metabólicas e fatores genéticos são complexos e desconhecidos, por isso pesquisas para otimizar os protocolos de indução de calos embriogênicos para cada genótipo são importantes, a fim de possibilitar a transformação genética em espécies de interesse. O resultado obtido no presente experimento indica que a prolina exerce papel específico na embriogênese somática, mas que a resposta é genótipo dependente, ressaltando essa a importância de otimizar as condições para cada cultivar.

Com tantas manipulações no meio de cultura e ambiente de crescimento e desenvolvimento dos explantes, a cultura de tecidos pode ocasionar a variação somaclonal das espécies, ou seja, a instabilidade genética, criando mutações no DNA que podem ser desejáveis ou não dependendo do objetivo da pesquisa (NÚÑEZ-PESTRANA et al., 2023). Nesse sentido, a citometria de fluxo é uma ferramenta que avalia a estabilidade genética das células e, no presente estudo, complementa a análise citoquímica, a fim de quantificar o conteúdo de DNA em células de calos embriogênicos, detectando variações na ploidia e garantindo que não ocorram mutações indesejadas.

A análise de citometria de fluxo apresentou somente um pico nos histogramas de todas as amostras, caracterizando as células como diploides, seguindo a mesma ploidia da planta controle. No entanto, é comum acontecer o fenômeno da endoreduplicação em calos com potencial embriogênico, apresentando valores múltiplos de ploidia como tetraploide ou octaploide, como observado por Lopes et al. (2016) em calos de pitaia. A estabilidade genética encontrada no presente estudo é interessante para o melhoramento vegetal, evitando perda de características de interesse da planta matriz pela mutação indesejável.

Assim como para a indução de calos, diversas variáveis influenciam a regeneração de brotos em calos embriogênicos, incluindo a combinação do meio de indução e o meio de regeneração, podendo apresentar efeitos residuais dos compostos adicionados à fase anterior. Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a prolina adicionada na fase de indução de calos parece ter desempenhado papel crucial na formação inicial dos calos embriogênicos, influenciando sua qualidade e potencial regenerativo.

Mesmo após a transferência para o meio de regeneração sem prolina, os efeitos da prolina aplicada anteriormente persistiram. Além disso, ainda houve resposta genótipo-específica em relação às concentrações de prolina no meio de indução. Os resultados do presente estudo mostram que a prolina adicionada ao meio de indução influencia na regeneração dos brotos de forma diferenciada para cada cultivar, o que demonstra seu efeito residual e genótipo-específico. A prolina tem papel fundamental na tolerância a estresses abióticos como estresse hídrico, salinidade e temperatura o que pode auxiliar indiretamente a regeneração das plantas, já que ao serem transferidas de um meio de cultura para outro as células são forçadas a mudarem a rota metabólica para se diferenciarem em novos indivíduos (HOSSEINIFARD et al., 2022).

É importante destacar que os resultados obtidos de número de calos embriogênicos foram altos nos tratamentos com 0, 0.5 g/L e 1.0 g/L de prolina para BRS Soberana mas a taxa de número de brotos regenerados foi considerada alta somente para os calos que se desenvolveram em meio contendo 1.0 g/L de prolina. Assim como para cultivar Douradão, mesmo obtendo numerosos calos embriogênicos, a taxa de regeneração foi baixa independente da concentração de prolina acrescida ao meio de indução na etapa anterior. Isso sugere que, embora o processo inicial de indução tenha sido eficiente em produzir células com potencial embriogênico, algo nas etapas subsequentes limitou o desenvolvimento dessas células para regenerar novas plantas. No caso da cultivar Douradão, houve incompatibilidade entre o meio de indução, em qualquer dose de prolina utilizada,

e o meio de regeneração, ao ponto que, para a cultivar BRS Soberana, ocorreu compatibilidade entre as duas fases quando na primeira adicionou-se 1.0 g/L de prolina.

O uso de meio de regeneração sem prolina permite isolar os efeitos das concentrações aplicadas na fase inicial. Portanto, os resultados obtidos refletem diretamente o impacto da prolina na fase de indução e destacam sua relevância para o sucesso das etapas posteriores, mostrando que a prolina na fase de indução de calos reflete o efeito significativo sobre o potencial de regeneração de plantas, mesmo após sua remoção na fase de regeneração. A dose ótima varia entre genótipos, reforçando a necessidade de protocolos específicos para cada cultivar.

Os resultados para a influência da prolina adicionada ao meio de indução de calos na aclimatização dos brotos que regeneraram desses calos também indicam seu efeito residual. A prolina fica acumulada nas células e protegem os indivíduos regenerados contra estresses abióticos (KOÇ and KARAYIGIT, 2023) e, considerando que a fase de aclimatização é um processo de adaptação das plantas *in vitro* ao ambiente *ex vitro*, os estresses são inevitáveis. No entanto, o excesso de prolina pode ser prejudicial ao desenvolvimento das plantas (KEYGHOBAD et al., 2014). Os resultados obtidos para a cultivar BRS Soberana, concordam com os estudos de Keyghobad et al. (2024) ao demonstrar que o número de brotos regenerados em calos que vieram do meio de indução com concentrações mais altas de prolina foi muito baixo. Mas para cultivar Douradão os efeitos da alta concentração de prolina no meio de indução não desfavoreceu o desenvolvimento de brotos, sendo um efeito variável dependendo do genótipo estudado.

Assim como nos calos, as plantas regeneradas também podem sofrer variação no seu conteúdo de DNA sendo algo comum de acontecer. A citometria de fluxo foi eficiente para mensurar o conteúdo de DNA de plantas regeneradas de arroz, as quais não apresentaram variação genética significativa entre o arroz selvagem e arroz indica cv IR36 regeneradas *in vitro* (KRISHNAN et al., 2013). Da mesma forma, o presente estudo não apresentou variação somaclonal significativa para a cultivar BRS Soberana. Além disso, os resultados reforçam a afirmação de Rahimi et al., 2023, de que citometria de fluxo é uma técnica eficiente para analisar a manutenção da estabilidade do DNA em plantas regeneradas de arroz, contribuindo para a obtenção de plantas geneticamente modificadas com uniformidade genética.

O resultado da taxa de sobrevivência à aclimatização obtido no presente estudo sugere que os brotos regenerados da cultivar BRS Soberana apresentaram mais resiliência e capacidade de adaptação às condições *ex vitro*, o que pode indicar maior estabilidade no ambiente *in vitro*, no

qual também apresentou plantas regeneradas mais vigorosas. Pesquisas apontam que protocolos e condições específicas *in vitro* podem aumentar a estabilidade e o vigor das plantas na aclimatização, levando a melhores taxa de sobrevivência e desempenho durante essa transição (BABANINA et al., 2023). Além disso, a resiliência e adaptabilidade das plantas às condições *ex vitro* são fundamentais para o sucesso da micropropagação e subsequente estabelecimento em ambientes naturais (BELANOVA et al., 2024).

O presente estudo foi promissor na obtenção de resultados significativos em cada etapa da cultura de tecidos vegetais, desde a indução de calos até a aclimatização de plantas vigorosas das cultivares BRS Soberana e Douradão. É importante destacar que foi observada a protrusão de plúmula na fase de indução de calos, antes da formação de massa de células básicas desorganizadas e, até mesmo, antes da protrusão radicular, evento primário na germinação do arroz (ZHU et al., 2024). No entanto, a indução de calos no arroz é significativamente influenciada pela presença da plúmula e pela ausência da radícula e a pesquisa clássica sobre indução de calos em sementes de arroz de Nishimura e Maeda (1977) indica que a plúmula é essencial para as interações fisiológicas que levam a formação de calos no arroz, mostrando que quando os tecidos da plúmula e do mesocótilo são cultivados, o tecido caloso é produzido e quando os tecidos mesocótilo e radicular são cultivados sem a plúmula, eles não produzem calos, enfatizando ainda mais a importância da plúmula.

As fases de indução de calos, regeneração de plantas e aclimatização são críticas na cultura de tecidos vegetais, servindo como etapas fundamentais para propagação *in vitro* bem-sucedida. Ao chegar à etapa de aclimatização, é essencial que as condições oferecidas melhorem a sobrevivência e o crescimento das plantas, exigindo um gerenciamento cuidadoso dos fatores ambientais e nutricionais. Algumas espécies podem apresentar altas taxas de mortalidade durante esta fase, necessitando de pesquisas contínuas para otimizar os protocolos de aclimatação e melhorar os resultados de sobrevivência (IRSYADI, 2021).

4.3.Efeito de diferentes doses de Nitrogênio na produtividade de plantas aclimatizadas

O arroz é uma espécie com alta exigência em diversos nutrientes e é importante que eles estejam disponíveis no momento certo para garantir boa produtividade. O nitrogênio tem efeito significativo em plantas de arroz, influenciando diversos parâmetros de crescimento e desenvolvimento. Pesquisas apontam que a aplicação de doses ideais de nitrogênio pode otimizar

a produtividade, mas o excesso pode ser prejudicial (Jiang et al., 2024). Em estudos realizados por Ravshanov et al. (2022), a dose de 150 kg/ha foi ruim para o rendimento e a qualidade das plantas de arroz.

As recomendações gerais indicadas por estudos recentes sugerem a aplicação entre 100 a 120 kg/ha de nitrogênio, a fim de aumentar a produtividade sem afetar a saúde da planta e qualidade dos grãos (SINGH et al., 2023). De acordo com Falahi et al. (2024), dependendo da dose de nitrogênio aplicada à planta, a produção de grãos e altura da planta podem ser afetadas (FALAHİ et al., 2024). Em pesquisa realizada por Ogoshi et al. (2020), utilizando doses crescentes de nitrogênio (0, 60, 120 e 180 kg/ha) para avaliar seu efeito quanto a severidade da brusone, a nutrição do tecido vegetal e qualidade dos grãos concluíram que níveis maiores que 60 kg/ha pode aumentar a severidade da doença, enquanto níveis mais baixos são prejudiciais para a produtividade e qualidade dos grãos.

Em plantas aclimatizadas, o nitrogênio é essencial para influenciar os processos fisiológicos relacionados às respostas das plantas aos estressores ambientais (ROCHA et al., 2019). Portanto, é importante entender os efeitos das doses de nitrogênio na aclimatização de plantas regeneradas, para obter a dose ideal que maximize o rendimento, crescimento e qualidade da planta.

O presente estudo revelou que a dose de nitrogênio não afeta significativamente nenhuma das características avaliadas para a aclimatização das plantas regeneradas de cultivar BRS Soberana, no entanto foram observadas diferenças significativas para os dados de cada característica avaliada para plantas aclimatizadas da cultivar Douradão. É importante observar que nas avaliações das características altura, número de panícula, número total de grãos, razão entre peso seco e peso fresco e índice de acúmulo de biomassa a interação entre os fatores dose de nitrogênio e concentração de prolina no meio de indução de calos foi significativa.

Como já discutido anteriormente, a prolina tem papel no aumento da tolerância ao estresse em plantas, seu uso tem proporcionado bons resultados em diferentes culturas (KOÇ et al., 2024). No presente estudo é observado a ação benéfica da prolina em plantas regeneradas e aclimatizadas quando submetidas à doses de nitrogênio que resultam em menor eficiência nas características avaliadas das plantas que não foram submetidas às doses de prolina no meio de indução de calos, o que é justificado pela sua ação protetora contra estresse.

O presente estudo revelou que as doses de 60 e 120 kg/ha proporcionam maior número de panícula, maior número de perfilho e maior número de grãos, ocasionando em maior produtividade

das plantas aclimatizadas, a dose de 60 kg/ha também ocasionou menor porcentagem de grãos estéreis. Esses resultados podem colaborar com a sugestão de estudos recentes de aplicação em torno de 90 kg/ha de nitrogênio, resultando em bons parâmetros de crescimento e produtividade (KUMAR et al., 2023; HOSSAIN et al., 2022).

De acordo com os resultados obtidos para produção de matéria seca, avaliados pela razão entre peso fresco e peso seco e índice de acúmulo de biomassa, as doses mais altas também proporcionaram maiores médias, revelando que níveis mais altos de nitrogênio podem melhorar o acúmulo de matéria seca. Estudos realizados por Ajmal et al. (2024) mostram que a aplicação de 125% da dose recomendada de nitrogênio proporcionou maior absorção de nutrientes e, conseqüentemente, maior acúmulo de biomassa. Além disso, o presente estudo concorda com os resultados de pesquisas que indicam que o aumento da taxa de aplicação de nitrogênio se correlaciona com o maior acúmulo de matéria seca (MA et al., 2023).

5. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem uma metodologia para indução de calos, regeneração de plantas e aclimatização de plantas regeneradas das cultivares BRS Soberana e Douradão.

Para a cultivar BRS Soberana sugere-se a indução de calos em meio MS suplementado com 0,3 g L⁻¹ de caseína hidrolisada 1,0 g L⁻¹ de prolina, 3 g L⁻¹ de 2,4D, 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, pH ajustado para 5,7 por quatro semanas em ambiente totalmente escuro, posterior regeneração em meio MS acrescido de 1 mg L⁻¹ de ANA, 2,5 mg L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7, em ambiente de 16h de fotoperíodo, individualização dos brotos após sete semana e subcultivo em meio de cultura MS contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7 para desenvolvimento de raiz e após 20 dias, transferir para aclimatização em vaso contendo substrato e realizar a adubação nitrogenada entre 60 a 120 kg/ha dividida em duas etapas, a primeira com 67% da dose total aplicadas em estágio V3 e a segunda com 33% da dose aplicada na fase reprodutiva de emborrachamento.

Para a cultivar Douradão, os resultados sugerem maior investigação relacionada à composição do meio de regeneração de brotos, pois o meio de indução de calos foi eficiente para qualquer dose de prolina (0, 0,5, 1, 1,5 e 2 g/L) mas, nas fases subsequentes, não houve aproveitamento da qualidade embriogênica dos calos, sugerindo a falta de combinação entre os componentes do meio de cultura. Para a fase de aclimatização, os resultados sugerem a adubação

de 60 a 120 kg/ha de nitrogênio dividida em duas etapas, a primeira com 67% da dose total aplicadas em estágio V3 e a segunda com 33% da dose aplicada na fase reprodutiva de emborrachamento.

REFERÊNCIAS

- ADRESS, S. et al. In vitro effect of peg and proline on callus growth and minerals values in basmati rice (*Oryza sativa*). **Journal of Agricultural Sciences–Sri Lanka**, v. 19, n. 1, 2024.
- AJMAL, K. K. et al. Impact of nitrogen and potassium management on growth, nutrient uptake and nutrient use efficiency of rice under semi dry condition. **ORYZA-An International Journal of Rice**, v. 61, n. 3, p. 234-241.
- AKAY, Hasan; KURT, Orhan. Effects of Cultivar and explant sources on callus induction and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). **J Agric Sci Technol**, v. 8, p. 97-104, 2018.
- BINTE MOSTAFIZ, Suraiya; WAGIRAN, Alina. Efficient callus induction and regeneration in selected indica rice. **Agronomy**, v. 8, n. 5, p. 77, 2018.
- BOJKO, Monika et al. Induction and Characteristics of Medicinal Plant *Tussilago farfara* L. in Callus Culture. 2024.
- CARVALHO FILHO, Rosebrando Sosthenes Leite et al. Caracterização histomorfológica e bioquímica de calos induzidos em *Cenostigma pyramidale* [Tul.] Gagnon & GP Lewis. **Ciência Florestal**, v. 33, n. 1, p. e66334, 2023.
- FALAH, Muhammad Nur et al. Study of Nitrogen and Phosphorus Doses on The Growth and Yield of Rice Plant (*Oryza sativa* L.) Mekongga Variety Used. **Journal of Rural and Urban Community Studies**, v. 2, n. 2, p. 54-62, 2024.
- GODEL-JEDRYCHOWSKA, Kamila et al. Symplasmic isolation marks cell fate changes during somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 9, p. 2612-2628, 2020.
- HOSSAIN, A. et al. Effect of Nitrogen Doses in Boro Rice Grown with Variable Levels of Floating Duckweed. **Bangladesh Agronomy Journal**, v. 25, n. 2, p. 109-117, 2022.
- HOSSEINIFARD, Marjanossadat et al. Contribution of exogenous proline to abiotic stresses tolerance in plants: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 5186, 2022.
- IJAZ, Bushra et al. Histo-morphological analysis of rice callus cultures reveals differential regeneration response with varying media combinations. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, p. 569-580, 2019.
- IRSYADI, Muhammad Burhanuddin. Factors that effect of the optimal plantlet growth from tissue culture on the acclimatization stage. In: **Proceeding International Conference on Science and Engineering**. 2021. p. 100-104.

JIANG, Ming-Jin et al. Balanced Nitrogen Reduction for Improved Grain Yield and Eating Quality in Mechanically Transplanted Hybrid Indica Rice. **Agriculture**, v. 14, n. 8, p. 1313, 2024.

KAIKAVOOSI, Keyghobad; NADAF, Altaf Hosseini; BAKHSHI KHANIKI, Gholamreza. Optimization of callus induction and regeneration in two Indica rice (*Oryza sativa* L.) varieties under absence of proline to decline its undesirable effects on 2-acetyl-1-pyrroline and other aromatic compounds. **Crop Biotechnology**, v. 5, n. 9, p. 29-38, 2015.

KOÇ, Esra; KARAYIĞIT, Belgizar. The protective role of exogenous proline in pepper callus exposed to long-term cold stress. **Botanica Serbica**, v. 48, n. 2, p. 185-193, 2024.

KRISHNAN, Subramanian Radhesh; PRIYA, Arumugam Mohana; RAMESH, Manikandan. Rapid regeneration and ploidy stability of 'cv IR36' indica rice (*Oryza Sativa*. L) confers efficient protocol for in vitro callus organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. **Botanical Studies**, v. 54, p. 1-12, 2013.

KUMAR, Amit et al. Effect of Planting Time and Nitrogen Doses on Growth, Phenology and Yield of Basmati Rice (*Oryza sativa* L.) under Agro-Climatic Conditions of Haryana, India. **International Journal of Plant & Soil Science**, v. 35, n. 20, p. 992-1001, 2023.

LI, Chunjia et al. Genotypic variation in the response to embryogenic callus induction and regeneration in *Saccharum spontaneum*. **Plant Genetic Resources**, v. 19, n. 2, p. 153-158, 2021.
LOPES, Camila Aparecida et al. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaia vermelha. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 1, p. 21-25, 2016.

MA, Peng et al. Effects of Nitrogen Application Rate on Dry Matter Weight and Yield of Direct-Seeded Rice under Straw Return. **Agronomy**, v. 13, n. 12, p. 3058, 2023.

NISHIMURA, Shigeo; MAEDA, Eizo. Histological studies of callus induction in rice seed. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 46, n. 2, p. 275-285, 1977.

NÚÑEZ PASTRANA, Rosalía et al. Molecular Markers Used in the Analysis of Somaclonal Variation During Plant Tissue Culture. In: **Genome Size and Genetic Homogeneity of Regenerated Plants: Methods and Applications**. Bentham Science Publishers, 2023. p. 23-42.

OGOSHI, Claudio et al. Influence of blast on the nutrition and yield of irrigated rice in Southern Brazil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, p. 1378-1386, 2020.

PAWAR, Bhausahab et al. Proline and glutamine improve in vitro callus induction and subsequent shooting in rice. **Rice Science**, v. 22, n. 6, p. 283-289, 2015.

RAHIMI, Sara et al. Flow Cytometry-Based Analysis of Tissue Culture-Derived Plants. In: **Genome Size and Genetic Homogeneity of Regenerated Plants: Methods and Applications**. Bentham Science Publishers, 2023. p. 272-293.

RAVSHANOV, Bekzod et al. Integrative effect of nitrogen fertilization and biotreatments on rice growth and yield potential under open-field agriculture. **Journal of Plant Nutrition**, v. 46, n. 8, p. 1701-1711, 2023.

ROCHA, Juliana Silva et al. Nitrogen supplementation improves the high-light acclimation of *Guazuma ulmifolia* Lam. seedlings. **Trees**, v. 33, p. 421-431, 2019.

- ROSSATO, Marieli et al. Embryogenic potential of the callus of gabirobeira, *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 41, p. 46358, 2019.
- SAKR, Dina E.; SAYED, Reem M. Morpho-histological observations on somatic embryogenesis in mature embryo derived callus of *Oryza sativa* L. cv. Sakha 101. **Journal of Scientific Research in Science**, v. 35, n. part 1, p. 126-141, 2018.
- SHARMA, Avinash; LAL, Dalpat; SUTRADHAR, Monoj. Effect of growth regulators on callus morphology of Rice anther culture. **J. Appl. Biol. Biotechnol**, v. 5, n. 03, p. 068-071, 2017.
- SILVA, Tecla dos Santos et al. In vitro shoot regeneration in *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, p. e69269, 2021.
- SINGH, Sukhchain et al. Rice Production and Nitrogen Use Efficiency in Different Nitrogen Management Systems Under Sub-Humid Conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 54, n. 12, p. 1670-1685, 2023.
- VIJAYALAKSHMI, U.; SHOURIE, Abhilasha. Remedial effect of ascorbic acid and citric acid on oxidative browning of *Glycyrrhiza glabra* callus cultures. **BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 97, n. 3, 2016.
- WEN, Li et al. Transcriptomic profiles of non-embryogenic and embryogenic callus cells in a highly regenerative upland cotton line (*Gossypium hirsutum* L.). **BMC Developmental Biology**, v. 20, p. 1-15, 2020.
- YUE, Jianhua et al. Integrated proteomic and metabolomic analyses provide insights into acquisition of embryogenic ability in *agapanthus praecox*. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 858065, 2022.
- ZHU, Mingdong et al. Single-cell transcriptome sequencing reveals the mechanism regulating rice plumule development. **The Crop Journal**, 2024.