



SUAMITH HERMÍNIO LUÍS LEVEQUE

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.),
MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens***

**LAVRAS – MG
2026**

SUAMITH HERMÍNIO LUÍS LEVEQUE

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE
ARROZ (*Oryza sativa* L.), MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Profa. Doutora Flávia Barbosa Silva Botelho

**LAVRAS – MG
2026**

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

Leveque, Suamith Hermínio Luís.

Otimização de protocolos para transformação genética de arroz (*Oryza sativa* L.),
mediada por *Agrobacterium tumefaciens* / Suamith Hermínio Luís Leveque. - 2026.
91 p. : il.

Orientadora: Flávia Barbosa Silva Botelho

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2026.
Bibliografia.

1. Calogênese. 2. Desinfestação de sementes. 3. Arroz. 4. Calos. 5. Regeneração. I.
Botelho, Flávia Barbosa Silva. II. Universidade Federal de Lavras. III. Título.

SUAMITH HERMÍNIO LUÍS LEVEQUE

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE
ARROZ (*Oryza sativa* L.), MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens***

**OPTIMIZATION OF GENETIC TRANSFORMATION PROTOCOLS IN RICE
(*Oryza sativa* L.) MEDIATED BY *Agrobacterium tumefaciens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de Julho de 2026

Dra. Flávia Barbosa Silva Botelho

Dra. Marlúcia Souza Pádua

Dra. Yasmin Vasques Berchembrock

Dr. Breno Régis Santos

UFLA

UFLA

EPAMIG

UNIFAL



Documento assinado digitalmente

FLAVIA BARBOSA SILVA BOTELHO

Data: 09/10/2026 13:10:54-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora

Profa. Doutora Flávia Barbosa Silva Botelho

**LAVRAS – MG
2026**

Hermínio Luís Leveque, em memória.
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela saúde e pela força que me concedeu o tempo todo para a efectivação deste mestrado; à minha orientadora, Professora Doutora Flávia Barbosa Silva Botelho, pelo acompanhamento incansável na condução desta pesquisa; uma pessoa de coração incrível a qual não é só professora/orientadora, mas também, uma pessoa que prepara os seus estudantes para o futuro, meu muito obrigado, à minha família e a Universidade Federal de Lavras - UFLA, ao Departamento de Química, ao Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia Vegetal da UFLA - PPGBV/UFLA e ao Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA - LCBM/UFLA pela estrutura oferecida para a realização da pesquisa assim como aos recursos humanos do laboratorio, professores, tecnicos, pos-doutorandos e os demais colegas. Também agradecer ao Núcleo de Pesquisa MelhorArroz/UFLA que me recebeu e disponibilizou todo o material vegetal usado neste experimento assim como todo o acolhimento e aprendizagem sobre trabalho em equipe, este não é só um núcleo de estudo, é uma família que se uniu com propósito de ajudar um a outro a ir além das suas capacidades, o meu muito obrigado. O presente trabalho foi realizado com apoio da fundação de amparo à pesquisa de minas gerais (fapemig). Agradecer ao Instituto de Investigação Agrária de Moçambique - IIAM/Moç. Por permitir que eu continuasse os meus estudos para o desenvolvimento das minhas competências profissionais e sociais o meu muito obrigado.

*“Cada protocolo otimizado representa um passo a mais para transformar conhecimento em
soluções capazes de alimentar o futuro”*
(Suamith Leveque)

RESUMO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais culturas alimentares do mundo, desempenhando papel fundamental na segurança alimentar global e constituindo a base da dieta de bilhões de pessoas. O desenvolvimento de protocolos eficientes de cultura de tecidos e transformação genética é essencial para acelerar programas de melhoramento e a obtenção de cultivares com características agronômicas superiores. Objetivou-se estudar a otimização de protocolos *in vitro* em arroz (*Oryza sativa* L.), abrangendo desde etapas de assepsia de sementes até respostas morfogênicas em cultura de tecidos e parâmetros de crescimento bacteriano de *Agrobacterium tumefaciens*. No primeiro experimento, investigou-se o efeito de pré-tratamentos físicos (lavagem com água corrente e detergente neutro), tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (NaClO) e secagem pós-assepsia sobre a contaminação e a indução de calos em diferentes genótipos. Os resultados indicaram que as etapas físicas de lavagem e secagem foram determinantes para a redução da contaminação, enquanto o aumento do tempo de exposição ao agente químico não teve efeito consistente. Entre os genótipos avaliados, CMG 1590 e Nipponbare apresentaram melhor desempenho, com menor contaminação e maior estabilidade na calogênese. No segundo experimento, avaliou-se o crescimento *in vitro* das cepas EHA105 e LBA4404, não sendo observadas diferenças significativas na densidade bacteriana, indicando comportamento equivalente sob condições controladas. Adicionalmente, foi analisada a resposta de genótipos de arroz à indução e regeneração de calos em meio N6 suplementado com diferentes concentrações (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; e 3,0 mg L⁻¹) de 2,4-D. Os resultados evidenciaram resposta concentração-dependente, com maior eficiência entre 2,0 e 2,5 mg L⁻¹, enquanto a ausência do regulador inviabilizou a calogênese e concentrações elevadas (acima de 2,5 mg L⁻¹) reduziram a resposta morfogênica. A análise estatística confirmou interação significativa entre genótipos e concentrações de 2,4-D. Conclui-se que a eficiência dos protocolos *in vitro* em arroz depende da integração entre etapas físicas de assepsia, ajustes hormonais adequados e seleção genotípica, sendo esses fatores fundamentais para o aprimoramento de sistemas de regeneração e futuras aplicações em melhoramento genético.

Palavras-chave: calogênese; desinfestação de sementes; cultura de tecidos; reguladores de crescimento; regeneração vegetal.

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the world's most important food crops, playing a fundamental role in global food security and serving as a staple food for billions of people. The development of efficient tissue culture and genetic transformation protocols is essential to accelerate breeding programs and the development of cultivars with superior agronomic traits. This study aimed to optimize *in vitro* protocols for rice (*Oryza sativa* L.), encompassing seed asepsis procedures, morphogenic responses in tissue culture, and bacterial growth parameters of *Agrobacterium tumefaciens*. In the first experiment, the effects of physical pre-treatments (washing with running water and neutral detergent), sodium hypochlorite (NaClO) exposure time, and post-asepsis drying on contamination and callus induction were evaluated in different rice genotypes. The results showed that the physical washing and drying steps were decisive in reducing contamination, whereas increasing the exposure time to the chemical disinfectant had no consistent effect. Among the evaluated genotypes, CMG 1590 and Nipponbare showed the best performance, with lower contamination rates and greater stability in callogenesis. In the second experiment, the *in vitro* growth of the *Agrobacterium tumefaciens* strains EHA105 and LBA4404 was evaluated, and no significant differences in bacterial density were observed, indicating equivalent performance under controlled conditions. Additionally, the response of rice genotypes to callus induction and regeneration was evaluated on N6 medium supplemented with different concentrations (0.0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, and 3.0 mg L⁻¹) of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The results demonstrated a concentration-dependent response, with the highest efficiency observed between 2.0 and 2.5 mg L⁻¹, whereas the absence of the growth regulator prevented callus formation, and higher concentrations (above 2.5 mg L⁻¹) reduced the morphogenic response. Statistical analysis confirmed a significant interaction between genotypes and 2,4-D concentrations. It is concluded that the efficiency of *in vitro* rice protocols depends on the integration of physical asepsis procedures, appropriate hormonal adjustments, and genotype selection, all of which are essential for improving regeneration systems and supporting future applications in genetic improvement.

Keywords: callogenesis; seed disinfection; tissue culture; plant growth regulators; plant regeneration.

INDICADORES DE IMPACTO

A presente pesquisa gerou impactos científicos e tecnológicos ao otimizar etapas fundamentais da cultura de tecidos e da transformação genética de arroz (*Oryza sativa* L.), contribuindo para o aprimoramento de protocolos relacionados à assepsia de sementes, indução de calos embriogênicos, infecção por *Agrobacterium tumefaciens* e regeneração de plantas. Os resultados obtidos possibilitam maior eficiência experimental, redução de perdas por contaminação e aumento da reprodutibilidade dos procedimentos laboratoriais, constituindo uma base metodológica que poderá ser empregue por universidades, instituições públicas de pesquisa e programas de melhoramento genético vegetal. Embora os impactos econômicos e sociais sejam predominantemente potenciais, a disponibilização de protocolos mais eficientes tende a reduzir custos associados ao uso de reagentes, tempo de execução e repetição de experimentos, favorecendo o desenvolvimento de pesquisas em biotecnologia vegetal. Em médio e longo prazo, os conhecimentos produzidos poderão contribuir para acelerar a obtenção de cultivares geneticamente melhoradas, com maior produtividade, resistência a estresses bióticos e abióticos e adaptação às mudanças climáticas, beneficiando pesquisadores, estudantes, instituições de pesquisa, empresas do setor agrícola, produtores rurais e, indiretamente, a sociedade por meio do fortalecimento da segurança alimentar. A pesquisa também contribuiu para a formação de recursos humanos qualificados e para o fortalecimento da infraestrutura científica na área de biotecnologia vegetal. Seus resultados apresentam aderência às áreas temáticas de Tecnologia e Produção, Educação e Meio Ambiente da Política Nacional de Extensão e encontram-se alinhados aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas, especialmente ao ODS 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável), ao ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura), ao ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis) e ao ODS 13 (Ação Contra a Mudança Global do Clima), ao fornecer subsídios científicos para o desenvolvimento de tecnologias voltadas à agricultura sustentável e à inovação em melhoramento genético de plantas.

IMPACT INDICATORS

The present research generated scientific and technological impacts by optimizing key stages of rice (*Oryza sativa* L.) tissue culture and genetic transformation, contributing to the improvement of protocols related to seed disinfection, embryogenic callus induction, *Agrobacterium tumefaciens* infection, and plant regeneration. The results obtained enable greater experimental efficiency, reduced losses due to contamination, and enhanced reproducibility of laboratory procedures, providing a methodological framework that can be adopted by universities, public research institutions, and plant breeding programs. Although the economic and social impacts are predominantly potential, the availability of more efficient protocols is expected to reduce costs associated with reagent consumption, experimental time, and the repetition of laboratory procedures, thereby supporting advances in plant biotechnology research. In the medium and long term, the knowledge generated may contribute to accelerating the development of genetically improved cultivars with enhanced productivity, greater resistance to biotic and abiotic stresses, and improved adaptation to climate change, benefiting researchers, students, research institutions, agricultural companies, farmers, and, indirectly, society through strengthened food security. The research also contributed to the training of highly qualified human resources and to the strengthening of scientific infrastructure in the field of plant biotechnology. Its outcomes are aligned with the National Extension Policy thematic areas of Technology and Production, Education, and Environment, and are consistent with the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs), particularly SDG 2 (Zero Hunger), SDG 9 (Industry, Innovation and Infrastructure), SDG 12 (Responsible Consumption and Production), and SDG 13 (Climate Action), by providing scientific support for the development of technologies aimed at sustainable agriculture and innovation in plant genetic improvement.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação informativa dos órgãos vegetativos e reprodutivos do arroz (<i>Oryza sativa</i> L.).....	23
Figura 2 – Produção e consumo mundial de arroz (2022-2026) em milhões de toneladas (base casca).	25
Figura 1 – Sementes de arroz sobre papel filtro após assepsia, em processo de secagem para redução de umidade antes do início da cultura in vitro	37
Figura 2 - Critérios de avaliação e fórmulas utilizadas para quantificação da contaminação, indução de calos e inércia em sementes de arroz submetidas à cultura in vitro.....	38
Figura 3 – Influência de tratamentos de desinfestação sobre a incidência (%) de sementes contaminadas em cinco genótipos. (A) Efeito da lavagem prévia em água (Não Lavadas x Lavadas). (B) Efeito do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (20 min x 30 min).....	41
Figura 4 - Boxplots da porcentagem de sementes contaminadas (%) dos genótipos Caçula, CMG 1590, Douradão, Nipponbare e Soberana em função da lavagem prévia das sementes (esquerda) e do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (direita). A linha central representa a mediana; as caixas correspondem ao intervalo interquartil (25-75%); as barras representam a amplitude dos dados. Letras diferentes indicam diferença significativa entre a variável dentro do genótipo pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	42
Figura 5 – Boxplots da porcentagem de sementes contaminadas (%) em função da secagem das sementes (A) e dos genótipos avaliados considerando o conjunto das condições de assepsia testadas (B). A linha central representa a mediana, as caixas representam o intervalo interquartil (25-75%), as barras indicam a amplitude dos dados e os pontos representam valores discrepantes. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	43
Figura 6 – Incidência de sementes contaminadas em diferentes genótipos de arroz sob condições de assepsia. (A) Efeito da secagem superficial pós-assepsia (com e sem secagem). (B) Comparação da porcentagem de sementes contaminadas entre os genótipos avaliados, considerando o conjunto dos tratamentos de assepsia. As linhas internas dos boxplots indicam a mediana, os limites das caixas representam o primeiro e terceiro quartis, as hastes mostram a amplitude dos dados e os pontos isolados representam valores discrepantes (outliers).....	44
Figura 7 – Densidade bacteriana ($\log_{10}$ UFC/mL) das cepas EHA105 e LBA4404. Os dados representam média $\pm$ erro padrão (SEM) de três repetições biológicas independentes. Não foram observadas diferenças significativas entre as cepas (teste t de Student, $p > 0,05$).	50

Fig. 1: Morphological stages of callus induction and plant regeneration in rice (<i>Oryza sativa</i> L.): (A) Detail of the seed scutellum showing the first signs of cellular dedifferentiation after 7 days on N6 medium supplemented with 2,4-D. (B) Shoot bud differentiation and early organogenesis from green nodular calli after 16 days on MS regeneration medium. (C) Acclimatization phase of regenerated plants, showing complete development (roots and shoots) and readiness for transfer to soil or ex vitro conditions.	62
Fig. 2: Callus induction percentage of <i>japonica</i> (Nipponbare) and <i>indica</i> (CMG1590) rice genotypes across different 2,4-D treatments. Both genotypes exhibit a quadratic response to increasing auxin concentrations, with peak induction at T4 (93.3% for and 80% for CMG1590) followed by a decline at T5. Data are expressed as mean $\pm$ SS of three biological replicates. 65	65
Fig. 3: Comparison between CMG1590 and genotypes. Bar heights indicate the mean induction percentage, and error bars represent the Standard Deviation (SD).	70
Fig. 4: Callus Induction Kinetics: Time to reach Effective Response (50% and 90%) as a Function of 2,4-D Concentration by Genotype. The graph illustrates the concentration-temporal response relationship of the CMG1590 and genotypes as a function of concentration.	72
Fig 5: Effect of 2,4-D Concentration (mg/L) on Callus Morphology and Coloration in Different Genotypes: Each point on the graph represents the morphological response observed at a given concentration, considering the physical aspect of the callus (symbols) and the predominant coloration (colors) simultaneously.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais subespécies de <i>Oryza sativa</i> com características de grão, ambiente de cultivo, tolerância ao frio e regiões típicas de ocorrência.	22
Tabela 2 – Produção, área plantada e produtividade do arroz no Brasil nas safras 2023/24 e 2024/25 e perspectiva 2025/26.	26
Tabela 1: Fatores avaliados no tratamento de sementes de arroz e seus níveis: (i) Pré-lavagem: sem lavagem ou com lavagem em água corrente; (ii) Exposição: 20 ou 30 minutos em NaClO; (iii) Manejo pós-assepsia: sem secagem ou com secagem em papel filtro estéril.....	36
Tabela 3 - Comparação das médias da porcentagem de sementes contaminadas (%) entre os genótipos, considerando o conjunto dos tratamentos avaliados. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	41
Tabela 4 – Probabilidade estimada de incidência de patógenos em sementes por genótipo, acompanhada do erro padrão e intervalos de confiança (IC) a 95% de probabilidade (EMMeans).	45
Tabela 5 – Comparações múltiplas par a par (post-hoc tests) das probabilidades de contaminação de sementes entre genótipos, expressas por razão de chances (Odds Ratio), erro padrão (SE) e estatística z.	46
Tabela 6 – Médias Marginais Estimadas (EMMeans) para a probabilidade de contaminação de sementes em função de lavagem e do manejo de secagem pós-assepsia, erro padrão (SE) e intervalos de confiança (IC 95%).	47
Tabela 7 – Médias marginais estimadas (EMMeans) para a probabilidade de indução de calos por genótipo e respectivos contrastes pareados. Os contrastes são apresentados como razão de chances (odds ratio), acompanhados do erro padrão (SE), estatística z e p-valor do teste de Wald.	48
Tabela 8 – Efeitos isolados da lavagem prévia e da secagem das sementes na probabilidade de indução de calos em arroz. Os valores representam as probabilidades estimadas, razões de chances (Odds ratio) e significância estatística para cada fator independente.	49
Tabela 9 – Probabilidade de sobrevivência de explantes de arroz que não apresentaram contaminação microbiana nem indução de calos em meio de cultura. Valores expressos em probabilidade estimada e Erro Padrão (SE).	49
Table 5: Analysis of Variance (ANOVA) of the treatments.	77
Table 1: Analysis of variance (ANOVA) for the effect of 2,4-D concentrations on callus induction in two rice genotypes. The results indicate the influence of different concentrations on the induction frequency for (<i>japonica</i>) and CMG1590 (<i>indica</i>). F-values and p-values denote the level of statistical significance.	66
Table 2: Multiple Comparison of Mean Differences with Respect to Initial Time (T0). Adjusted p-values obtained through multiple comparisons tests. The Difference column indicates the mean difference. Significance symbols are: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$	67

Table 3: Means and Standard Deviation of the Measured Variable in Genotypes. The Mean (%) column represents the average performance of the variable, and SD is the Standard Deviation. 69

Table 4: Means and standard deviations of the number of regenerated plants and regeneration rates (%) by genotype and treatment. 75

LISTA DE SIGLAS

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
IIAM	Instituto de Investigação Agrária de Moçambique
UFLA	Universidade Federal de Lavras
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	18
1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICA	20
2.1 Origem do arroz e a expansão pelo Brasil	20
2.2 Importância econômica, distribuição mundial e relevância geopolítica do arroz	21
2.3 Classificação do arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	22
2.3.1 Classificação Botânica	22
2.3.2 Morfologia da planta de arroz	23
2.4 O arroz como pilar da segurança alimentar global	24
2.5 Arroz de terras altas no contexto brasileiro	26
2.6 Biotecnologia aplicada a cultura de arroz	28
SEGUNDA PARTE	31
ARTIGO 1 – CONTROLE MICROBIANO EM CULTURA DE TECIDOS: ASSEPSIA DE SEMENTES DE ARROZ E PADRONIZAÇÃO DE INÓCULOS DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
1 INTRODUÇÃO	34
2 MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1 Material vegetal	35
2.2 Metodologia de desinfestação	35
2.2.1 Pré-lavagem das sementes em água corrente	36
2.2.2 Desinfestação com álcool 70% e Hipoclorito de Sódio (NaClO)	36
2.3 Avaliação fenotípica e análise estatística	38
2.4 Padronização de inóculo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
3 RESULTADOS	40
3.1 Eficácia da lavagem prévia e efeito do tempo de exposição das sementes ao hipoclorito ..	40
3.2 Análise do efeito da secagem e desempenho sanitário	43
3.3 Análise do fator genético e potencial de calogênese	47
3.4 Influência dos fatores isolados (lavagem e secagem) na calogênese	48
3.5 Comportamento dos genótipos quanto à viabilidade e recalcitrância dos explantes	49
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO	54
BIBLIOGRAFIA	55
ARTIGO 2 – Analysis of callus induction and regeneration in rice genotypes under different concentrations of 2,4-D	59
Bibliography	81
TERCEIRA PARTE	86

3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
	BIBLIOGRAFIA.....	88

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais culturas alimentares do mundo, sendo cultivado em diferentes continentes e consumido por mais da metade da população mundial (USDA, 2023). Entretanto, sua produtividade é frequentemente limitada por estresses abióticos, especialmente o déficit hídrico, que compromete processos fisiológicos essenciais, reduz o crescimento vegetal e afeta a estabilidade produtiva, principalmente em sistemas de cultivo de sequeiro (WICKBOLDT et al., 2019). Diante das mudanças climáticas, a identificação de mecanismos de tolerância ao estresse hídrico e a seleção de genótipos superiores tornaram-se estratégias fundamentais para os programas de melhoramento genético do arroz (Guimarães, 2017; Yang et al., 2024).

Embora o melhoramento genético convencional tenha contribuído significativamente para a adaptação e produtividade da cultura, sua eficiência é limitada pelo longo tempo necessário para obtenção de novas combinações genéticas, pela natureza quantitativa de muitos caracteres de interesse e pela disponibilidade restrita de variabilidade genética. Nesse contexto, ferramentas da biotecnologia vegetal, especialmente a cultura de tecidos e a transformação genética, apresentam-se como estratégias complementares para ampliar a eficiência dos programas de melhoramento.

A cultura de tecidos possibilita a regeneração de plantas geneticamente uniformes, a obtenção de variantes somaclonais e o estabelecimento de sistemas eficientes para introdução de genes de interesse. Entre as metodologias disponíveis, a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* destaca-se pela capacidade de transferência do T-DNA para células vegetais, utilizando explantes competentes, como calos embriogênicos derivados de sementes imaturas ou maduras, para posterior regeneração de plantas geneticamente modificadas. Esses sistemas constituem a base experimental para aplicações modernas, como a edição gênica via CRISPR/Cas9, permitindo o desenvolvimento de materiais com características agrônomicas desejáveis, incluindo maior tolerância a estresses ambientais, resistência a doenças e melhoria da qualidade nutricional (Niroula et al., 2005).

Entretanto, a eficiência da transformação genética depende da otimização de diversas etapas anteriores ao processo de introdução do gene. A assepsia das sementes, utilizadas como explantes, representa uma fase crítica para o estabelecimento das culturas *in vitro*, uma vez que

microrganismos associados aos materiais provenientes do campo podem comprometer a germinação e favorecer contaminações. A eficiência da desinfestação depende do equilíbrio entre concentração e tempo de exposição ao hipoclorito de sódio, pois tratamentos excessivos podem causar fitotoxicidade e reduzir a capacidade germinativa dos explantes (Sauer & Burroughs, 1986; Singh et al., 2021).

Após o estabelecimento asséptico, segue a indução de calos, a transformação e a posterior, a regeneração que constitui uma etapa determinante para a obtenção de plantas *in vitro*. Esse processo é influenciado principalmente pela interação entre genótipo e composição do meio de cultura. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é amplamente utilizado por estimular a desdiferenciação celular e a formação de calos com potencial regenerativo. Entretanto, sua eficiência depende da concentração aplicada e do genótipo avaliado, tornando necessária a otimização dos protocolos para diferentes materiais genéticos (Balcerowicz, 2024; Carsono et al., 2021; Gao et al., 2024; Garcia et al., 2019; Pathania & Sandhu, 2021).

Além disso, a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* requer a padronização das condições de infecção e cocultivo. A densidade bacteriana inadequada pode reduzir a eficiência de transferência do T-DNA ou provocar crescimento excessivo da bactéria e necrose dos tecidos vegetais. Da mesma forma, diferentes cepas, como EHA105 e LBA4404, apresentam respostas variáveis entre genótipos, influenciando diretamente a eficiência da transformação genética (Cheng et al., 1998; Majumder et al., 2021; Prías et al., 2022).

Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo estabelecer e otimizar protocolos relacionados às principais etapas necessárias para a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em diferentes genótipos de arroz, abrangendo a assepsia de sementes, indução de calos embriogênicos e condições de infecção bacteriana. A finalidade foi gerar uma base metodológica eficiente para futuras aplicações de engenharia genética e melhoramento molecular da cultura.

A escolha pelo formato de dissertação organizada em artigos científicos está relacionada à natureza progressiva e complementar da pesquisa desenvolvida. Cada etapa experimental representa uma contribuição científica específica dentro do processo de estabelecimento de um sistema eficiente de transformação genética, permitindo que os resultados sejam apresentados de forma mais objetiva, avaliados individualmente pela comunidade científica e potencialmente disseminados por meio de publicações. Embora independentes, os artigos apresentam uma relação sequencial, na qual a otimização da assepsia e estabelecimento *in vitro* fornece suporte para a indução de calos embriogênicos e, posteriormente, para a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Assim, esta dissertação está organizada em artigos complementares. O primeiro aborda a otimização das condições de assepsia, estabelecimento inicial da cultura *in vitro* e investiga condições associadas à transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*; o segundo avalia fatores relacionados à indução e qualidade dos calos embriogênicos em diferentes genótipos de arroz. Essa organização permite compreender, de forma integrada, os principais fatores que determinam a eficiência dos protocolos de transformação genética e fornece subsídios para aplicações futuras no melhoramento biotecnológico do arroz.

2 REFERENCIAL TEÓRICA

2.1 Origem do arroz e a expansão pelo Brasil

A história do arroz (*Oryza spp.*) é marcada por um longo processo de adaptação que acompanha o desenvolvimento das primeiras civilizações agrícolas. Embora sua domesticação tenha ocorrido há milhares de anos e diversos aspectos relacionados à sua origem ainda permaneçam em debate, a literatura reconhece dois eventos independentes de domesticação, que deram origem ao arroz asiático (*Oryza sativa* L.), no continente asiático, e ao arroz africano (*Oryza glaberrima* Steud.), na África Ocidental (Khush, 1997; Veltman et al., 2019; Wambugu; Ndjiondjop; Henry, 2021).

O arroz asiático (*Oryza sativa* L.) foi domesticado a partir do ancestral selvagem *Oryza rufipogon* há cerca de 8 000 - 9 000 anos na bacia do rio Yangtzé, na China, envolvendo seleção de características como redução da quebra de espiguetas e aumento da produtividade (Molina et al., 2011). A relação entre suas subespécies, japônica e índica, ainda é debatida, mas análises genômicas sustentam uma origem evolutiva única (Molina et al., 2011). De forma independente, *Oryza glaberrima* (arroz africano) foi domesticada há cerca de 3 000 anos no delta do rio Níger, contribuindo para a diversidade global do arroz (Veltman et al., 2019).

A história do arroz como cultura nas Américas está relacionada à expansão colonial europeia e às redes de circulação de plantas, conhecimentos agrícolas e práticas de cultivo estabelecidas durante o período atlântico. No Brasil, registros históricos indicam que o cultivo do arroz já estava presente desde os séculos XVI e XVII, inicialmente associado aos sistemas agrícolas coloniais e às áreas próximas às plantações de cana-de-açúcar. A participação de populações africanas escravizadas foi fundamental na disseminação de conhecimentos relacionados ao manejo agrícola, técnicas de cultivo e adaptação de práticas produtivas ao ambiente tropical, contribuindo para o desenvolvimento da rizicultura no contexto colonial (J.

Carney, 2017; J. A. Carney, 2004). Essa trajetória evidencia a expansão do arroz (*Oryza sativa* L.) para além de seus centros de domesticação na Ásia, resultando na consolidação da cultura como um dos principais componentes dos sistemas agrícolas brasileiros.

Após seu processo de domesticação e dispersão global, o arroz apresenta atualmente uma diversidade limitada de espécies cultivadas (Soares, 2004). Destaca-se que, dentre as espécies do gênero *Oryza*, apenas duas são amplamente cultivadas: *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima*. Segundo o autor, *O. sativa* apresenta maior adaptação a diferentes ambientes e melhor desempenho agrônômico, o que explica sua ampla adoção em relação a *O. glaberrima*.

2.2 Importância econômica, distribuição mundial e relevância geopolítica do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) representa uma das culturas agrícolas mais importantes para a humanidade, sendo considerado um alimento estratégico para a segurança alimentar mundial. Aproximadamente metade da população global depende desse cereal como principal fonte de energia alimentar, especialmente em países da Ásia, África e América Latina. Além de sua importância nutricional, a cadeia produtiva do arroz possui elevada relevância econômica, envolvendo milhões de agricultores, trabalhadores da indústria de processamento e agentes ligados ao comércio internacional. A produção mundial encontra-se fortemente concentrada no continente asiático, com destaque para China, Índia, Bangladesh, Indonésia e Vietnã, que respondem por grande parte da oferta global e exercem influência significativa sobre o mercado internacional. Em razão dessa concentração geográfica, alterações climáticas, eventos extremos, restrições comerciais ou instabilidades políticas nessas regiões podem comprometer a disponibilidade e influenciar os preços do cereal em escala mundial

Embora seja amplamente cultivado, o arroz apresenta uma distribuição desigual entre produção e consumo, sendo que diversos países da África Subsaariana ainda dependem de importações para atender à crescente demanda, impulsionada pelo aumento populacional, pela urbanização e pelas mudanças nos hábitos alimentares (AFRICARICE, 2021; Seck et al., 2012). Nesse contexto, o arroz assume importância geopolítica ao desempenhar papel estratégico nas relações comerciais internacionais, uma vez que a dependência de importações, a concentração da produção em poucos países e a vulnerabilidade às mudanças climáticas podem comprometer a segurança alimentar global. Dessa forma, investimentos em tecnologias que promovam ganhos de produtividade, adaptação a estresses ambientais e sustentabilidade da produção tornam-se fundamentais para assegurar a oferta futura desse cereal (FAO, 2023).

O Brasil destaca-se como um dos principais produtores de arroz fora do continente asiático, apresentando expressiva importância econômica e social para o agronegócio nacional, com produção concentrada principalmente na região Sul, especialmente no estado do Rio Grande do Sul (CONAB, 2025a; Embrapa, 2008). Entretanto, desafios relacionados à disponibilidade hídrica, à ocorrência de estresses abióticos e à necessidade de elevar a eficiência produtiva impulsionam o desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético e biotecnologia vegetal. Nesse contexto, a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e as tecnologias de edição genômica destacam-se como ferramentas promissoras para o desenvolvimento de cultivares mais produtivas, resilientes e adaptadas às diferentes condições de cultivo (Hiei et al., 1994a; Toki, 1997).

2.3 Classificação do arroz (*Oryza sativa* L.)

2.3.1 Classificação Botânica

O arroz (*Oryza sativa* L.) pertence à família Poaceae, caracterizada por espécies monocotiledôneas de grande importância agrícola e alimentar (Kellogg, 2015). É uma das espécies vegetais mais cultivadas no mundo e apresenta ampla diversidade genética, sendo dividido em duas principais subpopulações, *indica* e *japonica*, além de grupos como *aromatic*, *temperate japonica* e *tropical japonica* (Wang et al., 2014). Do ponto de vista taxonômico, *Oryza sativa* L. pertence à classe Monocotyledoneae, ordem Glumiflorae, família Poaceae, tribo Oryzeae e gênero *Oryza*, sendo tradicionalmente agrupado nas subespécies *indica*, *japonica* e *japonica tropical* (Soares, 2004) tabela 1. A subespécie *indica* é o mais produzido no Brasil.

Tabela 1 – Principais subespécies de *Oryza sativa* com características de grão, ambiente de cultivo, tolerância ao frio e regiões típicas de ocorrência.

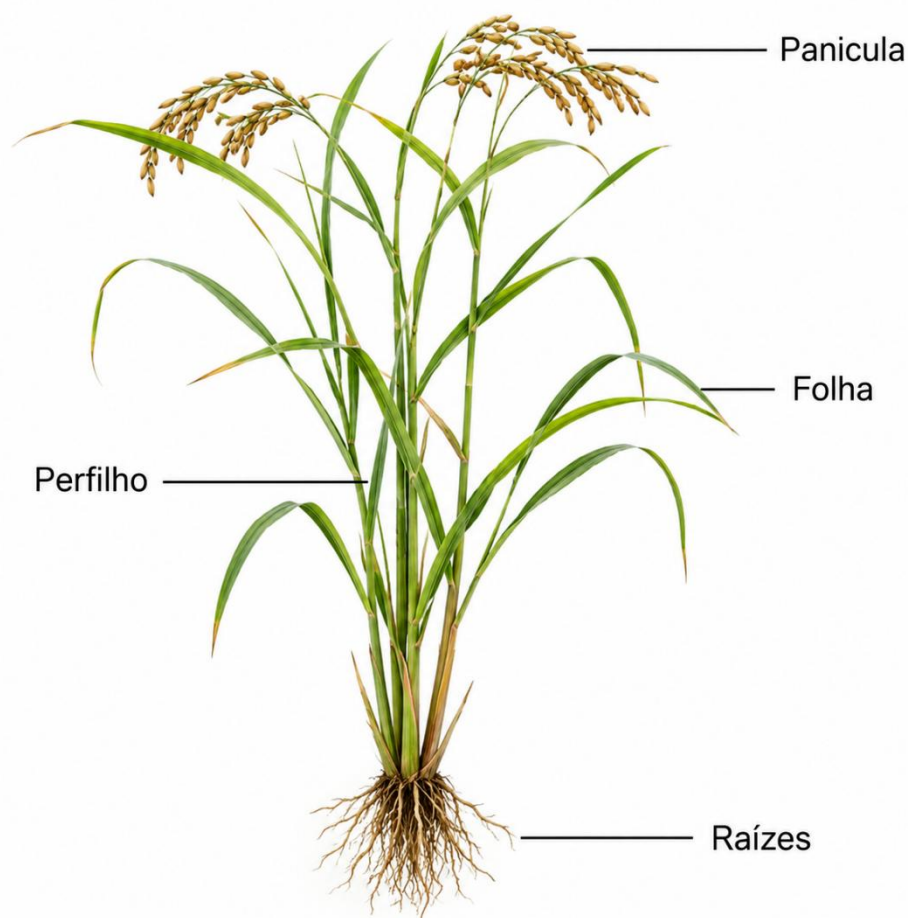
Subespécie	Grão	Ambiente	Tolerância ao frio	Região típica
<i>Índica</i>	Longo	Tropical	Baixa	Sul/sudeste asiático
<i>Japônica</i>	Curto	Temperado	Alta	Japão, Coreia, China
<i>Japônica Tropical</i>	Curto/medio	Temperado húmido	Média	Indonésia, América Latina

Fonte: Adaptado de Wang et al. (2014).

2.3.2 Morfologia da planta de arroz

A morfologia da planta de arroz (*Oryza sativa* L.) compreende órgãos vegetativos e reprodutivos responsáveis pelo crescimento, desenvolvimento e produção de grãos (Roberto et al., 2008). Os órgãos vegetativos incluem o sistema radicular fibroso, constituído por raízes seminais e adventícias, o colmo formado por nós e entrenós, e as folhas alternadas compostas por bainha, lígula, aurícula e lâmina foliar (Soares, 2004). Os órgãos reprodutivos são representados pela panícula, formada por espiguetas que abrigam as flores e originam os grãos, cujo fruto é uma cariopse protegida pelas estruturas florais, apresentando características morfológicas que podem variar entre os genótipos (Roberto et al., 2008). A Figura 1 ilustra os principais órgãos e estruturas morfológicas da planta de arroz.

Figura 1 – Representação informativa dos órgãos vegetativos e reprodutivos do arroz (*Oryza sativa* L.).



Fonte: Elaboração própria com auxílio da inteligência artificial ChatGPT (OpenAI), para fins exclusivamente ilustrativos.

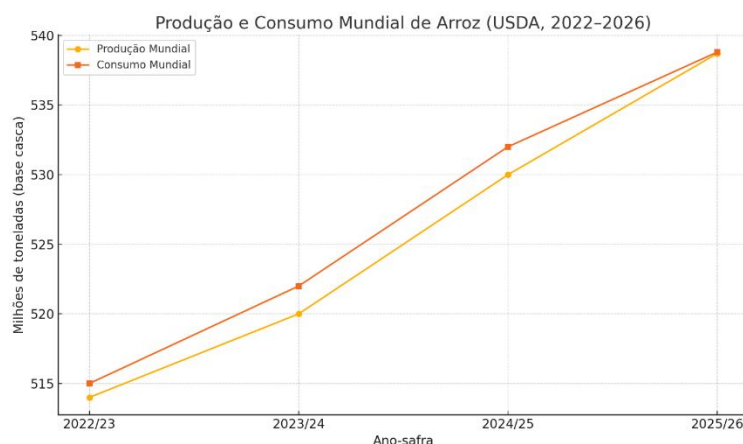
2.4 O arroz como pilar da segurança alimentar global

O arroz (*Oryza sativa* L.) vai além de sua função agrícola, constituindo um dos principais pilares da segurança alimentar mundial e uma *commodity* de elevada importância socioeconômica. Como alimento básico para bilhões de pessoas na Ásia, África e América Latina, desempenha papel fundamental na nutrição humana e na estabilidade dos mercados agrícolas internacionais. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), a produção mundial de arroz beneficiado para a safra 2025/26 está estimada em 538,7 milhões de toneladas, estabelecendo um novo recorde histórico. No mesmo período, o consumo global deverá alcançar 538,8 milhões de toneladas, evidenciando a manutenção de uma forte demanda mundial pelo cereal. Os estoques finais são projetados em aproximadamente 185,1 milhões de toneladas, enquanto o comércio internacional deverá atingir cerca de 61,3 milhões de toneladas, também configurando um recorde histórico para o mercado internacional (Childs & Abadam, 2025).

Esses números refletem o crescimento da demanda impulsionado pelo aumento populacional, pela urbanização e pela expansão do consumo em países asiáticos e africanos, reforçando a necessidade de avanços tecnológicos capazes de aumentar a produtividade de forma sustentável. Nesse contexto, o desenvolvimento de cultivares superiores e o aperfeiçoamento de ferramentas biotecnológicas, como a transformação genética e a edição gênica, tornam-se estratégias essenciais para enfrentar os desafios impostos pelas mudanças climáticas, pela maior incidência de estresses bióticos e abióticos e pela crescente limitação dos recursos naturais.

No Brasil, as perspectivas para a safra 2025/26 indicam um cenário mais desafiador para a rizicultura. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a área cultivada deverá apresentar redução em relação ao ciclo anterior em razão da desvalorização dos preços provocada pela elevada oferta observada na safra 2024/25. Ainda assim, a produção nacional está estimada em aproximadamente 11,5 milhões de toneladas, volume considerado suficiente para atender ao consumo interno e garantir o abastecimento nacional, sustentado pelos elevados níveis de produtividade alcançados nas últimas safras e pelas políticas públicas de apoio ao setor (CONAB, 2025).

Figura 2 – Produção e consumo mundial de arroz (2022-2026) em milhões de toneladas (base casca).



Fonte: USDA Economic Research Service - *Rice Outlook*, 2025; adaptado pela autora citada pela CONAB (2025).

O gráfico mostra a evolução da produção e do consumo mundial de arroz de 2022/26 a 2025/26, segundo projeções da USDA, evidenciando crescimento contínuo devido à maior demanda global.

Os oito maiores produtores mundiais de arroz estão na Ásia, liderados pela China, seguida por Índia, Bangladesh, Indonésia, Vietnã, Tailândia, Myanmar e Filipinas (O. F. Da Silva & Wander, 2023). Segundo dados estatísticos recentes, a China produziu cerca de 214 milhões de toneladas em 2023, representando aproximadamente 27% da produção mundial e 30% da asiática (USDA, 2023).

Nas Américas, Brasil e Estados Unidos destacam-se como produtores de arroz, com os EUA respondendo por parcela menor da produção mundial (EMBRAPA, 2023). Segundo projeções do USDA, a produção brasileira para 2025/26 deve ficar entre 11,2 e 11,3 milhões de toneladas em 1,6 milhão de hectares, ligeiramente abaixo da safra anterior (12,0 milhões de toneladas) (USDA, 2025). Conforme o 8.º Levantamento da Conab 2024/25, a produção brasileira foi de cerca de 12,1 milhões de toneladas, com produtividade média de ~7 071 kg/ha em 1,76 milhão de hectares (CONAB, 2025). A evolução da produção entre 2023/24 e 2024/25 pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2 – Produção, área plantada e produtividade do arroz no Brasil nas safras 2023/24 e 2024/25 e perspectiva 2025/26.

Safra	Área (milhões)	Produtividade (kg/ha)	Produção (milhões t)
2023/24	1.53	6.588	10.577
2024/25	1.76	7.071	12.140
2025/26	1.66	6.928	11.5

Fonte: Adaptado de (CONAB, 2025).

Olhando a tabela, estimativa para o ciclo 2025/26 indica uma redução de 5,6% na área semeada, projetada em 1,66 milhão de hectares, sendo que na área irrigada houve queda de em 3,7% e na de sequeiro a diminuição chegou a 12,5%. Com a menor área destinada à cultura, a produção de arroz chegou a 11,5 milhões de toneladas (CONAB, 2025).

2.5 Arroz de terras altas no contexto brasileiro

O arroz de terras altas (*Oryza sativa* L.), também conhecido como arroz de sequeiro, desempenhou papel decisivo na expansão da fronteira agrícola brasileira, especialmente durante as décadas de 1960 e 1970, quando foi amplamente cultivado em áreas recém-incorporadas à produção agrícola no Cerrado. Segundo Breseghello et al., (2021) e Furtini et al., (2022), a cultura foi uma das primeiras alternativas econômicas utilizadas na ocupação dessas novas fronteiras agrícolas, favorecendo a consolidação da produção de grãos em regiões até então pouco exploradas. Breseghello et al (2021) destacam que, com a expansão da soja no Cerrado e a consolidação do arroz irrigado na Região Sul, a importância econômica do arroz de terras altas diminuiu progressivamente.

Entretanto, nas últimas décadas, esse cenário foi modificado em decorrência da modernização dos sistemas produtivos e dos avanços obtidos pelo melhoramento genético. Nesse contexto, Breseghello et al., (2021) e Furtini et al., (2022), ressaltam que o arroz de terras altas passou a integrar sistemas agrícolas intensivos, sendo cultivado em rotação e sucessão com soja, milho, feijão e forrageiras, contribuindo para a diversificação da produção e para a sustentabilidade dos agroecossistemas. Resultados obtidos por Nascente et al., (2013) e Nascimento et al. (2022), reforçam que essa integração promove benefícios adicionais, como melhoria das propriedades físicas do solo, maior eficiência no manejo de plantas daninhas e incremento da estabilidade produtiva.

A retomada da competitividade do arroz de terras altas está diretamente relacionada ao trabalho desenvolvido pelos programas de melhoramento genético da Embrapa Arroz e Feijão, em cooperação com universidades como a Universidade Federal de Lavras e instituições públicas de pesquisa como EPAMIG e EMBRAPA. Conforme descrito por Breseghello et al., (2021), o desenvolvimento contínuo de novas cultivares permitiu elevar significativamente o potencial produtivo, a qualidade industrial dos grãos e a adaptação às condições edafoclimáticas do Cerrado brasileiro.

Como reflexo desse esforço, cultivares como BRS A501 CL, BRS A502, BRS A503, BRS A504 CL e BRS Esmeralda passaram a atender às exigências dos modernos sistemas de produção, combinando elevado rendimento, excelente qualidade culinária e maior estabilidade produtiva. Entre os avanços tecnológicos incorporados a essas cultivares, destaca-se a tecnologia Clearfield®. Destaca-se a tecnologia Clearfield®, baseada no uso de cultivares tolerantes a herbicidas do grupo das imidazolinonas, permitindo o controle eficiente de plantas daninhas em áreas cultivadas com arroz. que ampliou as possibilidades de manejo de plantas daninhas e contribuiu para aumentar a eficiência dos sistemas produtivos, conforme demonstrado por Furtini et al., (2022).

Embora o sistema irrigado permaneça predominante na rizicultura brasileira, representando a maior parcela da produção nacional, o cultivo em terras altas continua desempenhando papel estratégico, sobretudo nas regiões de Cerrado. De acordo com a (CONAB (2025), esse sistema encontra-se fortemente integrado aos modelos de produção baseados em plantio direto, sucessão de culturas e integração lavoura-pecuária. Nesse sentido, Lacerda e Nascente, (2021), destacam que a inserção do arroz nesses sistemas favorece a diversificação econômica das propriedades rurais, melhora a qualidade física e biológica do solo e reduz a pressão exercida por plantas daninhas e fitopatógenos. Resultados semelhantes foram observados por Moro et al., (2013), que evidenciaram benefícios relacionados à conservação do solo e ao aumento da eficiência do uso dos recursos naturais em áreas conduzidas sob sistemas conservacionistas.

Do ponto de vista agrônomo, o arroz de terras altas diferencia-se do sistema irrigado por desenvolver-se em ambiente aeróbio, utilizando predominantemente a água proveniente das precipitações pluviais, embora a irrigação suplementar por aspersão e pivô seja frequentemente empregada em sistemas de maior intensificação. Essa característica confere maior flexibilidade de cultivo e reduz significativamente a demanda hídrica quando comparada ao arroz irrigado por inundação. Segundo Moro et al., (2013), essa flexibilidade favorece a inserção da cultura em diferentes sistemas produtivos, enquanto Alcântara et al. (2023), ressaltam que práticas

conservacionistas, como o plantio direto, a rotação de culturas e o uso de adubos verdes, potencializam a conservação do solo, aumentam a eficiência do uso da água e dos nutrientes e contribuem para reduzir os impactos ambientais da atividade agrícola.

Apesar dos avanços obtidos pelo melhoramento genético e pelo aprimoramento das práticas de manejo, diversos fatores continuam limitando o potencial produtivo do arroz de terras altas. Furtini et al. (2022), destacam que a ocorrência de veranicos durante os estádios reprodutivos, especialmente no florescimento e enchimento dos grãos, representa uma das principais causas de perdas de produtividade. Além disso, os autores ressaltam que a baixa fertilidade natural dos solos do Cerrado exige manejo criterioso da fertilidade para que o potencial das cultivares seja plenamente explorado. Entre os fatores bióticos, a brusone, causada por *Magnaporthe oryzae*, permanece como a doença de maior impacto econômico para a cultura, enquanto plantas daninhas, insetos-praga e o aumento da frequência de eventos climáticos extremos, associados às mudanças climáticas, constituem desafios crescentes para a sustentabilidade da rizicultura, conforme discutido por Lanna et al. (2021).

Diante desse cenário, torna-se evidente que os avanços proporcionados pelo melhoramento genético convencional, embora expressivos, não são suficientes para atender, isoladamente, às demandas atuais da cultura. Conforme argumentam Breseghello et al., (2021), a crescente complexidade dos desafios agrícolas exige a incorporação de ferramentas capazes de acelerar o desenvolvimento de novas cultivares e ampliar a precisão dos programas de melhoramento.

Nesse contexto, técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos, a transformação genética, a seleção assistida por marcadores moleculares e a edição gênica, vêm assumindo papel cada vez mais relevante. Furtini et al. (2022) e Lanna et al. (2021), destacam que essas abordagens permitem a introdução direcionada de características relacionadas à produtividade, à resistência a estresses bióticos e abióticos e à adaptação às mudanças climáticas. Assim, a otimização de protocolos de regeneração e transformação genética representa uma etapa estratégica para ampliar a aplicação da biotecnologia no melhoramento do arroz, constituindo a base para o desenvolvimento de cultivares mais produtivas, resilientes e sustentáveis.

2.6 Biotecnologia aplicada a cultura de arroz

A biotecnologia vegetal tem desempenhado papel fundamental na modernização da agricultura, complementando o melhoramento genético convencional por meio de ferramentas que permitem a identificação, manipulação e introdução precisa de genes de interesse. No arroz

(*Oryza sativa* L.), essas tecnologias têm acelerado o desenvolvimento de cultivares com maior produtividade, resistência a doenças e pragas, tolerância a estresses ambientais e melhor qualidade nutricional dos grãos, contribuindo para atender à crescente demanda por alimentos em um cenário de mudanças climáticas e produção agrícola sustentável (ACQUAAH, 2020; FAO, 2022; OECD, 2023).

O arroz destaca-se entre as espécies vegetais mais estudadas pela biotecnologia devido à sua importância econômica e alimentar e às características que favorecem estudos moleculares e genéticos. Foi o primeiro cereal a ter o genoma completamente sequenciado, consolidando-se como espécie modelo para pesquisas com gramíneas de importância agrônômica, como milho, trigo, sorgo e cana-de-açúcar. O amplo conhecimento sobre sua genética, fisiologia e biologia molecular tem impulsionado o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas aplicadas à pesquisa e ao melhoramento genético, tornando o arroz uma das principais plataformas experimentais da biologia vegetal (Sasaki & Burr, 2000; Yu et al., 2002).

Os avanços da transformação genética possibilitaram o desenvolvimento de plantas de arroz com maior tolerância à seca, salinidade, inundação, temperaturas extremas e deficiência nutricional, além de resistência a doenças e insetos-praga. Também permitiram a utilização de genes relacionados à produtividade, arquitetura de plantas e qualidade industrial e nutricional dos grãos. Mais recentemente, a edição gênica por CRISPR/Cas9 ampliou as possibilidades de modificação precisa do genoma, permitindo alterações direcionadas sem a inserção permanente de DNA exógeno, representando um importante avanço para o desenvolvimento de novas cultivares (Asibi et al., 2019; Romero & Gatica-Arias, 2019).

Apesar desses avanços, a aplicação da biotecnologia ao melhoramento do arroz ainda enfrenta limitações técnicas. A eficiência da transformação genética depende do genótipo, da indução de calos embriogênicos, da capacidade regenerativa dos explantes e das condições de cultivo *in vitro*. Além disso, fatores como oxidação dos tecidos, baixa eficiência de infecção por *Agrobacterium tumefaciens* e reduzida regeneração de plantas continuam representando importantes gargalos, especialmente em cultivares de arroz de terras altas (Hiei et al., 1997; Mohammed et al., 2019).

Entre as principais ferramentas biotecnológicas aplicadas ao arroz destacam-se a cultura de tecidos, a seleção assistida por marcadores moleculares, a transformação genética e, mais recentemente, a edição gênica por sistemas CRISPR/Cas. A cultura de tecidos constitui a base dessas tecnologias, permitindo a regeneração de plantas a partir de células, tecidos ou órgãos cultivados *in vitro*. Essa técnica viabiliza a obtenção de calos embriogênicos, a embriogênese

somática, a propagação clonal e a regeneração de plantas transformadas, sendo indispensável para protocolos de transformação genética e edição gênica (Fehér, 2019; Ikeuchi et al., 2019).

Paralelamente, a utilização de marcadores moleculares revolucionou os programas de melhoramento ao permitir a identificação precoce de genes e locos associados a características agronômicas de interesse, reduzindo o tempo necessário para seleção de genótipos superiores. Mais recentemente, ferramentas de seleção genômica e análises de associação genômica ampla (Genome-Wide Association Studies - GWAS) passaram a complementar essas estratégias, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento e permitindo a exploração mais precisa da variabilidade genética disponível (Hiei; Komari; Kubo, 1997; Hiei et al., 1994; Hiei; Ishida; Komari, 2014; Mohammed; Samad; Rahmat, 2019).

A transformação genética representa um dos principais avanços da biotecnologia aplicada ao arroz, permitindo a introdução de genes de interesse e o desenvolvimento de plantas com características dificilmente obtidas apenas pelo melhoramento convencional. Entre os métodos disponíveis, destacam-se a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e o bombardeamento de partículas (biobalística). Dentre eles, a transformação mediada por *A. tumefaciens* é a mais utilizada em arroz devido à elevada eficiência de transferência de DNA, à inserção de menor número de cópias do transgene e à maior estabilidade genética das plantas regeneradas (Asibi et al., 2019; Romero & Gatica-Arias, 2019; Zafar et al., 2020).

Nesse contexto, a otimização dos protocolos de cultura de tecidos e transformação genética assume papel estratégico para ampliar a eficiência da engenharia genética aplicada ao arroz. Protocolos robustos, reprodutíveis e adaptados às características específicas de cada genótipo constituem requisito essencial para o sucesso da transformação genética e da edição gênica, possibilitando a incorporação mais rápida de características relacionadas ao aumento da produtividade, resistência aos estresses bióticos e abióticos e adaptação às mudanças climáticas. Assim, o aperfeiçoamento dessas metodologias representa uma etapa indispensável para fortalecer os programas de melhoramento genético e expandir o uso da biotecnologia no desenvolvimento de cultivares de arroz mais produtivas, resilientes e sustentáveis.

SEGUNDA PARTE

Artigo 1 - Elaborado conforme a norma NBR 6022	
Título do artigo:	Controle Microbiano em cultura de tecidos: assepsia de sementes de arroz e padronização de inóculos de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Autores:	Suamith Hermínio Luís Leveque Alisson Willians Teixeira Silva Elisa Ágilo Flávia Barbosa Silva Botelho



ARTIGO 1 – CONTROLE MICROBIANO EM CULTURA DE TECIDOS: ASSEPSIA DE SEMENTES DE ARROZ E PADRONIZAÇÃO DE INÓCULOS DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*¹

Suamith Hermínio Luis Leveque

<https://orcid.org/0009-0007-4346-8008>

Alisson Willians Teixeira Silva

<https://orcid.org/0000-0002-4642-0145>

Elisa Agilo

<https://orcid.org/0009-0009-4018-3845>

Flávia Barbosa Silva Botelho

<https://orcid.org/0000-0002-1675-0944>

Resumo: O presente estudo teve como objetivo avaliar, de forma integrada, a otimização de protocolos *in vitro* em arroz (*Oryza sativa* L.), abrangendo tanto a assepsia de sementes quanto aos parâmetros relacionados ao crescimento bacteriano de *Agrobacterium tumefaciens* em sistemas de transformação genética. No primeiro ensaio, investigou-se o efeito da lavagem com água corrente e detergente neutro, do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (NaClO) e da secagem pós-assepsia sobre a contaminação e a indução de calos em diferentes genótipos de arroz. Os resultados evidenciaram que as etapas físicas de pré-lavagem e secagem foram determinantes para a redução da contaminação, enquanto o aumento do tempo de exposição ao agente químico não apresentou efeito consistente. Entre os genótipos avaliados, CMG 1590 e Nipponbare destacaram-se pela menor contaminação e maior estabilidade na calogênese. No segundo ensaio, comparou-se o crescimento *in vitro* das cepas EHA105 e LBA4404, não sendo observadas diferenças significativas na densidade bacteriana ($p > 0,05$), indicando capacidade equivalente de multiplicação sob condições controladas. Contudo, a literatura destaca que a eficiência de transformação depende de fatores adicionais, como virulência e interação planta-bactéria. Conclui-se que a otimização de protocolos *in vitro* em arroz depende da integração entre etapas físicas de assepsia e critérios biológicos além da densidade bacteriana.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L.; cultura *in vitro*; transformação genética; calogênese.

Abstract: The present study aimed to integratively evaluate the optimization of *in vitro* protocols in rice (*Oryza sativa* L.), encompassing both seed sterilization procedures and parameters associated with *Agrobacterium tumefaciens* growth in genetic transformation systems. In the first experiment, the effects of washing with running water and neutral detergent, sodium hypochlorite (NaClO) exposure time, and post-sterilization drying on

¹ Artigo científico apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal.

contamination and callus induction were investigated in different rice genotypes. The results demonstrated that the physical steps of pre-washing and drying were critical for reducing contamination, whereas increasing exposure time to the chemical sterilizing agent did not show consistent effects. Among the evaluated genotypes, CMG 1590 and Nipponbare exhibited lower contamination rates and greater stability in callus formation. In the second experiment, the *in vitro* growth of the *Agrobacterium* strains EHA105 and LBA4404 was compared, with no significant differences observed in bacterial density ($p > 0.05$), indicating equivalent multiplication capacity under controlled conditions. However, previous studies highlight that transformation efficiency depends on additional factors, including bacterial virulence and plant-bacterium interactions. It is concluded that the optimization of *in vitro* protocols in rice requires the integration of physical sterilization procedures with biological criteria beyond bacterial growth capacity.

Keywords: *Oryza sativa* L.; *in vitro* culture; genetic transformation; callogenesis.

1 INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta essencial da biotecnologia moderna, permitindo a regeneração de plantas sob condições controladas e sendo amplamente utilizada em processos de micropropagação, transformação genética e edição gênica. A eficiência dessas aplicações depende do estabelecimento de sistemas regenerativos estáveis, nos quais a eliminação de contaminantes microbiológicos e a adequada resposta dos tecidos vegetais são fatores determinantes (George et al., 2007; Vargas & Ochoa, 2018).

A desinfestação superficial das sementes constitui uma etapa crítica para o estabelecimento de culturas in vitro, pois deve reduzir a carga microbiana sem comprometer a viabilidade dos tecidos. O hipoclorito de sódio tem sido amplamente utilizado na assepsia de diferentes espécies vegetais, demonstrando eficiência na redução da contaminação e no estabelecimento de culturas assépticas, incluindo cereais monocotiledôneos como trigo (*Triticum aestivum* L.) e milho (*Zea mays* L.) (Bošnjak Mihovilović et al., 2024; L. C. Silva et al., 2015; Terzi Aksoy, 2025; Tinak Ekom et al., 2026). Em arroz (*Oryza sativa* L.), Scheidt et al. (2020) demonstraram que a desinfestação adequada favorece a obtenção de plântulas normais e reduz a interferência de microrganismos superficiais. Entretanto, concentrações inadequadas ou tempos excessivos de exposição podem causar efeitos fitotóxicos, comprometendo a germinação e a indução de calos, etapas fundamentais para a transformação genética (Cassells, 2012; Leifert & Cassells, 2001).

Além da qualidade dos explantes, a eficiência da transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* depende do controle da densidade bacteriana utilizada no processo de infecção. A unidade formadora de colônia (UFC) representa uma medida funcional da população bacteriana viável, sendo amplamente empregada para avaliar a capacidade de crescimento e multiplicação de *Agrobacterium* em protocolos biotecnológicos (Hiei et al., 1997; Prías et al., 2022). Em arroz, o equilíbrio da concentração bacteriana é fundamental, pois densidades adequadas favorecem a transferência do T-DNA, enquanto o excesso de inóculo pode causar sobrecrecimento bacteriano e prejudicar a regeneração dos explantes (Cheng et al., 1998; Hiei et al., 2014).

A escolha da cepa de *Agrobacterium* também influencia a eficiência da transformação. A cepa EHA105 apresenta elevada capacidade de transferência genética, enquanto LBA4404 apresenta características distintas de interação com os tecidos vegetais, podendo resultar em diferentes respostas de transformação (Handel et al., 1997; Shri et al., 2013; Xiang et al., 2022).

Dessa forma, a otimização integrada das etapas prévias à transformação genética, incluindo a assepsia de sementes, a indução de calos e o controle do crescimento bacteriano, é essencial para aumentar a eficiência dos protocolos *in vitro* em arroz. Assim, este estudo objetivou avaliar estratégias de otimização de protocolos *in vitro* em *Oryza sativa* L., abrangendo a desinfestação de sementes, a resposta morfogênica dos tecidos e parâmetros relacionados ao crescimento de *Agrobacterium tumefaciens*, visando contribuir para o desenvolvimento de sistemas eficientes de transformação genética.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram utilizadas sementes de cinco genótipos de arroz: Nippombare, BRS Soberana, BRS Douradão, BRSMG Caçula e CMG1590, colhidas em campo e selecionadas quanto à integridade física e ausência de danos aparentes. O genótipo CMG1590, é proveniente da Universidade Federal de Lavras (UFLA) no programa de Melhoramento genético do arroz de terras altas em parceria com a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e Embrapa.

2.2 Metodologia de desinfestação

Foram utilizados álcool 70% e hipoclorito de sódio como agentes desinfestantes. As sementes foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$, constituído por três fatores experimentais: (i) lavagem prévia em água corrente (com e sem lavagem); (ii) tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (20 e 30 minutos), com renovação da solução a cada 10 minutos; e (iii) manejo pós-assepsia (com e sem secagem após três lavagens em água destilada autoclavada) (Tabela 1). Foram utilizadas três repetições, contendo dez sementes por parcela, para cada combinação de tratamento e genótipo avaliado.

Tabela 3: Fatores avaliados no tratamento de sementes de arroz e seus níveis: (i) Pré-lavagem: sem lavagem ou com lavagem em água corrente; (ii) Exposição: 20 ou 30 minutos em NaClO; (iii) Manejo pós-assepsia: sem secagem ou com secagem em papel filtro estéril.

Fator	Nível 1	Nível 2
(i) Pré-lavagem	Sem lavagem	Com lavagem (água corrente)
(ii) Exposição (NaClO)	20 minutos	30 minutos
(iii) Manejo Pós-assepsia	Sem secagem	Com secagem (papel filtro estéril)

Fonte: elaboração própria.

2.2.1 Pré-lavagem das sementes em água corrente

Em metade dos tratamentos, as sementes foram lavadas em água corrente com detergente neutro e duas gotas de Tween 20 (Polissorbato 20, um tensoativo não iônico utilizado para reduzir a tensão superficial e melhorar o contato das soluções com a superfície do material vegetal) por um período padronizado (10 minutos), visando remover sujidades, poeira e parte da microbiota superficial aderida ao tegumento, o que pode reduzir a carga inicial de contaminantes e aumentar a eficiência dos agentes desinfestantes. Na outra metade, as sementes foram diretamente submetidas à desinfestação, sem pré-lavagem.

2.2.2 Desinfestação com álcool 70% e Hipoclorito de Sódio (NaClO)

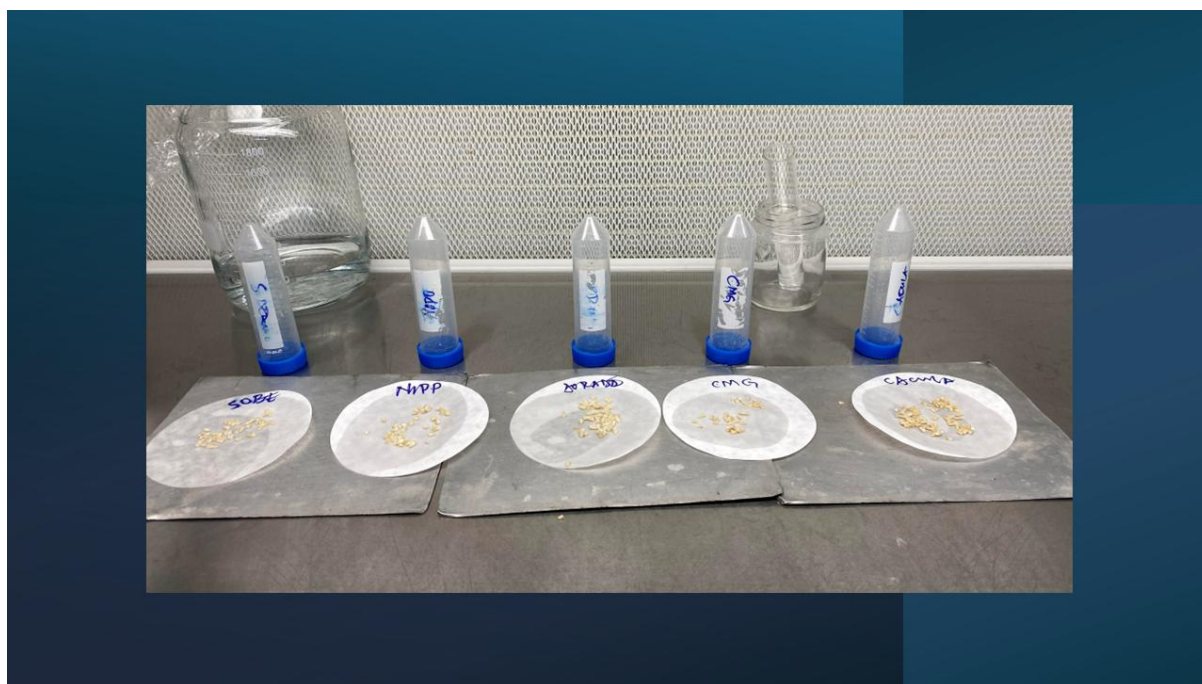
Após a pré-lavagem, as sementes dos dois tratamentos (com e sem pré-lavagem) foram transferidas para câmara de fluxo laminar e submetidas inicialmente à imersão em álcool 70% por 3 minutos, com agitação contínua, para rápida redução da carga microbiana superficial e aumento da permeabilidade do tegumento aos desinfetantes subsequentes.

Em seguida, o álcool foi descartado e as sementes foram imediatamente imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) comercial (2,0 a 2,5%) de cloro ativo, diluída em água destilada estéril, por dois tempos distintos: 20 minutos e 30 minutos, configurando o segundo fator experimental. Durante o período de exposição, a solução de NaClO foi renovada a cada

10 minutos, com o objetivo de manter a concentração efetiva de cloro ativo e evitar perda de eficiência germicida por degradação ao longo do tempo. Manejo de pós-asepsia e a inoculação em meio de indução de calos

Após o tratamento com hipoclorito, todas as sementes foram enxaguadas em água destilada autoclavada por lavagens sucessivas (5 vezes), visando remover resíduos de cloro aderidos à superfície, que podem causar fitotoxicidade e comprometer a calogênese. Em seguida, constituiu-se o terceiro fator experimental. Em parte dos tratamentos, as sementes foram dispostas sobre papel de filtro (previamente autoclavado) estéril em câmara de fluxo laminar e mantidas em secagem por aproximadamente 40 minutos (Figura 1), permitindo a evaporação do excesso de umidade e a estabilização dos tecidos antes da inoculação e nos demais tratamentos, as sementes foram imediatamente transferidas, ainda úmidas, para o meio de indução de calos Chu N6, que foi previamente estabelecido.

Figura 3 – Sementes de arroz sobre papel filtro após asepsia, em processo de secagem para redução de umidade antes do início da cultura in vitro



Fonte: elaboração própria, 2026.

As sementes desinfestadas foram inoculadas em meio de indução de calos específico para arroz, composto por meio Chu N6 completo (Chu et al., 1975), suplementado com 30g/L de sacarose como fonte de carbono, vitaminas e 2,4-D como regulador de crescimento auxínico, conforme metodologias estabelecidas para indução de calos embriogênicos em genótipos de arroz (Khokhar et al., 2018). As placas foram incubadas em condições controladas de temperatura e fotoperíodo, adequadas à calogênese de arroz, com cultivo inicial no escuro.

A inoculação em meio suplementado com 2,4-D marca a transição da etapa de desinfestação para a fase de resposta morfogênica. Após a assepsia, as sementes foram inoculadas em meio de cultura contendo 2,4-D, sob condições controladas de incubação, visando induzir a reprogramação celular e avaliar a influência dos protocolos de desinfestação na competência calogênica dos tecidos.

2.3 Avaliação fenotípica e análise estatística

Foram feitas as seguintes avaliações em todas as placas obtidas com os diferentes métodos de assepsia das sementes:

Número de sementes contaminadas e percentagem de contaminação, considerando-se a presença de crescimento visível de fungos e/ou bactérias no meio de cultura.

Número de sementes que originaram calos e percentagem de indução de calos, contabilizando somente aquelas que apresentaram formação clara de tecidos calogênicos.

Número de sementes que permaneceram assépticas, porém sem formação de calos (sementes não induzidas), e sua respectiva percentagem, permitindo diferenciar entre efeitos da assepsia sobre a sanitização e sobre a competência calogênica.

A Tabela 4 apresenta as variáveis-resposta consideradas nos experimentos, bem como seus respectivos critérios de avaliação e métodos de quantificação.

Tabela 4 - Critérios de avaliação e fórmulas utilizadas para quantificação da contaminação, indução de calos e inércia em sementes de arroz submetidas à cultura in vitro.

Variável	Critério de Avaliação	Cálculo (%)
Contaminação	Crescimento visível de fungos ou bactérias.	$\frac{\text{sementes contaminadas}}{\text{total de sementes}} \times 100$
Indução de Calos	Formação clara de massas de tecidos calogênicos.	$\frac{\text{sementes com calos}}{\text{total de sementes}} \times 100$
Inércia (Não induzidas)	Semente limpa (estéril), mas sem início de calogênese.	$\frac{\text{sementes assép. sem calos}}{\text{total de sementes}} \times 100$

Fonte: adaptado de Kumari, Nagpal e Katnoria (2024).

No experimento de assepsia de sementes, foram avaliadas as variáveis contaminação, indução de calos e inércia (sementes não induzidas). Adicionalmente, no experimento de padronização do inóculo bacteriano, foi avaliado o crescimento de *Agrobacterium tumefaciens*, determinado pela contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos à verificação dos pressupostos estatísticos, visando garantir a validade das inferências. As análises estatísticas foram realizadas no ambiente R versão 4.5.2 (R Core Team, 2025), utilizando a interface RStudio (Posit Software, 2025). Para o experimento de assepsia, os efeitos dos fatores genótipo, lavagem prévia, tempo de exposição ao hipoclorito de sódio e secagem pós-assepsia, bem como suas interações, foram avaliados por meio de modelos lineares generalizados com distribuição binomial e função de ligação logit. Cada variável-resposta (contaminação, indução de calos e inércia) foi analisada individualmente por meio de modelos lineares generalizados e partir dos modelos ajustados foram estimadas as probabilidades de ocorrência dos eventos, as médias marginais estimadas (*Estimated Marginal Means* – EMMs), as razões de chances (*Odds Ratio*), os intervalos de confiança de 95% e os contrastes entre tratamentos. Para o experimento de padronização do inóculo bacteriano, a variável UFC foi utilizada para comparar o crescimento das linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* após as diluições seriadas e o plaqueamento em meio seletivo.

2.4 Padronização de inóculo de *Agrobacterium tumefaciens*

As culturas de *Escherichia coli* contendo a construção plasmidial de interesse, armazenadas a -80 °C, foram inicialmente recuperadas em meio LB sólido suplementado com canamicina (50 mg L⁻¹) e rifampicina (20 mg L⁻¹), sendo incubadas a 37 °C por 16 h. Colônias isoladas foram selecionadas e cultivadas em meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos, sob agitação de 250 rpm a 37 °C por aproximadamente 15 h. O DNA plasmidial foi extraído por meio de miniprep utilizando kit comercial (Merck Bioscience), conforme protocolo do fabricante baseado em lise alcalina, seguido da determinação da concentração e pureza do DNA.

Posteriormente, o DNA plasmidial isolado foi utilizado para transformação de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* das linhagens LBA4404 e EHA105 por eletroporação. As células bacterianas foram submetidas a pulso elétrico de 2000 V e, após período de recuperação em meio apropriado, foram plaqueadas em meio seletivo contendo os antibióticos correspondentes para seleção dos transformantes.

A confirmação da transformação foi realizada por PCR de colônia, utilizando primers específicos para o vetor, seguido de eletroforese em gel de agarose e visualização sob luz UV.

As linhagens confirmadas foram ativadas por estriamento em meio LB sólido seletivo e incubadas a 28 °C por 48 h. Colônias isoladas foram transferidas para meio líquido LB com antibióticos e cultivadas a 28 °C e 180 rpm até atingirem fase logarítmica de crescimento (OD_{600} entre 0,6 e 0,8), monitorada por espectrofotometria. Posteriormente, as culturas foram padronizadas para $OD_{600} = 0,540$ e submetidas a diluições seriadas decimais (10^{-1} a 10^{-6}). Aliquotas de 100 μ L foram plaqueadas em meio LB seletivo, distribuídas com alça de Drigalski e incubadas a 28 °C por 48 h.

Cada ensaio foi composto por duas linhagens bacterianas (LBA4404 e EHA105), com três repetições biológicas e seis diluições avaliadas, resultando em 18 placas por linhagem (36 placas por rodada experimental). O ensaio foi repetido em três experimentos independentes, totalizando 108 placas analisadas. A quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada por contagem automatizada utilizando o software Colony Counter (Promega), sendo os dados utilizados para análise estatística de crescimento e variabilidade experimental. As colônias viáveis foram quantificadas nas placas que apresentaram entre 30 e 300 colônias, sendo os resultados expressos em número de UFC por placa.

3 RESULTADOS

3.1 Eficácia da lavagem prévia e efeito do tempo de exposição das sementes ao hipoclorito

A análise do efeito principal dos genótipos, considerando a média de todos os tratamentos de assepsia avaliados, evidenciou diferença significativa na porcentagem de sementes contaminadas ($p \leq 0,05$). O genótipo CMG 1590 apresentou a menor média de contaminação (25,0%), diferindo significativamente de Nipponbare (43,7%), BRS Caçula (42,9%), BRS Douradão (42,6%) e BRS Soberana (39,2%). Entre esses quatro genótipos, não foram observadas diferenças significativas (Tabela 3).

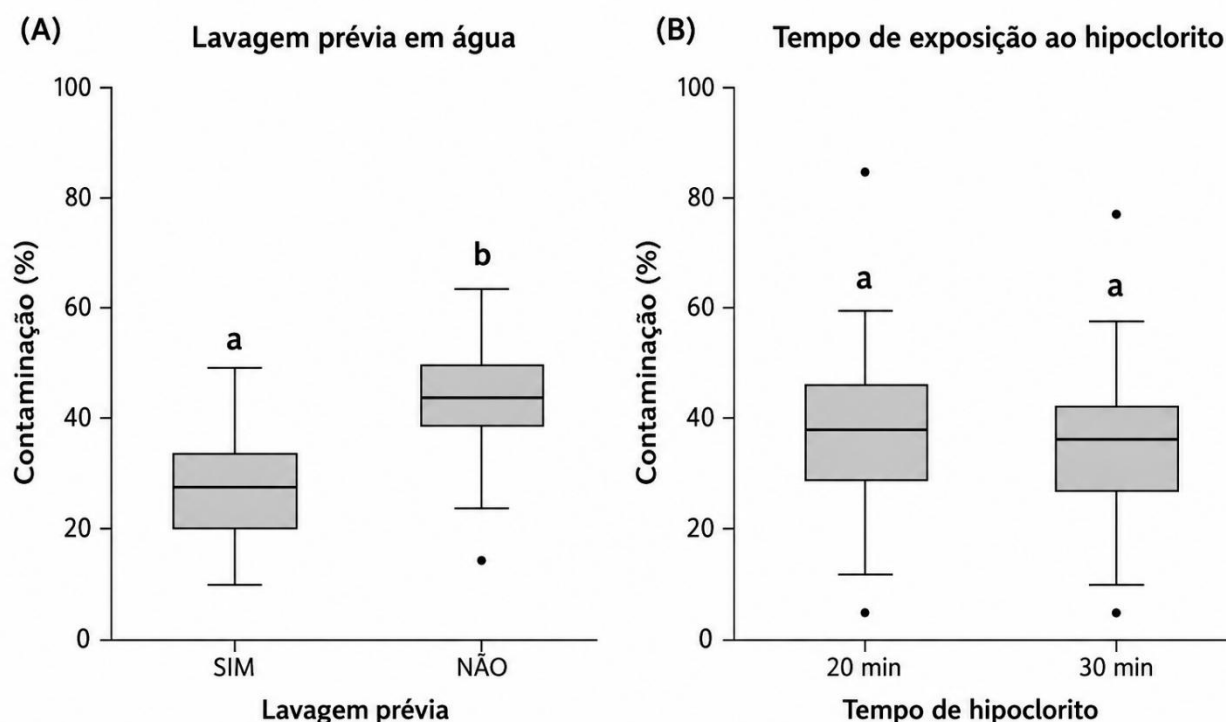
Tabela 5 - Comparação das médias da porcentagem de sementes contaminadas (%) entre os genótipos, considerando o conjunto dos tratamentos avaliados. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Genótipo	Média	Grupo
NIPPONBARE	0,4370	a
BRS MG CAÇULA	0,42916	a
BRS DOURADÃO	0,42608	a
BRS SOBERANA	0,39166	a
CMG 1590	0,2500	b

Fonte: elaboração própria.

Com o objetivo de otimizar os protocolos de assepsia, avaliou-se a eficácia da lavagem prévia em água (Figura 3A) na média dos genótipos, para essa variável foi observada uma diferença significativa entre os tratamentos e, em relação ao tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (Figura 3B), a análise de variância dos dados não detectou a diferença de significância.

Figura 4 – Influência de tratamentos de desinfestação sobre a incidência (%) de sementes contaminadas em cinco genótipos. (A) Efeito da lavagem prévia em água (Não Lavadas x Lavadas). (B) Efeito do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (20 min x 30 min).

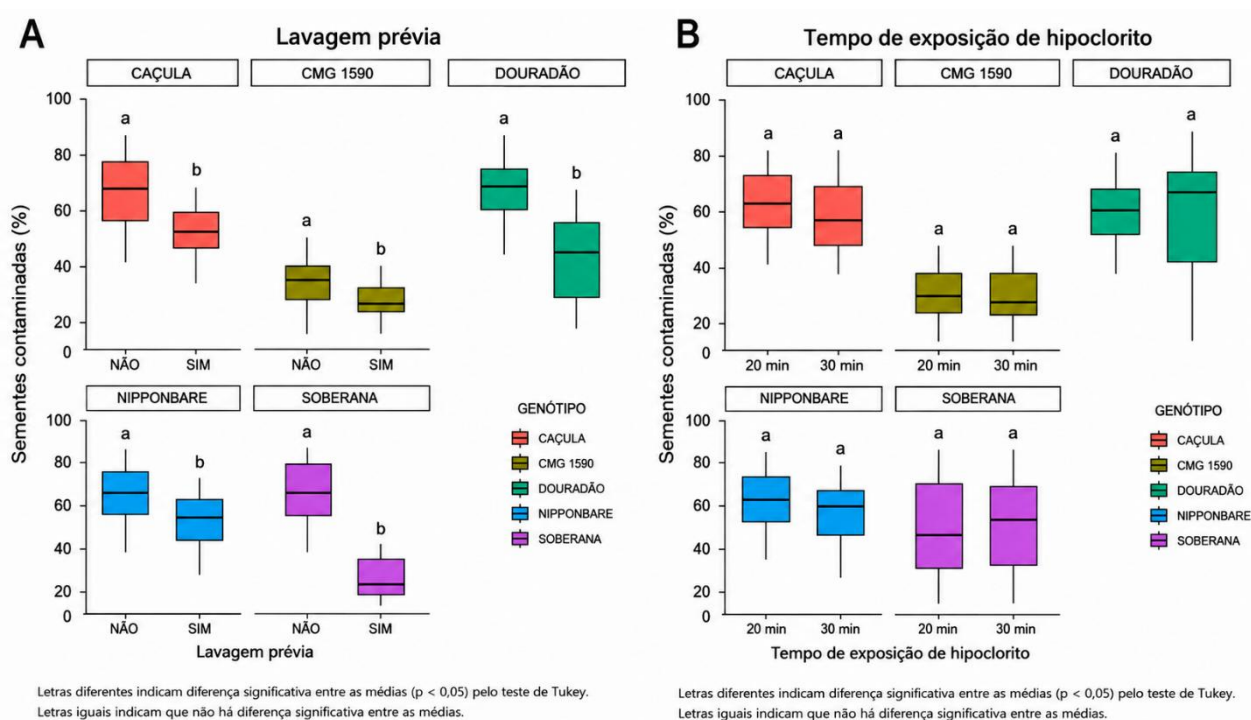


Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: elaboração própria

Observou-se redução da porcentagem de sementes contaminadas após a lavagem física em todos os genótipos avaliados, indicando efeito positivo dessa etapa no processo de assepsia, independentemente do material genético. Embora o genótipo BRS Soberana tenha apresentado a maior redução numérica na contaminação, passando de 50% para 20%, esse comportamento representa uma tendência descritiva entre os genótipos avaliados. O aumento do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio não promoveu redução consistente da contaminação (Figura 4).

Figura 5 - Boxplots da porcentagem de sementes contaminadas (%) dos genótipos Caçula, CMG 1590, Douradão, Nipponbare e Soberana em função da lavagem prévia das sementes (esquerda) e do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (direita). A linha central representa a mediana; as caixas correspondem ao intervalo interquartil (25-75%); as barras representam a amplitude dos dados. Letras diferentes indicam diferença significativa entre a variável dentro do genótipo pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Fonte: Elaboracao própria

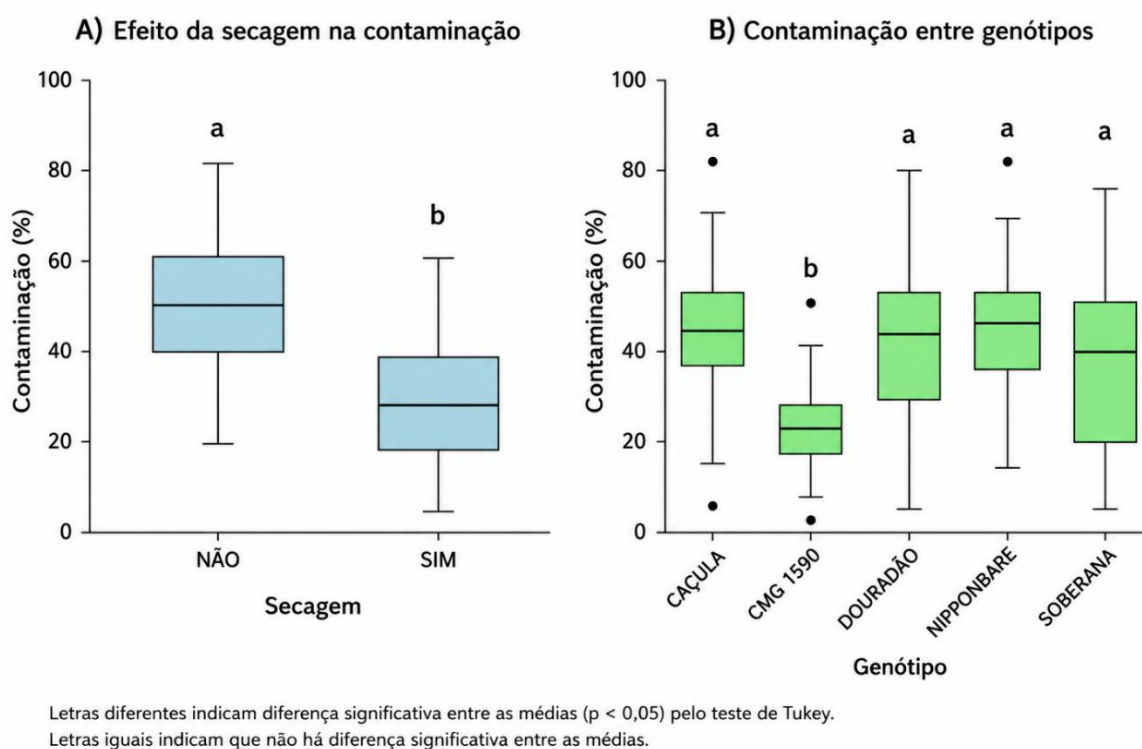
Em contraste com os demais materiais, o genótipo CMG 1590 apresentou menores taxas de contaminação em todas as condições avaliadas, mantendo comportamento consistente independentemente da lavagem prévia e do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio. Esse resultado sugere uma menor ocorrência de contaminação associada às sementes desse genótipo,

embora não seja possível determinar se essa resposta está relacionada a características intrínsecas do material genético ou à menor carga microbiana inicial.

3.2 Análise do efeito da secagem e desempenho sanitário

A análise da secagem pós-exposição ao hipoclorito de sódio mostrou redução nos níveis de contaminação em todos os genótipos avaliados (Figura 5A). A análise incluiu o fator secagem, avaliando sua influência na contaminação após a assepsia. A comparação entre a contaminação geral e os efeitos da lavagem, do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio e da secagem permitiu observar diferenças entre os tratamentos, possibilitando a identificação do protocolo que propicie uma menor contaminação (Figura 5B).

Figura 6 – Boxplots da porcentagem de sementes contaminadas (%) em função da secagem das sementes (A) e dos genótipos avaliados considerando o conjunto das condições de assepsia testadas (B). A linha central representa a mediana, as caixas representam o intervalo interquartil (25-75%), as barras indicam a amplitude dos dados e os pontos representam valores discrepantes. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



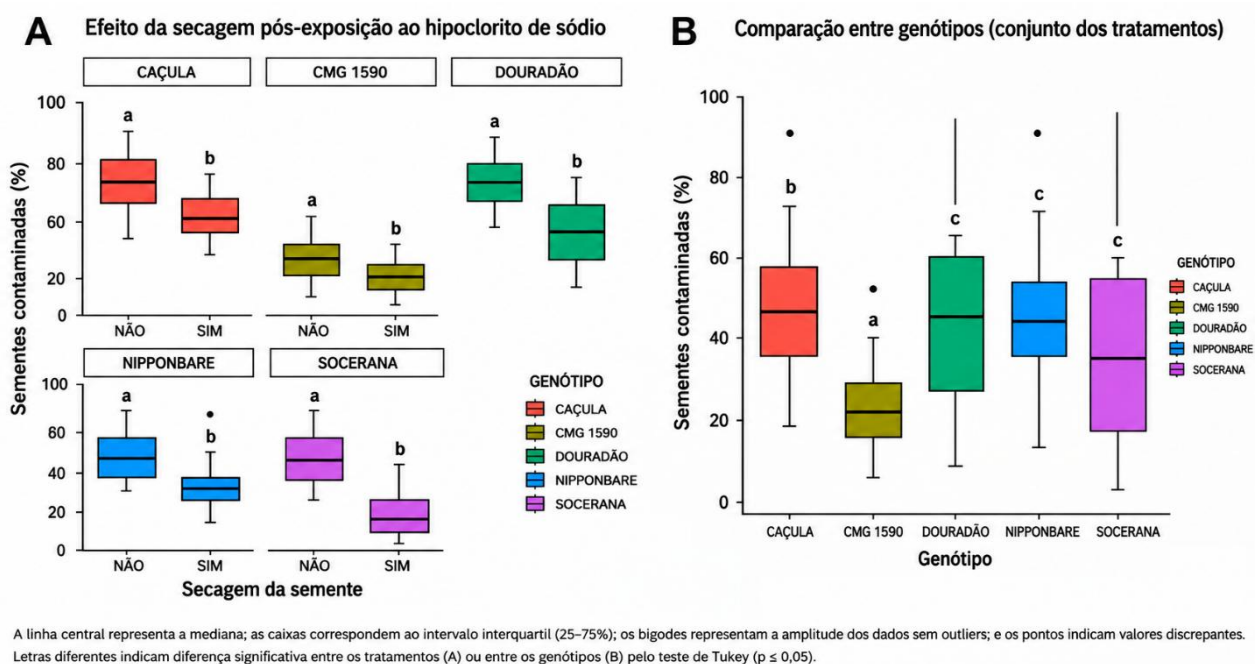
Fonte: Elaboração própria

Na comparação do efeito da secagem das sementes após a assepsia com hipoclorito de sódio, observou-se redução significativa da porcentagem de sementes contaminadas em todos

os genótipos avaliados, conforme evidenciado pelas diferenças entre sementes secas e não secas (Figura 6A). Considerando conjuntamente os fatores lavagem prévia, tempo de exposição ao hipoclorito de sódio e secagem das sementes, verificou-se diferença significativa entre os genótipos (Figura 6B). O genótipo CMG 1590 apresentou a menor porcentagem média de contaminação, diferindo significativamente dos demais genótipos. O genótipo Caçula apresentou valores intermediários, diferindo tanto de CMG 1590 quanto de BRS Douradão, Nipponbare e BRS Soberana, os quais não diferiram entre si.

Figura 7 – Incidência de sementes contaminadas em diferentes genótipos de arroz sob condições de assepsia. (A) Efeito da secagem superficial pós-assepsia (com e sem secagem).

(B) Comparação da porcentagem de sementes contaminadas entre os genótipos avaliados, considerando o conjunto dos tratamentos de assepsia. As linhas internas dos boxplots indicam a mediana, os limites das caixas representam o primeiro e terceiro quartis, as hastes mostram a amplitude dos dados e os pontos isolados representam valores discrepantes (outliers).



Fonte: Elaboração própria

A fim de conferir maior rigor às variações observadas entre os materiais, foram estimadas as probabilidades de contaminação (Tabela 4). Os dados apresentados permitem comparar o comportamento dos genótipos quanto à ocorrência de contaminação.

Tabela 6 – Probabilidade estimada de incidência de patógenos em sementes por genótipo, acompanhada do erro padrão e intervalos de confiança (IC) a 95% de probabilidade (EMMeans).

Genótipo	Probabilidade	Erro padrão	IC inferior	IC superior
BRSMG CAÇULA	0.421	0.0334	0.357	0.487
CMG 1590	0.240	0.0285	0.189	0.300
BRS DOURADÃO	0.415	0.0336	0.351	0.482
NIPPONBARE	0.434	0.0329	0.371	0.499
BRS SOBERANA	0.372	0.0344	0.308	0.442

Fonte: elaboração própria.

O genótipo CMG 1590 apresentou a menor probabilidade estimada de contaminação ($P = 0,240$), com intervalo de confiança de 0,189 a 0,300. Os genótipos Nipponbare ($P = 0,434$), BRSMG Caçula ($P = 0,421$) e BRS Douradão ($P = 0,415$) apresentaram as maiores probabilidades de contaminação, com sobreposição de seus intervalos de confiança. O genótipo BRS Soberana apresentou valor intermediário ($P = 0,372$) e o maior erro padrão (0,0344). Não houve sobreposição entre o intervalo de confiança superior do genótipo CMG 1590 e o intervalo inferior dos demais genótipos, com exceção de BRS Soberana. Esses resultados evidenciam que o genótipo influenciou a probabilidade de contaminação das sementes, indicando diferenças na suscetibilidade ao estabelecimento de microrganismos entre os materiais avaliados.

Para avaliar as diferenças entre os materiais, aplicou-se o teste de contrastes par a par utilizando a razão de chances (Odds Ratio) (Tabela 5). Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o genótipo CMG 1590 e os demais genótipos avaliados.

Tabela 7 – Comparações múltiplas par a par (post-hoc tests) das probabilidades de contaminação de sementes entre genótipos, expressas por razão de chances (Odds Ratio), erro padrão (SE) e estatística z.

Comparação	Odds ratio	SE	z	p-valor
BRSMG CAÇULA / CMG 1590	2.298	0.478	4.001	0.0006
BRSMG CAÇULA / BRS DOURADÃO	1.025	0.200	0.127	0.9999
BRSMG CAÇULA / NIPPONBARE	0.948	0.182	-0.277	0.9987
BRSMG CAÇULA / BRS SOBERANA	1.224	0.246	1.004	0.8534
CMG 1590 / BRS DOURADÃO	0.446	0.093	-3.866	0.0010
CMG 1590 / NIPPONBARE	0.413	0.085	-4.299	0.0002
CMG 1590 / BRS SOBERANA	0.533	0.114	-2.932	0.0278
BRS DOURADÃO / NIPPONBARE	0.925	0.178	-0.404	0.9944
BRS DOURADÃO / BRS SOBERANA	1.194	0.241	0.878	0.9052
NIPPONBARE / BRS SOBERANA	1.291	0.257	1.282	0.7024

Fonte: elaboração própria.

As chances de contaminação no genótipo BRSMG Caçula foram 2,29 vezes maiores em comparação ao genótipo CMG 1590 ($p = 0,0006$). De forma semelhante, o genótipo CMG 1590 apresentou menores chances de contaminação quando comparado ao Nipponbare ($OR = 0,413$; $p = 0,0002$) e ao BRS Douradão ($OR = 0,446$; $p = 0,0010$).

As comparações entre os genótipos BRSMG Caçula, BRS Douradão e Nipponbare não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). O genótipo BRS Soberana apresentou diferença significativa em relação ao CMG 1590 ($p = 0,0278$). A eficácia da higienização mecânica e do manejo de umidade pós-asepsia foi quantificada por meio das Médias Marginais Estimadas (EMMeans) (Tabela 6), permitindo a comparação entre os tratamentos de lavagem prévia e secagem.

Tabela 8 – Médias Marginais Estimadas (EMMeans) para a probabilidade de contaminação de sementes em função de lavagem e do manejo de secagem pós-assepsia, erro padrão (SE) e intervalos de confiança (IC 95%).

Lavagem	Probabilidade	SE	IC inferior	IC superior
NÃO	0.448	0.0212	0.407	0.490
SIM	0.303	0.0200	0.265	0.343

Contraste	Odds ratio	z	p
NÃO / SIM	1.87	4.917	<0.0001

Secagem	Probabilidade	SE	IC inferior	IC superior
NÃO	0.478	0.0210	0.437	0.519
SIM	0.278	0.0193	0.242	0.318

Contraste	Odds ratio	z	p
NÃO / SIM	2.37	6.764	<0.0001

Fonte: elaboração própria.

A lavagem prévia em água corrente reduziu a probabilidade de contaminação de 0,448 para 0,303. Não houve sobreposição entre os intervalos de confiança (IC 95%), com sementes não lavadas apresentando limite inferior de 0,407 e sementes lavadas limite superior de 0,343. O contraste estatístico indicou diferença significativa, com Odds Ratio de 1,87 ($p < 0,0001$).

A ausência da etapa de secagem resultou em probabilidade de contaminação de 0,478, enquanto a realização da secagem reduziu esse valor para 0,278. O contraste apresentou Odds Ratio de 2,37 e valor de z de 6,764. As estimativas apresentaram intervalos de confiança estreitos.

3.3 Análise do fator genético e potencial de calogênese

A influência do genótipo sobre a indução de calos foi avaliada por meio das Médias Marginais Estimadas (EMMeans), considerando o conjunto dos protocolos de assepsia. A Tabela 7 apresenta as probabilidades estimadas de indução de calos para cada genótipo, bem como os contrastes pareados expressos pela razão de chances (odds ratio), acompanhados dos respectivos erros padrão, estatísticas z e p-valores. Os contrastes indicaram diferença significativa apenas entre os genótipos BRSMG Caçula e CMG 1590 (odds ratio = 0,571; $p = 0,0212$), enquanto as demais comparações não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Tabela 9 – Médias marginais estimadas (EMMeans) para a probabilidade de indução de calos por genótipo e respectivos contrastes pareados. Os contrastes são apresentados como razão de chances (odds ratio), acompanhados do erro padrão (SE), estatística z e p-valor do teste de Wald.

GENÓTIPO	Odds ratio	SE	z	p-valor
BRSMG CAÇULA / CMG 1590	0.571	0.106	-3.022	0.0212
BRSMG CAÇULA / BRS DOURADÃO	0.831	0.155	-0.992	0.8592
BRSMG CAÇULA / NIPPONBARE	2.453	0.350	3.871	0.3127
BRSMG CAÇULA / SOBERANA	0.768	0.144	-1.411	0.6206
CMG 1590 / BRS DOURADÃO	1.456	0.271	2.014	0.2593
CMG 1590 / NIPPONBARE	1.085	0.210	0.420	0.9850
CMG 1590 / BRS SOBERANA	1.346	0.251	1.595	0.5005
BRS DOURADÃO / NIPPONBARE	1.366	0.258	1.652	0.4642
BRS DOURADÃO / BRS SOBERANA	0.925	0.174	-0.417	0.9937
NIPPONBARE / BRS SOBERANA	0.677	0.128	-2.068	0.2340
GENÓTIPO	Probabilidade	SE	IC inferior	IC superior
BRSMG CAÇULA	0.416	0.0320	0.355	0.479
CMG 1590	0.555	0.0323	0.491	0.617
BRS DOURADÃO	0.461	0.0330	0.398	0.526
NIPPONBARE	0.585	0.0317	0.325	0.449
BRS SOBERANA	0.481	0.0331	0.417	0.546

Fonte: elaboração própria.

Os genótipos Nipponbare e CMG 1590 apresentaram as maiores probabilidades de indução de calos ($P = 0,585$ e $0,555$, respectivamente), sendo os únicos a superar 50% de probabilidade após os tratamentos. O genótipo BRSMG Caçula apresentou a menor probabilidade de indução de calos ($P = 0,416$). Os genótipos BRS Soberana e BRS Douradão apresentaram valores intermediários de indução.

3.4 Influência dos fatores isolados (lavagem e secagem) na calogênese

A análise dos efeitos isolados mostrou que a lavagem prévia e a secagem pós-asepsia apresentaram maiores probabilidades de formação de calos, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que a lavagem prévia ($p = 0,0055$) e a secagem posterior ($p = 0,0221$) apresentaram efeitos significativos sobre a probabilidade de indução de calos. Observou-se aumento na probabilidade de formação de calos de 0,419 para 0,500 com a lavagem, e de 0,426 para 0,493 com a secagem.

Tabela 10 – Efeitos isolados da lavagem prévia e da secagem das sementes na probabilidade de indução de calos em arroz. Os valores representam as probabilidades estimadas, razões de chances (Odds ratio) e significância estatística para cada fator independente.

Lavagem		Probabilidade	
NÃO		0.419	
SIM		0.500	
Comparação:			
Contraste	Odds ratio		p
NÃO / SIM	0.72		0.0055
Secagem		Probabilidade	
NÃO		0.426	
SIM		0.493	
Comparação			
Contraste	Odds ratio	p	
NÃO / SIM	0.763	0.0221	

Fonte: elaboração própria.

3.5 Comportamento dos genótipos quanto à viabilidade e recalcitrância dos explantes

A probabilidade de ocorrência de inércia morfogênica, representada pela ausência de indução de calos em sementes assépticas, foi estimada por meio do modelo linear generalizado binomial, e os resultados estratificados por genótipo são apresentados na Tabela 9. Os genótipos BRS Soberana e BRSMG Caçula apresentaram as maiores probabilidades estimadas de inércia (0,178 e 0,164, respectivamente), enquanto Nipponbare apresentou a menor probabilidade (0,016).

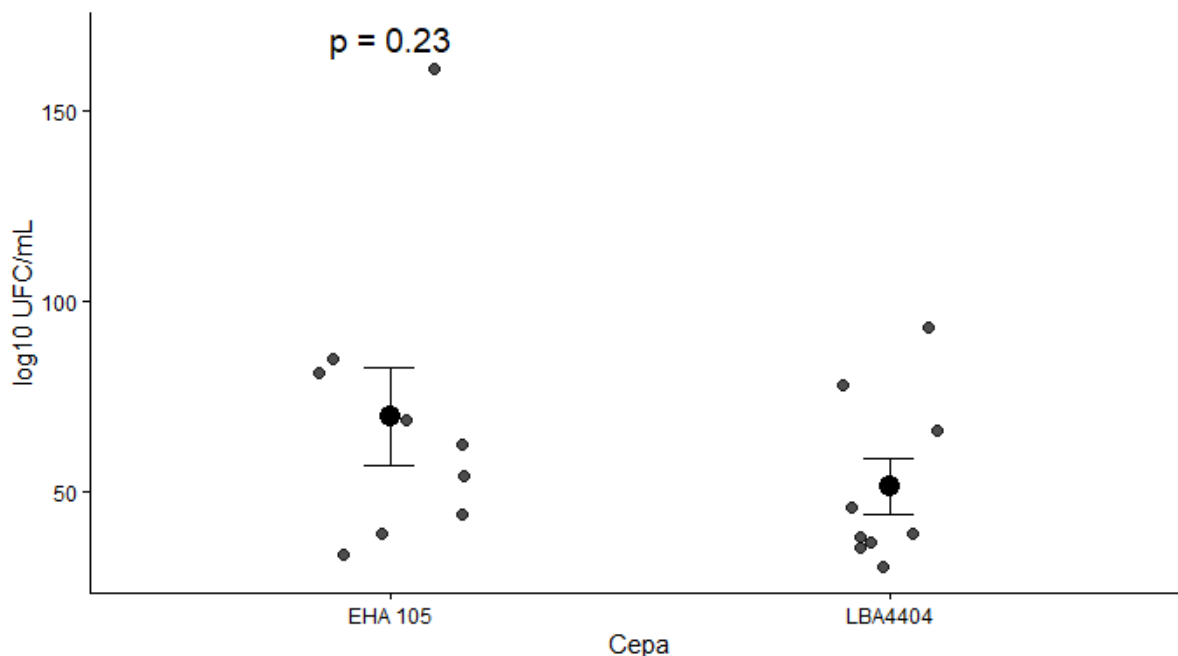
Tabela 11 – Probabilidade de sobrevivência de explantes de arroz que não apresentaram contaminação microbiana nem indução de calos em meio de cultura. Valores expressos em probabilidade estimada e Erro Padrão (SE).

Genótipo	Probabilidade	SE
DOURADÃO	0.117	0.024
SOBERANA	0.178	0.026
NIPPONBARE	0.016	0.030
CAÇULA	0.164	0.025
CMG 1590	0.103	0.022

Fonte: elaboração própria.

Ao que se refere a UFC, a análise de variância (ANOVA) não revelou diferença significativa entre as cepas avaliadas para a variável UFC ($F = 1,56$; $p = 0,23$), indicando ausência de efeito estatisticamente significativo da cepa nas condições experimentais testadas (Figura 7).

Figura 8 – Densidade bacteriana ($\log_{10}$ UFC/mL) das cepas EHA105 e LBA4404. Os dados representam média $\pm$ erro padrão (SEM) de três repetições biológicas independentes. Não foram observadas diferenças significativas entre as cepas (teste t de Student, $p > 0,05$).



As cepas avaliadas não diferiram estatisticamente entre si para a variável UFC. Pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, ambas as cepas foram agrupadas no mesmo nível de significância (grupo “a”), indicando comportamento semelhante quanto à formação de unidades formadoras de colônia.

4 DISCUSSÃO

A redução da contaminação observada após a lavagem prévia indica que parte significativa da carga microbiana está associada superficialmente às sementes. Esse comportamento sugere que a etapa de limpeza física atua como um fator determinante na eficiência da assepsia, ao reduzir barreiras orgânicas que interferem na ação do hipoclorito de sódio (Bošnjak et al., 2024). Esse efeito é consistente com a afirmativa que sementes podem abrigar uma microbiota diversa, a qual influencia diretamente a dinâmica de contaminação em condições *in vitro*. Além disso, a literatura indica que a presença de matéria orgânica reduz a eficácia de agentes oxidantes ao consumir o cloro ativo, fato que explica a maior eficiência observada quando a lavagem é aplicada previamente (Griffis; Manners; Girimurugan 2023; Silva et al. 2015).

Por outro lado, a análise do aumento do tempo de exposição ao NaClO evidenciou ausência de resposta linear na redução da contaminação, indicando que a ampliação do tempo não resultou em ganhos consistentes de assepsia. Esse comportamento sugere a existência de um limite de eficiência do tratamento químico, a partir do qual o aumento da exposição não promove melhorias adicionais significativas. Esse padrão é consistente com resultados relatados em outras espécies, nos quais o prolongamento do tempo de exposição ao hipoclorito não aumentou significativamente a eficiência da desinfestação, mesmo sob condições controladas (Faiad et al., 1997). Em conjunto, esses resultados indicam que a eficiência do protocolo não depende apenas da intensidade do agente químico, mas principalmente do equilíbrio entre as etapas físicas e químicas do processo.

Adicionalmente, estudos em arroz irrigado indicam que a desinfestação adequada com NaClO pode melhorar a expressão do potencial fisiológico, aumentando a proporção de plântulas normais e reduzindo anomalias e mortalidade (Scheidt et al., 2020), o que reforça a importância de se estabelecer um ponto ótimo de tratamento que maximize a assepsia sem comprometer a viabilidade dos explantes.

No genótipo BRS Soberana, observou-se descritivamente um aumento da mediana da porcentagem de contaminação após 30 minutos de exposição ao hipoclorito de sódio. Entretanto, essa variação não foi acompanhada de diferença estatisticamente significativa, devendo ser interpretada apenas como uma tendência observada nos dados. Ainda assim, esse comportamento pode refletir que tempos prolongados de exposição a agentes oxidantes nem sempre resultam em maior eficiência da desinfestação, conforme relatado por Faiad et al., (1997) e Scheidt et al. (2020).

Nesse contexto, os resultados obtidos indicam que o período de 20 minutos representa um ponto de equilíbrio mais eficiente entre sanitização e preservação do material, enquanto exposições superiores podem comprometer a integridade fisiológica sem ganhos adicionais consistentes. Assim, evidencia-se que a eficiência da assepsia depende mais da adequação do protocolo e da etapa física inicial de limpeza do que da intensificação do agente químico.

A etapa de secagem contribuiu adicionalmente para o controle da contaminação, atuando como uma barreira complementar após os tratamentos de lavagem e desinfestação química. A redução consistente dos níveis de contaminação observada após a remoção da umidade residual sugere que a presença de água superficial pode favorecer a sobrevivência de microrganismos remanescentes. Esse efeito foi particularmente evidente no genótipo BRS Soberana, que apresentou redução expressiva da contaminação após a aplicação sequencial dos tratamentos. Esses resultados estão de acordo com Davoudpour et al. (2020), que destacam a

importância da remoção da umidade residual após a assepsia para minimizar a proliferação microbiana e favorecer o estabelecimento do explante em meio de cultura, reforçando o papel da secagem como etapa complementar em protocolos de cultura de tecidos (Cassells, 2012b; Leifert & Cassells, 2001).

Esse entendimento se torna mais evidente quando se observa que o hipoclorito de sódio, embora eficiente na redução da contaminação superficial, pode não eliminar completamente microrganismos fortemente aderidos ou protegidos por estruturas mais complexas do tegumento (Miché & Balandreau, 2001). Essa limitação ajuda a explicar a persistência de contaminação em genótipos como BRS Douradão e Nipponbare, indicando que a eficiência do tratamento químico isolado não é suficiente para garantir assepsia completa.

Nesse contexto, a variação observada entre genótipos sugere forte influência da constituição biológica do material vegetal, uma vez que diferentes genótipos podem abrigar comunidades microbianas distintas e responder de forma desigual aos mesmos protocolos de assepsia (Chen et al., 2026). Essa influência genotípica ajuda a compreender as diferenças observadas entre materiais mais e menos suscetíveis, indicando que a resposta à assepsia não depende apenas do tratamento, mas também da interação com o hospedeiro.

De forma complementar, diferenças estruturais do tegumento podem interferir tanto na aderência de microrganismos quanto na eficiência de penetração do agente desinfestante, o que contribui para explicar a maior eficiência observada em genótipos como CMG 1590 em comparação a materiais mais suscetíveis. Assim, a eficiência do protocolo deve ser entendida como resultado da interação entre características do genótipo e das etapas de assepsia, e não apenas da intensidade do tratamento químico. Do ponto de vista estatístico, essa superioridade do CMG 1590 é confirmada pela separação clara de seus intervalos de confiança em relação aos genótipos mais suscetíveis, como Nipponbare, indicando uma diferença consistente no padrão de contaminação. Conforme Cumming e Finch (2005), a ausência de sobreposição entre intervalos de confiança de 95% constitui evidência robusta de diferenças estatísticas, reforçando a distinção do comportamento desse genótipo.

Além disso, a menor variabilidade observada no CMG 1590, evidenciada pelo erro padrão reduzido, indica maior estabilidade experimental e maior precisão nas estimativas, o que aumenta a confiabilidade das comparações entre genótipos, conforme discutido por Lenth (2016). Em conjunto, esses resultados indicam que o desempenho superior do CMG 1590 não se limita à menor contaminação, mas também à consistência de sua resposta sob diferentes condições do protocolo.

Os contrastes pareados não evidenciaram diferenças significativas entre os genótipos BRSMG Caçula, BRS Douradão e BRS Soberana ($p > 0,05$), indicando comportamento semelhante quanto à resposta aos protocolos de assepsia nas condições avaliadas. Em contraste, o genótipo CMG 1590 apresentou menor probabilidade de contaminação, diferenciando-se dos demais materiais avaliados.

Essa superioridade é reforçada pela análise de razão de chances, na qual o genótipo BRSMG Caçula apresentou 2,29 vezes maior probabilidade de contaminação em relação ao CMG 1590, evidenciando maior risco associado a esse material. Por outro lado, quando comparado ao Nipponbare, o CMG 1590 apresentou redução superior a 50% nas chances de infecção ($OR = 0,413$), o que indica menor susceptibilidade relativa à contaminação e reforça sua estabilidade sanitária.

Quando considerados os fatores operacionais do protocolo, observou-se que a lavagem prévia reduziu significativamente a contaminação (0,448 para 0,303), indicando que parte relevante da carga microbiana está associada à superfície das sementes. Esse resultado reforça a importância da remoção inicial de detritos, uma vez que favorece a ação subsequente do agente químico (Neergaard, 1977). De forma complementar, a secagem pós-assepsia também apresentou efeito significativo na redução da contaminação ($OR = 2,37$; $p < 0,0001$), evidenciando que a associação entre etapas físicas e químicas aumenta a eficiência do protocolo de assepsia (Carvalho, 2012).

Em conjunto, esses resultados indicam que a eficiência da assepsia não depende de um fator isolado, mas da interação entre etapas físicas, químicas e da própria resposta genotípica. Esse encadeamento é coerente com o conceito de hurdle technology, no qual múltiplas barreiras atuam de forma combinada para limitar a sobrevivência microbiana (Leistner, 2000).

Além disso, os resultados de indução de calos demonstram que o protocolo de assepsia não comprometeu a competência morfogenética dos explantes, uma vez que Nipponbare e CMG 1590 apresentaram altas taxas de calogênese e não diferiram estatisticamente entre si ($p = 0,9850$). Esse comportamento indica que a sanidade obtida pelo protocolo favoreceu a manutenção da capacidade de dediferenciação celular, conforme já relatado em estudos sobre cultura de tecidos vegetais (George; Hall; Klerk, 2007; Hiei et al., 1994).

Por fim, a recalcitrância observada em genótipos como BRS Soberana e BRSMG Caçula evidencia que, apesar da eficiência do protocolo de assepsia, existem limitações intrínsecas associadas ao material genético. Esses resultados reforçam que a resposta *in vitro* resulta da interação entre o estado sanitário do explante e sua competência fisiológica, sendo que

genótipos mais responsivos, como o CMG 1590, apresentam melhor equilíbrio entre controle de contaminação e capacidade regenerativa.

Os resultados obtidos pela análise de variância, considerando o caráter densidade bacteriana entre as cepas *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 e LBA4404, indicaram ausência de diferença significativa. A estimativa evidencia comportamento semelhante quanto ao crescimento *in vitro* sob as condições avaliadas ($F = 1,56$; $p = 0,23$), sugerindo que ambas as cepas apresentam capacidade equivalente de multiplicação em meio de cultura padrão, o que está de acordo com o facto de diferentes linhagens de *Agrobacterium* poderem exibir desempenho semelhante em condições controladas de crescimento.

Esse resultado está de acordo com relatos de que diferentes linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* podem apresentar taxas de crescimento semelhantes em condições controladas (Toki, 1997). Entretanto, a eficiência da transformação genética não depende exclusivamente da densidade bacteriana, mas também da expressão dos genes de virulência (*vir*), da capacidade de transferência do T-DNA e da interação entre a bactéria e o genótipo da planta hospedeira (Gelvin, 2003). Assim, embora não tenham sido observadas diferenças no crescimento bacteriano, a cepa EHA105, por ser derivada de uma linhagem hipervirulenta, tende a apresentar maior eficiência de transformação do que LBA4404 (Hiei et al., 1994; Toki, 1997). Esses resultados reforçam que a seleção da cepa para protocolos de transformação deve considerar características fisiológicas e moleculares associadas à transferência de T-DNA, e não apenas seu crescimento em meio de cultura.

5 CONCLUSÃO

Este estudo permitiu estabelecer que a eficiência dos protocolos *in vitro* em arroz (*Oryza sativa* L.) está associada à integração de fatores físicos, químicos, genotípicos e microbiológicos, que influenciam diretamente as etapas essenciais da transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. As etapas de lavagem prévia e secagem pós-asepsia mostraram-se determinantes para a redução da contaminação, enquanto o aumento do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio não proporcionou ganhos consistentes na desinfestação. Entre os genótipos avaliados, CMG 1590 apresentou melhor desempenho quanto à redução da contaminação e à indução de calos. As cepas EHA105 e LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* apresentaram crescimento *in vitro* semelhante, indicando comportamento equivalente nas condições avaliadas. Conclui-se que a otimização de protocolos *in vitro* em arroz depende da combinação adequada das etapas de assepsia, da seleção do genótipo e das

condições empregadas na cultura de tecidos e no cultivo bacteriano, constituindo uma base para estudos de regeneração e transformação genética.

BIBLIOGRAFIA

BOŠNJAK MIHOVILOVIĆ, Anita *et al.* The Use of Sodium Hypochlorite and Plant Preservative Mixture Significantly Reduces Seed-Borne Pathogen Contamination When Establishing In Vitro Cultures of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seeds. **Agriculture**, v. 14, n. 4, p. 556, 31 mar. 2024.

BOŠNJAK, Mihovilović Anita *et al.* The Use of Sodium Hypochlorite and Plant Preservative Mixture Significantly Reduces Seed-Borne Pathogen Contamination When Establishing In Vitro Cultures of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seeds. **Agriculture**, v. 14, n. 4, p. 556, 31 mar. 2024.

CARVALHO, Nelson Moreira de; Nakagawa, João. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. [S.l.: S.n.].

CASSELLS, Alan C. Pathogen and Biological Contamination Management in Plant Tissue Culture: Phytopathogens, Vitro Pathogens, and Vitro Pests. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 57–80.

CASSELLS, Alan C. Pathogen and Biological Contamination Management in Plant Tissue Culture: Phytopathogens, Vitro Pathogens, and Vitro Pests. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 57–80.

CHEN, Xiaoyulong *et al.* The tomato seed microbiome is mainly shaped by host genotype and production site. **mSystems**, v. 11, n. 1, 20 jan. 2026.

CHENG, Xiongying *et al.* Agrobacterium-transformed rice plants expressing synthetic cryIA (b) and cryIA (c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 2767–2772, 17 mar. 1998.

CHU, Chih-Ching; WANG, Ching-Chu; SUN, Ching-San. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, 26 out. 1975.

CUMMING, Geoff; FINCH, Sue. Inference by Eye: Confidence Intervals and How to Read Pictures of Data. **American Psychologist**, v. 60, n. 2, p. 170–180, 2005.

DAVOUDPOUR, Yalda *et al.* High resolution microscopy to evaluate the efficiency of surface sterilization of Zea Mays seeds. **PLOS ONE**, v. 15, n. 11, p. e0242247, 30 nov. 2020.

FAIAD, M. G. R. *et al.* Efeito do hipoclorito de sódio sobre a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillet. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 19, n. 1, p. 14–17, 30 jun. 1997.

GEORGE, Edwin F. ;; HALL, Michael A. ;; KLERK, Geert-Jan de. Plant Propagation by Tissue Culture. *In: GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; KLERK, Geert-Jan De (Orgs.)*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007.

GEORGE, Edwin F.; MICHAEL, A.; HALL, Geert-Jan De Klerk. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. v. 1

GRIFFIS, J. L.; MANNERS, M. M.; GIRIMURUGAN, S. B. Methods of asepsis for in vitro establishment and germination of *Eugenia uniflora* seeds. **Acta Horticulturae**, n. 1359, p. 155–164, fev. 2023.

HANDEL, Cristine Luise *et al.* Cereal Genetic Transformation via *Agrobacterium tumefaciens*. 1997.

HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUBO, T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Pub Med**, 1997.

HIEI, Yukoh *et al.* Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, v. 6, n. 2, p. 271–282, ago. 1994.

HIEI, Yukoh; ISHIDA, Yuji; KOMARI, Toshihiko. **Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens***. **Frontiers in Plant Science** Frontiers Media S.A., 7 nov. 2014.

KHOKHAR, Muhammad Ilyas; IQBAL, Muhammad Zaffar; DA SILVA, Jaime A. Teixeira. Rapid callogenesis and plant regeneration of fine and coarse varieties of rice. **BioTechnologia**, v. 98, n. 4, p. 283–293, 16 mar. 2018.

KUMARI, Anjana; NAGPAL, Avinash K.; KATNORIA, Jatinder K. Potential of some explants for callus induction and plantlet regeneration in *Solanum lycopersicum* L. under treatment of different plant growth regulators. **BioTechnologia**, v. 105, n. 3, p. 227–247, 30 set. 2024.

LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 37, n. 2, p. 133–138, mar. 2001.

LEISTNER, Lothar. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 1–3, p. 181–186, abr. 2000.

LENTH, Russell V. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. **Journal of Statistical Software**, v. 69, n. 1, 2016.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. **Plant Cell Culture Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2018. v. 1815

MICHÉ, Lucie; BALANDREAU, Jacques. Effects of Rice Seed Surface Sterilization with Hypochlorite on Inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3046–3052, jul. 2001.

NEERGAARD, Paul. **Methods for testing the health of seeds**. [S.l.: S.n.]. v. 2

PRÍAS, Blanco Mónica *et al.* An *Agrobacterium* strain auxotrophic for methionine is useful for switchgrass transformation. **Transgenic Research**, v. 31, n. 6, p. 661–676, 14 dez. 2022.

SCHEIDT, Bruno Tabarelli *et al.* Prior disinfection of irrigated rice seeds under laboratory conditions favors expression of physiological potential. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 19, n. 4, p. 494–497, 14 dez. 2020.

SHRI, Manju *et al.* An improved *Agrobacterium*-mediated transformation of recalcitrant indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Protoplasma**, v. 250, n. 2, p. 631–636, 10 abr. 2013.

SILVA, Jaime A. Teixeira da *et al.* Disinfection procedures for *in vitro* propagation of *Anthurium*. **Folia Horticulturae**, v. 27, n. 1, p. 3–14, 1 jun. 2015a.

SILVA, Luciano Coutinho *et al.* Decontaminant solution on in vitro growth of *Byrsonima intermedia* seedlings. **Ciência Rural**, v. 45, n. 4, p. 674–679, abr. 2015b.

TERZI AKSOY, Begüm. Surface Disinfection of Bread Wheat Seeds for in vitro Germination. **Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, v. 12, n. 1, p. 301–310, 30 maio 2025.

TINAK EKOM, Danielle Christelle *et al.* Genotype-specific disinfection protocols enable reliable in vitro culture from mature field-harvested maize seeds. **Discover Plants**, v. 3, n. 1, p. 90, 17 abr. 2026.

XIANG, Zhipan *et al.* Agrobacterium-Mediated High-Efficiency Genetic Transformation and Genome Editing of Chaling Common Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff.) Using Scutellum Tissue of Embryos in Mature Seeds. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 24 mar. 2022.

Artigo 2 - Redigido conforme norma do periódico científico - Versão publicada	
Título do artigo:	Analysis of callus induction and regeneration in rice genotypes under different concentrations of 2,4-D.
Autores:	Suamith Hermínio Luís Leveque Alisson Willians Teixeira Silva Elisa Ágilo Flávia Barbosa Silva Botelho
Periódico:	Discover plants-Springer Nature
ISSN	3005-1207
DOI	https://doi.org/10.1007/s44372-026-00624-x

ARTIGO 2 – ANALYSIS OF CALLUS INDUCTION AND REGENERATION IN RICE GENOTYPES UNDER DIFFERENT CONCENTRATIONS OF 2,4-D.

Suamith Herminio Luís Leveque*¹ Alisson Willians Teixeira Silva², Elisa Agilo³, Flávia Barbosa Silva Botelho⁴

¹Department of Chemistry: Postgraduate Program in Biotechnology Vegetable. University Federal from Lavras (UFLA) P.O. Box 3037 ZIP Code 37203-202 – Lavras, MG – Brazil

²Department of Chemistry: Postgraduate Program in Biotechnology Vegetable. University Federal from Lavras (UFLA) P.O. Box 3037 ZIP Code 37203-202 – Lavras, MG – Brazil

*Agricultural Research Institute of Mozambique, Av. das FPLM, nº 2698, P.O. Box 3658, Maputo, Mozambique.

³Provincial Directorate of Agriculture, District Services of Economic Activities – Niassa, Mozambique

⁴Department of Agriculture, University Federal of Lavras (UFLA), Box Postal Code 3037, Postal Code 37203-202 – Lavras, MG – Brazil

¹Corresponding author: Suamith Hermínio Luís Leveque: suamith.leveque@estudante.ufla.br

¹<https://orcid.org/0009-0007-4346-8008>,

Abstract

This study aimed to evaluate the response of different 2,4-D concentrations on callus induction and plant regeneration in *indica* and *japonica* rice genotypes, specifically the elite line CMG1590 and the model cultivar Nipponbare. Despite the importance of rice biotechnology, genotypic recalcitrance remains a major bottleneck for genome editing. Mature seeds were inoculated onto N6 medium supplemented with 2,4-D concentrations (0 to 3.0 mg/L) targeting the scutellum as the primary explant. The results revealed a quadratic dose-response relationship: the absence of 2,4-D (T0) prevented callus formation, whereas the peak induction occurred at 2.5 mg/L (T4), with 93.3% for Nipponbare and 80.0% for CMG1590. Mechanistically, Nipponbare's superior performance is attributed to efficient auxin signaling via the SCFTIR1/OsAFB2 complex, whereas supra-optimal concentrations (3.0 mg/L 2,4-D) were associated with reduced cellular performance, potentially reflecting oxidative stress responses and involvement of the OsMAPK6-ROS pathway. Regeneration on MS medium was most effective following induction at 2.0 mg/L (T3). ANOVA confirmed a highly significant Genotype × Regulator interaction ($p < 0.01$). In conclusion, this research validates a 2.0–2.5

mg/L 2,4-D threshold as a strategic platform to overcome recalcitrance, providing a robust protocol for future CRISPR/Cas9-mediated improvement of local rice germplasm.

Keywords: *Oryza sativa* L., Scutellum, 2,4-D, Somatic embryogenesis, Recalcitrance, Tissue culture optimization.

Introduction

Rice (*Oryza sativa* L.) remains a cornerstone of global food security and a fundamental model system for monocotyledonous genetics due to its small genome and established transformation protocols. However, its biotechnological advancement through gene editing is frequently constrained by morphogenic recalcitrance. This limitation is particularly pronounced when comparing *japonica* models to elite or *indica* genotypes, which often exhibit significantly lower *in vitro* responsiveness. (Carsono et al., 2021; Sidek et al., 2022). Consequently, optimizing callogenesis from mature embryos is a prerequisite for establishing high-throughput regeneration systems (Sutradhar et al., 2024).

The success of *in vitro* regeneration via somatic embryogenesis is governed by the interaction between the explant's genetic constitution and the exogenous hormonal balance. In this context, the synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is the gold standard for inducing cellular dedifferentiation. It acts by reprogramming specialized somatic tissues, such as the embryo scutellum, back into a totipotent meristematic state (Almeida et al., 2020; Usenbekov, et al., 2024). While essential for triggering this transition, 2,4-D concentrations must be precisely calibrated, suboptimal levels fail to induce embryogenesis, whereas supra-optimal concentrations can lead to somaclonal variation, physiological stress, or total inhibition of regenerative capacity (Susanto et al., 2020; Yimam et al., 2025).

Despite the ubiquity of 2,4-D protocols, genotype-dependent responses remain a critical bottleneck. Elite lines with superior agronomic traits often exhibit lower regeneration frequencies than laboratory models. As highlighted by recent studies, customizing these tissue culture parameters is a vital step for breeding programs focused on nutritional improvement or climate resilience (Usenbekov, et al., 2024).

Therefore, this study aimed to evaluate the morphogenic potential of two distinct rice genotypes, the model cultivar and the elite line CMG1590, under varying concentrations of 2,4-D. By analyzing the interaction between hormonal stimuli and genetic backgrounds, we aim to

develop a more efficient protocol for callus induction and subsequent plant regeneration, thereby providing a robust framework for future biotechnological interventions.

Materials and methods

Plant Material and Botanical Characterization

The study was conducted using mature seeds of two rice genotypes (*Oryza sativa* L.): a model *japonica* cultivar and the elite line CMG1590 (UFLA/EPAMIG/EMBRAPA). Botanically, the studied rice genotypes (*Oryza sativa* L.) follow the standard *Poaceae* architecture, characterized by cylindrical, hollow culms and a terminal panicle inflorescence. As a staple cereal originating from tropical and subtropical regions, its caryopsis (grain) houses the scutellum, a structure rich in meristematic cells and the primary target for embryogenic callus induction due to its high cellular competence and capacity for epigenetic reprogramming under exogenous auxin (Kellogg, 2015; Sutradhar et al., 2024). Within this species, the *indica* subspecies (represented by the elite line CMG1590) and the *japonica* subspecies (represented by the model cultivar Nipponbare) exhibit distinct morphophysiological traits. While *japonica* varieties are generally more amenable to *in vitro* manipulation, *indica* types often display higher recalcitrance, requiring precise adjustments in hormonal concentrations, such as 2,4-D, to overcome genotype-specific barriers to callus induction and subsequent plant regeneration (Yimam et al., 2025; Yoshida, 1981). Seeds of *Oryza sativa* L. used in this study were obtained from plants grown under controlled greenhouse conditions. The plant materials correspond to the cultivars CMG1590 and Nipponbare, maintained at the Universidade Federal de Lavras (UFLA). The CMG1590 cultivar was developed by the MelhorArroz research group at UFLA.

Surface Sterilization

Seeds were immersed in 70% (v/v) ethanol for 1 minute, followed by treatment with a 2.5% (v/v) sodium hypochlorite (NaOCl) solution supplemented with Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA) for 30 minutes (the solution was refreshed every 10 min). After five rinses in sterile deionized water, seeds were blotted dry on sterile filter paper.

Callus Induction and Incubation

Explants (mature seeds) were inoculated onto Chu (N6) basal medium (Chu et al., 1975) supplemented with 30 g/L sucrose, 7.0 g/L agar, B5 vitamins (Gamborg et al., 1968), proline 2.8 g/L and 0.3 g/L casein hydrolysate. The pH was adjusted to 5.8. The experimental factor was 2,4-D concentration (0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, and 3.0 mg/L). Cultures were maintained at $25 \pm$

2 °C in total darkness for 21–28 days. The developmental stages from explant inoculation to successful plantlet acclimation are shown in Figure 1.

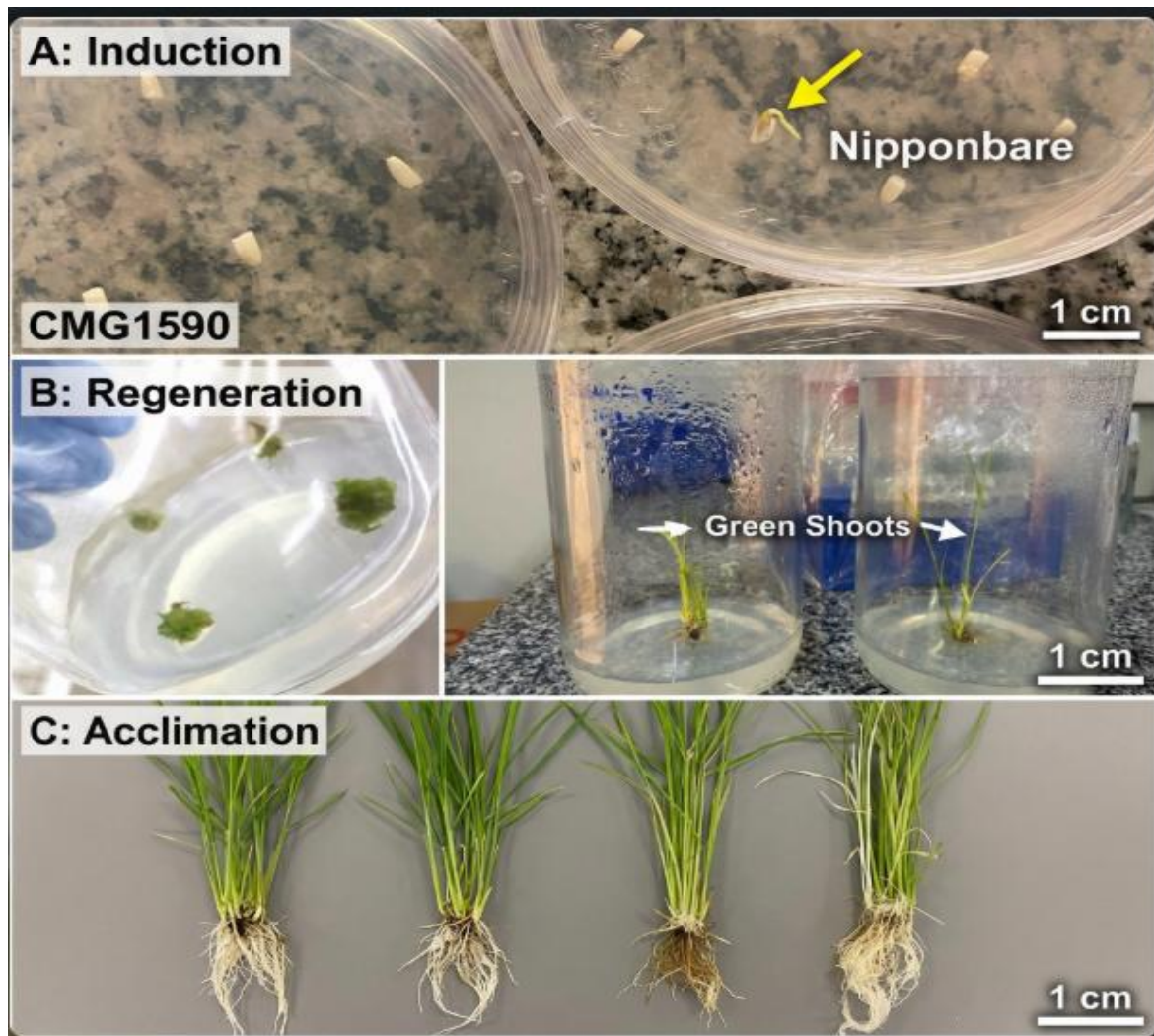


Fig. 1: Morphological stages of callus induction and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.): (A) Detail of the seed scutellum showing the first signs of cellular dedifferentiation after 7 days on N6 medium supplemented with 2,4-D. (B) Shoot bud differentiation and early organogenesis from green nodular calli after 16 days on MS regeneration medium. (C) Acclimatization phase of regenerated plants, showing complete development (roots and shoots) and readiness for transfer to soil or ex vitro conditions.

Shoot Regeneration

Embryogenic calli were transferred to Murashige & Skoog (MS) medium (Murashige & Skoog, 1962), supplemented with 2.0 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP) and 0.5 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA). For callus induction, Chu N6 medium was selected due to its

widespread use and validation in rice tissue culture protocols to promote embryogenic callus formation, as N6 supplemented with 2,4-D has been shown to efficiently induce calli from rice explants. For subsequent regeneration, MS medium was employed as it provides a balanced supply of macronutrients, micronutrients, and vitamins that support shoot and root differentiation, and is commonly used as a regeneration medium in rice protocols, yielding high shoot formation from calli. This two-step approach, with media optimized for each developmental stage, is consistent with current rice tissue culture methodologies (Ali et al., 2021; Gao et al., 2024; Yimam et al., 2025). Cultures were incubated under a 16-hour photoperiod ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Regeneration frequency and the average number of shoots per callus were recorded after 30 days.

Experimental Design and Data Analysis

The study employed a completely randomized design (CRD) in a 2×6 factorial arrangement (2 genotypes $\times$ 6 concentrations). with five replicates per treatment, each containing 15 seeds. Data were subjected to ANOVA. We calculated Callus Induction Frequency (CIF), Regeneration Frequency (RF), and the time for 50% and 90% induction (CE_{50} and CE_{90}). Percentage data were arcsine-transformed. Mean comparisons were performed using Tukey's HSD test ($p < 0.05$). Analyses were conducted in R (v. 4.2.2) using the ExpDes.pt and ggplot2 packages. The variables were determined according to the following equations:

(a) Callus Induction Frequency (CIF)

$$\text{CIF (\%)} = \frac{\text{number of seeds forming calli}}{\text{total number of inoculated seeds}} \times 100$$

(b) Regeneration Frequency (RF)

$$\text{RF (\%)} = \frac{\text{number of calli with green shoots}}{\text{total number of calli transferred to regeneration medium}} \times 100$$

(c) Non-linear regression analysis to determine the time required for 50% and 90% callus induction (CE_{50} and CE_{90}).

$$(d) f(x) = c + \frac{d-c}{1+\exp(b(x-e))}$$

Where:

$f(x)$: represents the percentage of callus induction over time x

x : Time (days)

d and c : are the upper and lower asymptotes, respectively

b : Slope of the curve (indicates the rate of the induction process)

e : CE50 value (time required to achieve 50% of the maximum induction).

(e) Arcsine square root transformation

$$y = \arcsin\sqrt{x/100}$$

Where:

y : is the transformed value used for statistical analysis.

x : is the observed frequency or percentage.

100: is the constant used to convert the percentage into a decimal fraction (0 to 1).

Results and discussion

Average percentage of calluses per treatment and per genotype

Callus induction from mature embryos followed a quadratic, concentration-dependent response, characterized by a complete absence of response in the control (T0) and peak efficiency at intermediate concentrations. The *japonica* genotype reached its induction zenith at T4 (93.3%), outperforming the local *indica* variety CMG1590, which achieved its maximum performance under the same treatment but at a lower rate (80%). This quantitative divergence highlights distinct embryogenic competence windows and genotype-specific hormonal sensitivity thresholds between the two subspecies (Figure 2).

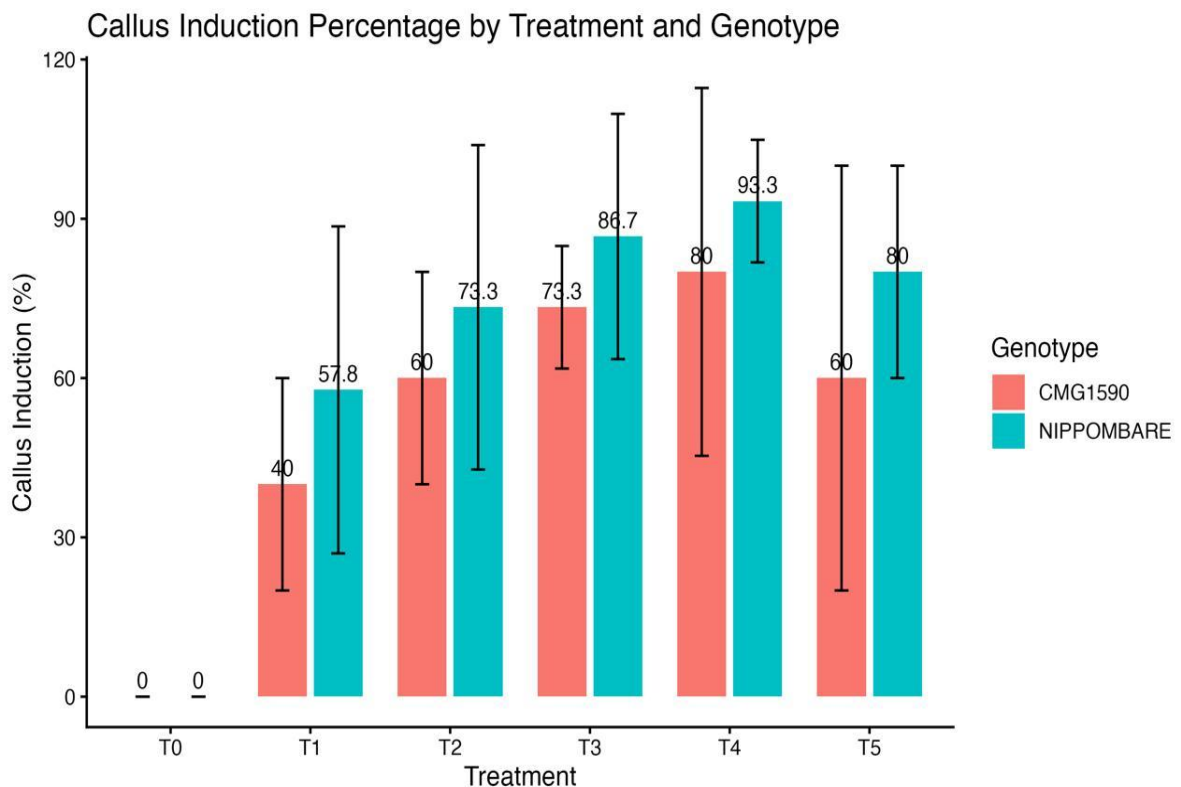


Fig. 2: Callus induction percentage of *japonica* (Nipponbare) and *indica* (CMG1590) rice genotypes across different 2,4-D treatments. Both genotypes exhibit a quadratic response to increasing auxin concentrations, with peak induction at T4 (93.3% for and 80% for CMG1590) followed by a decline at T5. Data are expressed as mean $\pm$ SS of three biological replicates.

The statistical superiority across all hormonal treatments (T1–T5) reflects a more responsive auxin signaling machinery. This phenomenon is underpinned by the upregulation of transcription factors such as OsARF16 and OsARF19, which catalyze the cellular transition to a dedifferentiated state. As reported by Guo et al., (2023) The efficiency of Aux/IAA repressor degradation (specifically OsIAA14) via the TIR1 receptor pathway is what distinguishes high-performance genotypes from recalcitrant varieties. Our data confirms that it maintains a consistently high induction stability (>90%), closely aligning with established reference standards (Yimam et al., 2025).

In contrast, the CMG1590 genotype exhibited a moderate recalcitrance profile, typical of tropical *indica* varieties, with a sharp decline in callogenesis at T5 (60%). This result suggests that elevated 2,4-D concentrations exceed the cellular tolerance threshold, triggering phytotoxicity. Mechanistically, this decline is attributed to the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and the activation of the OsMAPK5-mediated apoptosis pathway. The browning observed in regenerated calli likely reflects oxidative stress responses, as reported in previous studies of rice tissue culture and other plant species. This process involves enzymatic oxidation of phenolics, ROS production, and alterations in antioxidant enzyme activity (Permadi et al., 2024; Wu et al., 2024; Zhang et al., 2020). It should be noted that no direct experimental measurements of these markers were performed in the present study. Such convergence reinforces the conclusion that biochemical overstimulation, across species, triggers conserved defense responses that prioritize stress survival over cell proliferation.

Analysis of variance (ANOVA) revealed that 2,4-D concentrations strongly influenced callus induction in both genotypes. The treatment effect was highly significant in Nipponbare ($F = 7.136$; $p = 0.0026$) and significant in CMG1590 ($F = 4.064$; $p = 0.0217$), as shown in Table 1. These statistical data validate the observed concentration-dependent response, establishing a quadratic pattern with efficiency peaks at T4, followed by a decline at T5. This reinforces the existence of genotype-specific concentration thresholds for hormonal sensitivity and cellular stress.

Table 1: Analysis of variance (ANOVA) for the effect of 2,4-D concentrations on callus induction in two rice genotypes. The results indicate the influence of different concentrations on the induction frequency for (*japonica*) and CMG1590 (*indica*). F-values and p-values denote the level of statistical significance.

Genotype	Source of Variation	GL	SS	MS	F	p-value	Significance
Nipponbare	Treatment	5	17531	3506	7,136	0.0026	p < 0.01
	Residue	12	5896	491			
CMG1590	Treatment	5	12644	2529	4,064	0.0217	p < 0.05
	Residue	12	7467	622			

The observed induction rates demonstrate a high-precision biological response (*japonica*), which achieved a peak induction of 93.3% at T4, aligning closely with the findings of Tian et al., (2023), who reported 94.2% at 2.2 mg/L via single-cell RNA-seq, identifying the upregulation of *OsARF19* and *OsWOX5* as key drivers of scutellum derived callogenesis. Conversely, the local genotype CMG1590 (*indica*), despite its characteristic recalcitrance, reached 80% at T4. This performance surpasses 78.6% reported for the reference variety IR64 by Chirinos and Licausi (2024), highlighting the significant embryogenic potential of this germplasm.

These findings corroborate a significant treatment effect on both genotypes, supporting a concentration-dependent response pattern. Mechanistically, the optimal concentration window (1.8-2.6 mg/L) triggers the SCF^{TIR1}/OsAFB2 complex, promoting the degradation of OsIAA14/28 repressors and releasing OsARF16/19 transcription factors to activate master embryogenic genes such as *OsBBM1* and *OsLECI*, as elucidated by Guo et al. (2023).

However, the decline at T5 reflects a transition toward physiological inhibition. Supraoptimal concentrations induce a negative feedback loop mediated by OsMAPK6-ROS signaling and OsFIE1-mediated epigenetic reactivation, thereby blocking cellular totipotency, a mechanism recently validated by ChIP-seq analysis (Guo et al., 2023). This threshold-dependent response is further evidenced by the higher residual variance in CMG1590 (Mean Square Residue = 622) compared to (MS Residue = 491), suggesting that while both genotypes share the same molecular pathway, the *japonica* variety possesses a more resilient and broader embryogenic competence window.

The callogenic performance observed in this study aligns with the benchmarks established by Carsono, et al. (2021) and Khokhar et al. (2017), who identified 2.0–3.0 mg/L of 2,4-D as the

optimal range for inducing high-quality embryogenic callus in rice. The peak induction rates for (93.3%) and CMG1590 (80.0%) at intermediate concentrations are statistically validated by the significant treatment effects observed in ANOVA.

Mechanistically, this response is driven by the auxin-mediated activation of the SCF^{TIR1}/OsAFB2 complex, which initiates the embryo-like developmental pathway via the degradation of OsIAA repressors, a process fundamental to cellular totipotency as elucidated by (Guo et al., 2023). Conversely, the inhibitory effect observed at higher concentrations (T5) reflects a physiological threshold where excessive 2,4-D triggers OsMAPK6-ROS signaling and OsFIE1-mediated epigenetic repression. The higher instability of the CMG1590 genotype under these supra-optimal conditions is reflected in its greater residual variance (MS Residue = 622) compared to MS Residue = 491, suggesting a narrower and more sensitive embryogenic competence window for the local germplasm.

The analysis of variance (ANOVA) indicated a highly significant effect for the treatment factor ($p < 0.001$), confirming that callus induction in the evaluated germplasm is strictly dependent on exogenous 2,4-D supplementation. For the CMG1590 genotype, Tukey's test revealed significant differences relative to the control (T0) at treatments T3 and T4 (Table 2).

Table 2: Multiple Comparison of Mean Differences with Respect to Initial Time (T0).

Adjusted p-values obtained through multiple comparisons tests. The Difference column indicates the mean difference. Significance symbols are: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

<i>Comparison</i>	<i>Difference</i>	<i>p-adjusted</i>	<i>Significance</i>
$T2 - T0$	73.33	0.0155	*
$T3 - T0$	86.67	0.0046	**
$T4 - T0$	93.33	0.0025	**
$T5 - T0$	80.00	0.0084	**

This response pattern suggests a hormonal-sensitivity threshold inherent to the genotype, requiring high concentrations of the regulator to trigger the epigenetic reprogramming of somatic cells. It was observed that after reaching a peak response in treatment T4 (Difference = 93.33; $p = 0.0025$), the callus-promoting effect reached a stabilization phase in treatment T5.

This stabilization corroborates the findings of Zheng & Konzak, (1999) and Carsono, et al. (2021), the convergence of these data validates the existence of an optimal concentration window for auxins. According to these authors, the biological effect reaches saturation once

cellular auxin receptor sites are fully occupied, beyond this point, increasing the dose (as seen in the transition from T4 to T5) confers no further competitive advantage and may eventually induce phytotoxic responses or inhibitory ethylene synthesis.

While the genotype factor exhibited a trend effect ($p = 0.084$), the analysis of overall means revealed distinct variations in responsiveness. One genotype achieved a higher mean callus induction ($65.2 \pm 37.1\%$) compared to CMG1590 ($52.2 \pm 34.4\%$), demonstrating greater intrinsic sensitivity to 2,4-D treatments. This variation reinforces the multifactorial nature of *in vitro* morphogenesis, where the Genotype $\times$ Growth Regulator interaction serves as the primary modulator of experimental success. These results align with the thesis of Carsono, et al. (2021), where concentrations between 2 and 3 ppm were identified as optimal, proving that induction efficiency is a coordinated response between the exogenous dose and the endogenous hormonal balance of each specific genetic material.

The complexity of the response to 2,4-D transcends simple quantitative analysis. The stabilization observed at T5 can be further interpreted through the studies of Silva et al. (2015), who identified a biphasic effect for this regulator. Thus, the maintenance of high induction rates at increasing concentrations suggests that, while T4 represents the apex of cellular dedifferentiation (quantity), higher concentrations, such as T5, operate at the threshold of morphogenic quality. As suggested by Silva et al., (2015), intermediate concentrations may be more conducive to subsequent redifferentiation and organized development, underscoring the need to optimize concentration based on the specific regenerative goal of the *in vitro* protocol.

Furthermore, the predominant influence of genotypes is highlighted by Usenbekov, et al., (2024), who observed a distinct response pattern in their *in vitro* studies. Their two-way ANOVA indicated significant main effects for both culture medium and genotype ($p < 0.05$), but no interaction between these factors. This lack of Genotype $\times$ Environment interaction suggests that, for certain species, the morphogenic response is primarily intrinsic to the genetic material, with the environment acting as a general modulator without altering the hierarchy of genotypic performance.

Although our ANOVA results revealed a significant interaction effect (Genotype $\times$ Regulator, $p < 0.05$), reinforcing the necessity for genotype-specific protocols the findings of Usenbekov et al. (2024) serve as a critical counterpoint. This comparison illustrates that the magnitude of genetic control varies significantly across species and experimental conditions, in some cases even negating the interaction effect. Therefore, our results corroborate the importance of

balancing exogenous stimuli with the specific genetic background to overcome recalcitrance in materials such as CMG1590.

The individual capacity of each genotype to respond to 2,4-D treatments was a determining factor in the success of callus induction. Although the interaction effect was significant, the isolated analysis of the genotypes revealed distinct levels of morphogenic competence. This inherent biological variation is summarized in Table 3, which presents the performance of the genetic materials regardless of the treatment concentration.

Table 3: Means and Standard Deviation of the Measured Variable in Genotypes. The Mean (%) column represents the average performance of the variable, and SD is the Standard Deviation.

Genotype	Average (%)	SD
CMG1590	52.2	34.4
Nipponbare	65.2	37.1

The graphical representation of the data, as illustrated in figure 3, offers a robust comparative overview. This diagram highlights the intergenotypic differences, contrasting the mean Callus Percentage (%) between genotypes, with error bars representing the Standard Deviation (SD). This visualization is crucial for discerning and quantifying the variability and relative performance of each genotype.

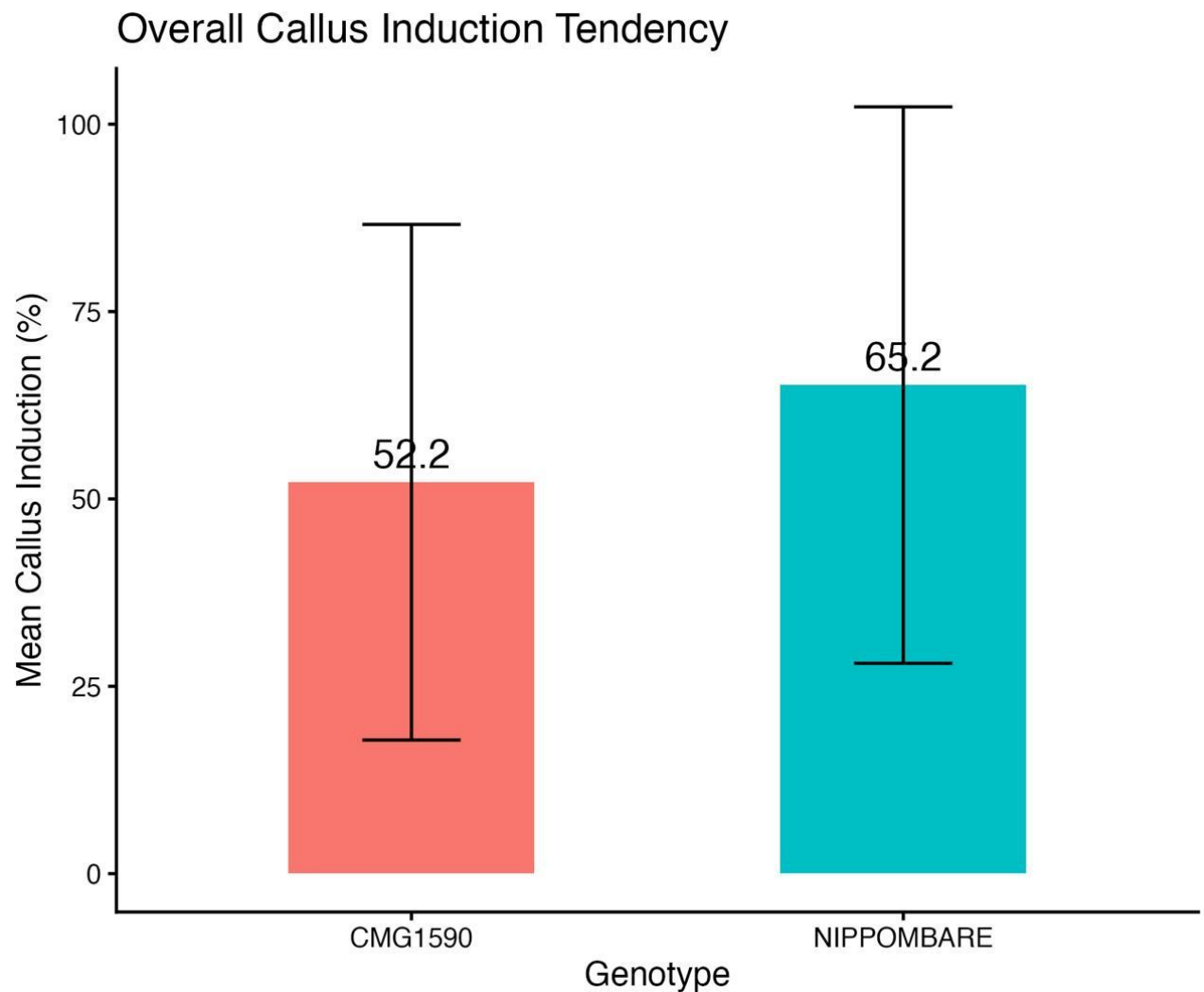


Fig. 3: Comparison between CMG1590 and genotypes. Bar heights indicate the mean induction percentage, and error bars represent the Standard Deviation (SD).

The results of this study underscore the pivotal role of genotype-environment interactions in rice tissue culture, particularly concerning the morphogenic potential under 2,4-D influence. The superior callus induction observed in (65.2%) compared to CMG1590 (52.2%) aligns with its established reputation as a model genotype for *in vitro* studies. This discrepancy highlights that although the fundamental pathways of dedifferentiation are conserved, the efficiency of the process is strongly influenced by the genetic background.

Critical observation is the high variability (Standard Deviation) exhibited in our study, while Silva et al. (2015), reported that it typically displays high stability and low intra-sample dispersion, our findings suggest a more heterogeneous response. This lack of uniformity may be attributed to subtle environmental fluctuations during the incubation period or differences in

the physiological state of the initial explants, indicating that high induction rates do not always correlate with experimental predictability.

The observed (hormonal plateau) between treatments T4 and T5 (2 to 3 mg/L) provides significant insight into auxin receptor saturation. This pattern is consistent with the findings of Meneses et al. (2005), who demonstrated via Tukey's test that concentrations exceeding 2 mg/L do not yield statistically significant gains in callus mass. This convergence of data suggests a biological threshold at which increasing exogenous 2,4-D concentration no longer modulates the mitotic activity of pericycle-derived cells but instead triggers inhibitory or phytotoxic effects.

Furthermore, the absence of induction in T0 (control) confirms that the activation of the callus-forming program in these genotypes is strictly dependent on exogenous signaling. The optimal response zone identified between T3 and T4 suggests that future large-scale micropropagation protocols should prioritize these concentrations to maximize biomass while minimizing the risk of somaclonal variation associated with excessive hormonal exposure.

Time to 50% and 90% Callus Induction (CE_{50} and CE_{90}) as a Function of 2,4-D Concentration

The kinetic profile of callus induction, quantified by the time required to reach 50% (EC_{50}) and 90% (EC_{90}) of maximum induction, revealed a nonlinear, concentration-dependent response in both genotypes (Figure 4).

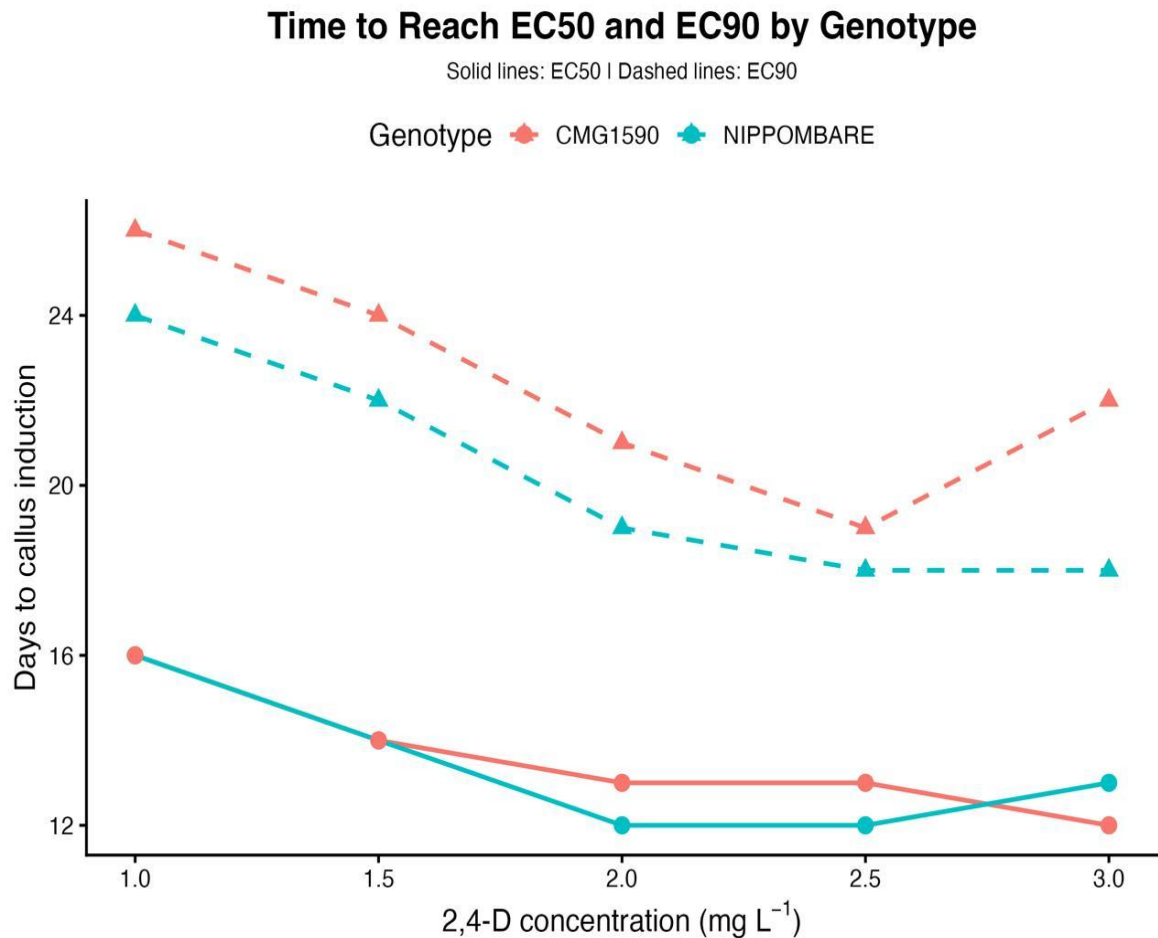


Fig. 4: Callus Induction Kinetics: Time to reach Effective Response (50% and 90%) as a Function of 2,4-D Concentration by Genotype. The graph illustrates the concentration-temporal response relationship of the CMG1590 and genotypes as a function of concentration.

A notable U-shaped trend was observed in EC50 and EC90 values, with the shortest time to reach induction peaks occurring between 2.0 and 2.5 mg/L of 2,4-D. At these intermediate concentrations, the EC50 was achieved in approximately 12 days, whereas CMG1590 followed a similar, albeit slightly delayed, trajectory.

This acceleration of the morphogenic process suggests a zone of optimal hormonal sensitivity. As supported by Yimam et al. (2025), rice genotypes often exhibit maximum efficacy within this narrow range (2.0–2.5 mg/L), followed by a plateau or decline. The biological saturation observed at 3.0 mg/L, where the time to reach EC90 begins to increase again for CMG1590, indicates that supra-optimal concentrations of 2,4-D may induce a stressful physiological state, delaying cellular dedifferentiation rather than promoting it.

Although both genotypes followed similar kinetic patterns, consistently maintained a temporal advantage over CMG1590, reaching induction milestones faster across almost all

concentrations. This temporal lead is a clear indicator of greater initial morphogenic competence.

This result aligns with the findings of Bhuiyan et al. (2014), who noted that *japonica* cultivars possess an inherent genetic architecture, likely linked to growth-response QTLs, that facilitates more efficient auxin signaling. In contrast, the wider dispersion and slower response of CMG1590 (often associated with *indica* traits) corroborate the reports of Silva, (2018) and Noor et al. (2022), where indica genotypes frequently exhibit greater intra-sample variation and a less predictable response to exogenous regulators.

The convergence of EC₅₀ values to a minimum of 12 days at 2.0 mg/L suggests a physiological limit for the rice scutellum cells to reprogram their fate. This plateau effect, also described by Carsono, et al. (2021), reinforces the idea that once the auxin receptors are saturated, additional 2,4-D does not accelerate the process. The greater stability of the response, as evidenced by the smaller divergence between its EC₅₀ and EC₉₀ curves at higher concentrations, suggests superior cellular homeostasis. This homogeneity is a crucial attribute of micropropagation protocols, as it ensures synchronized and predictable production of embryogenic calli, which is essential for large-scale regeneration.

Effect of 2,4-D Concentration on Callus Morphology

The synchrony between the reduction in induction time (EC₅₀ and EC₉₀) and the transition in callus morphology highlights a specific physiological window of high morphogenic competence between 2.0 and 2.5 mg/L of 2,4-D. This range represents a metabolic optimum in which cellular dedifferentiation occurs at maximal speed without triggering the toxic effects associated with hormonal overstimulation. As shown in Figure 4, the minimum time to reach EC₅₀ (~12 days) coincides precisely with the emergence of whitish-yellow friable calluses in the genotype (Figure 5). This correlation suggests that the acceleration of the cell cycle is intrinsically linked to the maintenance of an undifferentiated state.

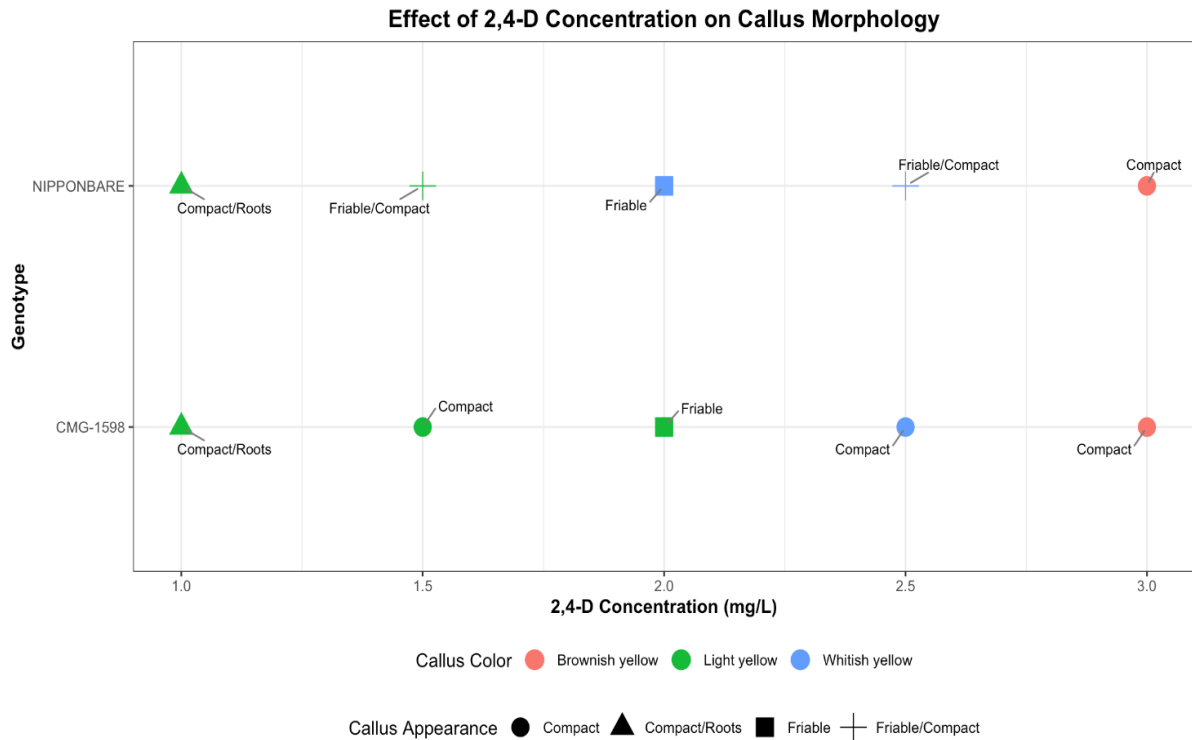


Fig 5: Effect of 2,4-D Concentration (mg/L) on Callus Morphology and Coloration in Different Genotypes: Each point on the graph represents the morphological response observed at a given concentration, considering the physical aspect of the callus (symbols) and the predominant coloration (colors) simultaneously.

According to Meneses et al. (2005) this light-yellow coloration and friability are hallmark characteristics of embryogenic calluses, reflecting an active and proliferative metabolic state. In contrast, the longer induction times observed at 1.0 mg/L (16 days) were accompanied by compact morphology and *rhizogenesis*, indicating that insufficient auxin levels fail to fully repress organogenic pathways, leading to premature differentiation rather than mass proliferation.

The comparative analysis of genotypes reveals a clear divergence in morphological plasticity. demonstrated a broad response range, transitioning from compact to friable and eventually returning to a compact state at 3.0 mg/L. This plasticity is supported by Silva et al. (2015), who are recognized as a global reference due to their sensitive and predictable auxin signaling.

Conversely, CMG1590 exhibited a more rigid morphological profile, predominantly maintaining compact calluses and showing higher EC₉₀ values at high concentrations. This behavior suggests a lower sensitivity to auxins or a higher threshold for inducing friability. This finding is consistent with Bhuiyan et al. (2014), who reported that *indica* type genotypes often display greater tissue rigidity and lower uniformity compared to *japonica* cultivars. The higher Standard Deviation observed in CMG1590 further solidifies the conclusion that its cellular

response is less synchronized, a factor that directly impacts the efficiency of large-scale regeneration protocols.

The rebound in EC₉₀ times and the darkening of calluses at 3.0 mg/L (transitioning to brownish yellow) signal the onset of supraphysiological stress. As demonstrated by Casarin et al. (2013) and Cunha et al. (1994), concentrations exceeding the 2.5 mg/L threshold trigger inhibitory effects often associated with phenolic oxidation and lignification.

This degradative phenomenon, observed in both genotypes at the highest concentration, indicates that the accumulation of indolic compounds and auxin receptor saturation disrupt cellular homeostasis. The increased rigidity and browning are not merely visual changes but physiological indicators of reduced regenerative potential, confirming that the T3-T4 range (2.0–2.5 mg/L) is the critical threshold for maintaining metabolic viability.

Plant regeneration under different treatments and genotypes

The evaluation of regenerative capacity in induced calli revealed that the efficiency of in vitro organogenesis is governed by the interaction between the genetic background and hormonal dosage. The regeneration percentage indicates that morphogenic competence is not merely an intrinsic trait, but a response modulated by the culture's chemical environment (Table 4).

Table 4: Means and standard deviations of the number of regenerated plants and regeneration rates (%) by genotype and treatment.

Genotype	Treatment	Average (plants)	Standard deviation	Average regeneration (%)
CMG1590	T0	0.00	0.00	0.0
CMG1590	T1	0.33	0.58	6.7
CMG1590	T2	0.67	0.58	13.3
CMG1590	T3	1.33	0.58	26.7
CMG1590	T4	0.33	0.58	6.7
CMG1590	T5	0.33	0.58	6.7
NIPPONBARE	T0	0.00	0.00	0.0
NIPPONBARE	T1	1.00	1.00	20.0
NIPPONBARE	T2	1.33	0.58	26.7
NIPPONBARE	T3	2.00	0.00	40.0
NIPPONBARE	T4	0.67	0.58	13.3
NIPPONBARE	T5	0.67	1.15	13.3

The data indicate that treatment T3 was the most efficient protocol for both genotypes, significantly improving the regeneration rate. The Nipponbare genotype achieved peak regeneration at T3, with an average of 2.0 plants/explant (40.0%), outperforming CMG1590, which showed 1.33 plants/explant (26.7%) under the same treatment. This divergence reinforces the principle of genotype dependence, wherein *in vitro* culture efficiency varies drastically across genetic materials even under identical cultivation conditions.

The sharp decline in regeneration observed at extreme concentrations (T0, T1, T4, and T5) demonstrates a dose-response relationship typical of growth regulators. As Bevitori (2013), postulated, *in vitro* regeneration follows an optimization pattern dependent on auxin concentrations (such as 2,4-D), where both hormonal deficiency and excess can inhibit cellular differentiation and subsequent shoot formation. In the case of T4 and T5, the decline in regeneration may be associated with residual effects of high auxin doses, which tend to favor callogenic proliferation over organized morphogenesis.

Conversely, literature presents significant variations depending on the biological material used. Khanna and Raina, (1998) and (Ozawa, 2009), reported rice genotypes that required higher cytokinin concentrations to achieve maximum regeneration rates. Such a discrepancy suggests that the morphogenic response is highly dependent on the explant's endogenous hormonal balance and the specific genetic material. In recalcitrant rice cultivars or when using alternative explants, the optimal response zone may shift from the 2,4-D pattern observed in this research. These results confirm that the success of *in vitro* morphogenesis is fundamentally predicated on the interplay between genetic predisposition and finely tuned levels of growth regulators. The superior performance of T3 not only validates its role as a model genotype but also establishes a strategic threshold for applications in rice biotechnology that demand high-efficiency plant recovery

The analysis of variance (ANOVA) summarized in Table 5 provides a rigorous perspective on the regeneration data previously described in Table 4. For the genotype, the test yielded a p-value of 0.068 ($F = 2.778$), indicating a marginal trend toward significance across treatments. Although this value does not meet the conventional $p < 0.05$ threshold, it suggests potential differences in hormonal responses that could be validated with a refined experimental design or more replicates.

In the case of CMG1590, the F-value of 2.28 and p-value of 0.112 indicate that the observed differences in means (Table 5) lack statistical support and are likely attributable to experimental variability or chance rather than a genuine effect of the 2,4-D concentrations.

Table 12: Analysis of Variance (ANOVA) of the treatments.

Genotype	F	p-value
Nipponbare	2,778	0.068
CMG1590	2.28	0.112

The interpretation of marginally non-significant results, those in the range of 0.06 to 0.10, is a subject of significant debate in biostatistical literature. As discussed by Greenland et al., (2016) and Hackshaw & Kirkwood (2011), the p approx 0.05 threshold is largely arbitrary. These authors suggest that borderline results, such as those found in this study, indicate a trend rather than a definitive absence of effect.

They argue that marginal results warrant further analysis with larger sample sizes to determine whether the observed pattern reflects a genuine biological phenomenon obscured by high within-sample dispersion. Therefore, the result suggests greater sensitivity to the treatment than CMG1590, although the current sample size limits more robust statistical confirmation.

This statistical framework supports the interpretation of the Tukey test and the graphical representation in Figure 6. The Tukey test suggests that T3 may represent a statistically distinct group (a) compared with the control T0 (b), while the overall ANOVA effect was marginal ($p > 0.05$). This indicates a localized increase in morphogenic competence rather than a consistent global effect across treatments. Conversely, the absence of significant differentiation in CMG1590 all treatments lassified within group “a” supports its characterization as a genotype with lower plasticity under the ested condition.

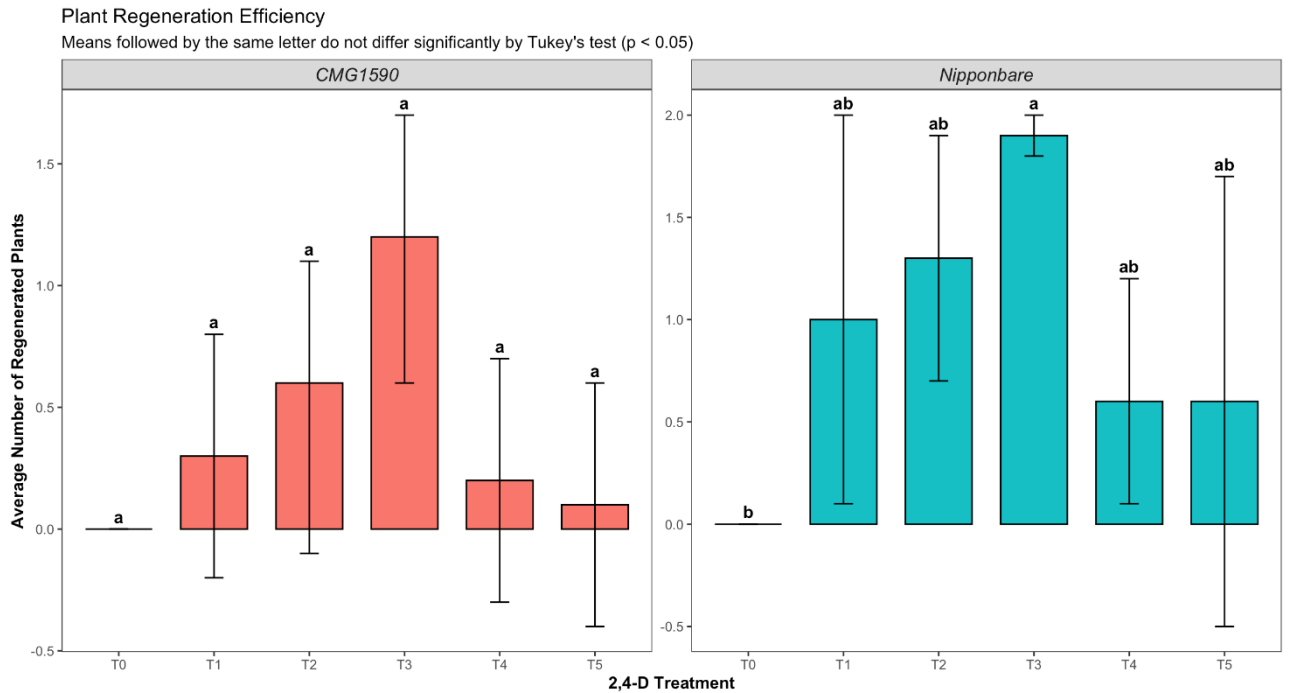


Fig. 6: Plant regeneration efficiency of two rice genotypes under different 2,4-D induction treatments. The bar charts present the average number of regenerated plants per genotype. Data are expressed as means $\pm$ standard error. Means followed by the same letter within each genotype do not differ significantly by Tukey's test ($p < 0.05$). T0 to T5 represent increasing concentrations/treatments of 2,4-D during the callus induction phase.

Conclusion

The findings of this study provide irrefutable evidence that *in vitro* morphogenic competence in rice is governed by a precise Genotype $\times$ Auxin interaction. We conclude that activation of the embryogenic program in the scutellum of both *japonica* (Nipponbare) and *indica* (CMG1590) genotypes is strictly dependent on an optimal exogenous 2,4-D signaling window, identified here as 2.0-2.5 mg/L. Statistical validation via ANOVA and Tukey's test shows that while the fundamental SCFTIR1/OsAFB2 signaling pathway for cellular dedifferentiation is conserved across subspecies, the elite line CMG1590 has a narrower physiological tolerance threshold. The observed decline in regeneration at higher concentrations (3.0 mg/L) confirms that supra-optimal hormonal levels trigger inhibitory feedback loops, likely mediated by OsMAPK6-ROS signaling, that effectively block cellular totipotency. Consequently, this

research establishes a standardized, robust platform for biotechnological applications. The optimized 2.0–2.5 mg/L 2,4-D protocol is recommended as the strategic baseline for future genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated improvement of local indica germplasm, ensuring high-frequency recovery of fertile plantlets.

Authors Contribution Statement

Suamith Herminio Luis Leveque, Corresponding Author and Project Leader. Responsible for conceptualization, experimental design, conducting most of the *in vitro* experiments (explant preparation, callus induction, plant regeneration), and drafting the manuscript (initial draft, Results, and Discussion). Master Alisson Willians Teixeira Silva contributed to the critical review of the manuscript and the discussion of results, especially comparing the induction kinetics (CE_{50}/CE_{90}) and the patterns of response stabilization. Elisa Agilo was responsible for the data analysis and statistics (ANOVA, Tukey's Test) for callus formation frequency and regeneration rates. Also performed the linguistic review and formatting of the final manuscript. Professor Flávia Barbosa Silva Botelho (PhD) provided the plant material (CMG1590 elite line) and contributed to the review of the Introduction and Discussion, ensuring the research was contextualized with the specialized literature on rice genotypes and 2,4-D.

DECLARATION

Ethical approval

Not applicable

Plant material (*Oryza sativa L.*) was obtained from greenhouse-grown plants under controlled conditions. Seeds were used for in vitro callus induction in accordance with institutional guidelines and national regulations. No specific permits were required, as this is a cultivated, non-protected species.

permissions/licences

Not applicable

No permits or licenses were required for plant collection, as *Oryza sativa L.* seeds were obtained from greenhouse-grown plants and did not involve collection from natural environments.

Consent to participate

Not applicable

Consent to Publish

Not applicable

Data Availability Statement

All data generated or analysed during this study are included in this published manuscript and its Supplementary Material.

The dataset for Callus Induction Frequency (CIF) and Regeneration Frequency (RF) is available in the following format: Callus Induction Frequency (CIF) and Regeneration Frequency (RF) (Sheet 1 and Sheet 2).

The dataset for regeneration rates and the number of regenerated plants is available in the following format: Regeneration rates and number of regenerated plants (Sheet 2).

The dataset for statistical analysis results (ANOVA and Tukey's test) is available in the following format: Statistical analysis results (ANOVA, Tukey's test) (Sheet 1).

The dataset for Time to Callus Induction at 50% and 90% (CE₅₀ and CE₉₀) is available in the following format: Time to Callus Induction at 50% and 90% (CE₅₀ and CE₉₀) (Sheet 3).

Conflict of interest

The authors declare that all data presented in this manuscript were jointly reviewed and approved by all co-authors prior to submission. There are no conflicts of interest among the authors, nor between the authors and any external institution or organization. The research was conducted independently, and no financial, professional, or personal relationships have

influenced the interpretation or presentation of the results. The work was originally written in Portuguese, and with the aid of translation tools, it was translated into English.

Funding Declaration

The authors declare that no financial support or funding was received for the research, authorship, and/or publication of this article.

6 BIBLIOGRAPHY

- Ali, J., Nicolas, K. L. C., Akther, S., Torabi, A., Ebadi, A. A., Marfori-Nazarea, C. M., & Mahender, A. (2021). Improved Anther Culture Media for Enhanced Callus Formation and Plant Regeneration in Rice (*Oryza sativa* L.). *Plants*, 10(5), 839. <https://doi.org/10.3390/plants10050839>
- Almeida, S. P., Souza, J. M., Amorim, A. M., Gusmão, S. A. de, Souza, R. O., & Santos, A. S. (2020). In vitro culture of jambu with different growth regulators. *Horticultura Brasileira*, 38(2), 134–138. <https://doi.org/10.1590/s0102-053620200204>
- Bevitori, R. (2013). *Cultivo in vitro do arroz (Oryza sativa L.): conceitos básicos e protocolo*. www.cnpaf.embrapa.br
- Bhuiyan, R., Abunasar Miah, M., Kabir Shakil, S., Ferdous Iqbal, M., Mosnaz, A., Hammadul Hoque, M., Chandra Biswas, G., & Prodhan, S. H. (2014). Comparison of Callus Initiation and Regeneration Frequency for Two Submerge Tolerant Rice (*Oryza sativa*). In *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)* (Vol. 9, Number 1). www.iosrjournals.orgwww.iosrjournals.org74|
- Carsono, N., Juwendah, E., Liberty, Sari, S., Damayanti, F., & Rachmadi, M. (2021). Optimize 2,4-D concentration and callus induction time enhance callus proliferation and plant regeneration of three rice genotypes. *Biodiversitas*, 22(7), 2555–2560. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220702>
- Casarin, T., Carla, ;, Silveira, F., Paulo, ;, Rocha, E., Ariano, E. ;, De Magalhães, M., Luciana, J. ;, Dode, B., Luciano, ;, & Pinto, S. (2013). *EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2,4 D NA INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE SEMENTES PARA DIFERENTES CULTIVARES DE ARROZ (Oryza sativa L.)*.
- Chirinos, X., & Licausi, F. (2024). Suffocated shoots: Hypoxia-induced synthesis of salicylic acid inhibits plant regeneration. *Molecular Plant*, 17(4), 528–530. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2024.03.008>

- Chu, C.-C., Wang, C.-C., Sun, C.-S., Chu, C.-Y., Yin, K., Chen Hsu, & Bi, F. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*.
- Cunha, M. B. da, Paranhos, J. T., Franco, E. T. H., & Dorneles, L. T. (1994). Efeitos da interação de auxinas e sistemas de cultivo in vitro na indução de calos a partir de embriões de arroz. *Ciência Rural*, 24.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- Gao, R., Zong, Y., Zhang, S., Guo, G., Zhang, W., Chen, Z., Lu, R., Liu, C., Wang, Y., & Li, Y. (2024). Efficient isolated microspore culture protocol for callus induction and plantlet regeneration in japonica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Methods*, 20(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01189-0>
- Greenland, S., Senn, S. J., Rothman, K. J., Carlin, J. B., Poole, C., Goodman, S. N., & Altman, D. G. (2016). Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: a guide to misinterpretations. *European Journal of Epidemiology*, 31(4), 337–350. <https://doi.org/10.1007/s10654-016-0149-3>
- Guo, F., Wang, H., Lian, G., Cai, G., Liu, W., Zhang, H., Li, D., Zhou, C., Han, N., Zhu, M., Su, Y., Seo, P. J., Xu, L., & Bian, H. (2023a). Initiation of scutellum-derived callus is regulated by an embryo-like developmental pathway in rice. *Communications Biology*, 6(1), 457. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04835-w>
- Guo, F., Wang, H., Lian, G., Cai, G., Liu, W., Zhang, H., Li, D., Zhou, C., Han, N., Zhu, M., Su, Y., Seo, P. J., Xu, L., & Bian, H. (2023b). Initiation of scutellum-derived callus is regulated by an embryo-like developmental pathway in rice. *Communications Biology*, 6(1), 457. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04835-w>
- Hackshaw, A., & Kirkwood, A. (2011). Interpreting and reporting clinical trials with results of borderline significance. In *BMJ* (Vol. 343, Number 7815). <https://doi.org/10.1136/bmj.d3340>
- Kellogg, E. A. (2015). *Flowering Plants. Monocots*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-15332-2>
- Khanna, H. K., & Raina, S. K. (1998). Genotype x culture media interaction effects on regeneration response of three indica rice cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52(3), 145–153. <https://doi.org/10.1023/A:1006032303195>

- Khokhar, M. I., Iqbal, M. Z., & Teixeira Da Silva, J. A. (2017). Rapid callogenesis and plant regeneration of fine and coarse varieties of rice. *Biotechnologia*, 98(4), 283–293. <https://doi.org/10.5114/bta.2017.72289>
- Meneses, A., Flores, D., Muñoz, M., Arrieta, G., & Espinoza, A. M. (2005). Effect of 2,4-D, hydric stress and light on indica rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. *Revista de Biología Tropical*, 53(3–4), 361–368. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442005000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Noor, W., Lone, R., Kamili, A. N., & Husaini, A. M. (2022). Callus induction and regeneration in high-altitude Himalayan rice genotype SR4 via seed explant. *Biotechnology Reports*, 36, e00762. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00762>
- Ozawa, K. (2009). Establishment of a high efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 176(4), 522–527. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.01.013>
- Permadi, N., Akbari, S. I., Prismantoro, D., Indriyani, N. N., Nurzaman, M., Alhasnawi, A. N., Doni, F., & Julaha, E. (2024). Traditional and next-generation methods for browning control in plant tissue culture: Current insights and future directions. *Current Plant Biology*, 38, 100339. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2024.100339>
- Sidek, N., Nulit, R., Kong, Y. C., Yien, C. Y. S., Sekeli, R., & EL-Barghathi, M. F. (2022). Callogenesis and somatic embryogenesis of *Oryza sativa* L. (cv. MARDI Siraj 297) under the influence of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin. *AIMS Agriculture and Food*, 7(3), 536–552. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2022033>
- Silva, J. G. Da, Schreinert, R., Santos, D., Medeiros Souza, T., Dienes Machado, N., Peters, J. A., & Costa De Oliveira, A. (2015). Somatic embryogenesis and plant regeneration in Brazilian rice genotypes. In *AJCS* (Vol. 9, Number 11).
- Silva, L. C., Paiva, R., Vargas, D. P., Silva, D. P. C. da, Barbosa, S., & Herrera, R. C. (2015). Decontaminant solution on in vitro growth of *Byrsonima intermedia* seedlings. *Ciência Rural*, 45(4), 674–679. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20120078>
- Silva, L. et al. (2018). Biotechnology in developing nations: A systematic review. *International Journal of Biotechnology*, 7, 145–167.

- Susanto, F. A., Wijayanti, P., Fauzia, A. N., Komalasari, R. D., Nuringtyas, T. R., & Purwestri, Y. A. (2020). Establishment of a plant tissue culture system and genetic transformation for agronomic improvement of Indonesian black rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 141(3), 605–617. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01819-0>
- Sutradhar, M., Singh, B. K., Samanta, S., Ali, Md. N., & Mandal, N. (2024). Multiple cytokinin elevates indirect regeneration potential of indica rice mature embryo. *Gene Reports*, 36, 101965. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2024.101965>
- Tian, S., Zhang, J., Zhao, H., Zong, M., Li, M., Gong, G., Wang, J., Zhang, J., Ren, Y., Zhang, H., Li, S., Wen, C., & Xu, Y. (2023). Production of double haploid watermelon via maternal haploid induction. *Plant Biotechnology Journal*, 21(7), 1308–1310. <https://doi.org/10.1111/pbi.14045>
- Usenbekov, B., Amirova, A., Zeinalov, Z., Meldebekova, A., Mynbayeva, D., Berkimbay, K., & Kurbangaliyeva, T. (2024). Creation of rice doubled haploids with low amylose content using in vitro anther culture. *Brazilian Journal of Biology*, 84. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.284946>
- Wu, K., Liu, Y., Xu, Y., Yu, Z., Cao, Q., Gong, H., Yang, Y., Ye, J., & Jia, X. (2024). Unveiling the Molecular Mechanisms of Browning in *Camellia hainanica* Callus through Transcriptomic and Metabolomic Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(20), 11021. <https://doi.org/10.3390/ijms252011021>
- Yimam, T., Abide, M., Benor, S., & Guadie, D. (2025a). Protocol optimization for callus induction and shoot regeneration of Ethiopian rice varieties (*Oryza sativa* L.). *BMC Biotechnology*, 25(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12896-025-00981-7>
- Yimam, T., Abide, M., Benor, S., & Guadie, D. (2025b). Protocol optimization for callus induction and shoot regeneration of Ethiopian rice varieties (*Oryza sativa* L.). *BMC Biotechnology*, 25(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12896-025-00981-7>
- Yimam, T., Abide, M., Benor, S., & Guadie, D. (2025c). Protocol optimization for callus induction and shoot regeneration of Ethiopian rice varieties (*Oryza sativa* L.). *BMC Biotechnology*, 25(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12896-025-00981-7>
- Yoshida, S. (1981). Fundamentals of Rice Crop Science. International Rice Research Institute (IRRI). *IRRI*.
- Zhang, K., Su, J., Xu, M., Zhou, Z., Zhu, X., Ma, X., Hou, J., Tan, L., Zhu, Z., Cai, H., Liu, F., Sun, H., Gu, P., Li, C., Liang, Y., Zhao, W., Sun, C., & Fu, Y. (2020). A common wild rice-derived BOC1 allele reduces callus browning in indica rice transformation. *Nature Communications*, 11(1), 443. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14265-0>

Zheng, M. Y., & Konzak, C. F. (1999). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction and plant regeneration in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 19(1), 69–73. <https://doi.org/10.1007/s002990050712>

TERCEIRA PARTE

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de otimizar protocolos *in vitro* aplicados à transformação genética de arroz (*Oryza sativa* L.), considerando etapas fundamentais como assepsia de sementes, estabelecimento da cultura de tecidos, indução de calos embriogênicos e condições relacionadas ao crescimento de *Agrobacterium tumefaciens*. A partir dos experimentos realizados, foi demonstrado que a eficiência dos sistemas de transformação genética depende da integração entre fatores microbiológicos, fisiológicos e genéticos, não sendo determinada por uma única etapa isolada do protocolo. No estabelecimento inicial da cultura *in vitro*, verificou-se que os procedimentos físicos de pré-lavagem das sementes e secagem após a assepsia foram determinantes para a redução da contaminação, enquanto o aumento do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio não promoveu benefícios consistentes. Entre os genótipos avaliados, CMG 1590 apresentou maior estabilidade sanitária e menor incidência de contaminação, destacando-se como material promissor para estudos posteriores de transformação genética. A análise do crescimento bacteriano demonstrou que as cepas EHA105 e LBA4404 apresentaram comportamento semelhante quanto à multiplicação em condições controladas, indicando que a densidade bacteriana, embora seja um fator importante, não deve ser considerada isoladamente na avaliação da eficiência de transformação, uma vez que aspectos relacionados à virulência, compatibilidade genótipo-cepa e interação planta-bactéria também influenciam o processo. Além disso, a avaliação da resposta morfogênica evidenciou que a indução de calos em arroz é fortemente dependente da interação entre genótipo e concentração do regulador de crescimento 2,4-D, com melhores respostas observadas em concentrações intermediárias, enquanto concentrações elevadas reduziram o potencial regenerativo dos tecidos. Dessa forma, os objetivos propostos foram alcançados ao estabelecer informações relevantes para o aprimoramento de protocolos de cultura de tecidos e transformação genética em arroz, fornecendo uma base metodológica para futuras aplicações em programas de melhoramento molecular. Como limitações, destaca-se que o estudo concentrou-se na otimização das etapas iniciais e intermediárias do processo, não abrangendo a avaliação completa da eficiência de transformação por meio da confirmação da integração do T-DNA e obtenção de plantas geneticamente modificadas. Portanto, estudos futuros devem integrar as condições otimizadas de assepsia, indução de calos, seleção genotípica e utilização

de diferentes combinações entre cepas bacterianas e condições de infecção, visando aumentar a eficiência final de transformação e ampliar a aplicação dessas ferramentas em estratégias modernas de melhoramento, como a edição gênica. Assim, os resultados obtidos contribuem para o avanço do conhecimento em biotecnologia vegetal ao demonstrar que a construção de sistemas eficientes de transformação genética em arroz depende de uma abordagem integrada, capaz de considerar simultaneamente as características do explante, as condições do cultivo *in vitro* e os fatores biológicos envolvidos na interação com *Agrobacterium tumefaciens*.

BIBLIOGRAFIA

ACQUAAH, GEORGE. **Principles of Plant Genetics and Breeding, 3rd Edition**. [S.l.]: Wiley-Blackwell, 2020.

AFRICARICE. **Rice production and food security in Africa**. Africa Rice Center. [S.l.: S.n.].

ALCÂNTARA, Flávia Aparecida de *et al.* Atributos do solo e rendimento de arroz de sequeiro após adubação verde e compostos orgânicos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 18, 2023.

ASIBI, Aziiba Emmanuel; CHAI, Qiang; COULTER, Jeffrey A. Rice Blast: A Disease with Implications for Global Food Security. **Agronomy**, v. 9, n. 8, p. 451, 15 ago. 2019.

BALCEROWICZ, Martin. Stop the flow: Improving somatic embryogenesis using auxin transport inhibitors. **The Plant Journal**, v. 118, n. 2, p. 293–294, 17 abr. 2024.

BRESEGHELLO, Flavio *et al.* Building the Embrapa rice breeding dataset for efficient data reuse. **Crop Science**, v. 61, n. 5, p. 3445–3457, 26 set. 2021.

CARNEY, Judith. O Arroz Africano na História do Novo Mundo. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 6, n. 2, p. 182, 10 set. 2017.

CARNEY, Judith A. ‘With grains in her hair’: rice in colonial Brazil. **Slavery & Abolition**, v. 25, n. 1, p. 1–27, abr. 2004.

CARSONO, Nono *et al.* Optimize 2,4-D concentration and callus induction time enhance callus proliferation and plant regeneration of three rice genotypes. **Biodiversitas**, v. 22, n. 7, p. 2555–2560, 1 jul. 2021.

CHENG, Xiongying *et al.* Agrobacterium-transformed rice plants expressing synthetic cryIA (b) and cryIA (c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 2767–2772, 17 mar. 1998.

CHILDS, N.; ABADAM, V. **Rice outlook: May 2025 (Report No. RCS-25D)**. [S.l.: S.n.].

CONAB. **Conab – Boletim da Safra de Grãos, 8º Levantamento**. [S.l.: S.n.].

CONAB. **“Perspectivas” da Conab aponta para uma produção de grãos na safra 2025/26 de 353,8 milhões de toneladas**. [S.l.: S.n.].

DA SILVA, Osmira Fátima; WANDER, Alcido Elenor. **Importância econômica e social**.

EMBRAPA. Sistema de produção de arroz de terras altas. 2008.

EMBRAPA. **Arroz e Feijão**.

FAO. **The State of Food and Agriculture**. [S.l.]: FAO, 2022.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT: Crops and livestock products. isponível em: <https://www.fao.org/faostat/>. ROMA: [S.n.].

FEHÉR, Attila. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 26 abr. 2019.

FURTINI, Isabela Volpi *et al.* BRS A502: an upland rice cultivar for intensive sustainable cropping systems in the Brazilian Cerrado. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 22, n. 3, 2022.

GAO, Runhong *et al.* Efficient isolated microspore culture protocol for callus induction and plantlet regeneration in japonica rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Methods**, v. 20, n. 1, p. 76, 24 maio 2024.

GARCIA, Claudia *et al.* Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 137, n. 2, p. 193–212, 18 maio 2019.

GUIMARÃES, Paulo Henrique Ramos. **Método para fenotipagem de raiz e mapeamento associativo para tolerância à deficiência hídrica em arroz**. Goiás: [S.n.].

HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUBO, T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Pub Med**, 1997.

HIEI, Yukoh *et al.* Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA . **The Plant Journal**, v. 6, n. 2, p. 271–282, ago. 1994a.

HIEI, Yukoh *et al.* Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, v. 6, n. 2, p. 271–282, 18 ago. 1994b.

HIEI, Yukoh; ISHIDA, Yuji; KOMARI, Toshihiko. **Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens***. **Frontiers in Plant Science**Frontiers Media S.A., , 7 nov. 2014.

IKEUCHI, Momoko *et al.* Molecular Mechanisms of Plant Regeneration. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, n. 1, p. 377–406, 29 abr. 2019.

KELLOGG, Elizabeth A. **Flowering Plants. Monocots**. Cham: Springer International Publishing, 2015.

KHUSH, Gurdev S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, v. 35, n. 1–2, p. 25–34, set. 1997.

LACERDA, Mabio Chrisley; NASCENTE, Adriano Stephan. Tecnologias para o cultivo do arroz de terras altas em sistema plantio direto na região do Cerrado. **Embrapa**, jun. 2021.

LANNA, Anna Cristina *et al.* Upland rice: phenotypic diversity for drought tolerance. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 5, 2021.

MAJUMDER, Shuvobrata; DATTA, Karabi; DATTA, Swapan Kumar. Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of Rice by Hygromycin Phosphotransferase (hptII) Gene Containing CRISPR/Cas9 Vector. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 69–79.

MEDEIROS, Carlos Eduardo Garcia; FURTINI, Isabela Volpi; BRESEGHELLO, Flávio. **Caracterização Agronômica de Linhas Puras Recombinantes do Cruzamento Douradão x BRS Soberana em Arroz de Terras Altas**. *[S.l.: S.n.]*.

MOHAMMED, Sulaiman; SAMAD, Azman Abd; RAHMAT, Zaidah. Agrobacterium-Mediated Transformation of Rice: Constraints and Possible Solutions. **Rice Science**, v. 26, n. 3, p. 133–146, maio 2019a.

MOHAMMED, Sulaiman; SAMAD, Azman Abd; RAHMAT, Zaidah. Agrobacterium-Mediated Transformation of Rice: Constraints and Possible Solutions. **Rice Science**, v. 26, n. 3, p. 133–146, maio 2019b.

MOLINA, Jeanmaire *et al.* Molecular evidence for a single evolutionary origin of domesticated rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 20, p. 8351–8356, 17 maio 2011.

MORO, Edemar *et al.* Upland rice under no-tillage preceded by crops for soil cover and nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 6, p. 1669–1677, dez. 2013.

NASCENTE, A. S. *et al.* Upland rice yield as affected by previous summer crop rotation (soybean or upland rice) and glyphosate management on cover crops. **Planta Daninha**, v. 31, n. 1, p. 147–155, mar. 2013.

NASCIMENTO, Vagner do *et al.* Cover Crops and Mechanical Scarification in the Yield and Industrial Quality of Upland Rice. **Frontiers in Environmental Science**, v. 10, 30 jun. 2022.

NIROULA, RK *et al.* Effect of Genotype and Culture Media on Callus Induction and Plant Regeneration from Matured Rice Grain Culture. **Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science**, v. 26, p. 21–26, 1 abr. 2005.

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development. Internal Co-ordination Group for Biotechnology: Biotechnology Updated . 2023.

PATHANIA, Shivali; SANDHU, Jagdeep Singh. Effect of 2,4-d on embryogenic callus induction and evaluation of G418 on growth inhibition in rice calli. **Agricultural Research Journal**, v. 58, n. 1, p. 18–22, 2021.

PRÍAS, Blanco Mónica *et al.* An Agrobacterium strain auxotrophic for methionine is useful for switchgrass transformation. **Transgenic Research**, v. 31, n. 6, p. 661–676, 14 dez. 2022.

ROBERTO, Jaime *et al.* Descritores Botânicos, Agronômicos e Fenológicos do Arroz (*Oryza sativa* L.) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Arroz e Feijão Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2008.

ROMERO, Fernando Matías; GATICA-ARIAS, Andrés. CRISPR/Cas9: Development and Application in Rice Breeding. **Rice Science**, v. 26, n. 5, p. 265–281, set. 2019.

SASAKI, Takuji; BURR, Benjamin. International Rice Genome Sequencing Project: the effort to completely sequence the rice genome. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 2, p. 138–142, 1 abr. 2000.

SAUER, D. B.; BURROUGHTS, R. Disinfection of seed surfaces with sodium hypochlorite. **The American Phytopathological Society**, 1986.

SECK, Papa Abdoulaye *et al.* Crops that feed the world 7: Rice. **Food Security**, v. 4, n. 1, p. 7–24, 22 mar. 2012.

SINGH, Brijesh Kumar *et al.* A Comparative Analysis among Different Surface Sterilisation Methods for Rice Invitro Culture. **International Journal of Plant & Soil Science**, p. 148–154, 3 ago. 2021.

SOARES, Antônio Alves. **Cultura de Arroz**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.editora.ufla.br>.

TOKI, Seiji. Rapid and efficient Agrobacterium-mediated transformation in rice. **Plant Molecular Biology Reporter**, 1997.

USDA. **This report contains assessments of commodity and trade issues made by usda staff and not necessarily statements of official U.S. government policy Country: Mozambique Post: Maputo Report Category: Biotechnology and Other New Production Technologies**. [S.l.: S.n.].

USDA. **Produção de arroz no Brasil**. [S.l.: S.n.].

VELTMAN, Margaretha A. *et al.* Origins and geographic diversification of African rice (*Oryza glaberrima*). **PLOS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0203508, 6 mar. 2019a.

VELTMAN, Margaretha A. *et al.* Origins and geographic diversification of African rice (*Oryza glaberrima*). **PLOS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0203508, 6 mar. 2019b.

WAMBUGU, Peterson W.; NDJIONDJOP, Marie-Noelle; HENRY, Robert. Genetics and Genomics of African Rice (*Oryza glaberrima* Steud) Domestication. **Rice**, v. 14, n. 1, p. 6, 7 dez. 2021.

WANG, C. H. *et al.* Genetic diversity and classification of *Oryza sativa* with emphasis on Chinese rice germplasm. **Heredity**, v. 112, n. 5, p. 489–496, 2014.

WICKBOLDT, KATHARINA ROJAHN. *et al.* **Conteúdo de aba e aba-ge em dois genótipos de arroz submetidos a déficit hídrico recorrente**. [S.l.: S.n.].

YANG, Xin *et al.* **PanicleNeRF: low-cost, high-precision in-field phenotyping of rice panicles with smartphone.** [*S.l.: S.n.*].

YU, Jun *et al.* A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). **Science**, v. 296, n. 5565, p. 79–92, 5 abr. 2002.

ZAFAR, Kashaf *et al.* Genome Editing Technologies for Rice Improvement: Progress, Prospects, and Safety Concerns. **Frontiers in Genome Editing**, v. 2, 4 jun. 2020.