

INDUÇÃO DE CALOS E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ *IN VITRO* UTILIZANDO A TÉCNICA DE CULTURA DE ANTERAS

CIMA, Francieli F.¹, SOUZA, Tatiane M.¹, WENDT, Simone N.², PETERS, José A.³, COSTA DE OLIVEIRA, Antonio¹

¹Centro de Genômica e Fitomelhoramento – FAEM/UFPeI, Campus Universitário, s/nº · Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS

²Universidade Tecnológica Federal do Paraná, PR

³Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia/ UFPeI
franci_cima@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, sendo caracterizado como um dos principais alimentos para mais da metade da população mundial. Sua importância é destacada principalmente em países em desenvolvimento, tais como o Brasil, desempenhando papel estratégico em níveis econômico e social (WALTERI et al., 2008).

A cultura de tecidos vegetais, utilizando distintos processos de manipulação *in vitro*, abriu novos caminhos com eficientes técnicas de auxílio ao melhoramento genético convencional (MAGALHÃES JR. et al., 1998). A obtenção de plantas duplo-haplóides é uma ferramenta biotecnológica promissora e sua principal vantagem reside no fato de que em apenas uma geração em laboratório podem ser obtidas plantas 100% homozigotas, permitindo desta forma, um extraordinário ganho de tempo na fixação de caracteres de interesse e na otimização da seleção de constituições genéticas superiores (LENTINI et al., 1994).

Os duplo-haplóides podem ser obtidos por via ginogênica ou por meio da androgênese. A androgênese consiste da regeneração *in vitro* de uma planta a partir de micrósporos imaturos, grãos de pólen ou anteras. Experimentalmente, há uma preferência por obter-se haplóides a partir de gametas masculinos, uma vez que estão presentes em maior número nas anteras, o que facilita a aplicação da técnica e, além disso, apresentam melhores resultados (TERMIGNONI, 2005).

Três pontos são de fundamental importância na obtenção de plantas através da cultura de anteras, via androgênese indireta: a formação de calos a partir de anteras; a formação de gemas a partir de calos e a obtenção de plantas a partir das gemas. A primeira etapa é essencial e devemos considerar alguns fatores como o genótipo, o meio de cultivo e o estágio de desenvolvimento do grão de pólen (PETERS et al., 1998).

A capacidade de regeneração do arroz *in vitro* depende do genótipo e de sua interação com as condições de cultivo (ZHANG; HATTORI, 1996). O principal fator que limita o uso das técnicas de cultivo *in vitro* em arroz é a etapa de regeneração, necessitando de profundos estudos para aprimorar a eficiência do processo (MAGALHÃES JR. et al., 1998).

Segundo Mantell et al. (1994), os determinantes críticos do sucesso da cultura e da produção de plantas são: as condições fisiológicas da planta doadora, o tipo de pré-tratamento aplicado aos botões florais removidos da planta, a fase de desenvolvimento do pólen e a presença ou ausência de reguladores de crescimento suplementares no meio.

Tendo em vista o exposto acima, objetivou-se com este trabalho estudar o índice de formação de calos e regeneração de plantas de arroz *in vitro* a partir da cultura de anteras.

2 METODOLOGIA

O presente estudo utilizou panículas de arroz provenientes de sementes F₁ oriundas do cruzamento das cultivares Nipponbare (spp. *japonica*) e BRS Atalanta (spp. *indica*). A coleta das anteras imaturas foi realizada a cada dois dias, quando a distância entre a aurícula da folha bandeira e da penúltima folha encontrava-se entre quatro e oito centímetros, estágio em que os grãos de pólen na sua maioria encontram-se uninucleados. Como pré-tratamento, as anteras foram submetidas à temperatura de 8°C por sete dias. Em seguida, foram desinfestadas com álcool 70% por um minuto, sob agitação constante e, logo após, em hipoclorito de sódio 5% (princípio ativo), durante 7 minutos. Posteriormente, as anteras foram lavadas quatro vezes em água destilada autoclavada.

Foram realizados dois tratamentos, onde foram utilizados o meio de cultura líquido NL (LENTINI et al., 1994), suplementado com 5% (p/v) de maltose e reguladores de crescimento (Tabela 1). Os meios foram distribuídos em frascos de vidro, onde posteriormente foram autoclavados por 20 minutos, a 120°C e 1,5 atm de pressão. Após a inoculação das anteras nos frascos, os mesmos foram acondicionados no escuro em temperatura de 25°C por 40-60 dias.

O meio para regeneração de plantas foi o MS sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 7g L⁻¹ de ágar, 4 mg L⁻¹ de cinetina, 1 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) e 3% de sacarose. Os calos formados foram transferidos para o meio MS e incubados à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 16 h de luz (3000 lux de intensidade luminosa proveniente de lâmpadas fluorescentes brancas-frias) por um período de 30-45 dias.

Neste estudo foi avaliado o número de calos formados, gemas verdes e gemas albinas em cada tratamento.

Tabela 1 – Tratamentos utilizados para indução de calos a partir de anteras de arroz imaturas. Pelotas-RS, 2010.

Meio de Regeneração	Tratamento	Regulador de Crescimento	Quantidade no meio mg L ⁻¹
NL líquido	1	2,4-Diclorofenoxiacético (0,5 mg mL ⁻¹)	2
		Picloran (0,07 mg mL ⁻¹)	0,07
		Cinetina (1 mg mL ⁻¹)	1
	2	Ácido naftaleno acético (1 mg mL ⁻¹)	4
Cinetina (1 mg mL ⁻¹)		1	

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em cultura de tecidos, dois parâmetros de regeneração de plantas são particularmente importantes: a frequência de indução de calos e a eficiência de regeneração a partir destes (PENG; HODGES, 1989). O número de anteras inoculadas e a regeneração de calos estão descritos na Tabela 2. No Tratamento 1 obteve-se uma menor formação de calos, no entanto o número de gemas verdes foi superior ao Tratamento 2. Segundo Miah et al. (1985), a habilidade de formação de

calos é herdável como um caráter recessivo e cultivares de arroz do tipo japonico, quando comparadas a cultivares indicas, parecem ter melhor capacidade de formação de calos.

Em ambos os tratamentos o índice de gemas albinas foi superior à formação de gemas verdes. A ocorrência deste fenômeno varia com a espécie, o genótipo, a composição do meio de cultura e com a temperatura de incubação (RAINHA, 1989). Além disso, a combinação de dois ou mais reguladores de crescimento podem alterar a frequência de formação não só de calos como também de plantas verdes no processo de cultivo de anteras (LENTINI et al., 1994). A frequência de plantas albinas é bastante variável, podendo representar de 5 a 90% das gemas regeneradas (MANTELL et al., 1994).

A eficiência de regeneração é, geralmente, influenciada pelo meio de indução de calos. Trabalhos demonstram que o uso de Ácido naftaleno acético (ANA) tem maior capacidade de regeneração do que calos formados na presença de 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (HUANG et al., 1981). Segundo Zapata et al. (1983), relataram que o uso do regulador 2,4-D acelera a produção de gemas em arroz e aumenta a síntese de citocinina endógena, quando utilizado durante a formação de calos, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 2 - Número e porcentagem de formação de calos, gemas verdes e gemas albinas obtidas a partir de cultura de anteras de arroz provenientes do cruzamento entre as cultivares Nipponbare e BRS Atalanta. Pelotas-RS, 2010.

Genótipo	Tratamento	Anteras inoculadas (n°)	Calos Formados		Calos Regenerados			
			(n°)	(%)	Gemas Verdes		Gemas Albinas	
					(n°)	(%)	(n°)	(%)
N x A	1	7.920	1.075	13,57	8	0,74	9	0,84
N x A	2	5.400	1.847	34,20	1	0,05	3	0,16

N x A = Cruzamento das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta.

4 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitem concluir que o tratamento 1 mostrou-se mais eficiente para a formação de plantas verdes e o tratamento 2 para a formação de calos.

5 REFERÊNCIAS

HUANG, H.S.; LING, T.H.; TSENG, P.L. et al. Studies on medium component in anther culture of *Oriza sativa* subsp. *hsien* by mathematical methods. In: **Plant Tissue Culture. Proceedings of the Beijing Symposium**. Pitman publishing, London, p.244-246, 1981.

LENTINI, Z.; REYES, P.; MARTÍNEZ, C.; NÚÑEZ, V.; ROCA, W. **Mejoramiento del arroz con cultivo de anteras: aplicaciones en el desarrollo de germoplasma adaptado a ecosistemas latinoamericanos y el Caribe**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), p.79, 1994.

MAGALHÃES, JR. A.M. de; TERRES, A.L.; FAGUNDES, P.R.R.; FRANCO, D.F.; PETERS, J.A. **Cultura de anteras no melhoramento genético de arroz irrigado**. Agropecuária Clima Temperado, Pelotas, v. 1, n. 2, p.183-191, 1998.

MANTELL, S.H.; MATHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução a engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p.344, 1994.

MIAH, M.A.A.; EARLE, E.D.; KRUSH, G.S. Inheritance of callus formation ability in anther cultures of rice, *Oryza sativa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, n.70, p.113-116, 1985.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised médium for rapid growth and bioassay with tabacco tissue cultures. **Physiol. Plant**, v.15, p.473-497, 1962.

PENG, J.; HODGES, T.K. regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 25, n.1, p. 91-94, 1989.

PETERS, J.A.; BOBROWSKI, V.L.; ROSINHA, G.M.S. Produção de haplóides e duplohaplóides.In: Torres. A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A.. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasilia, DF: EMBRAPA/SPI.v.1, p.569-612, 1998.

RAINA, S.K. Tissue culture in rice improvement: status and potencial. **Advances in Agronomy**, n. 42, p. 339-97, 1989,

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.

ZAPATA, F.J.; KRUSH, G.S.; CRILL, J.P. et al. **Rice anther culture at IRRIL. In: Cell and Tissue Tecniques for Cereal Crop Improvement**. Manila, Philippines, p.27-46, 1983.

ZHANG, L.; HATTORI K. Genetic analysis of regeneration ability in rice seed callus. **Genes & Genetic Systems**, v. 71. n. 5, p. 379-384, 1996.

WALTERI, M.; MARCHEZANII, E.; AVILAI, L. A. de. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.4, p.1184-1192, jul, 2008.