

INDUÇÃO DE CALOS ATRAVÉS DO CULTIVO DE ANTERAS DE ARROZ PROVENIENTES DO CRUZAMENTO ENTRE AS CULTIVARES BRS FIRMEZA E EPAGRI 107

SILVA, Patricia S.¹, SOUZA, Tatiane M.¹, WENDT, Simone N.², PETERS, José A.³, COSTA DE OLIVEIRA, Antonio¹

¹Centro de Genômica e Fitomelhoramento – FAEM/UFPeL, 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/ UFPeL
pati.ssilva@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um cereal que assume papel fundamental na alimentação humana, fazendo parte da dieta básica de pelo menos dois terços da população mundial, o que torna a espécie de grande interesse para a pesquisa, para o seu melhoramento, como também produto estratégico para várias nações (LANNES et al., 2004).

A homozigose alcançada mediante a haploidização é uma interessante ferramenta para o melhoramento vegetal. No processo convencional de melhoramento genético, após cruzamento intervarietal, são necessárias de sete a nove gerações para alcançar a homozigose, sendo então um processo demorado e trabalhoso (SANTOS, 2003).

Uma das vantagens no sistema de duplo-haplóide é a diminuição no tempo necessário para o estabelecimento de novas cultivares, uma vez que linhagens homozigotas são obtidas em uma única geração em culturas anuais. Este sistema representa para os programas de melhoramento uma economia não só em relação ao tempo como também quanto aos custos de produção de novas linhagens (MORAES-FERNANDES, 1990).

Os métodos para produção de haplóides envolvem o cultivo de anteras, ovários e micrósporos, para estimular o desenvolvimento de células gametofíticas haplóides, permitindo a formação de calos ou embriões regeneráveis. Dentre esses, a cultura de anteras, também chamada de androgênese, tem sido a mais empregada. Entretanto, apesar de existirem relatos de formação de haplóides a partir de anteras em mais de 250 espécies, o uso dessa técnica no melhoramento tem sido limitada a poucas espécies como fumo, trigo, triticales, arroz, milho, colza e couve (PETERS et al., 1999).

A maior dificuldade da aplicação da cultura de anteras consiste na adequação do meio de cultura, para que ocorra a divisão celular, o processo de ativação e desativação dos genes, no momento e no local apropriado, visando à diferenciação celular e, conseqüentemente, a obtenção de uma planta (SALOMON, 2003).

Vários são os fatores que podem afetar a eficiência do processo de produção e de regeneração de plantas duplo-haplóides, destacando-se, o genótipo e fisiologia da planta doadora, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos e as condições de cultivo (constituição do meio nutritivo, pH, temperatura e reguladores de crescimento) (TREJO-TAPIA et al., 2002). Em cereais como arroz, trigo, aveia e cevada fatores desencadeadores de estresse como baixa ou alta temperatura,

estresse osmótico e salino são considerados como essenciais no processo de androgênese, dependendo do genótipo (TREJO-TAPIA et al., 2002).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a formação de calos a partir da cultura de anteras de arroz.

2 METODOLOGIA

O presente estudo utilizou panículas de arroz provenientes de sementes da geração F₁ oriundas do cruzamento das cultivares BRS Firmeza e Epagri 107. 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 encontram-se na sua maioria 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, imersas em hipoclorito de sódio 5% (princípio ativo), durante 7 minutos. Posteriormente, as anteras foram lavadas quatro vezes em água destilada autoclavada.

Foram realizados dois experimentos, onde utilizou-se o meio de cultura líquido NL (LENTINI et al., 1994), suplementado com 5% (p/v) de maltose, acrescido de diferentes reguladores de crescimento (Tabela 1). Os meios foram distribuídos em frascos de vidro, autoclavados por 20 minutos, a 120°C e 1,5 atm de pressão. Após a inoculação das anteras, os frascos foram transferidos para o escuro a 25°C por 40-60 dias.

Foram inoculadas 60 espiguetas de arroz por frasco em ambos os tratamentos. O número de anteras inoculadas por tratamento estão descritos na Tabela 2.

Avaliou-se neste estudo o número de calos formados em cada experimento.

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

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro tratamento não ocorreu a formação de calos, enquanto que no segundo a porcentagem de formação foi de 1,4 % (Tabela 2). De acordo com Lannes et al. (2004) vários fatores podem influenciar no desempenho da indução de calos, como o comprimento do dia, a radiação solar e a temperaturas às quais estavam submetidas às plantas doadoras de pólen.

Segundo Agarwal e Bhojwani (1993), a semente tardia certamente atua como um fator de estresse para as plantas doadoras, podendo agir sobre diversos mecanismos que favoreçam a formação de calos e a regeneração de plantas. Peters

et al. (1999), consideram que a baixa luminosidade e temperatura, podem afetar o desenvolvimento dos micrósporos. Sendo assim, estes fatores também podem ter influenciado em nossos resultados, tendo em vista que este trabalho foi realizado entre os meses de agosto a fevereiro, sendo que as sementes foram semeadas em diferentes épocas em casa de vegetação.

Além das condições relativas à fisiologia das anteras, a constituição do meio de cultura afeta diretamente a eficiência dos protocolos de indução de calos e regeneração de plantas *in vitro* (BHOJWANI et al., 1999). Peng e Hodges (1989) detectaram diferenças na regeneração de plantas em diferentes cultivares do grupo índico.

Tendo em vista estes fatores que influenciam a regeneração das plantas, a identificação da região genômica e a determinação do meio mais apropriado para cada genótipo, poderão aprimorar os resultados obtidos na cultura de anteras.

Tabela 2 – Número e porcentagem de formação de calos obtidas a partir de cultura de anteras de arroz provenientes do cruzamento entre as cultivares BRS Firmeza X Epagri 107, Pelotas - RS, 2010.

Genótipo	Tratamento	Anteras inoculadas	Calos Formados	
		(n°)	(n°)	(%)
BRS Firmeza X Epagri 107	1	3.600	0	0
BRS Firmeza X Epagri 107	2	23.760	333	1.40

4 CONCLUSÕES

A presença do regulador de crescimento ácido naftaleno acético (ANA) e cinetina contidos no Tratamento 2 permitiu a formação de calos no presente estudo.

5 REFERÊNCIAS

AGARWAL, P.K.; BHOJWANI, S.S. Enhanced microspore embryogenesis and plant regeneration in anther cultures of *Brassica juncea* cv. PR-45. **Euphytica**, Dordrecht, v.70, n.3, p.191-196, 1993.

BHOJWANI, S.S.; SOH, W.Y.; PANDE, H. Morphogenesis in haploid cell cultures. In: SOH, W.Y.; BHOJWANI, S.S. **Morphogenesis in plant tissue cultures**. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1999. Cap.3, p.70-104.

LANNES, S.D.; ZIMMER, P.D.; OLIVEIRA, A.C. de; CARVALHO, F.I.F. de; VIEIRA, E.A.; MAGALHÃES JR, A.M. de; KOPP, M.M.; FREITAS, F.A. de . Regeneração *in vitro* de anteras de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) e mapeamento de QTL associado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1355-1362, 2004.

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.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. de; PICARD, E. Viability of haploid production by anther culture using brasilian wheat genotypes. **Revista Brasileira de Genética**, v.6, n.2, p.261-277, 1983.

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 duplo-haplóides. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. Cap.3, p.569-611.

SALOMON, M.V. **Trigo: avaliação de linhagens diplóides obtidas via cultura de anteras**. Piracicaba. *Dissertação* (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. 2003.

SANTOS, E. K. dos. **Totipotência Celular e Cultura de Tecidos Vegetais**. In: FREITAS, L.B. de & BERED, F. (Org.). **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2003, p.415-444.

TREJO-TAPIA, G.; MALDONADO AMAYA, U.; SALCEDO MORALES, G.; SANCHEZ, A.D.; MARTINEZ BONFIL, B.; RODRIGUEZ-MONROY, M.; JIMENEZ-APARICIO, A. The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of Rice. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.71, p.41-46, 2002.