

OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS DUPLO-HAPLÓIDE EM ARROZ

Gilmar Roberto Zaffari¹; Dilnei Souza Medeiros²; Alexander de Andrade³; Rubens Marschalek⁴

Palavras-chave: *Oryza sativa*, cultura de anteras, micropropagação.,

INTRODUÇÃO

O uso de ferramentas da biotecnologia como a cultura de anteras para a obtenção de plantas duplo-haplóides é altamente promissora para o melhoramento genético. A técnica possibilita que em apenas uma geração em laboratório sejam obtidas plantas homozigotas, promovendo um ganho de tempo na fixação de caracteres de interesse e a 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 na regeneração *in vitro* de uma planta a partir de micrósporos imaturos – grãos de pólen ou antera. A cultura de micrósporos pode reverter o programa de desenvolvimento gametofítico para esporofítico, permitindo a geração de plantas duplo-haplóides. Na cultura de anteras de arroz a alta taxa de indução e formação de calos não necessariamente irá possibilitar a obtenção de plantas verdes. A interação de fatores bióticos e abióticos como o genótipo, estágio de desenvolvimento do pólen, composição do meio de cultura e a hora do dia em que é realizada a coleta irão induzir a resposta morfogenética *in vitro* das anteras. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo implementar e aperfeiçoar um protocolo eficiente de cultura de anteras de arroz que possibilite a obtenção rotineira de plantas duplo-haplóides a partir de uma cultivar comercial, para posterior aplicação em populações F1 do programa de melhoramento genético de arroz da Epagri.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, da Epagri-Estação Experimental de Itajaí. As panículas de arroz, cultivar Epagri 109, foram coletadas em plantas no estágio R2 em dois horários do dia (às 8 e às 12 horas) e em duas fases de desenvolvimento de planta, definidas pelas distâncias de 6 e 8cm, entre a aurícula da folha bandeira e a penúltima folha. As panículas foram mantidas a 10°C por 7 dias, em frasco contendo água, com a base das panículas imersas, e coberto com saco plástico. Em seguida, as panículas foram lavadas em água destilada por 5 minutos, posteriormente imersas em álcool 70% por 1 minuto e então mantidas por 20 minutos em solução a 0,4% de hipoclorito de sódio. Após esta desinfestação, o material foi lavado três vezes em água destilada esterilizada, permanecendo imerso nesta até a manipulação em câmara de fluxo laminar.

As panículas foram divididas em três regiões: apical, mediana e basal. A extração das anteras de cada região foi realizada em câmara de fluxo laminar. As anteras foram transferidas para placas de Petri contendo água estéril, até a transferência para o meio de cultivo. Após o plaqueamento das anteras inteiras, as culturas foram mantidas em sala escura por 120 dias a 25°C.

O meio de cultura básico utilizado para a indução e a formação de calos foi o Murashige & Skoog (1962) (MS) modificado, denominado N6 (Chu et al., 1978) + 4,0 mg.L⁻¹ ácido naftaleno acético (ANA) + 1,0 mg.L⁻¹ cinetina (CIN) e o meio N6 + 2,0 mg.L⁻¹ ANA + 0,5 mg.L⁻¹ CIN, ambos adicionados de sacarose (50 g.L⁻¹) como fonte de carbono e ágar-agar (0,7%) como agente gelificante.

Após sete dias da formação, os calos foram transferidos para o meio de regeneração de plântulas MS adicionado de 1,0 mg.L⁻¹ ANA + 1,0 mg.L⁻¹ 6- benzil aminopurina (BAP) + 1,0 mg.L⁻¹ CIN, ágar-agar 0,7 %, sacarose 30 g.L⁻¹, mio-inositol 100 mg.L⁻¹ (M1) e MS adicionado de 1,0 mg.L⁻¹ ANA + 1,0 mg.L⁻¹ 6- benzil aminopurina (BAP) + 0,5 mg.L⁻¹ CIN, ágar-agar 0,7 %, sacarose 20 g.L⁻¹, mio-inositol 100 mg.L⁻¹ (M2). Estas culturas foram incubadas em sala de crescimento à temperatura de 28 ± 2°C, umidade relativa do ar de aproximadamente 60%, fotoperíodo de 16 horas, sob luz de intensidade de 50 mmol.m⁻².s⁻¹, durante 30 dias.

As plantas regeneradas foram transferidas para meio sólido MS e, após o desenvolvimento do sistema radicular, para vasos plásticos contendo casca de arroz calcinada, e irrigadas com solução nutritiva de MS diluída 1:4. As plantas foram então aclimatizadas em câmara de crescimento à temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 16 horas, cobertas com plástico e posteriormente transferidas para casa de vegetação e protegidas com tela sombrite com 50% de redução de luminosidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estágio do desenvolvimento fisiológico da planta, medido com a distância de 8 cm, resultou no maior índice de formação de calo, num período de 92 a 112 dias de incubação (Tabelas 1 e 2). Em relação ao horário de coleta os melhores resultados foram obtidos às 8 horas da manhã e principalmente nas regiões apical e mediana da panícula de arroz. Entretanto, a região basal também apresentou formação de calo, porém em índices baixos. Segundo Santos & Bodanese-Zanettini (2002) o estágio de desenvolvimento do micrósporo é crítico para a eficiência da indução haplóide.

Em relação aos meios de cultura testados a taxa de formação de calos variou de 1,33 a 6,67%. Com a utilização do meio N6 adicionado de 4 mg.L⁻¹ de ANA e de 1 mg.L⁻¹ de CIN o índice de formação calos foi quatro vezes maior (6,67 %) em relação ao percentual obtido no meio N6 adicionado de 2 mg.L⁻¹ de ANA e 0,5 mg.L⁻¹ de CIN (1,33 %), considerando o estágio de desenvolvimento de 6 cm, com coleta às 8 horas e utilizando a região apical (Tabelas 1 e 2).

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com Reynolds (1997) que afirma que fatores abióticos tornam o micrósporo competente para a androgênese. A condição fisiológica da planta doadora das anteras parece ser determinante na resposta morfogenética *in vitro* do processo esporofítico. Esta condição da planta é influenciada pela nutrição, pelo comprimento do dia, pela radiação solar e pelas temperaturas noturnas que a planta foi submetida (RAINA, 1997).

Tabela 1 – Formação de calos em anteras de *Oryza sativa* L., cultivar Epagri 109, no cultivo *in vitro*, em meio N6 (Chu et al, 1978) adicionado de 4 mg.L⁻¹ de ácido naftalenacético e de 1 mg.L⁻¹ de cinetina, de acordo com a fase de desenvolvimento das plantas, o horário de coleta e a região de extração das anteras.

* Fase do desenvolvimento	Horário da coleta (h)	Região de extração	Anteras inoculadas (un)	Anteras que formaram calo (un)	Índice de formação de calo (%)	Tempo de formação de calo (dias)
6 cm	8:00	Apical	75	-	0	-
		Mediana	75	-	0	-
		Basal	75	1	1,33	107
	12:00	Apical	75	-	0	-
		Mediana	75	-	0	-
		Basal	75	-	0	-
8 cm	8:00	Apical	75	5	6,67	99
		Mediana	75	4	5,33	108
		Basal	75	2	2,67	112
	12:00	Apical	75	-	0	-
		Mediana	75	-	0	-
		Basal	75	1	1,33	92

* Distância da aurícula da folha bandeira à penúltima folha no estágio embrorachado.

Tabela 2 – Formação de calos em anteras de *Oryza sativa* L., cultivar Epagri 109, obtida no cultivo *in vitro*, em meio N6 (Chu et al, 1978) adicionado de 2 mg.L⁻¹ de ácido naftalenacético e de 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina, de acordo com a fase de desenvolvimento das plantas, o horário de coleta e a região de extração das anteras.

* Fase do desenvolvimento	Horário da coleta (h)	Região de extração	Anteras inoculadas (un)	Anteras que formaram calo (un)	Índice de formação de calo (%)	Tempo de formação de calo (dias)
6 cm	8:00	Apical	75	-	0	-
		Mediana	75	1	1,33	107
		Basal	75	1	1,33	84
	12:00	Apical	75	-	0	-
		Mediana	75	-	0	-
		Basal	75	-	0	-
8 cm	8:00	Apical	75	-	0	-
		Mediana	75	-	0	-
		Basal	75	-	0	-
	12:00	Apical	75	-	0	-
		Mediana	75	-	0	-
		Basal	75	1	1,33	106

* Distância da aurícula da folha bandeira à penúltima folha no estádio embrorachado.

Tabela 3 – Regeneração de plantas de *Oryza sativa* L., cultivar Epagri 109, a partir de calos de anteras cultivados, em meio Murashige e Skoog (1962) adicionado de 1 mg.L⁻¹ de ácido naftalenacético, 1 mg.L⁻¹ de benzoinopurina e 1 mg.L⁻¹ de cinetina, 3% de sacarose (M1); e meio de Murashige e Skoog (1962) com 50 % da concentração salina, adicionado de 1 mg.L⁻¹ de ácido naftalenacético, 1 mg.L⁻¹ de benzoinopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina e 2% de sacarose (M2), de acordo com o meio de cultivo, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Meio de cultura	Calos inoculados (un)	Calos com regeneração (%)	Plantas regeneradas(un)		
			Verdes	Albinas	Total
M1	6	50	0	3	3
M2	5	40	9	0	9

A eficiência de regeneração de plantas duplo-haplóides de arroz pela cultura de anteras, a partir dos calos inoculados, variou de 40 a 50 %. O meio de cultura MS com 50 % da concentração salina, adicionado de 1 mg.L⁻¹ de ácido naftalenacético, 1 mg.L⁻¹ de benzoinopurina e 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina e 2% de sacarose (M2) induziu maior porcentagem de regeneração de plantas (M2). Das 12 plantas regeneradas, nos dois meios, 75 % (09) eram verdes e somente 25 % (03) eram albinas (Tabela 3;). Verificou-se uma resposta genótipo-dependente em função do meio utilizado, onde somente o meio M1 promoveu a obtenção de plantas albinas. As condições relativas ao meio de cultura afetaram diretamente a eficiência dos protocolos de indução de calos e de regeneração de plantas *in vitro*. Entretanto, sabe-se que as condições ideais de cultivo são quase que específicas para cada genótipo (PERTERS et al., 1999).

CONCLUSÃO

As melhores respostas morfogênética in vitro para a obtenção de plantas duplo-haplóides de arroz foram obtidas com explantes derivados da região apical ou mediana de panículas que apresentavam uma distância de 6 cm entre a aurícula da folha bandeira e a penúltima folha coletados as 8 horas da manhã. O meio N6 adicionado de 4 mg.L⁻¹ de ANA, 1 mg.L⁻¹ CIN e 50 g.L⁻¹ sacarose foi o que apresentou a melhor resposta para formação de calo e o meio MS 50 % adicionado de 1 mg.L⁻¹ ANA, 1 mg.L⁻¹ de BAP, 0,5 mg.L⁻¹ de CIN e 20 g.L⁻¹ de sacarose para a regeneração de plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: Proceeding Symposium Plant Tissue Culture, Science Press, Peking, pp. 45-50, 1978.

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.; STIVAL, A.L.; BRAMMER, S.P., *et al.* Haplodiploidização: genética e melhoramento. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília : EMBRAPA/CBAB, V.2, p.569-612, 1999.

MURASHIGE T.; SKOOG. F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497, 1962.

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/CBAB, V2, p.569-612, 1999.

RAINA, S.K. Doubled haploid breeding in cereals. *Plant Breeding Reviews*, v.15, n.1, p.141-186, 1997.

REYNOLDS, T.L. Pollen Embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v.33, p.1-10, 1997.

SANTOS K.E.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n.1, p.165-173, 2002.