

dentro del grupo que incluye los cultivares sugiere que dicha maleza se encuentra continuamente evolucionando en los campos de arroz en Uruguay. Se ha demostrado que la técnica AFLP es muy efectiva para evaluar la diversidad genética entre los distintos biotipos de la maleza y plantea una futura aplicación de la misma en la realización de un fingerprinting de variedades de arroz locales.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

- Bress- Patry et al, 2001. Theor Appl Genet 102: 118- 126.
Yoon, M. S. et al, 2000. J. Plant Res. 113: 375- 386.
Xu, R.Q.et al, 2000. Crop Sci.40: 808-815.
Vaughan, D.Aet al, 1999. Proc. Int. Symp. "World Food Security", Kyoto: 277- 280.
Innan et al. 1999. Genetics 151: 1157-1164

UTILIZAÇÃO DA REGIÃO MERISTEMÁTICA DE ÁPICES CAULINARES DE ARROZ COMO FONTE DE EXPLANTES GENETICAMENTE ESTÁVEL NA REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS

Leda Fontelles da Silva Tavares⁽¹⁾; Ariano Martins de Magalhães Jr.⁽²⁾; José Antônio Peters⁽³⁾ 1. Eng Agrº, Mestrando, UFPel-FAEM, Cx. Postal 354, Cep.: 96010-900, Pelotas (RS). 2. Eng. Agrº, Mestre, Pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Cx. Postal 403, CEP 96001-970, Pelotas (RS). E-mail: ariano@cpact.embrapa.br 3. Eng Agrº, Doutor, Professor UFPel-FAEM, Cx. Postal 354, Cep.: 96010-900, Pelotas (RS).

Em cultura de tecidos pode-se fazer uso de vários explantes para induzir um cultivo *in vitro*. A regeneração *in vitro* é mais facilmente induzida em alguns órgãos que em outros. Admite-se que estas diferentes expressões morfogênicas reflitam a natureza e o grau de

diferenciação dos tecidos (Kerbaui, 1999). Neste contexto, órgãos imaturos apresentam melhor capacidade regenerativa, entretanto, possuem o inconveniente de estarem disponíveis apenas em um curto período de tempo. Recentemente, iniciou-se a utilização de explantes da região basal e meristemática de ápices caulinares, obtidos a partir de sementes recém germinadas, contendo gemas axilares (Christou & Ford, 1995). Estes, além de possuírem elevada estabilidade genética (Greco et al, 1990), aliam o elevado potencial de regeneração dos órgãos imaturos, com a facilidade de obtenção a qualquer época do ano.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade do uso de explantes da região meristemática de ápices caulinares, estabelecendo-se protocolos de regeneração, via organogênese direta.

Como material botânico, utilizou-se sementes das cultivares de arroz irrigado, BRS 6 “Chuí”, obtidas na Embrapa Clima Temperado - Estação Experimental Terras Baixas.

Na obtenção de explantes da região meristemática de ápices caulinares realizou-se os seguintes procedimentos. As sementes foram, previamente descascadas, e desinfestadas com álcool 70%, durante 3 minutos, solução de hipoclorito de sódio 40% (produto comercial), por um período de 40 minutos, seguido por 3 lavagens em água destilada esterilizada e, por fim, solução de cloreto de mercúrio 0,6% durante um minuto, seguido por 4 lavagens em água destilada esterilizada. Após, as sementes foram inoculadas em meio de cultura para germinação, e mantidas no escuro, a temperatura de $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 3 a 4 dias. Decorrido este período, as sementes foram seccionadas, o coleoptile eliminado e foram retirados os explantes, com 0,3 a 0,5 cm de comprimento. Sete a dez dias após a inoculação em meio de cultura, os explantes apresentaram desenvolvimento de parte aérea, a qual foi eliminada para ao redor de 1/3, deixando o explante com, aproximadamente 0,5 a 1,0 cm.

O experimento com regeneração direta foi composto pelos seguintes meios de regeneração de brotos: MS + 0,5 mg.l⁻¹ TDZ + 0,2 mg.l⁻¹ ANA; MS + 1,0 mg.l⁻¹ TDZ + 0,2 mg.l⁻¹ ANA; MS + 2,0 mg.l⁻¹ TDZ + 0,2 mg.l⁻¹ ANA; MS + 4,0 mg.l⁻¹ TDZ + 0,2 mg.l⁻¹ ANA.

A condução do experimento foi no sistema unifatorial, com o fator experimental, meios de cultura, composto por quatro níveis experimentais, sendo utilizado um delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e cinco explantes/frasco.

Os meios de cultura tiveram seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada durante 20 minutos, a 120°C e 1,5 atm de pressão.

Os explantes de cada tratamento foram colocados em câmara de crescimento sob densidade de fluxo de 31,41 w.m⁻², temperatura de $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante o período de luz (16 horas) e $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante o escuro.

Após a regeneração dos explantes, os brotos foram transferidos para meio de enraizamento, composto pelo meio básico MS acrescido de 60 g.l⁻¹ sacarose, 100 mg.l⁻¹ mio-inositol e 7,0 g.l⁻¹ ágar. As plantas desenvolvidas foram aclimatadas, inicialmente em tubos de ensaio contendo água destilada e posteriormente transferidas para vasos, em casa de vegetação.

As sementes colhidas das plantas R₀, obtidas por cultura de tecidos via organogênese direta, foram utilizadas para viabilizar uma avaliação morfológica e molecular das plantas R₁. Para tal, estas foram semeadas a campo, em covas (2 a 3 sementes/cova), totalizando 80 covas/tratamento.

Aos 45 dias após a semeadura, retirou-se 10 amostras de folhas de cada tratamento para realizar uma análise de polimorfismo por PCR, via RAPD. As amostras foram então reunidas em grupos de 5 plantas, formando dois grupos, com duas extrações de cada para proporcionar maior confiabilidade nos resultados. Para triagem dos primers utilizou-se os Kits OPX e OPY (Operon Technologies, Inc.), cada um contendo 20 *primers* distintos e DNA de cinco plantas de arroz da cv. BRS 6 “Chuí”, não oriunda de cultura de tecidos.

Para extração de DNA genômico foi utilizado o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1995). O DNA extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro modelo Ultrospec 2000 UV/Visible, Pharmacia Biotech. As reações de amplificação foram realizadas

em um volume de 25µl, conforme Williams et al. (1990). O resultado da amplificação foi analisado através do software NTSYS (Rohlf, 1989).

Ao final do ciclo reprodutivo, procedeu-se a análise morfológica, comparando-se individualmente cada planta com a testemunha. Avaliou-se altura, ciclo, pilosidade da folha e do grão e tipo de grão. Além disto, coletou-se 10 panículas de cada tratamento para avaliar características quantitativas, como número de grãos, espiguetas estéreis (%), peso de 1.000 grãos e comprimento de panícula.

Os resultados da organogênese direta da cv. BRS 6 “Chuí”, indicaram não haver diferenças estatísticas entre os meios (Tabela 1), para a variável percentagem de regeneração, sendo que todos os tratamentos apresentaram uma alta taxa de regeneração de brotos.

Tabela 1. Percentagem de regeneração, número médio de brotos/explante e eficiência de regeneração, cv. BRS 6 “Chuí”.

Tratamentos ¹	Regeneração (%)	N ^o brotos/explante	Eficiência
1	96,38	15,19	14,30
2	100,00	13,85	13,96
3	99,40	25,31	24,60
4	100,00	26,05	24,46

¹Tratamentos: 1- MS + 0,5 mg.l⁻¹ TDZ + 0,2 mg.l⁻¹ ANA; 2- MS + 1,0 mg.l⁻¹ TDZ + 0,2 mg.l⁻¹ ANA; 3- MS + 2,0 mg.l⁻¹ TDZ + 0,2 mg.l⁻¹ ANA; 4-MS + 4,0 mg.l⁻¹ TDZ + 0,2 mg.l⁻¹ ANA

O número médio de brotos/explante demonstrou haver diferenças estatísticas significativas, levando a formação da equação polinomial $Y = 3,759 + 0,392 X$, com um coeficiente de determinação de 0,711 (Figura 1). Deste modo, há uma tendência a incrementar o número de brotações/explante a medida que aumenta-se a concentração de TDZ. O aumento desta citocinina em meio de cultura pode levar ao aumento do perfilhamento, já que esta classe de reguladores de crescimento promove a divisão celular, além de anular a dominância apical (Yui, 1990).

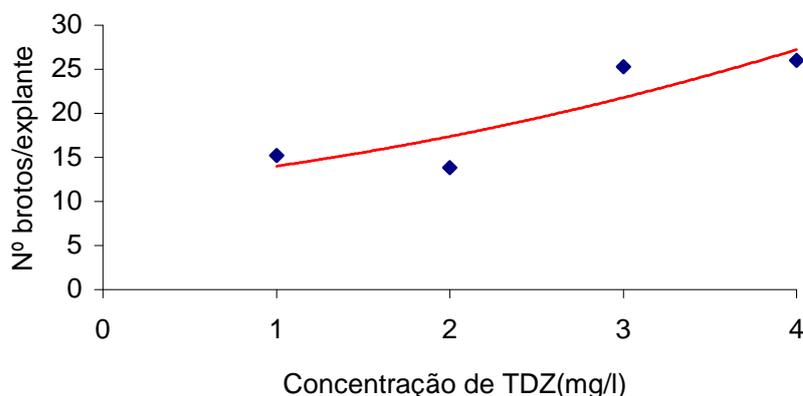


Figura 1 - Número médio de brotos/explante, cv. BRS 6 “Chuí”. 1- MS + 0,5 mg.l⁻¹ TDZ + 0,2 mg.l⁻¹ ANA; 2- MS + 1,0 mg.l⁻¹ TDZ + 0,2 mg.l⁻¹ ANA; 3- MS + 2,0 mg.l⁻¹ TDZ + 0,2 mg.l⁻¹ ANA; 4- MS + 4,0 mg.l⁻¹ TDZ + 0,2 mg.l⁻¹ ANA.

Em média, atingiu-se 20 brotos/explante regenerante. Pádua (1997), encontrou resultados similares, com cerca de 20 brotações em cada explante com a utilização do regulador de crescimento TDZ.

A eficiência de regeneração deste experimento pode ser considerada muito elevada, onde foram obtidas, em média, 19,5 brotações para cada explante inoculado (Tabela 1).

Na análise morfológica realizada nas plantas regeneradas por organogênese direta, não observou-se plantas atípicas. Nas avaliações de altura de plantas, ciclo, pilosidade de folhas e de grãos e tipo de grãos verificou-se que todas as plantas amostradas estavam fenotipicamente semelhantes a testemunha. Semelhantemente, nas variáveis número de grãos, espiguetas estéreis (%), peso de 1.000 grãos e comprimento de panícula não observou-se diferenças estatísticas significativas (dados não apresentados).

A fim de proceder a análise molecular das plantas R₁, selecionou-se os seguintes *primers* OPY - 02; OPY - 04; OPY - 05; OPY - 14; OPY - 17 e OPY - 20. Os seis *primers* utilizados determinaram a formação de 37 bandas, as quais foram analisadas individualmente em cada genótipo. A análise de polimorfismo permitiu a formação de dois grandes grupos, com uma grau de similaridade de, no mínimo, 70% entre eles. O coeficiente de Jaccard ficou ao redor de 0,8. Este, indica que entre os materiais de um mesmo sub-grupo, existe, no mínimo, 80% de similaridade.

As diferenças observadas entre amostras de um mesmo tratamento podem ser justificadas pela presença de quimerismo e artefatos do *primer*. Segundo Yang & Quiros (1993), foi encontrado 22,7% de bandas originárias de artefatos. Outro fator que também pode ter interferido nos resultados está relacionado a concentração do DNA genômico. Welsh & McClelland (1990) demonstraram variações no padrão de amplificação quando houve alterações na concentração do DNA genômico.

Em uma análise conjunta do polimorfismo por RAPD e a análise fenotípica, observa-se que a primeira detectou maior diversidade entre os materiais. Esta observação concorda com aquela encontrada por Godwin et al.(1997), que verificaram um nível significativamente superior de polimorfismo a nível de DNA, pela técnica de RAPD, quando comparado a análise fenotípica. Estes autores indicam que o polimorfismo observado no RAPD e não encontrado na análise fenotípica, pode estar relacionado à seqüências altamente repetidas de DNA, que não interferem nas características fenotípicas.

O trabalho realizado indicou que a utilização de explantes da região meristemática de ápices caulinares é uma alternativa viável e eficiente para regeneração direta de plantas de arroz, com elevada estabilidade genética, comprovada pelas análises morfológicas realizadas a campo, bem como pelas análises moleculares (RAPD) dos materiais regenerados *in vitro*. Conclui-se também que a regeneração direta de brotos pode ser atingida através dos regulador de crescimento TDZ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHRISTOU, P. & FORD, T.L. Recovery of Chimeric Rice Plants from Dry Seed using Electric Discharge Particle Acceleration. **Annals of Botany**, v.75, p. 449-454, 1995.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1995. pp.220. (EMBRAPA-CENARGEM Documento 20).
- GODWIN, I.D.; SANGDUEN, N.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; PIPERIDIS, G.; ADCINS, S.W. RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var. indica) somaclonal progenies. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 320-324, 1997.
- GRECO, B.; LOMANACO, A.; BOGGINI, B.; TOMASSINI, C.; TANZARELLA, O.A. Clonal propagation of rice through proliferation of axillary shottos. **Euphytica**, v.48, p. 12-127, 1990
- KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In.: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, v.2, p. 519-531, 1999.

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiolo. Plant**, v.15, p. 473-479, 1962.
- PÁDUA, Vânia L. Muniz de. **Regeneração *in vitro* e transformação genética de arroz (*Oryza sativa* L.) por eletroporação de tecidos intactos**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997. 91p. Tese (doutorado) - Ciências Biológicas (Genética).
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 1.50. New York: Exater, 191p., 1989.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.24, p. 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p. 6531-6535, 1990.
- YANG, X. & QUIROS, C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 86, p. 205-212, 1993.
- YUI, E. **Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira (*Malus domestica*, Borkh)**. Lavras: ESAL. 1990, 69p. Dissertação (Mestrado).

ENSAIO ESTADUAL DE VALOR DE CULTIVO E USO DE LINHAGENS PROMISSORAS DE ARROZ IRRIGADO DA EMBRAPA-CLIMA TEMPERADO, RIO GRANDE DO SUL, SAFRA 2001/2001

Daniel F.Franco⁽¹⁾; Ariano M. de Magalhães⁽¹⁾; Arlei L. Terres⁽¹⁾; Francisco J. Verneti Jr.⁽¹⁾; Paulo H. Rangel⁽²⁾; Beatriz Pinheiro⁽²⁾; Viridiano Cutrin⁽²⁾; Francisco P. Moura Neto⁽²⁾. 1. EMBRAPA Clima Temperado. Cx. Postal 403, Cep.: 96.001-970-Pelotas-RS. E.mail daniel@cpact.embrapa.br. 2. EMBRAPA Arroz e Feijão, Rodovia Goiânia/Nova Veneza, Km 12, Cx. Postal 179, Fazenda Capivari. Santo Antonio de Goias, GO; Cep: 74001-970

O desenvolvimento de cultivares mais produtivas para disponibilizá-las aos produtores é um processo constante nos programas de melhoramento genético. Estes buscam desenvolver cultivares que apresentam alta adaptabilidade aos diversos ambientes em que são cultivadas e, expressem em termos de elevado rendimento de grãos associados a características agronômicas e industriais adequadas. Portanto, antes que uma nova cultivar seja colocada a disposição dos orizicultores, seu comportamento deve ser avaliado nas diversas regiões orizícolas do Estado, que variam, no que diz respeito, às condições de solo e clima. O desenvolvimento de novas cultivares de arroz irrigado para o Rio Grande do