

Avaliação de Cultivares de Arroz (*Oryza sativa* L.) para Cultivo In Vitro

Rosângela Bevitori¹

Introdução

A produção de calos embriogênicos com alta capacidade de regeneração é um pré-requisito fundamental para a transformação genética de arroz, muito utilizada como ferramenta para estudo de função de genes e incorporação de variabilidade genética nos programas de melhoramento dessa cultura.

O potencial para a indução de calos e a regeneração em plantas depende de certos fatores, tais como o genótipo da planta, o tipo e o estado fisiológico do explante e também da composição dos meios de cultivo. Entre esses fatores, a diferença genotípica é considerada a mais importante. Genótipos de arroz apresentam resposta específica ao cultivo *in vitro*, pois essa característica é controlada por um grupo de genes expressos durante o desenvolvimento do embrião.

No processo de transgenia, o uso de genótipos de arroz elite que já possuam características agronômicas desejáveis é essencial para reduzir o

número de retrocruzamentos na recuperação da característica inserida através da transformação genética. Conseqüentemente, o tempo para o desenvolvimento da nova cultivar pode ser reduzido.

A busca por novas cultivares brasileiras, responsivas à indução de calos e que apresentem alta capacidade de regeneração é de extrema importância para incorporar genes por transgenia, com possibilidade de se utilizar comercialmente a linhagem obtida, sem depender de retrocruzamentos.

Os genótipos BRS Primavera e BRS Bonança são as cultivares brasileiras já identificadas por possuírem resposta à indução de calos e de regeneração em plantas (BEVITORI et al., 2014). Entretanto, essas cultivares apresentam restrições comerciais e agronômicas, dependendo da região ou condições onde são produzidas. Portanto, é essencial identificar novas cultivares elite de arroz que possuam características agronômicas desejáveis e possam ser utilizadas no cultivo *in vitro*.

¹ Engenheira-agrônoma, Ph.D. em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

Dessa forma, este estudo teve o objetivo de avaliar cinco cultivares elite de arroz quanto ao potencial de produzir calos e regenerar plantas: BRS Bonança, BRS Sertaneja, BRS Esmeralda, BRS Talento e BRS CIRAD 302 (híbrido), que apresentam diferentes características quanto a ciclo, porte, produtividade, dentre outras. A cultivar BRS Bonança foi incluída no estudo para servir de comparação entre as cultivares testadas por apresentar alta capacidade de resposta à indução de calos e regeneração em plantas.

Material e Métodos

O protocolo básico do cultivo *in vitro* utilizado foi aquele descrito por Bevitori (2013), que consiste na utilização de sementes maduras inoculadas em meio N6 (CHU et al., 1975), modificado pela suplementação com os aminoácidos asparagina e arginina e pela substituição de sacarose por maltose (BEVITORI, 2013). Resumidamente, as sementes foram inoculadas em meio N6 modificado e mantidas no escuro à temperatura de 27-28 °C. Após 30 dias, os calos formados a partir dos calos primários originados das sementes (unidades embriogênicas ou calos secundários) foram transferidos para meio adequado para proliferação por sete dias, nas mesmas condições de luz e temperatura. Quando atingiram o tamanho ideal, os calos foram transferidos para o meio de pré-regeneração por sete dias e, em seguida, para o meio de regeneração e mantidos à temperatura de 27-28 °C e fotoperíodo de 16 horas. Após 30 dias, as plântulas foram então transferidas para meio de enraizamento. Uma vez enraizadas, as plântulas foram aclimatadas e transferidas para casa de vegetação.

Resultados e Discussão

Os calos primários das cultivares BRS Sertaneja, BRS Esmeralda e BRS CIRAD 302 liberaram para o meio as unidades embriogênicas (UEs). Entretanto, como esperado, as UEs dos diferentes genótipos apresentaram morfologia variada, desde aquosas, invaginadas, não globulares, brancas e hídricas (BEVITORI et al., 2014; NABORS et al., 1983). Diferenças quanto à resposta à indução e proliferação de calos embriogênicos foram observadas em todos os genótipos. O calo desejável é o embriogênico, que apresenta a formação de pequenos embriões somáticos capazes de regenerarem plantas completas, com raiz e parte aérea. Entretanto, nenhum genótipo de arroz é capaz de formar somente calos embriogênicos (BEVITORI et al., 2014). Genótipos com boa resposta à indução apresentam maior número de calos embriogênicos que os demais tipos de calos. O número, cor e tamanho dos calos embriogênicos também são dependentes do genótipo e do meio de indução utilizados, além da qualidade das sementes.

Os calos de BRS Sertaneja, BRS Esmeralda e BRS CIRAD 302 foram comparáveis aos de BRS Bonança (Figura 1), cujos calos são friáveis, de formato globular, e de cor amarelo-clara. Por outro lado, os calos provenientes de BRS Talento mostraram-se compactos. Esse tipo de calo não libera as UEs e pouco regenera. Esse mesmo resultado foi obtido por Bevitori et al. (2014) quando se utilizou a cultivar BRS Caiapó.

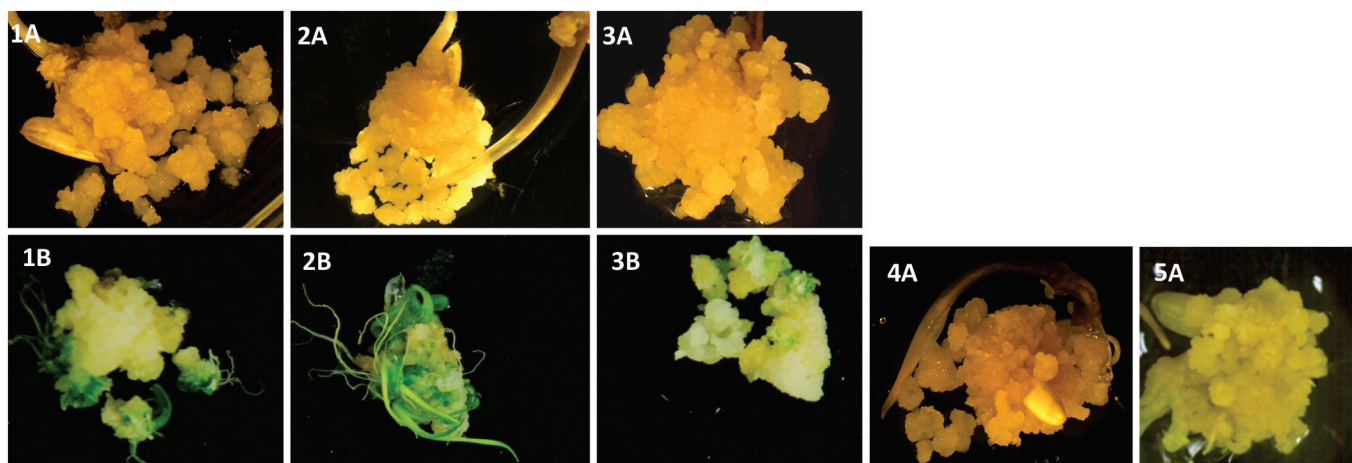


Figura 1. Calos primários (A) e em regeneração (B) dos genótipos (1) BRS Esmeralda, (2) BRS Bonança, (3) BRS Talento, (4) BRS Sertaneja e (5) BRS CIRAD 302.

Quanto a percentagem de sementes que produziram calos, o genótipo BRS Esmeralda obteve 89% de calos, não diferindo significativamente de BRS Bonança (91%), seguido de BRS Sertaneja (70%), BRS CIRAD 302 (65%) e BRS Talento (30%) (Tabela 1). As diferenças quanto ao nível de significância entre as cultivares sob as mesmas condições nutricionais indicam que a frequência de calos é genótipo-específico. Utilizando outros genótipos, Agrawal et al. (2006) e Hoque et al. (2007) também verificaram resultados semelhantes.

Para obtenção de calos embriogênicos é imprescindível a utilização de sementes vigorosas e livres de contaminações endógenas. A qualidade dos calos embriogênicos pode ser melhorada pela otimização das dosagens dos componentes dos meios de indução, como a concentração de fitormônios, dentre outros, favorecendo assim o desenvolvimento de potenciais morfogenéticos de cada genótipo (BEVITORI et al., 2014). Um meio de cultivo diferenciado, seja ele de indução ou de regeneração, pode aumentar a quantidade de calos embriogênicos de boa qualidade de BRS Sertaneja, com consequente melhoria na obtenção de plantas regeneradas, pois a interação entre o genótipo e as condições de cultivo é também importante (VISARADA et al., 2002). Isso foi confirmado nos experimentos de Bevitori (2013) e Bevitori et al. (2014). Quando sementes de BRS Bonança foram inoculadas em meio N6 (CHU et al., 1975), a percentagem de sementes que produziram calos foi de 72%. Ao suplementar o meio N6 com asparagina e arginina e maltose (em substituição à sacarose), a percentagem obtida por esse genótipo foi de 95%.

Tabela 1. Percentagem de calos derivados de sementes maduras e de calos em regeneração de cinco genótipos de arroz.

Genótipo	% de calos*	% de regeneração*
BRS Bonança	91 a	86 a
BRS Esmeralda	89 a	79 a
BRS Sertaneja	70 b	55 b
BRS CIRAD 302	65 b	29 c
BRS Talento	30 c	20 c

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente no nível de 5% de probabilidade, pelo teste t.

Após cinco a dez dias, o processo de formação da parte aérea iniciou-se, sendo que BRS Bonança foi o mais precoce, apresentando pontos verdes aos sete dias. Os calos se tornam verdes devido ao aumento da expressão de alguns genes relacionados à fotossíntese (CHE et al., 2006).

A capacidade de regeneração dos genótipos variou de 20% a 86%, sendo que a do BRS Esmeralda (79%) equiparou-se à do BRS Bonança (86%), não havendo diferença significativa entre ambos os genótipos (Tabela 1). BRS Bonança, BRS Esmeralda e BRS Sertaneja exibiram as primeiras brotações mais precocemente do que os demais (Figura 1).

Constata-se com esses resultados que calos embriogênicos são considerados de boa qualidade quando também apresentam alto potencial de regeneração em plantas (Tabela 1). Apesar de não ter diferido significativamente com relação à percentagem de regeneração de BRS Bonança e BRS Esmeralda, o genótipo BRS Sertaneja apresenta potencial para esta característica, devido ao fato de que a percentagem de plantas regeneradas pode ser incrementada através da utilização de um meio de regeneração diferenciado, com modificações em alguns de seus componentes, pois a frequência de regeneração de plantas *in vitro* é dependente dos genótipos utilizados, bem como da sua interação com as condições de cultivo (OZAWA et al., 2003).

Conclusão

Com os resultados obtidos neste estudo, confirma-se que BRS Bonança é um genótipo que apresenta alta capacidade de produzir calos embriogênicos e de regenerar plantas. Comparado a esse genótipo, conclui-se que BRS Esmeralda é responsivo à indução de calos e apresenta potencial elevado de regeneração, podendo ser recomendado em estudos que visem o cultivo *in vitro* como uma ferramenta de propagação da planta em áreas biotecnológicas.

Referências

- AGRAWAL, P. K.; GOSAL, S. S.; SIDHU, G. S. Sequential reduction of 2,4-D improves whole plant regeneration from long-term maintained calli in some indica cultivars of rice. *Oryza*, Cuttack, v. 43, n. 1, p. 10-15, Jan. 2006.
- BEVITORI, R. **Cultivo *in vitro* do arroz (*Oryza sativa* L.): conceitos básicos e protocolo.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013. 68 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 285).

BEVITORI, R.; POPIELARSKA-KONIECZNA, M.; SANTOS, E. M. dos; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; PETROFEZA, S. Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation. **Protoplasma**, New York, v. 251, n. 3, p. 545-554, May 2014.

CHE, P.; LOVE, T. M.; FRAME, B. R.; WANG, K.; CARRIQUIRY, A. L.; HOWELL, S. H. Gene expression patterns during somatic embryo development in maize Hi II callus culture. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 62, n. 1/2, p. 1-14, Sept. 2006.

CHU, C. C.; WANG, C. S.; SUN, C. S.; HSU, V.; YIN, K. C.; CHU, C. Y.; BI, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through experiments on the nitrogen sources. **Science China Mathematics**, Beijing, v. 18, n. 5, p. 659-668, 1975.

HOQUE, M. N.; RAHMAN, L.; HASSAN, L. Effect of culture media on seed dormancy and callus induction ability of some wild and cultivated rice genotypes. **Biotechnology**, Faisalabad, v. 6, n. 1, p. 61-63, 2007.

NABORS, M. W.; HEYSER, J. W.; DYKES, T. A.; DeMOTT, K. J. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. **Planta**, Berlin, v. 157, n. 5, p. 385-391, Apr. 1983.

OZAWA, K.; KAWAHIGASHI, H.; KAYANO, T.; OHKAWA, Y. Enhancement of regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) calli by integration of the gene involved in regeneration ability of the callus. **Plant Science**, Oxford, v. 165, n. 2, p. 395-402, Aug. 2003.

VISARADA, K. B. R. S.; SAILAJA, M.; SARMA, N. P. Effect of callus induction media on morphology of *Embryogenic calli* in rice genotypes. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 45, n. 4, p. 495-502, Dec. 2002.

Comunicado Técnico, 224



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Arroz e Feijão
Endereço: Rod. GO 462 Km 12 Zona Rural, Caixa Postal 179 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO
Fone: (62) 3533 2123
Fax: (62) 3533 2100
www.embrapa.br/fale-conosco/sac
www.embrapa.br
1ª edição
On-line (2015)

Comitê de publicações

Presidente: Pedro Marques da Silveira
Secretário-Executivo: Luiz Roberto R. da Silva
Membros: Camilla Souza de Oliveira, Luciene Fróes Camarano de Oliveira, Flávia Rabelo Barbosa Moreira, Ana Lúcia Delalibera de Faria, Heloisa Célis Breseghello, Márcia Gonzaga de Castro Oliveira, Fábio Fernandes Nolêto

Expediente

Supervisão editorial: Luiz Roberto R. da Silva
Revisão de texto: Camilla Souza de Oliveira
Normalização bibliográfica: Ana Lúcia D. de Faria
Editoração eletrônica: Fabiano Severino