

## CULTIVO DE ANTERAS DE ARROZ PARA OBTENÇÃO DE DUPLOS HAPLÓIDES

Fernando Adami Tcacenco<sup>(1)</sup>, Satoru Yokoyama<sup>(1)</sup>, Caroline Schulenburg da Silva<sup>(2)</sup>. 1. Epagri, Estação Experimental de Itajaí, Caixa Postal 277, 88301-970 – Itajaí, SC, E-mail: tcacenco@epagri.rct-sc.br; 2. UNIVALI, Universidade do Vale do Itajaí. Rua Uruguai, 458, Caixa Postal 360, 88302-202, Itajaí, SC.

A cultura de células, protoplastos e tecidos de plantas, constitui uma das áreas de maior êxito da biotecnologia; esta tecnologia conquistou destacada posição na propagação massal de plantas, no melhoramento genético e na conservação e manejo do germoplasma. Os últimos avanços no cultivo de antera, em especial no arroz, oferecem novas possibilidades para a aplicação desta técnica nos programas de fitomelhoramento, podendo-se regenerar duplo haplóide em um curto espaço de tempo, alcançando assim a homozigose, que de outra maneira levaria de seis a sete gerações a campo. Dentre os muitos fatores que influem no sucesso do cultivo de antera de arroz para a obtenção de duplo haplóide, revisados por LENTINI *et al.* (1997), estão o genótipo do material e as condições ambientais sob as quais as plantas se desenvolveram até o florescimento. Em linhas gerais, materiais do grupo *japônica* são mais adaptados a cultura de tecidos e de anteras do que materiais do grupo *indica*, embora alguns trabalhos tenham demonstrado a boa adaptação da cultivar Epagri 109, do grupo *indica*, na formação de calos e regeneração de plantas a partir de sementes maduras ou embriões imaturos (TCACENCO 1999 a,b). Há também grande influência da temperatura e da radiação solar durante os meses que antecedem a formação do grão de pólen, preferindo-se material desenvolvido sob temperaturas ao redor de 19 °C à noite e 29 °C durante o dia, e sob alta radiação solar; temperaturas superiores a 30 °C induzem a formação de plantas albinas. Também se constata que anteras colhidas de perfilhos primários, em dias ensolarados no horário entre 8 e 10 horas da manhã, têm maior capacidade de regeneração de duplo haplóide.

No presente trabalho, foi feita a aplicação do cultivo de anteras em materiais oriundos de cruzamentos realizados na Epagri, na safra 1999/2000, cujos descendentes F1 ou RCF2 foram semeados na safra 2000/2001, na Estação Experimental de Itajaí, localizada no município de Itajaí, Santa Catarina. Os materiais foram semeados em parcelas ou linhas, e conduzidos sob o sistema de irrigação por inundação. As panículas foram sendo colhidas à medida em que entravam em florescimento, o que ocorreu durante os meses de janeiro a março de 2001. A colheita foi feita quando a distância entre as aurículas das duas últimas folhas era de 5 a 8 cm, o que deve corresponder ao estágio de grão de pólen uninucleado médio e tardio. O material utilizado neste trabalho foi coletado no período de 01/02/2001 a 02/04/2001.

As panículas foram limpas com algodão embebido em etanol 70%, lavadas com água esterilizada, embaladas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração (9 °C) por 7 a 12 dias, até o processamento das mesmas. Para desinfecção final, realizada em câmara de fluxo laminar, imediatamente antes do processamento, foi utilizado o seguinte protocolo: imersão em etanol 70% por um minuto, três lavagens em água destilada e esterilizada, imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,75% (preparada a partir do produto comercial com 2% a 2,5% de cloro ativo) por três minutos, e três lavagens em água destilada e esterilizada. Para a remoção das anteras, as espiguetas foram cortadas na sua base. As anteras foram removidas do interior das espiguetas por batimento na borda de vidros de cultura contendo 10 mL do meio de cultivo "C" para a indução de calos, conforme descrito em LENTINI *et al.* (1997), contendo 2 mg/L de 2,4-D, 0,07 mg/L de picloram, e 0,5 mg/L de cinetina, e suplementado com 10 mg/L de AgNO<sub>3</sub> e 50 g/L de maltose. Cerca de 90 a 150 anteras, provenientes de 15 a 30 espiguetas, foram incubadas em cada frasco. Todos os meios foram autoclavados segundo protocolos correntes em laboratórios de cultivo de tecidos vegetais. Para indução de calos, os vidros foram mantidos sem iluminação, sob

temperatura de 25 °C, por períodos que variaram de 5 a 20 semanas, até que houvesse a formação de calos. Uma vez formados, os calos foram transferidos para meio de regeneração de plantas: meio MS sólido, acrescido de 30 g/L de sacarose, 1 mg/L de ANA, 4 mg/L de cinetina e 7 g/L de ágar. Os calos foram incubados a 25 °C, com fotoperíodo de 16 horas.

Foram implantados ao todo 1.115 vidros, provenientes de 120 plantas e 41 cruzamentos ou retrocruzamentos, envolvendo 13 linhagens ou cultivares como progenitores: Epagri 106, 107, 108 e 109, Passarinho, Roxo, IR841, Cica 8, RCN-B-93-193, Fedearroz50, NP125, Multi-espigueta e Raminad. A taxa média de contaminação *in vitro* foi de 30%. Foi avaliada a capacidade de formação de calos para os diversos cruzamentos, bem como para os períodos de colheita das inflorescências a campo; para este último item, as coletas foram agrupadas em quatro períodos: 01/02/2001 a 15/02/2001 (Período 1), 16/02/2001 a 02/03/2001 (Período 2), 03/03/2001 a 17/03/2001 (Período 3) e 18/03/2001 a 02/04/2001 (Período 4).

Das 120 plantas utilizadas, obtiveram-se calos de 42 delas, pertencentes a 22 cruzamentos ou retrocruzamentos. O percentual de formação de calos para as diversas linhagens ou cultivares que participaram dos cruzamentos encontram-se na Tabela 1. O número de vidros implantados a partir dos genótipos de híbridos e de retrocruzamentos em que cada linhagem ou cultivar participou foi bastante variável (de 6 até 432). Os percentuais de formação de calos foram igualmente variáveis, provavelmente em função do genótipo; no entanto, há que se ressaltar que muitos cruzamentos tiveram florescimento mais tardio ou tiveram inflorescências colhidas mais tardiamente, por exemplo aqueles onde a linhagem multi-espigueta (YOKOYAMA *et al.*, 1999) participou, e isto pode ter influenciado nos percentuais de formação de calos, uma vez que os melhores períodos para o cultivo de anteras *in vitro* foram os mais precoces.

Tabela 1 - Formação de calos a partir de anteras implantadas *in vitro* provenientes de híbridos ou retrocruzamentos envolvendo 13 linhagens e cultivares de arroz. Epagri/EEI, Itajaí, SC, 2001

Linhagem ou cultivar utilizada no cruzamento como um dos progenitores	Vidros implantados com anteras do respectivo cruzamento	Formação de calos
	--- número ---	--- % ---
Cica 8	78	39,7
Fedearroz 50	44	29,5
Roxo	432	19,0
Epagri 106	106	17,9
RCN-B-93-193	188	16,5
IR 841	359	15,9
Epagri 108	409	15,4
Passarinho	147	14,3
Epagri 109	358	13,4
Epagri 107	241	8,7
Multi-espigueta	314	1,9
NP 125	15	0,0
Raminad	6	0,0

Os resultados para os diversos períodos de colheita encontram-se na Figura 1. Observa-se uma forte influência dos períodos de colheita sobre a formação de calos; material colhido mais cedo, durante o mês de fevereiro, apresentou um melhor desempenho no tocante à formação de calos quando comparado ao material colhido nos períodos finais, durante o mês de março. Estes resultados estão de acordo com dados de literatura, uma vez que, nas condições ambientais onde as plantas utilizadas no trabalho foram cultivadas, houve um decréscimo na radiação solar e nas temperaturas diurnas e noturnas, o que

influencia na capacidade de formação de calos e regeneração de plantas a partir de anteras de arroz *in vitro*.

O presente trabalho continua em andamento, e existem ainda cerca de 50 calos em meio de regeneração de plantas. Até o momento, foi obtida apenas uma planta, proveniente do cruzamento Epagri 108 / Roxo // Epagri 108.

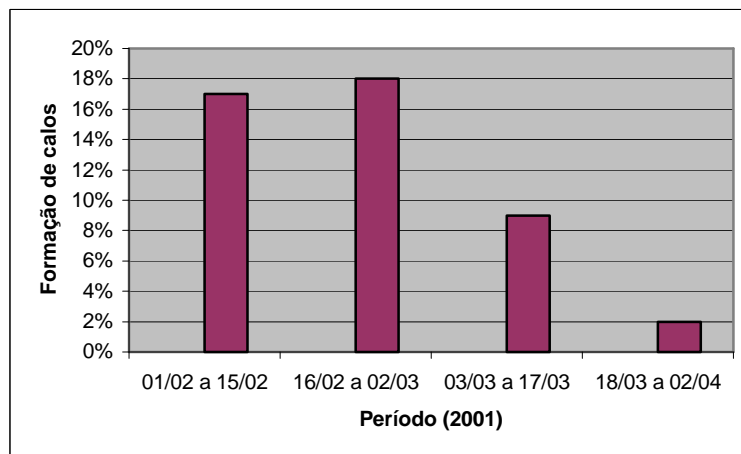


Figura 1 - Formação de calos a partir de anteras de arroz cultivadas *in vitro*, colhidas em quatro períodos. Epagri/EEI. Itajaí, SC, 2001

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LENTINI, Z.; MARTINEZ, C.; ROCA, W. 1997. **Cultivo de anteras de arroz no desenvolvimento do germoplasma.** – Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 57p. Ilus. (publicação CIAT; no. 293) ISBN 958-9438-92-6.
- TCACENCO, F. 1999. **Cultura 'in vitro' de cultivares e linhagens catarinenses de arroz.** In: Congresso Brasileiro de Arroz irrigado,1; Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, 23.; 1999, Pelotas. **Anais...Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1999.p.120-123. ISBN 85-85941-05-7.**
- TCACENCO, F. 1999. **Efeito da idade de embriões imaturos na formação de calos e na regeneração de plantas de arroz 'in vitro'.** In: Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado,1; Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, 23.; 1999, Pelotas. **Anais...Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1999.124-125. ISBN 85-85941-05-7.**
- YOKOYAMA, S.; BACHA, R.; ISHI, T. 1999. **Multi-espiguetas, genótipo em potencial para uso em melhoramento.** In: Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado,1; Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, 23.; 1999, Pelotas. **Anais...Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1999.p.111. ISBN 85-85941-05-7.**