

CULTURA 'IN VITRO' DE CULTIVARES E LINHAGENS CATARINENSES DE ARROZ

Tecocenco, P. A. Epagri, Estação Experimental de Itajaí, Caixa Postal 277, 88301-970 - Itajaí. Email: tecocenco@epagri.rct-sc.br

Vários meios de cultura tem sido utilizados para o arroz, sendo os resultados dependentes da cultivar ou linhagem utilizada e do tipo de explante, entre outros fatores. Os meios MS, LS e N6 estão entre os mais comumente utilizados para a indução de calos e regeneração de plantas de arroz. Da mesma forma, vários órgãos ou tecidos podem ser utilizados para a embriogênese direta ou indireta, incluindo raízes, colmos, folhas, panículas imaturas, sementes maduras ou imaturas, coleóptilos, e embriões. Vários reguladores de crescimento tem também sido utilizados em associação com aqueles meios, para promover embriogênese e organogênese, sendo o 2,4-D geralmente incluído para a indução de calos.

Um experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Louisiana (Baton Rouge) em 1997, para avaliar a qualidade de calos de arroz produzidos 'in vitro' e o potencial de regeneração de plantas dos mesmos, procurando-se encontrar um pequeno número de caracteres morfológicos que poderão ser usados para a seleção de calos embriogênicos. Nove cultivares ou linhagens catarinenses foram utilizadas, além de duas cultivares do tipo *japonica* (Tabela 1). Três meios de cultura foram testados: CC, LS e N6. Para a formação de calos, utilizou-se 2,4-D (2 mg L^{-1} em CC e N6, e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ em LS). Para a regeneração de plantas, utilizou-se zeatin ribosídeo ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$) e ácido indole-acético - AIA (1 mg L^{-1}).

As sementes descascadas foram imersas por um a dois minutos em álcool a 70%, lavadas com água esterilizada, imersas por 40 minutos em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 2,65%, com agitação e vácuo, lavadas abundantemente com água esterilizada, colocadas em placas de Petri de 100 mm x 15 mm contendo os meios de cultura para indução de calos, e mantidas no escuro a 28°C por duas semanas para a germinação e a formação de calos. Os calos que se formaram a partir dos embriões, entre o mesocótilo e a radícula, foram removidos, transferidos para novas placas, e mantidos nas mesmas condições por mais três semanas para permitir o seu desenvolvimento, sendo nesse período subcultivados uma vez para novo meio. Após esse período de crescimento, os calos foram transferidos para os meios de regeneração de plantas, mantidos a 28°C e 16 horas de fotoperíodo ($25 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), sendo subcultivados a cada duas semanas por um período de 15 semanas. Os calos que não se desenvolveram ou que não formaram plantas foram descartados a cada subcultivo.

Antes de se transferirem os calos para os meios de regeneração, anotaram-se os seguintes atributos para cada calo: cor, presença de raízes, fiabilidade, e aparência. Todos os caracteres foram do tipo binário (presença/ausência), muitos deles com múltiplos estádios. Ao final do experimento, quando o material havia sido cultivado por 21 semanas, anotaram-se a intensidade de pontos verdes em cada calo, utilizando-se escala de 1 a 9, e o número de plantas já regeneradas.

Quando aplicável, os dados foram analisados através de análise de variância com o teste de Duncan, análise de componentes principais com a matriz de covariâncias, e análise de conglomerados com o coeficiente de Jacquard, a distância média ou o coeficiente de similaridade.

Todas as cultivares ou linhagens formaram um maior ou menor número de calos, sendo a qualidade e a quantidade dependentes do genótipo e do meio de cultura. Os resultados da análise de variância para germinação de sementes indicou que não houve diferenças significativas entre cultivares ou meios de cultura. As percentagens médias de germinação

entre cultivares variaram de 90,0% (SC155) a 97,8% (Bengal) e entre meios de 93,3% (LS) a 96,7% (CC). A porcentagem de formação de mostrou a seguinte variação entre cultivares: 58,0% (SC 148) a 93,3% (Bengal); entre meios, a variação foi de 80,4% (LS) a 90,1% (N6). A porcentagem de calos de boa qualidade foi ainda mais variável, desde 43,5% (Epagri 107) até 91,3% (Epagri 106) e desde 60,3% (meio LS) até 78,4% (meio CC). Houve também diferenças significativas entre meios e cultivares para o peso de calos. A cultivar Epagri 106 e o meio de cultura CC produziram em média calos mais pesados.

Mesmo apresentando algumas "boas" características, o material produzido nos meios de cultura N6 e LS não regenerou plantas, ao passo que cinco das onze cultivares ou linhagens produziram plantas 'in vitro' quando cultivadas no meio CC (Tabela 1). Essas cultivares apresentaram uma média de 6,7 plantas por calo. A melhor cultivar foi a Epagri 109, que apresentou uma média de 10,6 plantas por calo, sendo que alguns calos dessa cultivar produziram até 28 plantas. A quase totalidade dos calos dessa cultivar produziu plantas. O meio de cultura CC apresentou, em geral, calos mais desenvolvidos, e com a predominância das cores branca e creme (Figura 1). A maior parte desses calos não foi friável, e apresentou uma superfície irregular. Calos produzidos no meio LS apresentaram características opostas: eram menores, mais escuros, mais friáveis, e tinham uma superfície mais regular e brilhante. Calos produzidos no meio de cultura N6 foram intermediários.

As seguintes generalizações podem ser feitas quanto às características dos calos produzidos em meio CC:

- Cor: nenhum calo produzido no meio CC apresentou escores positivos para a cor preta, mas escores positivos para as cores branca, creme e amarela foram encontrados em várias combinações; cores claras foram definitivamente associadas a regeneração de plantas neste meio, já que calos com coloração preta não produziram plantas, e calos com coloração marrom apenas produziram se também apresentavam setores com coloração clara, geralmente amarela;
- Friabilidade: a maior parte dos calos foram friáveis ou intermediários, e em geral a friabilidade também esteve associada a cores intermediárias (creme e amarela);
- Forma e aparência: a maioria dos calos apresentou superfície lisa e brilhante, sendo que aqueles com uma superfície mais irregular não regeneraram plantas;
- Presença de raízes: a formação de raízes nas fases iniciais de formação e crescimento de calos foi negativamente associada à capacidade de regeneração de plantas.
- Peso: para o meio CC, o peso médio por calo foi de 440 mg, variando desde 100 mg até 750 mg; em geral, calos mais pesados não apresentaram altas taxas de regeneração, e as cultivares que apresentaram o maior potencial (Epagri 108, Epagri 109 e SC 144) apresentaram pesos baixos.

Os resultados até agora obtidos também indicam que o meio de cultura CC é o mais adequado para o material de Santa Catarina. No futuro, pode-se vir a trabalhar com os componentes desse meio, para otimizar mais ainda a produção de plantas 'in vitro'. Há também indicação que a seleção de calos com as melhores características morfológicas nas fases iniciais da cultura de tecidos pode aumentar o resultado final, já que apenas os melhores calos seriam passados de uma fase para a outra.

A cultivar Epagri 109, devido ao seu excelente comportamento 'in vitro', poderá tornar-se uma cultivar padrão para experimentos de cultura de tecidos e transformação genética de cultivares de arroz de grão longo do tipo *indica*. Essa classe de material apresenta em geral baixas taxas de regeneração em cultura de tecidos, mas esta cultivar produziu

Tabela 1 - Características e capacidade de regeneração 'in vitro' de várias cultivares de arroz em meio de cultura CC

Cultivar	Subespécie	Genealogia e outras características	Número de calos que regeneraram plantas	Porcentagem de calos regeneráveis	Número médio de plantas por calo (variação)
Bengal	<i>japonica</i>	Cultivar americana	Nenhum	-	-
Epagri 106	<i>indica</i>	P3085-F4-54/CT 6771	Nenhum	-	-
Epagri 107	<i>indica</i>	Cica4/P1890 (=CNA 5259)	Nenhum	-	-
Epagri 108	<i>indica</i>	CT 7347/IR 21015-72-3-3-3-1	3	33,3	3,7 (2-7)
Epagri 109	<i>indica</i>	CT 7347/IR 21015-72-3-3-3-1	8	88,9	10,6 (2-28)
SC 144	<i>indica</i>	Linhagem brasileira	2	22,2	1,5 (1-2)
SC 147	<i>indica</i>	Linhagem brasileira	Nenhum	-	-
SC 148	<i>indica</i>	Linhagem brasileira	Nenhum	-	-
SC 153	<i>indica</i>	Linhagem brasileira	1	11,1	3
SC 155	<i>indica</i>	Linhagem brasileira	2	22,2	2,5 (2-3)
Taipei 309	<i>japonica</i>	Cultivar do Taiwan	Nenhum	-	-