

EFEITO DA IDADE DE EMBRIÕES IMATUROS NA FORMAÇÃO DE CALOS E NA REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ 'IN VITRO'

Tocacenco, F. A. Epagri, Estação Experimental de Itajaí, Caixa Postal 277, 88301-970 - Itajaí.
Email:tocacenco@epagri.rs.gov.br

Vários órgãos podem ser utilizados como fonte do explante para a cultura 'in vitro' de arroz, incluindo embriões jovens, panículas imaturas, anteras, sementes maduras, colmos e folhas. Os embriões jovens, imaturos, são considerados como uma das melhores fontes, tanto para a formação de calos quanto para a regeneração de plantas. Um dos maiores problemas associados com este tipo de material é que em geral há a necessidade da coleta dos embriões com uma idade bastante precisa, cerca de 14 dias após a fertilização, o que faz com que o procedimento seja de baixo rendimento, particularmente para linhagens ou cultivares que apresentam um período muito longo de florescimento. Para cultivares com período de florescimento concentrado, o procedimento se torna praticamente impossível, uma vez que demanda muita mão-de-obra em um espaço curto de tempo. Além disso, pela própria morfologia do florescimento da espécie, a panícula do arroz apresenta, ao mesmo tempo, diferentes estádios de desenvolvimento.

Em decorrência desta característica, qualquer experimentação baseada na cultura 'in vitro' de embriões jovens de arroz demanda a coleta quase que diária de inflorescências, e a utilização de apenas a parte central da mesma. A seleção das panículas e das espiguetas é geralmente empírica, e uma grande parte do material coletado em uma determinada data é descartada, já que o grau de maturidade pode se encontrar abaixo ou acima do grau ótimo, ou seja, 14 dias após a fertilização.

Uma das maneiras de atenuar este tipo de problema é a utilização de embriões com diferentes graus de maturidade. Neste caso, poder-se-ia colher porções grandes das inflorescências, por exemplo metade das mesmas, quando o grau médio de maturidade fosse próximo do ideal. A questão então se resumiria em estabelecer a qualidade do material gerado pelos embriões encontrados no segmento de panícula, que podem ter uma diferença de até cerca de dez dias no tempo decorrido após a fertilização.

Para verificar esta hipótese, foi conduzido um experimento no Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Louisiana (Baton Rouge), em 1997, no qual embriões imaturos com várias idades, até cerca de três semanas após a fertilização, foram utilizados. A linhagem SC 153, do tipo *indica*, foi utilizada em conjunção com o meio de cultura CC. Para a indução de calos utilizou-se 2,4-D na proporção de 2 mg L^{-1} , e para a regeneração de plantas utilizou-se a combinação de zeatin ribosídeo ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$) e ácido indole-acético (1 mg L^{-1}).

Porções de inflorescências, geralmente metade das mesmas, foram coletadas de plantas em casa de vegetação quando o número médio de dias após a fertilização era de cerca de 14 determinados empiricamente. As espiguetas foram separadas individualmente e desinfetadas através de um procedimento duplo, no qual as mesmas foram inicialmente imersas em álcool 70% por dois minutos, e após serem lavadas, imersas em solução de hipoclorito de cálcio a 2,65% por 40 minutos, sendo este último procedimento conduzido sob vácuo.

Após eliminação do agente desinfetante, os embriões foram removidos das espiguetas. Um corte foi feito atravessando a pálea e a lema em desenvolvimento, acima da base, e o embrião foi forçado para fora pela aplicação de uma leve pressão na porção central da semente jovem. A coleta dos embriões foi realizada em câmara de fluxo laminar sob microscópio estereoscópico com o aumento adequado. Para sementes já mais maduras, das quais não foi possível extrair o embrião apenas pela pressão aplicada, houve a necessidade de remoção total da pálea e da lema.

Os embriões removidos foram classificados em três grupos: (a) embriões "jovens", coletados cerca de sete a dez dias após a fertilização, e que não haviam ainda atingido o estágio leitoso; estes embriões eram bastante pequenos e facilmente removidos da semente; (b) embriões intermediários, coletados de sementes fertilizadas há mais de dez dias, mas que ainda se encontravam no estágio de grão leitoso; estes embriões também eram facilmente removidos; e (c) embriões "velhos", coletados de sementes que já haviam passado do estágio de grão leitoso. A nomenclatura "jovem", "intermediário" e "velho" aplica-se, no presente contexto, apenas para diferenciar as três classes, já que todos os embriões empregados são, no senso clássico, considerados como jovens ou imaturos.

Após a coleta, os embriões foram colocados em placas de Petri contendo meio para indução de calo por um período de duas semanas, sendo mantidos no escuro a 28 °C. Os calos que se formaram a partir dos embriões foram transferidos para novas placas e mantidos nas mesmas condições por mais três semanas, para favorecer o crescimento e desenvolvimento, após o que foram transferidos para meio de regeneração e mantidos sob iluminação. O número de embriões imaturos que geraram calos e o número de plantas por calo foram anotados ao final do experimento. Foram coletados ao todo 69 embriões, divididos nas seguintes quantidades por categoria: jovens, 20; intermediários, 31; velhos, 18. Devido a contaminações havidas durante as diversas fases da experimentação, ao final coletaram-se dados de 9 embriões jovens, 16 intermediários e 9 velhos, num total de 35 embriões.

Os resultados (Tabela 1) indicam que a eficiência da formação de calos diminuiu com o aumento da idade do embrião. Todos os embriões jovens geraram calos, ao passo que apenas 69,6% dos embriões mais velhos o fizeram; embriões com idade intermediária geraram calos na proporção de 90,1%. Observações feitas também indicaram que a taxa de contaminação por bactérias e fungos foi muito mais alta para os embriões mais velhos, devido à maior exposição a esses agentes, quando ainda na planta em casa de vegetação. A regeneração de plantas seguiu a mesma tendência; uma alta proporção dos embriões mais jovens regeneraram plantas (77,8%), enquanto que essa taxa diminuiu para os embriões intermediários (62,5%) e velhos (55,6%). Quando estas percentagens são multiplicadas pelas percentagens de formação de calos, verificou-se que a eficiência de formação de plantas em embriões jovens foi o dobro da observada para embriões velhos. Os embriões jovens produziram, igualmente, mais do que o dobro do número de plantas geradas por embriões velhos (3,89 plantas e 1,50 plantas, respectivamente). No entanto, devido à alta variabilidade apresentada dentro de cada categoria, não houve diferença estatística entre esses valores.

Em geral, os resultados indicam que a utilização de embriões mais jovens, antes mesmo de atingirem o estágio ideal relatado na literatura para implantação de culturas 'in vitro', pode ser uma ferramenta a ser utilizada para o aumento da eficiência de experimentos deste tipo. Assim, pode-se utilizar praticamente todas as espiguetas de uma determinada inflorescência, se a mesma for coletada quando as espiguetas centrais encontram-se no estágio de grão leitoso, cerca de duas semanas após a fertilização. Devido às correlações negativas entre idade do embrião e capacidade de formação de calos e geração de plantas, há ainda vantagens em se utilizarem os embriões mais jovens dentro de uma inflorescência.

Tabela 1- Efeito da idade de embriões imaturos da linhagem de arroz SC 153 na formação de calos e na regeneração de plantas 'in vitro'

Idade dos embriões	Embriões que formaram calos	Calos que regeneraram plantas	Embriões que geraram plantas ^a	Plantas por calo
	-----%-----	-----%-----	-----%-----	-----Número----- ± desvio-padrão
Jovens	100	77,8%	77,8%	3,89 ± 3,22
Intermediários	90,1	62,5%	56,3%	2,69 ± 2,89
Velhos	69,6	55,6%	38,7%	1,50 ± 2,22

^aA percentagem de embriões que geraram plantas foi obtida pela multiplicação da percentagem de embriões que formaram calos pela percentagem de calos que regeneraram plantas.