

PRODUÇÃO DE PLANTAS DUPLO-HAPLÓIDES DE ARROZ POR CULTURA DE ANTERAS

Gilmar Roberto Zaffari¹; Dilnei Souza Medeiros²; Klaus Konrad Scheuermann³; Rubens Marschalek⁴; Henri Stuker⁵

Palavras-chave: *Oryza sativa*, cultura de anteras, micropropagação

INTRODUÇÃO

A obtenção de plantas duplo-haplóides de arroz é uma ferramenta biotecnológica promissora que propicia a geração em laboratório de plantas 100% homozigotas. Muitas das respostas morfogenéticas da formação de calos e regeneração *in vitro* de plantas duplo-haplóides, a partir de anteras, são dependentes do genótipo, sendo que normalmente genótipos da subespécie *japonica* respondem melhor do que genótipos da subespécie *indica* (HU, 1985; RAINA, 1997). A obtenção de duplo-haplóides androgenéticos para a obtenção de linhagens puras pode ser justificado pela redução de tempo e de custos e pela melhor eficiência na seleção (MORAES-FERNANDES et al., 1999). Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo produzir plantas duplo-haplóides a partir de 38 genótipos F₁ da subespécie *indica* do programa de melhoramento genético de arroz da Epagri.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, da Epagri-Estação Experimental de Itajaí. As panículas de arroz, de 38 genótipos F₁ da subespécie *indica* (SCH-10-2124, SCH-10-2138, SCH-10-2151, SCH-10-2169-5, SCH-10-2173-3, SCH-10-2173-4, SCH-10-2173-5, SCH-10-2173-6, SCH-10-2173-7, SCH-10-2173-8, SCH-10-2173-9, SCH-10-2173-12, SCH-10-2173-17, SCH-10-2175-1, SCH-10-2175-2, SCH-10-2175-3, SCH-10-2175-5, SCH-10-2175-6, SCH-10-2175-7, SCH-10-2175-11, SCH-10-2175-13, SCH-10-2175-16, SCH-10-2175-19, SCH-10-2179-1, SCH-10-2179-2, SCH-10-2179-3, SCH-10-2179-4, SCH-10-2179-5, SCH-10-2179-8, SCH-10-2179-11, SCH-10-2179-12, SCH-10-2181-5, SCH-10-2181-7, SCH-10-2187-3, SCH-10-2187-4, SCH-10-2187-8, SCH-10-2188-5, SCH-10-2189-1), foram coletadas, às 10 horas, em plantas no estágio R2, quando a distância entre a aurícula da folha bandeira e a penúltima folha era de 6 a 8 cm. As panículas foram mantidas a 10°C por 7 dias. Em seguida, as panículas foram lavadas em água destilada por 5 minutos, posteriormente desinfestadas em álcool 70% por 1 minuto e em hipoclorito de sódio a 0,4%, por 20 minutos e enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada.

A extração das anteras da panícula foi realizada em câmara de fluxo laminar. As anteras foram transferidas para placas de petri contendo água estéril, até a transferência para o meio de cultivo. Após o plaqueamento das anteras inteiras, as culturas foram mantidas em sala escura por 90 dias a 25°C.

O meio de cultura básico utilizado para a indução e a formação de calos foi o Murashige & Skoog (1962) (MS) modificado, denominado N6 (CHU et al., 1978). As anteras foram inoculadas em três meios: M1 = N6 + 0,5 mg.L⁻¹ ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) + 2,0 mg.L⁻¹ ácido naftaleno acético (ANA) + 0,5 mg.L⁻¹ cinetina (CIN); M2 = N6 + 2,0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg.L⁻¹ ANA + 0,5 mg.L⁻¹ CIN; M3 = N6 + 4,0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 2,0 mg.L⁻¹ ANA + 0,5 mg.L⁻¹ CIN. Todos os meios foram adicionados de sacarose (50 g.L⁻¹) como fonte de

¹ Eng. Agrônomo, Dr. Fisiologia Vegetal, EPAGRI/Estação Experimental de Itajaí, CP 277, CEP 88.301-970, Itajaí, SC, (47)3341-5244; E-mail: gzaffari@epagri.sc.gov.br.

² Téc. Química, EPAGRI/Estação Experimental de Itajaí, E-mail: dilneimedeiros@epagri.sc.gov.br.

³ Eng. Agrônomo, Dr. Melhoramento, EPAGRI/Estação Experimental de Itajaí, E-mail: rubensm@epagri.sc.gov.br.

⁴ Eng. Agrônomo, Dr. Fitopatologia, EPAGRI/Estação Experimental de Itajaí, E-mail: klaus@epagri.sc.gov.br.

⁵ Eng. Agrônomo, Dr. Estatística, EPAGRI/Estação Experimental de Itajaí, E-mail: stuker@epagri.sc.gov.br.

carbano e ágar-agar (0,7%) como agente gelificante.

Os calos viáveis com tamanho ≥ 2 mm de diâmetro foram transferidos para os meios de regeneração de plântulas: MR1 = MS + 1,0 mg.L⁻¹ ANA + 1,0 mg.L⁻¹ 6- benzil aminopurina (BAP) + 1,0 mg.L⁻¹ CIN e sacarose 30 g.L⁻¹; MR2 = MS 50% + 1,0 mg.L⁻¹ ANA + 1,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg.L⁻¹ CIN e sacarose 20 g.L⁻¹. As culturas foram incubadas em sala de crescimento à temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de aproximadamente 60%, fotoperíodo de 16 horas, sob luz de intensidade de $50 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante 30 dias.

As plantas regeneradas foram transferidas para meio sólido MS e, após o desenvolvimento do sistema radicular, transplantadas para vasos plásticos contendo casca de arroz calcinada. A aclimatização das plantas consistiu de câmara úmida em sala de crescimento à temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. Após 30 dias, as plantas foram transferidas para casa de vegetação até o final do ciclo da cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resposta morfogênética para a formação de calo dos 38 genótipos F₁ da subespécie indica foi elevada (73,7%), uma vez que 28 genótipos formaram calo. Entretanto, somente 18 genótipos (47,4%) desenvolveram calos viáveis nos meios testados (Tabela 1). A maior formação de calos ocorreu no meio M1, porém o maior número de calos viáveis foi induzido no meio M2. O tempo para a indução e a formação dos calos variou de 34 a 86 dias, evidenciando uma resposta específica e dependente do genótipo e da composição do meio de cultura (Tabela 1).

A regeneração de plantas verdes e albinas ocorreu em somente seis genótipos F₁ de arroz testados (33,3 %) (Tabela 2). Porém, apenas quatro genótipos regeneraram um total de 25 plantas verdes e destes somente três genótipos produziram 19 plantas duplo-haplóides. Não houve um efeito diferenciado da composição do meio de cultura na resposta de regeneração de plantas. Entretanto, observou-se que há uma resposta genótipo-dependente, onde o meio de cultura tem um papel importante no suprimento de sinais para a diferenciação das células do calo (PETERS et al., 1999). Ao final do ciclo das plantas em casa de vegetação, das 25 plantas duplo-haplóides obtidas, somente 19 plantas produziram sementes. As plantas duplo-haplóides apresentaram diferentes graus de fertilidade: plantas férteis, plantas parcialmente férteis e plantas completamente estéreis. Resultado semelhante foi obtido por Sah e Niroula (2007) trabalhando com cultura de anteras de híbridos de *Oryza sativa* e *Oryza rufipogon*, onde das 21 plantas verdes duplo-haplóides obtidas somente seis foram parcialmente férteis. Otani et al. (2005) trabalhando com anteras de plantas transgênicas de arroz obtiveram plantas duplo-haplóides férteis com grande produção de sementes em casa de vegetação.

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam que os genótipos da subespécie *indica* apresentam menor capacidade de resposta morfogênética tanto para a formação de calo quanto para a regeneração de plantas duplo-haplóides. Porém, mesmo assim, a técnica de cultura de anteras de arroz mostrou-se viável na produção de plantas duplo-haplóides como apoio ao programa de melhoramento genético da Epagri.

Tabela 1 – Formação de calos, em meios M1, M2 e M3, a partir do cultivo *in vitro* de anteras de genótipos F1 de *Oryza sativa* L.

Genótipo	Número de calos						Tempo para formação dos calos (dias)		
	Formados			Viáveis (≥ 2 mm)			M1	M2	M3
	M1	M2	M3	M1	M2	M3			
SCH-10-2124	8	0	0	1	0	0	82	-	-
SCH-10-2138	22	15	2	4	4	1	40	65	86
SCH-10-2151	9	6	3	3	2	0	66	58	62
SCH-10-2169-5	4	2	-	0	0	-	59	86	-
SCH-10-2173-4	1	2	-	0	0	-	43	65	-
SCH-10-2173-5	4	0	-	0	0	-	44	-	-
SCH-10-2173-8	0	6	-	0	2	-	-	57	-
SCH-10-2173-12	10	4	-	1	0	-	60	65	-
SCH-10-2173-17	0	2	-	0	0	-	-	73	-
SCH-10-2175-1	0	7	-	0	3	-	-	40	-
SCH-10-2175-3	2	0	-	2	0	-	49	-	-
SCH-10-2175-5	1	0	-	0	0	-	72	-	-
SCH-10-2175-11	6	0	-	2	0	-	43	-	-
SCH-10-2175-16	21	20	-	0	1	-	65	50	-
SCH-10-2175-19	8	6	-	0	0	-	50	65	-
SCH-10-2179-1	0	1	-	0	0	-	-	63	-
SCH-10-2179-2	0	12	-	0	3	-	-	42	-
SCH-10-2179-3	0	4	-	0	2	-	-	41	-
SCH-10-2179-5	3	7	-	0	2	-	71	77	-
SCH-10-2179-8	15	12	-	0	0	-	50	60	-
SCH-10-2179-11	1	3	-	0	0	-	108	79	-
SCH-10-2179-12	4	8	-	0	1	-	43	49	-
SCH-10-2181-5	0	1	-	0	1	-	-	43	-
SCH-10-2181-7	2	1	-	0	0	-	43	73	-
SCH-10-2187-3	8	0	-	3	0	-	44	-	-
SCH-10-2187-4	5	7	-	1	4	-	49	57	-
SCH-10-2187-8	21	17	-	11	9	-	34	44	-
SCH-10-2188-5	2	2	-	0	1	-	49	55	-

Tabela 2– Regeneração de plantas duplo-haplóides a partir do cultivo *in vitro* de calos de genótipos F1 de *Oryza sativa* L., em meio MR1 e MR2 após 30 dias de cultivo.

Genótipo	Número de calos				Número de plantas verdes			
	transferidos		com regeneração de plantas		regeneradas		com sementes	
	MR1	MR2	MR1	MR2	MR1	MR2	MR1	MR2
SCH-10-2124	1	0	0	0	0	0	0	0
SCH-10-2138	4	5	1	3	0	5	0	0
SCH-10-2151	2	3	2	2	5	3	4	3
SCH-10-2175-3	2	1	1	1	1	0	1	0
SCH-10-2181-5	1	0	1	0	0	0	0	0
SCH-10-2187-3	2	1	0	1	0	0	0	0
SCH-10-2187-8	10	9	6	2	7	4	7	4

CONCLUSÃO

Os genótipos F1 da subespécie *indica* apresentam elevada resposta morfogênica para a indução e a formação de calo. A capacidade de diferenciação dos calos formados foi extremamente baixa para a regeneração de plantas. As plantas duplo-haplóides obtidas apresentam fenótipo e fertilidade semelhante aos progenitores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: **Proceeding Symposium Plant Tissue Culture**, Science Press, Peking, pp. 45-50, 1978.
- HU, H. Use of haploids in crop improvement. In: **Biotechnology in International Agricultural Research. Proc. Inter-Seminar IARC's and Biotech.** Int. 1 Rice Research Institute, College, Laguna, Philippines. Pp. 763-772. 1985.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B.; STIVAL, A.L.; BRAMMER, S.P., *et al.* Haplodiploidização: genética e melhoramento. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília : EMBRAPA/CBAB, V.2, p.569-612, 1999.
- MURASHIGE T.; SKOOG. F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15(3): 473-497, 1962.
- OTANI, M.; WAKITA, Y.; SHIMADA, T. Doubled haploid plant production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using anther culture. **Plant Biotechnology**, 22 (2): 141-143. 2005.
- PETERS, J.A.; BOBROWSKI, V.L.; ROSINHA, G.M.S. Produção de haplóides e duplo-haplóides. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília:EMBRAPA/CBAB, v.2, p.569-612, 1999.
- RAINA, S.K. Doubled haploid breeding in cereals. **Plant Breeding Reviews**, v.15, n.1, p.141-186, 1997.
- SAH, B. P.; NIROULA, R. K. Successful regeneration and characterization of anther derived rice hybrid plants from *O. sativa* L. x *O. rufipogon* Griff. **Scientific World**, v. 5, n. 5, p. 14-18. 2007.