

REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE PANÍCULAS IMATURAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)¹

Liane T. Dornelles²
José Antônio Peters³

Recebido em 16-09-91. Aceito em 18-02-93

RESUMO: Com o objetivo de verificar o potencial de regeneração direta e indireta, panículas imaturas de duas cultivares de arroz (BR IRGA 410 e 414) foram cultivadas em meio mineral de Murashige & Skoog, contendo 1mg/l e 2mg/l de 2,4-D ou 2mg/l de 2,4-D mais 0,2mg/l de K para indução de calos e 1mg/l de ANA e 4 mg/l de K para regeneração direta de gemas. Em ambos os genótipos 100% das panículas formaram calos, porém sua regeneração foi dependente do meio de formação dos calos. Na regeneração direta 100% das panículas nas duas cultivares formaram gemas, com médias de 5,8 gemas/panículas.

Abreviaturas: MS - meio básico de Murashige & Skoog; 2,4-D - ácido 2,4 diclorofenoxiacético; K - cinetina; AIA - ácido 3-indolacético; ANA - ácido - naftalenoacético;

Palavras-chave: *Oryza sativa* L.; regeneração; panículas imaturas

ABSTRACT: Aiming to observe the direct and indirect regeneration potencial, immature panicles of rice cultivars BR IRGA 410 and 414 were cultured on Murashige & Skoog's basal medium complemented with either 1mg/l or 2 mg/l 2,4-D or 2 mg/l 2,4-D or 2 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l K for callus induction and with 1 mg/l of ANA + 4 mg/l of K for direct bud regeneration. In both genotypes, 100% of the panicles developed callus, but the regeneration showed dependency on the callus forming medium. Throuh direct regeneration, 100% of the panicles from both cultivars developed buds with average of 5.8 buds/panicle. **ABREVIATION:** Murashige, and Skoog medium; 2,4-D - ácido 2,4 dochlorofenoxiacetic acid; K - Kinetin; AIA - indole - 3 - acetic acid; ANA - acido - naphthaleneacetic acid.

Key words: *Oryza sativa* L.; regeneration; immature panicles.

1 - Parte da Dissertação de Mestrado em agronomia do primeiro autor, Faculdade de Agronomia da UFPEL. Trabalho apresentado no XLII Congresso Nacional de Botânica, Goiânia,GO.

2 - Bolsista CAPES - UFPEL

3 - UFPEL/Departamento de Botânica, Campus Universitário, C.P. 345, CEP 96100 - Pelotas - RS.

Introdução

A expansão dos cultivos está levando a uma busca de alternativas viáveis para obtenção de maior variabilidade genética. A procura de genótipos e explantes específicos, capazes de produzir calos morfogenéticos e uma alta taxa de regeneração de plantas é um ponto importante para a aplicação da cultura *in vitro* na agricultura (Mikami & Kinoshita, 1988). Para estes autores a criação de novos genótipos poderá ser uma fonte valiosa de variabilidade para estudos envolvendo técnicas de seleção.

A regeneração via embriogênese ou organogênese tem sido obtida principalmente a partir da cultura de embriões e panículas imaturas. Segundo Kott *et al.* (1985), tecidos imaturos geralmente formam calos a partir de rápidas divisões das células da epiderme. Em embriões imaturos calos são formados a partir de células do escutelo e mostram um alto potencial embriogênico, provavelmente devido a sua natureza meristemática.

Entre os fatores que afetam a frequência de diferenciação dos tecidos estão em estágio de desenvolvimento, ploidia do explante e reguladores de crescimento do meio de cultura. Ling *et al.* (1983) observaram que o desenvolvimento de panículas imaturas é muito complexo e é sensivelmente influenciado pelos constituintes do meio. Chou *et al.* (1983) relataram que tecidos mais jovens de panículas imaturas apresentam melhor potencial de regeneração do que aqueles em estágio mais avançados de desenvolvimento.

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção de plantas através de regeneração direta e indireta de panículas imaturas de arroz em diferentes meios de cultura, visando sua utilização no melhoramento dessa espécie

Material e Métodos

Foram utilizadas panículas imaturas de arroz (*Oryza sativa* L.) das cultivares BR IRGA 410 e BR IRGA 414 provenientes do campo experimental do CPATB - EMBRAPA. As panículas foram selecionadas entre 55° e 65° dias após a emergência das plântulas, quando as mesmas apresentavam em torno de 5 a 15mm de comprimento.

A desinfestação do material vegetal ocorreu em duas etapas: primeiramente os colmos (10 cm) foram desinfestados com álcool 70 % por um minuto e hipoclorito de sodio (20% produto comercial) por vinte minutos, e posteriormente lavadas 4 vezes em águas destilada e esterilizada. Após as panículas imaturas foram novamente desinfestadas com hipoclorito de sódio (20% do produto comercial) por cinco minutos e lavadas 3 vezes em água destilada esterilizada.

As panículas foram colocadas em meio mineral básico MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 3% (p/v) de sacarose, 100 mg/l de mio-inositol e 6g/l de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 N antes da autoclavagem.

Para a formação de calos foram adicionados ao meio MS, 1,0 ou 2,0 mg/l de 2,4-D ou 2,0 mg/l de 2,4-D mais 0,2 mg/l de K. Após 25 a 30 dias em cultura os calos foram avaliados e transferidos para o mesmo meio básico, porém acrescido de 3,0 mg/l de K mais 0,2 mg/l de AIA para a regeneração de gemas.

Quando a finalidade era a produção direta de gemas, foram acrescentados 4,0 mg/l de K e 1,0 mg/l de ANA ao meio básico.

Os tubos de ensaio contendo os explantes para a formação de calos foram mantidos no escuro à temperatura de 25+1°C. As panículas imaturas testadas para a regeneração direta, bem como os calos repicados para o meio de formação de gemas foram incubadas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz e oito horas de escuro, à temperatura de 25+1°C no período claro e 23+1°C no período escuro e com uma intensidade luminosa de 4000 lux (lâmpadas “gro-lux” e branca-fria) por um período de 30 dias. Na regeneração indireta foram avaliados a percentagem de calos formados a partir dos explantes, a percentagem de gemas formadas e o número médio de gemas por explante.

Resultados e Conclusões

Uma alta percentagem de formação de calos foi obtida em todos os meios, nos dois genótipos utilizados (Tabela 1). Os calos formados eram bem desenvolvidos, esponjosos e com coloração cremosa (Figura 1), sendo que alguns mostravam formação de raízes. Para Bajaj & Bidani (1980) a formação dos calos e a regeneração de plantas são altamente influenciadas pelo genótipo, o que também foi confirmado por Mikami & Kinoshita (1988) os quais relataram que a proliferação de células *in vitro* pode ter diferentes determinantes genéticos de acordo com as condições fisiológicas do explante.

Tabela 1 - Percentagem de calos formados a partir de panículas imaturas de arroz, cvs. BR IRGA 414 e BR IRGA 410. Pelotas, RS, 1990.

Genótipo	Meio de Formação dos Calos	Nº de Panículas Utilizadas	Nº de Calos Formados	% de Formação de Calos
BR IRGA 414	1	20	19	95
	2	20	20	100
	3	20	20	100
BR IRGA 410	1	20	20	100
	2	20	20	100
	3	20	20	100

Meio 1: MS + 1,0 mg 2,4-D; Meio 2: MS + 2,0 mg/l 2,4-D; Meio 3: MS + 2,0 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l K.

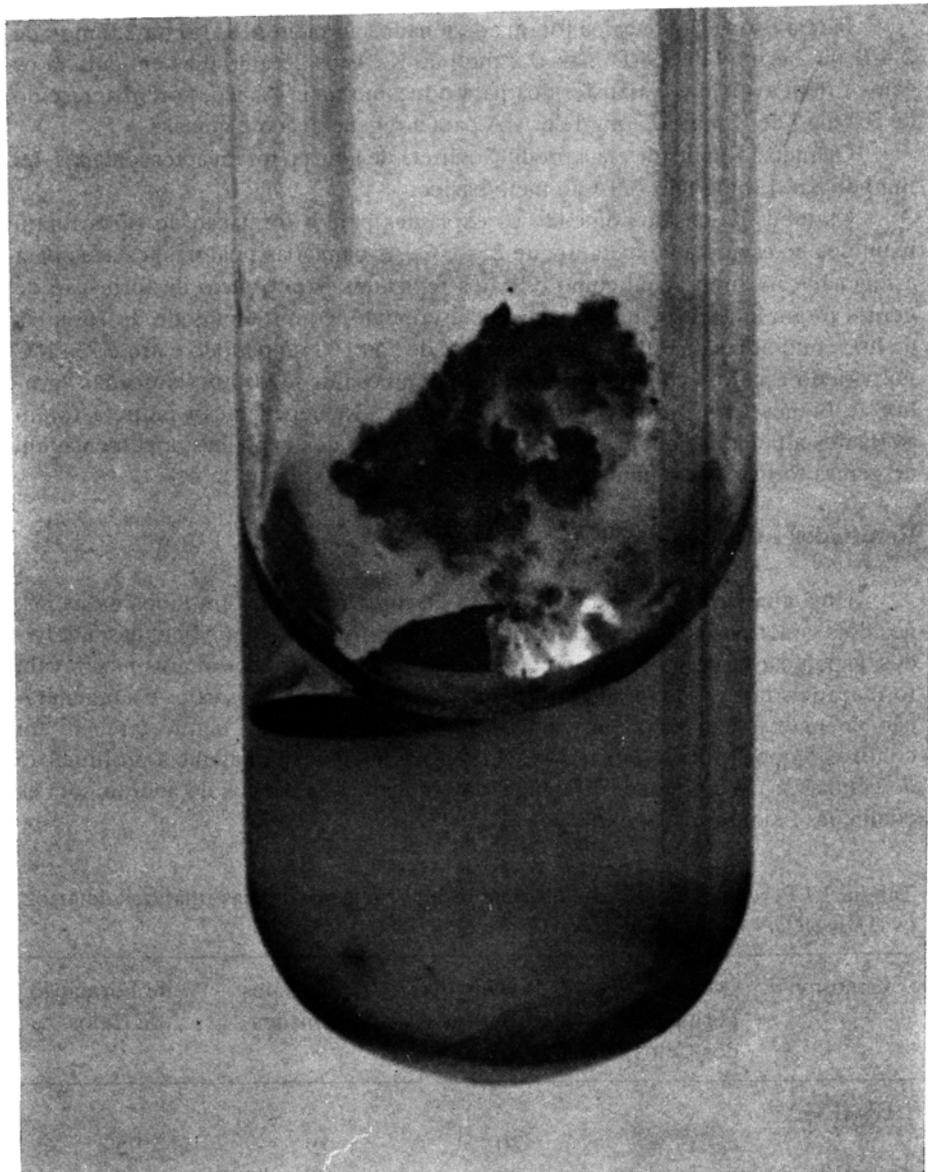


Figura 1 - Calo formado a partir de panícula imatura de arroz, cv. BR-IRGA 410, em meio contendo 2,0 mg/l de 2,4-D e 0,2 mg/l de K.

De modo contrário à formação de calos, a percentagem de regeneração de gemas foi diferente entre os genótipos utilizados e entre os meios indutores de

calos. O genótipo BR IRGA 410 (Tabela 2) mostrou-se mais eficiente na regeneração de gemas do que o BR IRGA 414 (27,4 e 6,3% em média, respectivamente). A maior percentagem de regeneração (cv BR IRGA 410) ocorreu com calos formados no meio contendo 2,0 mg/l de 2,4-D e 0,2 mg/l de K com 36,4%. Para o mesmo genótipo calos provenientes de meio com 2,0 mg/l de 2,4-D mostraram baixa capacidade de regeneração (12,3%). BRAR et al. (1985) relataram que doses de 2,0 mg/l de 2,4-D ou maiores mostraram uma alta frequência de formação de calos, porém com reduzida taxa de regeneração. As frequências de regeneração eram melhoradas quando uma citocinina era acrescida ao meio, demonstrando desta forma a influencia das citocininas na regeneração de gemas. Para o genótipo BR IRGA 414 a melhor regeneração (8,4%) foi alcançada quando os calos tiveram origem no meio com 1,0 mg/l de 2,4-D. Chou *et al.* (1983) obtiveram uma frequência de rediferenciação para panículas imaturas variando de 61,9 a 100%. Para os mesmos autores, panículas imaturas jovens (5 a 15mm) apresentaram desdiferenciação mais elevada do que aquelas em estágio mais avançado de desenvolvimento. Essa diferença no potencial de desdiferenciação desses tecidos, provavelmente deve-se a uma maior atividade metabólica dos tecidos imaturos os quais apresentam altas concentrações de fitohormônios bem como uma relação mais adequada dos mesmos.

Tabela 2 - Percentagem de regeneração, número total de gemas e número médio de gemas por calo, formadas em calos provenientes de panículas imaturas de arroz, cvs. BR IRGA 414 e BR IRGA 410. Pelotas, RS, 1990.

Genótipo	Meio de Formação do Calo	Nº de Calos Repicados c/ Gemas	% de Regeneração	Nº Total de Gemas	Nº Médio de Gemas por calo	
BR IRGA						
414	1	190	16	8,4	37	2,3
	2	168	7	4,2	13	1,9
	3	219	14	6,4	24	1,7
410	1	108	36	33,3	65	1,8
	2	154	19	12,3	32	1,7
	3	118	43	36,4	68	1,6

Meio de regeneração de calos: MS + 3,0 mg/l de K + 0,2 mg/l de AIA.

Na regeneração direta (Tabela 3) não ocorreu diferença entre os genótipos utilizados, sendo que 100% das panículas mostraram formação de gemas (Figura 2) com média de 6,3 e 5,4 de gemas por panícula nos genótipos BR IRGA 414 e BR IRGA 410, respectivamente. Já Ling *et al.* (1983) obteve uma frequência de



Figura 2 - Regeneração direta de gemas de panícula imatura de arroz, cv. BR-IRGA 410.

regeneração de 61,2 e 15,8% em meios MS e N6 (Chu *et al.*, 1975), respectivamente, utilizando ANA e K (2,0 mg/l de cada regulador de crescimento). Segundo Raina (1989) a obtenção de calos através do cultivo de inflorescências imaturas faz-se importante pois os mesmos retêm seu potencial de regeneração por longo tempo, permitindo assim a obtenção de um grande número de plantas. Muitas destas plantas podem apresentar mutações genéticas com características agrônômicas desejáveis.

Os resultados do presente trabalho, nas condições em que foi realizado permitem as seguintes conclusões.

1. A percentagem de formação de calos e gemas a partir de panículas imaturas é alta, independentemente do genótipo e do meio de cultura utilizado.

2. A capacidade de regeneração dos calos provenientes de panículas imaturas varia com o genótipo e com o meio de formação de calos. A cv. BR IRGA 410 apresenta maior eficiência na formação de gemas e o meio contendo 1,0 mg/l de 2,4-D e 02 mg/l K afetou positivamente a fase de regeneração.

Tabela 3 - Percentagem de regeneração direta, número médio de gemas por explante e número de gemas obtidas a partir de panículas imaturas de arroz, cvs BR IRGA 414 e BR IRGA 410. Pelotas, RS, 1990.

Genótipo	Nº de Panículas		% de Regeneração	Nº Total de Gemas	Nº Médio de Gemas/Panícula
	Utilizadas	com Gemas			
BR IRGA					
414	20	20	100	126	6,3
410	20	20	100	108	5,4

Meio para regeneração direta: MS + 4,0 mg/l K + 1,0 mg/l ANA.

Referências Bibliográficas

- BAJAJ, Y.P.S. & M. BIDANI. 1980. Differentiation of genetically variable plants from embryo-derived callus cultures of rice. *Phytomorphology* 30(213): 290-4
- BRAR, D.S.; D.H. LING S. YOSHIDA. 1985. Plant regeneration from somatic cell cultures of some IR varieties of rice. In: *Biotechnology in International Agricultural Research, Manila, International Rice Research Institute*, p. 169-77.
- CHOU, K. T.; K.L.GE; I.S. TSAI; C.S.YANG & H.W.YANG 1983. Callus induction and redifferentiation of different hybrid rice plant parts. In: *Cell and Tissue Culture Techniques for cereal Crop Improvement. Science Press, Beijing*, p. 207-13.
- CHU, C. C.; C.C. WANG; C.S. SUN; C. HSU; K.C. YIN & C.Y.CHU 1975.

- Establishment of an efficient medium for anther nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18:659-68.
- KOTT, L.S.; M.J. HOWART; R.L. PETERSON & K.J. KASHA 1985. Light and electron microscopy of callus initiation from haploid barley embryos. *Can. J. Bot* 63:1801-5.
- LING, D.H.; W.Y. CHEN M.F. CHEN; Z.R. MA 1983. Direct development of plantlets from immature panicles of rice in vitro. *Plant Cell Reports* 2: 172-4.
- MIKAMI, T. & T. KINOSHITA 1988. Genotypic effects on the callus formation from different explants of rice, *Oryza sativa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12: 311-4
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised formula for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-97.
- RAINA, S.K. 1989. Tissue culture in rice improvement: status and potential. *Advances in Agronomy* 42: 339-98.