

# ORGANOGENESE INDIRETA DE EXPLANTES DE ARROZ DA REGIÃO MERISTEMÁTICA DE ÁPICES CAULINARES

## INDIRECT ORGANOGENESIS OF RICE EXPLANTS FROM MERISTEMATIC REGION OF SHOOT TIPS

TAVARES, Leda F. da S.<sup>1</sup>; MAGALHÃES JR., Ariano M. de <sup>2</sup>; PETERS, José A. <sup>3</sup>

### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo melhorar a regeneração "in vitro" de plantas de arroz (cultivar BRS 7 "Taim"). Foram utilizados explantes da região meristemática de ápices caulinares. A regeneração de brotos, via organogênese indireta, foi desenvolvida em duas partes: indução de calos e posterior regeneração de brotos. Para indução de calos, utilizou-se meios de cultura compostos por sais e vitaminas de MS, acrescidos de mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>) e sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), perfazendo os seguintes tratamentos: MS; MS + 2,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D; MS + 4,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D; MS + 2,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 12mM prolina + 2,0 mg L<sup>-1</sup> caseína + 30 g L<sup>-1</sup> sorbitol + 5 mM MES. Os agentes solidificantes, também constituíram fatores experimentais, sendo utilizados Ágar (7,0 g L<sup>-1</sup>) e Fitigel (2,5 g L<sup>-1</sup>). Na etapa de regeneração de brotos, os calos obtidos foram transferidos para diferentes meios de regeneração, compostos pelos meios básicos de MS e N<sub>6</sub> conforme descrito a seguir: MS + 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; MS + 5,0 mg L<sup>-1</sup> CIN + 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; MS + 3,0 mg L<sup>-1</sup> CIN + 0,2 mg L<sup>-1</sup> ANA + 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; MS + 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA + 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; MS + 1,0 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 2,0 mg L<sup>-1</sup> caseína + 30 g L<sup>-1</sup> sorbitol + 5 mM MES + 12 mM prolina + 10 g L<sup>-1</sup> sacarose; MS + 80 g L<sup>-1</sup> sacarose; N<sub>6</sub> + 80 g L<sup>-1</sup> sacarose e N<sub>6</sub> + 30 g L<sup>-1</sup> sacarose. Os resultados mostraram que todos os tratamentos com 2,4-D formaram calos, porém somente aquele suplementado com sorbitol, prolina, caseína e MES foi capaz de regenerar plantas, regeneração esta que foi melhor na presença de Fitigel. Os tratamentos formados pelos sais e vitaminas de MS apresentaram uma regeneração superior àquela observada para o meio N<sub>6</sub>.

**Palavras-chave:** regeneração, cultura de tecidos, protocolo, *Oryza sativa* L.

**Abreviaturas:** 2,4-D: ácido 2,4 diclorofenoxiacético; ANA: ácido naftalenoacético; BAP: benzilaminopurina; CIN: cinetina; MES: ácido 2-(N-morfolino); TDZ: tiazurone.

### INTRODUÇÃO

O melhoramento genético visa a modificação de construções gênicas das plantas para torná-las mais úteis ao homem, tendo como principal meta a elevação do valor econômico das espécies. Dentre algumas características frequentemente modificadas estão a produtividade, resistência à doenças e qualidade nutricional (BORÉM, 1997). Para alcançar tais objetivos, os melhoristas têm contado com o auxílio de algumas ferramentas valiosas no processo de

evolução das plantas, como a seleção, a recombinação e as mutações (BORÉM & MILACH, 1999), além da utilização de plantas transgênicas. A cultura de tecidos vegetais, utilizando distintos processos de manipulação *in vitro*, abriu novos caminhos com eficientes técnicas de auxílio ao melhoramento genético convencional (MAGALHÃES JR. et al., 1998). As principais aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas ocorrem na conservação de germoplasma, no aumento da variabilidade genética para fins de seleção, incluindo-se a transformação genética, na introgressão de genes de interesse para espécies alvo e na aceleração de programas de melhoramento (FERREIRA et al., 1998).

A frequência de regeneração de plantas "in vitro" é dependente dos genótipos utilizados, bem como da sua interação com as condições de cultivo (OZAWA et al., 2003). A cultura de tecidos pode ser iniciada pela utilização de diferentes tipos de explantes. No entanto, a regeneração *in vitro* é mais facilmente induzida em alguns órgãos do que em outros. Admite-se que estas diferentes expressões morfogênicas reflitam a natureza e o grau de diferenciação dos tecidos (KERBAUY, 1999). Neste contexto, órgãos imaturos apresentem melhor capacidade regenerativa, entretanto, possuem o inconveniente de estarem disponíveis apenas em um curto período de tempo.

O principal fator que limita o uso das técnicas de cultivo "in vitro" em arroz é a etapa de regeneração, necessitando de profundos estudos para aprimorar a eficiência do processo (MAGALHÃES JR. et al., 1998). Nos últimos anos, iniciou-se a utilização de explantes da região basal e meristemática de ápices caulinares, obtidos a partir de sementes recém germinadas de arroz, contendo gemas axilares (CHRISTOU & FORD, 1995). Estes, além de possuírem elevada estabilidade genética (GRECO et al., 1990), aliam o elevado potencial de regeneração dos órgãos imaturos, com a facilidade de obtenção em qualquer época do ano. TAKEUCHI et al. (2000), avaliando a influência de mapeamento de QTLs através da técnica de RFLP na regeneração "in vitro" utilizaram calos originados de sementes maduras de arroz.

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo aprimorar protocolos de regeneração, testando diferentes meios de cultura, reguladores de crescimento e agentes solidificantes, via organogênese indireta de explantes de arroz provenientes da região meristemática de ápices caulinares de sementes maduras.

<sup>1</sup> Engº Agrº, Mestre, FAEM-UFPEL, Cx. Postal 354, Cep. 96010-900, Pelotas (RS). ledatavares@terra.com.br

<sup>2</sup> Engº Agrº, Pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Cx. Postal 403, Cep. 96001-970, Pelotas (RS). ariano@cpact.embrapa.br

<sup>3</sup> Engº Agrº, Doutor, Prof. FAEM-UFPEL, Cx. Postal 354, Cep. 96010-900, Pelotas (RS). peters@ufpel.tche.br

(Recebido para Publicação em 13/06/2003, Aprovado em 28/04/2004)

## MATERIAL E MÉTODOS

Como material botânico, utilizou-se sementes da cultivar de arroz irrigado, BRS 7 "Taim", obtidas na Embrapa Clima Temperado - Estação Experimental Terras Baixas.

Para desinfestação das sementes, previamente descascadas, utilizou-se álcool 70%, durante 3 minutos, solução de hipoclorito de sódio 40% (produto comercial) por 40 minutos, seguido de 3 lavagens em água destilada estéril e, por fim, solução de cloreto de mercúrio 0,6% durante um minuto, seguido por 4 lavagens em água destilada estéril. Após, as sementes foram inoculadas para germinação, e mantidas no escuro, à temperatura de  $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 3 a 4 dias. Para germinação das sementes, utilizou-se frascos com algodão embebido em meio de cultura composto pelos sais e vitaminas de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) complementado com mio-inositol  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , sacarose  $10 \text{ g L}^{-1}$  e  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  ANA.

Após a germinação das sementes, as plântulas foram seccionadas, o coleótilo eliminado e foram retirados os explantes da base do tecido meristemático, com 0,3 a 0,5 cm de comprimento. Sete a dez dias após a inoculação em meio de cultura, os explantes apresentaram desenvolvimento de parte aérea, a qual foi eliminada para ao redor de 1/3, deixando o explante com, aproximadamente, 0,5 a 1,0 cm.

A regeneração de brotos, via organogênese indireta, foi desenvolvida em duas partes consecutivas, indução de calos e posterior regeneração de brotos. Para indução de calos, utilizou-se meios de cultura compostos por sais e vitaminas de MS, acrescidos de mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), perfazendo os seguintes tratamentos:

- 1- MS
- 2- MS +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D
- 3- MS +  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D
- 4- MS +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $12 \text{ mM}$  prolina +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  caseína +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sorbitol +  $5 \text{ mM}$  MES

Os agentes solidificantes também constituíram um fator experimental, com dois tratamentos: Ágar ( $7,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e Fitagel ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ). Para indução de calos, os explantes foram mantidos no escuro a uma temperatura de  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Para determinar o melhor meio de indução de calos, avaliou-se a porcentagem de regeneração, através da relação entre o número de calos inoculados e o número de explantes regenerados. Calos com 20 a 25 dias, provenientes dos diferentes meios de cultura foram transferidos para um único meio de regeneração. Este, foi formado pelos sais e vitaminas de MS acrescido de  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) e ágar ( $7,0 \text{ g L}^{-1}$ ).

Esta etapa foi conduzida em um esquema fatorial, com o fator experimental meios de cultura em quatro níveis e o agente solidificante em dois níveis, totalizando oito tratamentos.

Na etapa de regeneração de brotos, calos obtidos no tratamento 4, solidificado com fitagel, foram transferidos para diferentes meios de regeneração de brotos, composto pelos meios básicos de MS e  $\text{N}_6$  (CHU et al., 1975) conforme descrito a seguir:

- MS +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sacarose;
- MS +  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  CIN +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sacarose;
- MS +  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  CIN +  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sacarose;
- MS +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sacarose;

MS +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ +  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  caseína +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sorbitol +  $5 \text{ mM}$  MES +  $12 \text{ mM}$  prolina +  $10 \text{ g L}^{-1}$  sacarose;

MS +  $80 \text{ g L}^{-1}$  sacarose;

$\text{N}_6$  +  $80 \text{ g L}^{-1}$  sacarose;

$\text{N}_6$  +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sacarose.

Todos estes meios de regeneração foram solidificados com ágar ( $7,0 \text{ g L}^{-1}$ ) tiveram o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada durante 20 minutos, a  $120^{\circ}\text{C}$  e 1,5 atm de pressão. Esta etapa de regeneração de gemas foi conduzida no esquema unifatorial, no qual oito meios de cultura formaram os tratamentos. Para a avaliação dos meios de regeneração de brotos, verificou-se a relação entre o número de calos inoculados e o número de explantes regenerados.

A regeneração de brotos foi conduzida em câmara de crescimento sob densidade de fluxo de  $31,41 \text{ w m}^{-2}$ , temperatura de  $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante o período de luz (16 horas) e  $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante o escuro.

A eficiência final do processo de regeneração foi avaliada através da relação entre o número total de brotos obtidos e o número de explantes inicialmente inoculados. Este parâmetro considera, indiretamente, a % de regeneração e o número médio de brotos por explante. Não foi realizada análise estatística para avaliar esta variável, visto que, como se trabalhou com os valores totais, não havia repetições.

Após a regeneração dos explantes, os brotos foram transferidos para meio de enraizamento, composto pelo meio básico MS acrescido de  $60 \text{ g L}^{-1}$  sacarose,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  mio-inositol e  $7,0 \text{ g L}^{-1}$  ágar. As plantas desenvolvidas foram aclimatadas, inicialmente em tubos de ensaio contendo água destilada e posteriormente transferidas para vasos, em casa-de-vegetação.

Todos os experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado. Realizou-se seis repetições (frasco) de cada tratamento, com 5 explantes/frasco, totalizando 30 explantes/tratamento. Os experimentos foram analisados pelo programa estatístico SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984), utilizando o teste de Tukey para comparação de médias.

Os dados de porcentagem de formação de calos e de regeneração de brotos foram transformados segundo o arco seno da raiz quadrada de  $(x/100)$ , onde "x" significa o valor percentual obtido para cada variável. Os dados relativos ao número médio de brotos por explante foram transformados segundo a raiz quadrada de  $(x + 0,5)$ , onde "x" são os valores observados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fase indução de calos observou-se, para todos os tratamentos, a formação dos mesmos a partir do 10º dia de cultivo, sendo que mais de 60% destes apresentavam-se como potencialmente embriogênicos. Esta classificação morfológica encontra-se de acordo com a realizada por RUEB et al. (1994).

Analisando-se a formação de calos (Tabela 1 e Figura 1), observa-se que houve diferença estatística significativa somente no fator experimental meio de cultura, onde o tratamento 1, sem 2,4-D, não apresentou formação de calo em ambos os agentes solidificantes. A presença deste regulador de crescimento é indispensável para a formação de calos

(MITSUOKA et al., 1994). Segundo MAHERSWARAM & SREE-RANGASAMY (1989), o nível ótimo do regulador de crescimento 2,4-D para formação de calos, a partir de sementes de arroz, é de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Não foi verificada diferença estatística significativa para o fator de tratamento agente solidificante, bem como para a interação entre os dois fatores.

Tabela 1 - Análise de variação da Porcentagem de formação de calos (fase de indução de calos), Pelotas-RS, 1999.

Causas de variação	GL	Quadrado Médio
Meio de cultura	3	21213,4803 <sup>***</sup>
Agente solidificante	1	13,3181 <sup>ns</sup>
Meio de cultura * agente sol.	3	84,3479 <sup>ns</sup>
Resíduo	40	55,9359
Média geral		64,225
CV (%)		11,645

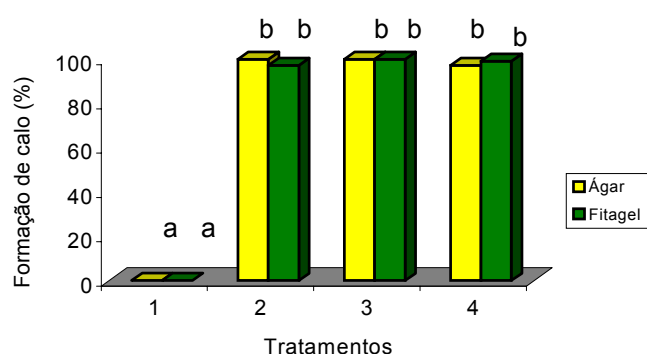


Figura 1 - Porcentagem de formação de calo, cv. BRS 7 "Taim". 1- MS; 2- MS +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D; 3- MS +  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D; 4- MS +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D + 12 mM prolina +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  caseína +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sorbitol + 5 mM MES.

A fim de determinar o efeito do meio de indução na taxa de regeneração de brotos, calos oriundos dos tratamentos 2, 3 e 4 foram transferidos para um único meio de regeneração. Excluiu-se o tratamento 1 porque neste, não houve formação de calos.

De acordo com os resultados obtidos, somente o fator experimental meio de cultura mostrou diferenças estatísticas (Tabela 2). Observou-se que somente aqueles calos provenientes do tratamento 4, contendo  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D enriquecido com prolina, caseína, MES e sorbitol regeneraram brotos (Figura 2). Segundo a análise estatística realizada, não foi observada diferença estatística significativa para o fator de tratamento agente solidificante, bem como para a interação entre os dois fatores. Apesar disso, verificou-se uma regeneração um pouco superior (24,19%) quando se utilizou o agente solidificante fitigel.

Apesar de não ter diferido significativamente com relação à porcentagem de regeneração, o agente solidificante fitigel foi considerado superior ao ágar, uma vez que a formação de calos embriogênicos, que regeneram brotos, foi de 70% quando se utilizou o agente solidificante fitigel e, ficou reduzida para 52% quando o meio de cultura foi solidificado com ágar (Figura 3). Não foi realizada análise estatística desta

variável, visto que a mesma está relacionada com a % regeneração, a qual já foi analisada. Este resultado concorda com aquele encontrado por PÁDUA (1997) em que o fitigel causou 14% de redução no índice de oxidação dos calos e um incremento de 20% na quantidade de calos embriogênicos.

Tabela 2 - Análise de variação da Porcentagem de regeneração (fase de indução de calos), Pelotas-RS, 1999.

Causas de variação	GL	Quadrado Médio
Meio de cultura	2	1482,4228 <sup>***</sup>
Agente solidificante	1	56,4903 <sup>ns</sup>
Meio de cultura * agente sol.	2	56,4902 <sup>ns</sup>
Resíduo	18	155,1208
Média geral		9,140
CV (%)		136,259

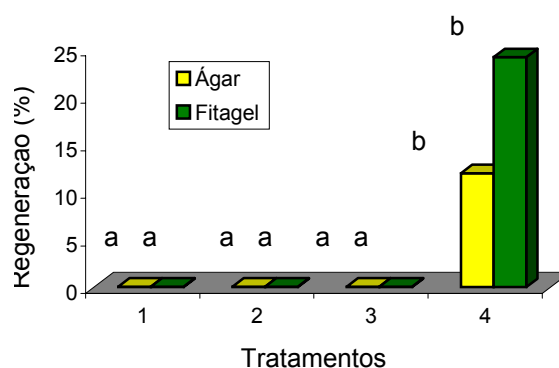


Figura 2 - Porcentagem de regeneração de calos oriundos dos distintos meios, cv. BRS 7 "Taim", regenerados em um único meio de cultura. Tratamentos: 2- MS +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D; 3- MS +  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D; 4- MS +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D + 12 mM prolina +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  caseína +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sorbitol + 5 mM MES.

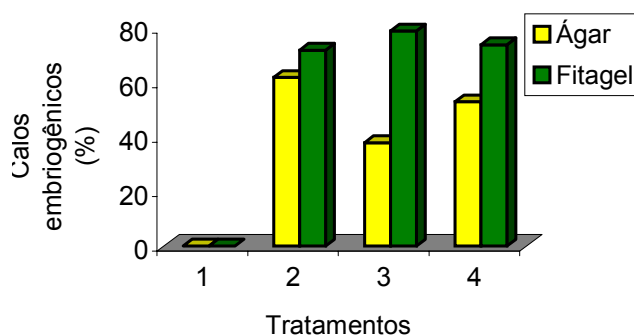


Figura 3 - Porcentagem de calos embriogênicos oriundos dos distintos meios, cv. BRS 7 "Taim", regenerados em um único meio de cultura. Tratamentos: 2- MS +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D; 3- MS +  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D; 4- MS +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D + 12 mM prolina +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  caseína +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sorbitol + 5 mM MES.

A segunda etapa deste experimento foi desenvolvida a partir de um único meio de indução de calos com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D e enriquecido com prolina, caseína, MES e sorbitol e

solidificado com fitigel. Este foi o meio de cultura que apresentou melhores resultados na etapa de indução de calos. Cerca de 15 a 20 dias após a transferência para meio de regeneração, os calos apresentavam pontos esverdeados, iniciando a formação dos brotos.

Os resultados de regeneração de brotos (Tabela 3 e Figura 4) não apresentaram tratamentos com diferenças estatísticas significativas. Contudo, encontrou-se bons resultados nos tratamentos 2 e 3, ambos enriquecidos com os reguladores de crescimento ANA e CIN. Segundo DORNELLES & PETERS (1993), houve 100% de regeneração de plantas quando se utilizou estes reguladores de crescimento.

Tabela 3 - Análise de variação da Porcentagem de regeneração a partir de um único meio de indução (fase de regeneração), Pelotas-RS, 1999.

Causas de variação	GL	Quadrado Médio
Meio de cultura	7	399,43 <sup>HS</sup>
Resíduo	40	161,91
Média geral	19,98	
CV (%)	63,67	

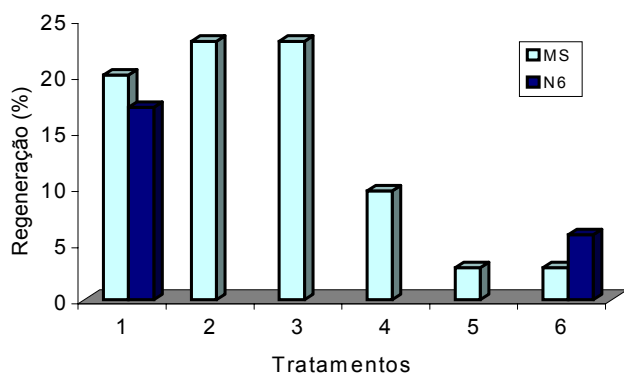


Figura 4 - Porcentagem de regeneração de calos induzidos no meio MS + 2,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D enriquecido com 12 mM prolina + 2,0 mg L<sup>-1</sup> caseína + 30 g L<sup>-1</sup> sorbitol + 5 mM MES, cv. BRS 7 "Taim". Tratamentos: 1- 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; 2- 5,0 mg L<sup>-1</sup> CIN + 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; 3- 3,0 mg L<sup>-1</sup> CIN + 0,2 mg L<sup>-1</sup> ANA + 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; 4- 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA + 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; 5- 1,0 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 2,0 mg L<sup>-1</sup> caseína + 30 g L<sup>-1</sup> sorbitol + 5 mM MES + 12 mM prolina + 10 g L<sup>-1</sup> sacarose; 6- 80 g L<sup>-1</sup> sacarose.

Por outro lado, os tratamentos 5 e 6 ocasionaram as mais baixas regenerações. A ausência de reguladores de crescimento, associado à alta concentração de sacarose (tratamento 6) e as concentrações dos reguladores de crescimento TDZ e ANA (1,0 mg L<sup>-1</sup> e 0,1 mg L<sup>-1</sup>, tratamento 5) devem ter afetado negativamente a regeneração. AL KHAYRI et al. (1996) não encontraram respostas à regeneração com esta concentração de ANA em alguns genótipos de arroz.

Em cultura de tecidos, dois parâmetros de regeneração de plantas são particularmente importantes, a frequência de indução de calos e eficiência de regeneração a partir destes calos (PENG & HODGES, 1989). Segundo estes mesmos autores, uma boa taxa de regeneração pode ser alcançada

com uma alta frequência de regeneração de plantas ou por um elevado número de plantas/explante ou por ambos. Entretanto, RUEB et al., (1994) consideraram como melhor meio de indução de calos aquele que apresentou um maior número de brotações/explante, mesmo que este não tenha demonstrado elevada porcentagem de regeneração.

Quanto ao número de brotos/calor regenerante (Tabela 4 e 5), observaram-se diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

Tabela 4 - Análise de variação do Número médio de brotos por explante (fase de regeneração), Pelotas-RS, 1999.

Causas de variação	GL	Quadrado Médio
Meio de cultura	7	4,653
Resíduo	24	1,633
Média geral	3,34	
CV (%)	38,176	

No tratamento 6 (MS + 80 g L<sup>-1</sup> sacarose) atingiu-se 46,39 brotos/calor. Este, por outro lado, foi o meio de cultura no qual obteve-se a mais baixa regeneração. No meio de cultura N<sub>6</sub>, similarmente, obteve-se maior número de brotos/calor no meio com 80 g L<sup>-1</sup> sacarose. Da mesma forma, ao analisar-se a eficiência final de regeneração, os tratamentos 2, 3 e 6 apresentaram valores similares. Por outro lado, o tratamento 5, induziu a mais baixa eficiência. De qualquer maneira, em média, os tratamentos formados pelos sais e vitaminas de MS apresentaram uma regeneração superior àquela observada para o meio N<sub>6</sub>. Segundo MAHERSWARAM & SREERANGASAMY (1989), para as mesmas concentrações de regulador de crescimento, o meio MS apresentou maiores frequências de regeneração de plantas quando comparado ao meio N<sub>6</sub>. As diferenças entre estes dois meios de cultura estão relacionadas à fonte de nitrogênio, a elevada concentração do íon fosfato em N<sub>6</sub>, bem como a ausência de cobalto e molibdênio.

Tabela 5 - Número médio de brotos/explante e eficiência de regeneração, cv. BRS 7 "Taim".

Tratamentos <sup>1</sup>	Nº brotos/explante	Eficiência
1	7,85 b	2,03
2	8,51 b	3,13
3	9,94 b	3,13
4	9,98 ab	1,46
5	2,68 b	0,20
6	46,39 a	3,10
7	15,49 ab	1,60
8	10,12 ab	2,26

<sup>1</sup>Tratamentos: 1- MS; 2- MS + 5,0 mg L<sup>-1</sup> CIN + 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA; 3- MS + 3,0 mg L<sup>-1</sup> CIN + 0,2 mg L<sup>-1</sup> ANA; 4- MS + 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA; 5- MS + 1,0 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 2,0 mg L<sup>-1</sup> caseína + 30 g L<sup>-1</sup> sorbitol + 5 mM MES + 12 mM prolina; 6- MS + 80 g L<sup>-1</sup> sacarose; 7- N<sub>6</sub> + 80 g L<sup>-1</sup> sacarose; 8- N<sub>6</sub>.

<sup>2</sup> Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem pelo teste de Tukey P<0,05

## CONCLUSÕES

A presença de 2,4-D é fator fundamental para indução de calos, porém somente aquele meio de cultivo suplementado com sorbitol, prolina, caseína e MES foi capaz de regenerar plantas, regeneração esta melhorada com a presença do

agente solidificante Fitagel. Para regeneração de brotos, os tratamentos contendo os reguladores de crescimento BAP e CIN tenderam a apresentar os melhores resultados.

#### ABSTRACT

This work aimed at enhancing the "in vitro" regeneration of rice plants (cultivar BRS 7 "Taim"). Explants from meristematic region of shoot tips were utilized. Shoot regeneration, by indirect organogenesis, was developed in two phases: callus induction and shoot regeneration. For callus induction salts and vitamins of MS media plus inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) and sucrose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) were used in the following treatments: MS; MS +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D; MS +  $4.0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D; MS +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $12 \text{ mM}$  prolin +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  casein +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sorbitol +  $5 \text{ mM}$  MES. Solidifying agents also constituted experimental factors, being used Agar ( $7.0 \text{ g L}^{-1}$ ) and Phytigel ( $2.5 \text{ g L}^{-1}$ ). For shoot regeneration, calli obtained were transferred to different media based on the MS and  $N_6$  (Chu et al., 1975) according to the following: MS +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sucrose; MS +  $5.0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN +  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sucrose; MS +  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN +  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sucrose; MS +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sucrose; MS +  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ +  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  casein +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sorbitol +  $5 \text{ mM}$  MES +  $12 \text{ mM}$  proline +  $10 \text{ g L}^{-1}$  sucrose; MS +  $80 \text{ g L}^{-1}$  sucrose;  $N_6$  +  $80 \text{ g L}^{-1}$  sucrose and  $N_6$  +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sucrose. The results showed that all treatments with 2,4-D formed calli, but only that supplemented with sorbitol, proline, casein and MES was capable of regenerating plants, which was better with Phytigel. The treatments formed with MS' salts and vitamins presented a superior shoot regeneration to that observed for the  $N_6$  medium.

Key words: regeneration, tissue culture, protocol, *Oryza sativa* L

#### REFERÊNCIAS

- AL-KHAYRI, J.M.; SHAMBLIN, C.E.; McNEW, R.W.; et al. Callus induction and plant regeneration of U.S. rice genotypes as effected by medium constituents. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, New York, v.32, p. 227-232, 1996.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa:UFV, 1997. 547p.
- BORÉM, A.; MILACH, S.C.K. Melhoramento de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. KL3 Comunicação. n.7, p.68-72, 1999.
- CHRISTOU, P. & FORD, T.L. Recovery of chimeric rice plants from dry seed using electric discharge particle acceleration. **Annals of Botany**, London, v.75, p. 449-454, 1995.
- CHU, C.C.; WANG, C.S.; SUN, C.C.; et al.. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experimentation on nitrogen sources. **Scientia Sinica**, Peking, v.18, n.5, p. 659-668, 1975.
- GRECO, B.; LOMANACO, A.; BOGGINI, B.; et al.. Clonal propagation of rice through proliferation of axillary shottos. **Euphytica**, Wageningen, v.48, p. 12-127, 1990.
- KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, v.2, p. 519-531, 1999.
- MAGALHÃES, JR., A.M. de; TERRES, A.L.; FAGUNDES, P.R.R.; et al.. Cultura de anteras no melhoramento genético de arroz irrigado. **Agropecuária Clima Temperado**, Pelotas, v.2, p. 183-191, 1998.
- MAHESWARN, M.; SREE RANGASAMY, S.R. Influence of genotypes and culture media on callus induction and plant regeneration in *Oryza* species. **Journal of Genetics and Breeding**, Roma, v.43, p. 165-170, 1989.
- MITSUOKA, K.; HONDA, H.; XING, X.H.; et al.. Effect of intracellular 2,4-D concentration on plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa*, L.) callus. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.42, p. 364-366, 1994.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-479, 1962.
- OZAWA, K.; KAWAHIGASHI, H.; KAYANO, T. et al.. Enhancement of regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) calli by interation of the geneinvolved in regeneration ability of the callus. **Plant Science**, Oxford, v. 165, p. 395-402, 2003.
- PÁDUA, V.L.M de. **Regeneração in vitro e transformação genética de arroz (*Oryza sativa* L.) por eletroporação de tecidos intactos**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997. 91p. Tese (doutorado) - Ciências Biológicas (Genética).
- PENG, J. & HODGES, T.K. Genetic analysis of plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 25, n.1, p. 91-94, 1989.
- RUEB, S.; LENEMEN, M.; SCHILPEROORT, R.A.; et al.. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague-Holanda, v.36, p. 259-264, 1994.
- TAKEUCHI, Y.; ABE, T.; SASAHARA, T. RFLP mapping of QTLs influencing shoots regeneration from mature seed-derived calli in rice. **Crop Science**, Madison, v.40, 245-247, 2000.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST: Sistema de análise estatística para computador**. Regitrado na Secretaria Especial de Informática (SEI), sob nº 066-060 – categoria A, Pelotas, 1984.