

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Dissertação

Avaliação de genótipos e cruzamentos de arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à resposta a cultura de anteras e estresse por ferro

Tatiane Medeiros Souza

Pelotas, 2011

Tatiane Medeiros Souza

Avaliação de genótipos e cruzamentos de arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à resposta a cultura de anteras e estresse por ferro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientador: PhD. Antonio Costa de Oliveira – FAEM/UFPel

Co-orientadores: Dr. José Antônio Peters – Departamento de Botânica/UFPel

Dr. César Rombaldi - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial/UFPel.

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

S729a Souza, Tatiane Medeiros

Avaliação de genótipos e cruzamentos de arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à resposta a cultura de anteras e estresse por ferro / Tatiane Medeiros Souza; orientador Antonio Costa de Oliveira; co-orientadores José Antonio Peters e César Rombaldi - Pelotas, 2011.- 80f. : il.- Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1. Arroz 2. Cultura de anteras 3.Toxidez de ferro 4. Duplo-haplóides I.Oliveira, Antonio Costa de (orientador) II. Título.

CDD 633.18

Banca Examinadora:

Dr. Antônio Costa de Oliveira – FAEM/UFPeI (presidente)

Dr. José Antônio Peters – Departamento de Botânica/UFPeI

Dra. Vera Lúcia Bobrowski – Departamento de Zoologia e Genética/UFPeI

Dra. Simone Neumann Wendt - Universidade Tecnológica Federal do Paraná/UTFPR

*Aos meus pais Bromero e Maria do Carmo,
Aos meus irmãos Diego e Matheus
Dedico*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, pela constante proteção e por mais esta graça concedida.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de realizar o Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitomelhoramento.

Ao professor Antonio Costa de Oliveira, pela orientação, ensinamentos concedidos e principalmente pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Professor José Antonio Peters, pela co-orientação, paciência, dedicação, conselhos e pela amizade.

Ao Pesquisador Ariano Martins de Magalhães pelas conversas e ensinamentos, assim como pelo espaço disponibilizado na Embrapa para um dos experimentos realizados neste trabalho.

Aos funcionários da Embrapa Clima Temperado – Estação Terras Baixas, Ailton e Paulo Tim.

Ao Professor Fernando I. F. de Carvalho, pelos ensinamentos.

Ao Professor Luciano Carlos da Maia, pelos ensinamentos.

Ao Professor Enrique Moliterno, pelas aulas de inglês no CGF. Essas aulas ficarão na memória, pois, além do aprendizado, tivemos muitos momentos de descontração e risos juntamente com as colegas Adri e Fabi.

A Professora Denise Colares, pelos ensinamentos como também pelas divertidas horas de coletas de arroz que renderam muitas conversas e algumas histórias para contar.

A amiga Simone Neumann Wendt pela amizade e ajuda nesse trabalho.

A amiga Taciane Finatto, pelas infinitas conversas, desabafos, trocas de idéias, pelos momentos alegres e aqueles nem tanto. Enfim, agradeço pela grande amizade.

As estagiárias e amigas do CGF Fran e Pati pelo companheirismo e ajuda na realização deste trabalho.

Aos colegas do Centro de Genômica e Fitomelhoramento Sydney, Glacy, Lara, Murilo, Adriana, Renata, Naciele, Claudete, Camila, Gabriela, Viviane, Carla, Maraisa, Rafael, Henrique, Laerte, Dani, Daniel, Thais, Elisane, Leomar, Solange, Diego, Luiz Felipe, Fernando, Juliana, Éder, Ederson, Cristiano, Savana e Felipe.

Aos ex-colegas Guilherme, Itamara, Juliana, Gustavo, Clauber e Fabiana.

Aos colegas e aos Professores Valmor e Eugênia do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas que me acolheram com muita simpatia.

As amigas Elizete, Raquel, Cristina e ao amigo Renan, do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pela amizade.

A minhas amigas queridas Vavá, Lari, Poty, Carla, Deise, Michele, Mirele, Marcinha, Débora, Francine e Luiza que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e fazendo dos momentos de descontração serem sempre muito divertidos.

A minha mãe querida, primeiramente por ter me concebido. Pelo seu amor e dedicação em todos os momentos da minha vida. Pela educação que me proporcionou, sempre me ensinado os verdadeiros valores da vida e pela força nos momentos difíceis.

Ao meu pai, que mesmo a distância sempre me apoia e acredita no meu futuro. A todas as lições e aprendizados.

Aos meus irmãos e familiares, em especial a minha Vó Maria, pelos ensinamentos e lições de vida que levarei comigo para sempre.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Resumo

SOUZA, TATIANE MEDEIROS. **Avaliação de genótipos e cruzamentos de arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à resposta a cultura de anteras e estresse por ferro.** 2011. 80f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A cultura de anteras de arroz é uma técnica utilizada para a obtenção de plantas haplóides. Esta técnica tem grande utilidade no melhoramento de plantas, pois possibilita a obtenção de plantas totalmente homocigotas em apenas uma geração. Desta forma, características importantes e de caráter recessivo são manifestadas sem a necessidade de conduzir uma população a várias gerações de autofecundação. O arroz, cereal de grande importância econômica e social, apresenta em condições de alagamento, toxidez ao ferro. Este estresse pode ocasionar elevadas perdas na produtividade de uma lavoura de arroz. Através de cruzamentos entre genótipos contrastantes a tolerância ao ferro e com a obtenção de uma população duplo-haplóide será possível estudar os mecanismos que envolvem a toxidez do ferro em plantas de arroz. O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de uma população duplo-haplóides de arroz a partir da geração F_1 e F_2 , obtida do cruzamento entre os genótipos Nipponbare x BRS Atalanta e BRS Firmeza x Epagri 107. Foram testados três meios de cultura: N_6 (2,4 – D, Picloran e Cinetina) NL (2,4 – D, Picloran e Cinetina) e NL (ANA e Cinetina). Foram realizados três experimentos. O primeiro testando os três meios de cultura em Nipponbare x BRS Atalanta e BRS Firmeza x EPAGRI 107. No segundo, a resposta a cultura de anteras com os genótipos Nipponbare e BRS Atalanta no meio de regeneração NL (ANA e Cinetina). O terceiro experimento utilizou somente o cruzamento Nipponbare x BRS Atalanta com o meio de cultura NL (ANA e Cinetina). Foi realizado também o estudo sobre a influência de diferentes fontes e concentrações de ferro em meio de cultura *in vitro* para o cultivo do arroz. As fontes utilizadas foram EDTA férrico e sulfato férrico nas concentrações de 0,9 mM, 4,5 mM e 9,0 mM. Os resultados obtidos na obtenção de plantas duplo-haplóides foram mais expressivos no primeiro experimento com o meio de cultura 1, onde a regeneração de plantas verdes teve uma taxa de eficiência de 0,11%. A indução de calos e regeneração de plantas verdes e albinas foi maior entre o cruzamento Nipponbare x BRS Atalanta. As fontes e concentrações de ferro testadas nas cultivares Nipponbare e BRS Atalanta apresentaram diferenças significativas para genótipo em todas as variáveis analisadas, sendo a variável comprimento de parte aérea a que mais obteve diferenças significativas.

Palavras-chaves: arroz, cultura de anteras, toxidez de ferro, duplo-haplóides.

Abstract

SOUZA, TATIANE MEDEIROS. **Evaluation of genotypes and crosses of rice (*Oryza sativa* L.) as the response to anther culture and iron stress.** 2011. 80f. Essay - Graduate Program in Agronomy. Federal University of Pelotas, Pelotas.

The anther culture of rice is a technique used to obtain haploid plants. This technique is useful in plant breeding because it enables breeders to obtain fully homozygous plants in one generation. Thus, important and recessive features are expressed without the need to conduct a population through several generations of selfing. Rice, cereal of great economic and social importance, when under flooding conditions may face iron toxicity. That can cause high losses in the rice crop productivity. Through crosses between genotypes with contrasting tolerance to iron and to obtain a double haploid population, it is possible to study the mechanisms involved in the toxicity of iron to rice plants. The objective of this work was to develop a double-haploid population of rice from the F1 and F2 generations from the cross between genotypes Nipponbare x BRS Atalanta and BRS Firmeza x Epagri 107. Three different culture media: N6 (2.4 – D, Kinetin and Picloran), NL (2.4 – D, Picloran and Kinetin) and NL (NAA and Kinetin) were tested. Three experiments were conducted. The first testing the three culture media in Nipponbare x BRS Atalanta and BRS Firmeza x EPAGRI 107. In the second, the response to anther culture with genotypes Nipponbare and BRS Atalanta on regeneration medium NL (NAA and Kinetin). The third experiment consisted of F1 of the cross Nipponbare x BRS Atalanta with the culture medium NL (NAA and Kinetin). The study focused on the influence of different sources and concentrations of iron in culture medium for in vitro cultivation of rice. The sources used were ferric EDTA and ferric sulphate in concentrations of 0.9 mM, 4.5 mM and 9.0 mM. The results obtained in double-haploid plants were more expressive in the first experiment with the 1 culture medium, where the regeneration of green plants had an efficiency rate of 0,11%. The callus induction and regeneration of green plants and albino was greater in the cross Nipponbare x BRS Atalanta. The sources and concentrations of iron tested cultivars Nipponbare and BRS Atalanta genotype showed significant differences in all variables, being the variable shoot length the one presenting the most significant differences.

Keywords: rice, anther culture, iron toxicity, double-haploid.

Lista de Figuras

Capítulo I – Revisão Bibliográfica

- Figura 1 Segregação de genótipos e fenótipos em populações F₂ e duplo-haplóides, a partir de uma planta heterozigota para os genes de recombinação independente.....23

Capítulo II – Resposta diferencial ao ferro de duas cultivares de arroz *in vitro*

- Figura 1 Comparação de médias da variável comprimento de parte aérea das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro.....45
- Figura 2 Comparação de médias da variável comprimento raiz das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro.45
- Figura 3 Comparação de médias da variável número de folhas das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro.....46
- Figura 4 Comparação de médias da variável massa fresca de parte aérea das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro.....46

Figura 5	Comparação de médias da variável massa fresca de raiz das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro.....	47
Figura 6	Comparação de médias da variável massa seca de parte aérea das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro.....	47
Figura 7	Comparação de médias da variável massa seca de raiz das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro.....	48

Capítulo III. Obtenção de duplo-haplóides de arroz (*Oryza sativa* L.) utilizando a técnica de cultura de anteras

Figura 1	A) Plantas de arroz obtidas pela técnica de cultura de anteras na primeira fase de aclimatização; B) Segunda fase de aclimatização em casa de vegetação.....	58
Figura 2	Plantas dos cruzamentos Nipponbare x BRS Atalanta nas diferentes épocas de semeadura utilizadas no primeiro experimento.	60
Figura 3	Plantas dos cruzamentos Nipponbare x BRS Atalanta utilizadas no segundo experimento.....	61

Lista de Tabelas

Capítulo II - Diferentes fontes e concentrações de ferro em meio de cultura *in vitro* para o cultivo do arroz

Tabela 1	Genótipos, fontes e concentrações de ferro dos doze tratamentos testados em arroz em meio de cultura líquido <i>in vitro</i>	43
Tabela 2	Análise de variância para os fatores de variação (FV) genótipo (G), fonte (F) e concentração (C) de ferro e as interação entre esses fatores para as variáveis analisadas comprimento de parte aérea (CPA) e raiz (CR), número de folhas (NF), massa fresca de parte aérea (MFPA) e raiz (MFR) e massa seca de parte aérea (MSPA) e raiz (MSR).....	44

Capítulo III. Obtenção de duplo-haplóides de arroz (*Oryza sativa* L.) Utilizando a técnica de cultura de anteras

Tabela 1	Meios de cultura e reguladores de crescimento utilizados no experimento 1 com anteras de arroz, para a indução de formação de calos	59
Tabela 2	Número de anteras inoculadas, calos formados, plantas verdes e albinas regeneradas nos três experimentos realizados testando diferentes meios de cultura.....	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. CAPÍTULO I	14
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. A cultura do arroz.....	14
2.2. Toxidez de ferro em arroz.....	17
2.3. Biotecnologia Vegetal	19
2.4. Cultura de anteras	21
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
3. CAPÍTULO II	40
RESPOSTA DIFERENCIAL AO FERRO DE DUAS CULTIVARES DE ARROZ <i>IN VITRO</i>	40
3.1. INTRODUÇÃO.....	40
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.4. CONCLUSÃO	50
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
4. CAPÍTULO III	53
OBTENÇÃO DE DUPLO-HAPLÓIDES DE ARROZ (<i>Oryza sativa L.</i>) UTILIZANDO A TÉCNICA DE CULTURA DE ANTERAS	53
4.1 INTRODUÇÃO.....	53
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.4. CONCLUSÕES.....	67
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	74

1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz é uma cultura de grande importância econômica e social sendo, o segundo cereal mais produzido no mundo. O Brasil destaca-se como primeiro país fora da Ásia em produção e consumo (FAO, 2010) tendo produzido na última safra 11,5 milhões de toneladas. O Estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz do país, representando cerca de 63% da produção (CONAB, 2010).

O melhoramento genético de plantas visa o aumento da produtividade, qualidade de grão e aspectos relacionados a estresse abiótico e biótico. Entre os mais importantes estresses abióticos, a toxidez por ferro destaca-se por ser responsável por perdas significativas na produção de arroz irrigado. Os danos causados pela toxidez dependem do nível de ferro no solo, da tolerância da cultivar quanto a este estresse, da época do plantio, do manejo da água e da época de submergência (SAHARAWAT, 2004). Estima-se que no Rio Grande do Sul a perda na produção pode chegar a 20% em lugares onde a toxidez de ferro é mais acentuada (IRGA, 2004).

A cultura de tecidos vegetais, utilizando distintos processos de manipulação *in vitro*, tem sido empregada em diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas (MORAES-FERNANDES et al., 1999). Uma das aplicações da cultura de tecidos no melhoramento de plantas é a obtenção de plantas haplóides, que possuem somente metade do patrimônio genético. Estas plantas são, portanto, estéreis e através da duplicação de seu número cromossômico recuperam a condição de diplóides, restaurando assim a fertilidade. A planta desta forma passa a ser chamada de duplo-haplóide, sendo totalmente homozigota, uma vez que cada cromossomo terá sua cópia exata (MORAES-FERNANDES, 1990).

No entanto, diversos fatores podem influenciar na obtenção de plantas duplo-haplóides. Entre eles, fatores genéticos, meio de cultura, planta doadora de micrósporos, estágio de desenvolvimento dos micrósporos, pré-tratamento e a grande produção de plantas albinas (SILVA, 2010).

Em relação aos fatores genéticos, os genótipos da subespécie japônica possuem uma melhor resposta a técnica de cultura de anteras quando comparadas com genótipos da subespécie indica (RAINA; ZAPATA, 1997). Porém, muitos trabalhos recentes visam modificações de meios de cultura e alguns tratamentos

para aumentar assim a resposta de genótipos indica para a obtenção de haplóides (KHATUN et al., 2010; DEWI et al., 2009; BAGHERI; JELODAR, 2008; JAVED et al., 2007; ROY; MANDAL, 2005).

A obtenção de uma população duplo-haplóide com características diferenciais a tolerância ao ferro podem contribuir para estudos futuros visando entender os mecanismos que controlam a tolerância ao ferro em arroz. Desta forma, esta ferramenta possibilitará a seleção precoce de indivíduos tolerantes ao excesso de ferro, contribuindo de maneira significativa com a eficiência dos programas de melhoramento genético.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de regeneração de plantas de arroz da subespécie indica e japonica, assim como, os cruzamentos realizados entre japonica X indica e indica X indica. O estudo de diferentes fontes e concentrações de ferro em meios de cultura também foram testados neste trabalho, a fim de verificar seu comportamento em cultivares de arroz tolerantes e sensíveis a toxidez por ferro.

2. CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal fonte de alimento para mais da metade da população mundial. Sua importância é destacada principalmente em países em desenvolvimento, tais como o Brasil, desempenhando papel estratégico em níveis econômico e social (WALTER et al., 2008).

A produção nacional de arroz no ano de 2009/10 foi de 11.660,3 mil toneladas. Para a safra de 2010/2011 a produção nacional de arroz deve ficar próxima de 12.500 mil toneladas, tendo um incremento ao redor de 912,4 mil toneladas (7,8%) em relação à safra anterior (CONAB, 2010).

Apenas uma pequena quantidade de arroz é consumida como ingrediente em produtos processados, sendo seu maior consumo na forma de grão. O arroz é uma excelente fonte de energia, devido à alta concentração de amido, fornecendo também proteínas, vitaminas e minerais, e possui baixo teor de lipídios. Nos países em desenvolvimento, onde o arroz é um dos principais alimentos da dieta, ele é responsável por fornecer, em média, 715 kcal per capita por dia, 27% dos carboidratos, 20% das proteínas e 3% dos lipídios da alimentação. No Brasil, o consumo per capita é de 108 g por dia, fornecendo 14% dos carboidratos, 10% das proteínas e 0,8% dos lipídios da dieta (KENNEDY et al., 2002). Portanto, devido à importância do arroz na dieta de grande parte da população, sua qualidade nutricional afeta diretamente a saúde humana (WALTER et al., 2008).

A composição do grão do arroz e de suas frações está sujeita a diferenças varietais, variações ambientais, de manejo, de processamento e de armazenamento, obtendo grãos com características nutricionais diferenciadas (ZHOU et al., 2002). No entanto, os nutrientes do arroz não estão distribuídos uniformemente no grão. As camadas externas apresentam maiores concentrações de proteínas, lipídios, fibra, minerais e vitaminas, enquanto o centro é rico em amido (WALTER et al., 2008).

Diferentes efeitos no organismo tem sido relacionados aos diversos componentes do arroz presentes no farelo e/ou no endosperma. Efeitos benéficos à saúde tem sido relatados por pesquisas, como o auxílio no controle da glicose sanguínea, redução dos lipídios séricos e da pressão arterial, auxiliando na prevenção e no controle de doenças crônicas, como diabetes e doenças cardiovasculares (RONG et al., 1997; XIA et al., 2003).

2.1.1. Diferenças entre as subespécies de arroz Indica e Japonica

As cultivares de arroz pertencentes à subespécie indica são predominantemente cultivadas nos trópicos e subtropicais e as pertencentes à subespécie japonica em regiões temperadas (MACKILL, 1995; MACKILL; LEI, 1997).

As subespécies indica e japonica podem ser diferenciadas por diversos fatores, desde aspectos morfológicos até reações a estresses abióticos. As principais diferenças estão relacionadas à tolerância das plantas a baixas temperaturas, resistência a seca, acamamento em resposta a fertilizantes, habilidade competitiva com plantas vizinhas, germinação e taxa de crescimento em baixas temperaturas, longevidade da semente e eficiência fotossintética das folhas com o mesmo conteúdo de proteína (MACKILL et al., 1996; OKA; MORISHIMA, 1997).

Características como relação comprimento/largura dos grãos também são usadas para diferenciar as duas subespécies. As cultivares da subespécie indica apresentam grãos mais longos e finos e os da subespécie japonica geralmente apresentam grãos largos e curtos (MATSUO, 1997).

Em cruzamentos entre as subespécies indica e japonica, é observado com frequência a ocorrência de alta esterilidade de espiguetas, a qual é apontada como sendo decorrente de causas genéticas (OKA; MORISHIMA, 1997). Entretanto, apesar da alta esterilidade, as diferenças entre as subespécies indicam a existência de grande variabilidade genética para ser explorada, tendo a possibilidade de se obter ganhos genéticos significativos em programas de melhoramento por meio de cruzamentos entre as duas subespécies.

2.1.2. Melhoramento Genético de Arroz

Os primeiros trabalhos de pesquisa no mundo visando o melhoramento genético do arroz ocorreram no início do século 20, com o principal objetivo de incrementar o rendimento de grãos (BORLAUG, 1983). A seleção buscava o aumento do número de grãos e o tamanho da panícula. Em 1927, uma equipe de pesquisadores japoneses, lançou as primeiras cultivares do grupo japonica com folhas eretas e colmos fortes, características que influenciam diretamente os componentes de rendimento (NEDEL et al., 1998).

Na década de 60, o IRRI (International Rice Research Institute) deu início a estudos de melhoramento de arroz onde o principal objetivo era o aumento da produtividade. Uma década depois, a ênfase passou a ser o aumento a resposta fotossintética e resistência a pragas e moléstias (BEACHELL et al., 1972).

No Brasil, o arroz irrigado teve maior desenvolvimento no Rio Grande do Sul por apresentar condições climáticas favoráveis e solos hidromórficos capazes de reter água para a irrigação. No ano de 1938, ocorreu a primeira introdução de germoplasma para fins de pesquisa. A cultivar Caloro, do grupo japonica, originária de Louisiana – USA era bem adaptada e considerada resistente ao frio, porém devido ao seu porte alto acamava com facilidade quando cultivada sob elevada fertilidade (TERRES et al., 1998).

Diversas ferramentas podem ser incorporadas aos programas de melhoramento, com o objetivo de otimizar a obtenção de genótipos superiores. O uso da biotecnologia e a formação de híbridos são ferramentas que auxiliam o aumento do patamar de produtividade das cultivares (NEDEL et al., 1998). Como exemplo de técnicas biotecnológicas, podemos citar a transgenia, a seleção assistida por marcadores, a mutação induzida e a bioinformática.

O arroz é considerado uma espécie modelo para estudos genético-moleculares (MOORE et al., 1995), principalmente em função do tamanho pequeno do seu genoma – 389 Mb (IRGSP, 2005); da sintonia com outros genomas como trigo, milho, aveia, cevada e sorgo (DEVOS; GALE, 2000); da publicação do seqüenciamento parcial das duas principais subespécies indica (YU et al., 2002) e japonica (GOFF et al., 2002) e do seqüenciamento completo pelo International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP, 2005). Essas características permitem que os genes correspondentes ou colineares, em diferentes gramíneas, sejam obtidos mais

facilmente, levando a um enriquecimento das informações sobre os caracteres de interesse.

2.2. Toxidez de ferro em arroz

A nutrição mineral refere-se ao suprimento, à absorção e à utilização de nutrientes essenciais pela planta. A produtividade das culturas é influenciada por vários fatores, entre eles, a disponibilidade de nutrientes, na quantidade e proporção adequadas. A otimização da eficiência nutricional é fundamental para aumentar a produtividade e reduzir o custo de produção. Vários fatores como, clima, solo, planta e suas interações afetam a absorção e a utilização de nutrientes pelas plantas. Para a eficiência máxima de nutrientes, todos estes fatores devem ter nível ótimo durante o desenvolvimento da cultura (VIEIRA, 1999).

Os nutrientes se caracterizam em macro e micronutrientes, dependendo da exigência nutricional da planta para cada elemento. Os micronutrientes participam, principalmente, em processos enzimáticos da planta, sendo exigidos em menor quantidade, sendo que o elemento ferro tem como principal função ativar enzimas e transportadores de elétrons (TAIZ; ZEIGER, 2004), participando em processos fundamentais como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese de DNA e em grande parte das reações bioquímicas, tanto na produção como consumo de oxigênio (BRIAT, 1995; BRIAT, 1997).

Um dos mais importantes estresses abióticos que limitam a produção de arroz de terras baixas é a toxidez por ferro (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000). A toxidez por ferro é caracterizada como uma desordem nutricional provocada pela captação de Fe^{2+} para concentrações superiores a 300 mg kg^{-1} (TANAKA; YOSHIDA, 1972; YAMAUCHI; PENG, 1995), assim super expressando ou diminuindo uma série de processos metabólicos, resultando em danos para a planta de arroz (BIENFAIT, 1985; BODE et al., 1995).

Os sintomas geralmente observados são manchas foliares (bronzamento), escurecimento das raízes, redução no desenvolvimento do sistema radicular e inibição do crescimento da planta (DOBERMANN; FEIRAHURST, 2000). A nível celular pode estimular a produção de etileno nas folhas (PENG; YAMAUCHI, 1993).

Assim dependendo da severidade da toxicidade e da capacidade de tolerância das cultivares de arroz, a redução na produção pode chegar 100% (SAHRAWAT, 2004).

A relação entre a gravidade da toxicidade de ferro, os sintomas expressos e o rendimento ainda não foram claramente estabelecidos. Estudo realizado por Briat et al. (2007) ao testarem diferentes genótipos a toxidez ao ferro, sugerem que a absorção de ferro é regulada por mecanismos diferentes. Estes acontecimentos podem variar entre os estádios de desenvolvimento da cultura na época de colheita, assim como entre as estações do ano. Geralmente, os danos da colheita são maiores quando a toxicidade ocorre no início do estágio vegetativo, podendo levar a uma completa queda da safra (ABU et al., 1989).

Em solos inundados, o oxigênio é rapidamente esgotado pela respiração dos microrganismos e raízes das plantas. Portanto, logo após a inundação de um campo de arroz, a redução de óxidos e hidróxidos de ferro podem resultar no acúmulo de grandes quantidades de Fe^{2+} na solução do solo, dada uma condição de Fe-tóxicos (RATERING; SCHNELL, 2000). A presença de óxidos de ferro amorfos e o baixo potencial redox nestes solos promovem um aumento nas quantidades de ferro em solução disponível para as plantas. Desta forma, as pequenas quantidades de Fe^{3+} (forma férrica) presentes na solução do solo são reduzidas a Fe^{2+} (forma ferrosa) (BECANA et al., 1998). Como os compostos de ferro ferroso são muito mais solúveis que os compostos férricos, o resultado é um aumento na solubilidade total do ferro. Conforme o potencial redox diminui, a solubilidade do ferro tende a aumentar exponencialmente de modo que praticamente todo o ferro detectável na solução do solo encontra-se na forma reduzida de Fe^{2+} (LINDSAY, 1979).

Durante o alagamento do solo, a água também funciona como uma barreira para a difusão do oxigênio atmosférico para o solo, tornando o ambiente hipóxico. O acúmulo de CO_2 na água resultantes da presença de microrganismos anaeróbicos diminui o pH favorecendo redução de compostos oxidados (PONNAMPERUMA, 1972).

Os danos causados pela toxicidade do ferro podem ser diretos ou indiretos. A toxidez direta é a absorção e acúmulo excessivo deste elemento. Caracteriza-se pela presença de pontuações castanho-escuras sobre a superfície das folhas (bronzamento), retardo no crescimento e redução de produtividade (PONNAMPERUMA, 1972; SAHRAWAT, 2004). A toxidez indireta ocorre devido a formação de uma capa férrica sobre a superfície das raízes. Em consequência,

ocorre a redução de absorção, transporte e/ou utilização de outros nutrientes pelas plantas como P, K, Ca, Mg, Mn e Zn. Morfologicamente, a planta aparenta folhas amareladas (SAHRAWAT, 2004).

A realização de estudos que visem a identificação dos genes envolvidos na expressão de tolerância ao ferro somada à maior capacidade de armazenamento de ferro no grão, poderão contribuir para o aumento da produção em áreas irrigadas por inundação e auxiliar na produção de grãos com maior teor do elemento.

2.3. Biotecnologia Vegetal

O melhoramento genético vem sendo auxiliado por modernas técnicas de biotecnologia vegetal. A biotecnologia divide-se em biologia celular, que abrange cultura de tecidos, e biologia molecular (FERREIRA et al., 1998).

A biotecnologia pode fornecer meios para o aumento da produção agrícola pela aplicação do conhecimento molecular da função dos genes e das redes regulatórias envolvidas na tolerância a estresse, desenvolvimento e crescimento das plantas (TAKEDA; MATSUOKA, 2008). A transformação genética de plantas cultivadas possibilita a validação funcional de genes individuais selecionados, bem como a exploração direta dos transgênicos no melhoramento genético, visando à inserção de características agrônômicas desejáveis (CARRER et al., 2010).

Outra análise de grande interesse atual é a de expressão gênica, também chamada de análise de transcriptoma. É uma metodologia significativa para identificar genes candidatos, predição da função de genes e regiões regulatórias (MOCHIDA; SHINOZAKI, 2010). Esse método é baseado na hibridização nos microarranjos e gene *chips* que permitem analisar a expressão de dezenas de milhares de genes simultaneamente. Genes identificados com expressão diferencial são clonados e analisados funcionalmente no metabolismo celular, sendo a transgenia um dos métodos utilizados.

O desenvolvimento e a aplicação das técnicas com marcadores moleculares nas últimas décadas induziram transformações consideráveis em diversos ramos da biologia, notadamente a biologia molecular (clonagem posicional), a genética evolutiva (cartografia comparativa), a genética quantitativa (detecção e identificação de *locus* que controlam QTL), e o melhoramento genético (seleção assistida por

marcadores) (CARRER et al., 2010). No melhoramento genético, o desenvolvimento de marcadores ligados a genes de resistência contra pragas e agentes patogênicos, ou a sua utilização para acelerar a escolha do melhor parental, possibilita uma condução mais precisa dos programas de seleção quando comparado às seleções baseadas em outros marcadores. Além disso, a seleção assistida por marcadores moleculares permite a construção de genótipos que seriam dificilmente produzidos apenas com a seleção fenotípica (ALZATE-MARIN et al., 2005).

A cultura de tecidos é uma excelente ferramenta para clonar plantas em escala comercial, além de colaborar na realização de estudos de transformação genética e conservação de espécies vegetais. Permite ainda aperfeiçoar a interação entre fatores abióticos (nutricionais, luminosos, temperatura etc) e bióticos (hormonais e genéticos), resultando em plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores (FERREIRA et al., 1998). O desenvolvimento de populações duplo-haplóides (DH) é um dos ramos da cultura de tecidos, podendo ser obtida pela cultura de anteras. Devido a homozigose perfeita das linhagens DH, a análise genética e as pesquisas com marcadores moleculares são bastante utilizadas para estudos e também para o desenvolvimento de novas cultivares (MORAES-FERNANDES et al., 1999).

2.3.1. Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos refere-se às técnicas de excisão, desinfestação e cultura, em meio nutritivo, em condições assépticas, de células, tecidos ou órgãos de planta (TORRES et al., 1999). A totipotência celular é o princípio básico de aplicação da cultura de tecidos (COCKING, 1986). A manipulação, ao nível celular, baseia-se nesta totipotência vegetal, onde células germinais ou somáticas, em condições adequadas, podem regenerar plantas viáveis e férteis (KERBAUY, 2004).

Os estudos na área de cultura de tecidos vegetais foram iniciados a partir da metade do século XIX, onde cientistas como Trécul (1853), Vöchting (1878) e Reehinger (1893) realizaram experiências com diversos fragmentos de tecidos isolados de plantas superiores. Eles observaram a formação de calos a partir de fragmentos de caule e de pedaços de raízes (DODDS; ROBERTS, 1985). Em 1902, Haberlandt demonstrou ser possível manter células em estado viável por um período

de aproximadamente um mês em solução nutritiva (MANTEL et al., 1994). No entanto, a cultura de tecidos em arroz somente teve início na década de 50, porém a regeneração de plantas a partir de calos induzidos de sementes, raízes e pólen, só foram obtidas na década seguinte (BONATO, 1994).

Em relação as aplicações da cultura de tecidos, elas podem ser diretamente associadas ao melhoramento vegetal. Entre elas, a limpeza viral, onde visa a “limpeza” de cultivares infectadas com vírus; a multiplicação clonal, com cultura de gemas ou segmentos nodais; a manutenção e intercâmbio de germoplasma em condições assépticas; a obtenção de haplóides, através da cultura de anteras e óvulos; e a obtenção de híbridos interespecíficos, com a cultura de embriões; obtenção de variantes somaclonais (RAMALHO, 2008; FERREIRA et al., 1999). A resposta e 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).

Com os progressos alcançados, as técnicas de cultura de tecidos tem tido um papel de destaque no desenvolvimento de cultivares superiores. Contudo, essas técnicas não são empregadas isoladamente nos programas de melhoramento vegetal, mas associados com os métodos descritos como clássicos, sendo sua contribuição de maior ou menor importância, no qual irá depender do objetivo do pesquisador (SANTOS, 2003; BONATO, 1994).

2.4. Cultura de anteras

Em arroz, é possível obter linhagens homocigotas através do cultivo de anteras imaturas em meio de cultura. O cultivo de anteras é a manipulação *in vitro* de grãos de pólen imaturos contidos dentro das anteras, para inibir o desenvolvimento gametofítico e induzir o desenvolvimento esporofítico (LENTINI et al., 1997). No caso da cultura do arroz, este processo tem início mediante a formação de um tecido não diferenciado que se denomina calo e termina com a formação de embriões e plantas (NIIZEKI; OONO, 1968).

Haplóides androgênicos foram descobertos acidentalmente, mas por Guha e Maheshwari em 1964 de *Datura innoxia* (Solanaceae). Após quatro anos, Niizeki e

Oono produziram os primeiros haplóides de arroz (DATTA, 2005). Desde então, avanços tem sido realizados em laboratórios de todo o mundo. A primeira variedade desenvolvida por cultura de anteras ocorreu em 1975, e até hoje muitas cultivares já foram lançadas em todo mundo (HAN, 1985; FANG, 1991; LIANG; HUANG, 1991; LYNCH et al., 1991; CASTRO et al., 2004).

As plantas produzidas pelo método de cultura de anteras podem produzir de 40 a 70% de haplóides, triplóides ou tetraplóides, sendo o restante de 30 a 60% diplóides e férteis (NISHI; MITSUOKA, 1969).

A utilização da técnica de cultura de anteras como prática rotineira em programas de melhoramento genético tem ocorrido lentamente, principalmente por que as respostas são totalmente dependentes do genótipo utilizado. O arroz do tipo japonica irrigado tem uma resposta maior em cultura de anteras do que do tipo japonica de sequeiro e indica (CHEN et al., 1991).

A primeira cultivar de arroz obtida pela técnica de cultura de anteras no Brasil foi desenvolvida pela Embrapa Arroz e Feijão. A BRS Colosso, assim chamada, foi lançada no ano de 2004 (CASTRO et al., 2004). A cultivar desenvolvida para ambientes de terras altas obteve bom desempenho de produtividade e bons caracteres de interesse. No entanto, em pouco tempo apresentou problema de resistência a brusone (*Pyricularia grisea*), deixando de ser recomendada para cultivo. Outro genótipo do mesmo cruzamento que deu origem a BRS Colosso também foi obtida, a BRS Liderança, no entanto também mostrou quebra de resistência a brusone (ARAÚJO et al., 2005; FILIPPI et al., 2006).

2.4.1. Genética das plantas Duplo-haplóides

A cada grão de pólen proveniente de plantas híbridas F_1 representadas por um gameta diferente, a população de plantas duplo-haplóides (DH) mostra a variabilidade genética esperada em uma geração F_2 e a vantagem adicional que cada indivíduo terá em um genótipo homozigoto, fixado definitivamente. Com a aplicação da técnica de cultura de anteras, pode-se obter linhas homozigotas em apenas 8 a 9 meses, contando a partir da semeadura das sementes híbridas F_1 ou F_2 . Nos sistemas convencionais geralmente utilizados para o melhoramento de

arroz, a mesma estabilidade homozigota é obtida depois de cinco a seis gerações de autopolinização (LENTINI et al., 1997).

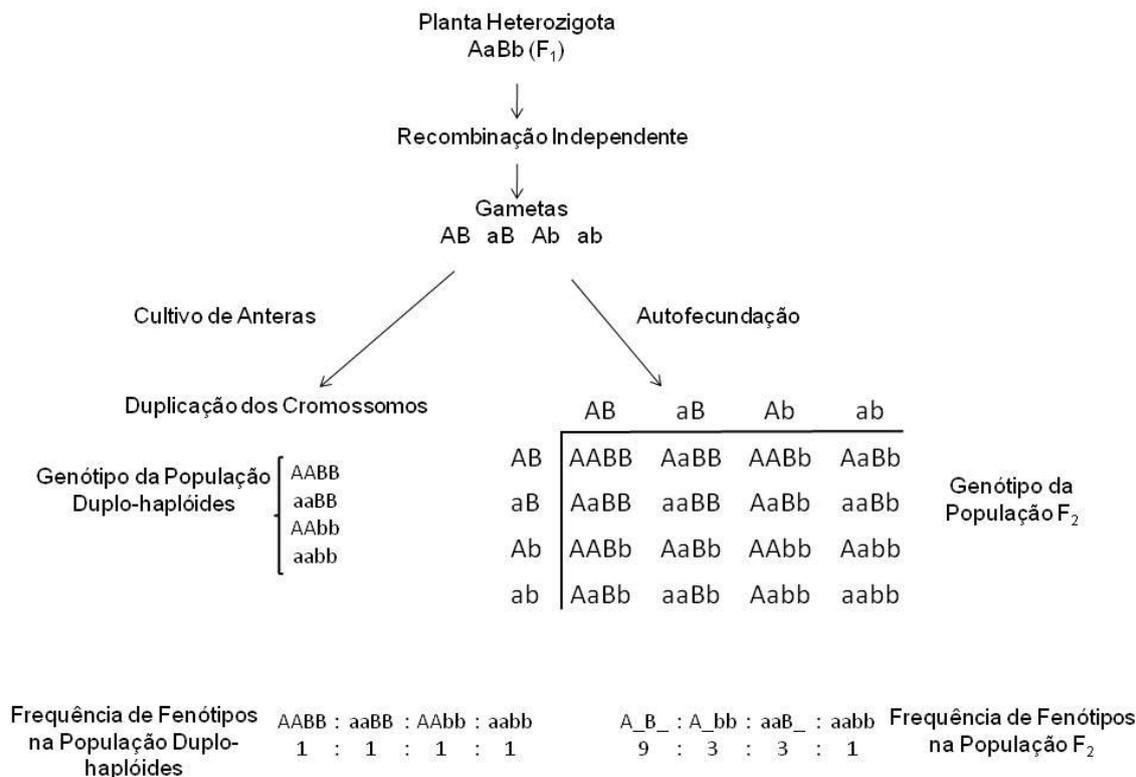


Figura 1 - Segregação de genótipos e fenótipos em populações F₂ e duplo-haplóides, a partir de uma planta heterozigota para os genes de recombinação independente (Adaptado de LENTINI et al., 2007). FAEM/UFPel-CGF, 2011.

Com a técnica de cultura de anteras ocorre a melhoria de eficiência de seleção, em comparação com as seleções iniciais feitas por métodos convencionais de melhoramento. O aumento da eficiência ocorre tanto para caracteres qualitativos como para caracteres quantitativos, facilitando a identificação de genótipos superiores (SNAPE, 1989).

A seleção de indivíduos em uma população F₂ é mais efetiva quando os alelos desejáveis são dominantes. No entanto, quando se trata de alelos recessivos somente se pode detectar em uma proporção de $(1/4)^n$. Em uma população de duplo-haplóides, os genótipos recessivos tem uma freqüência maior, isto é, $(1/2)^n$,

isso facilita a seleção de genes recessivos desejáveis, já que não são mascarados por genes dominantes (MORAES-FERNANDES et al., 1999).

Teoricamente, se os pais de híbridos tem “n” pares de alelos que recombinam independentemente, a eficiência da seleção de um genótipo homozigoto dentro de uma população, é de $(1/2)^{2n}$ em casos de melhoramento de diplóides e de $(1/2)^n$ com melhoramento de duplo-haplóides. Isto sugere que a eficiência de seleção no melhoramento com duplo-haplóides é 2n vezes mais alta que com melhoramento utilizando diplóides (BAENZIGE; SCHAEFFER, 1983). Com base no exposto, a melhoria na eficiência da seleção com cultura de anteras tem permitido desenvolver cultivares de arroz, a partir de populações duplo-haplóides menores que as populações normalmente usadas pelos métodos convencionais (SHEN et al., 1983).

A análise do controle genético da cultura de anteras demonstrou que a herança da formação de calos e a eficiência da cultura de anteras são influenciadas por efeitos aditivos e dominantes (HE et al., 2006; ZHANG; QIFENG, 1993). Miah et al. (1985) também demonstraram que o efeito do gene aditivo predominou na determinação da capacidade de formação de calos e que a herdabilidade do caráter restrito foi muito elevada nas variedades estudadas. Uma análise dialélica realizada utilizando duas variedades de arroz indica e duas variedades Iranianas locais, indicaram forte efeito aditivo para a indução de calos e regeneração de plantas verdes (BAGHERI; JELODAR, 2008). O componente de variação genética aditiva para as características da cultura de anteras é maior em variedades japônica que nas indicas (YAN et al., 1996).

O controle genético de regeneração de planta verde, por outro lado, é bem menos estabelecido. Efeitos aditivos e não-aditivos têm sido estudados para a identificar diferenças no potencial de regeneração entre os genótipos (SILVA, 2010).

2.4.2. Fatores que influenciam o cultivo de anteras

Vários fatores podem influenciar na produção de plantas duplo-haplóides derivadas de cultura de anteras. Estes fatores é que farão com que a técnica de cultura de anteras seja realizada com eficiência para assim a obtenção de bons resultados, ou seja, bons índices de formação de calos e de regeneração de plantas verdes.

- Genótipo

O genótipo é o fator que mais influencia na frequência de anteras produtoras de calos, a capacidade de diferenciar calos em plantas, a proporção de plantas verdes e albinas e na ploidia das plantas regeneradas.

Uma das maiores diferenças são encontradas entre os tipos de arroz japônica e indica (CHEN et al., 1991). Estudos realizado por Peng e Hodges (1989) através de um cruzamento dialélico entre quatro cultivares do grupo indica, já demonstravam a diferença entre as duas subespécies. Verificou-se neste estudo que o índice de regeneração das plantas variou de 0% a 86%, confirmando assim a origem genética da habilidade de regeneração. Em trabalho realizado com as cultivares BRS “Taim” (subespécie índica) e Taipei 309 (subespécie japônica), não apresentou diferença significativa entre as médias de indução de calos e regeneração de plantas. No entanto, as médias mais elevadas foram obtidas na população da subespécie japônica, tanto para indução de calos como para regeneração de plantas (LANNES, 2000).

Estudos sobre as variedades japônica e indica e os seus híbridos têm mostrado que a indução de calos e regeneração de plantas apresentam características independentes de herança quantitativa (BAGHERI; JELODAR, 2008; HE et al., 2006; YAN et al. 1996; ZHANG; QIFENG, 1993; QUIMIO; ZAPATA, 1990; MIAH et al., 1985).

- Estado fisiológico das plantas doadoras de anteras

As condições de crescimento das plantas doadoras como o fotoperíodo, a intensidade de luz, a temperatura, a nutrição mineral, os tratamentos físicos e a aplicação de reguladores de crescimento podem influenciar na resposta dos micrósporos ao cultivo *in vitro* (CHEN et al., 1991; VASIL et al., 1987).

Panículas coletadas de plantas cultivadas em campos experimentais obtiveram melhor resposta na cultura de anteras em comparação com as anteras coletadas de plantas cultivadas em vaso em casas de vegetação (VEERARAGHAVAN, 2007; RAINA, 1997). Em geral, anteras de plantas desenvolvidas a campo com baixo período de nebulosidade e chuva apresentam

maior resposta, devido a altos níveis de radiação solar. As anteras de plantas desenvolvidas a baixas temperaturas (15 °C para a noite e 20 °C para o dia) são mais afetadas que aquelas desenvolvidas a altas temperaturas (30 a 35 °C). Porém, as anteras de plantas que crescem a temperaturas superiores a 30 °C tendem a produzir uma maior porcentagem de plantas albinas (CHEN et al., 1991). As temperaturas ótimas para o crescimento das plantas são então de 24° e 34 °C para a noite e para o dia, respectivamente (SILVA, 2010).

Em relação ao ponto de coleta das panículas de arroz, recomenda-se que sejam coletadas em dias ensolarados, entre as 8 e 10 horas da manhã (DORNELES, 1990). Este procedimento pode aumentar a capacidade de resposta ao método do que as panículas provenientes de coletas realizadas em dias chuvosos e depois das 10 horas da manhã (LENTINI et al., 1997).

- Estádio de desenvolvimento do grão de pólen

O estado de desenvolvimento dos grãos de pólen no momento em que as anteras são cultivadas *in vitro* é um fator determinante na resposta obtida pela técnica de cultura de anteras.

Em arroz, o estado ótimo do grão de pólen para a indução de calos é no estágio uninucleado medio e tardio (JAHNE; LORZ, 1995; CHEN et al., 1991). Depois de dois dias de cultivo ocorre a primeira divisão que resulta na formação de dois núcleos que estão separados por uma membrana. Por volta do quinto dia de cultivo *in vitro* inicia a segunda divisão mitótica. Nas primeiras divisões geralmente origina-se membranas celulares que permitem a formação de núcleos independentes, cujo número pode variar de dois a oito, para cada micrósporo. Aos vinte dias de cultivo forma-se uma massa de tecido amorfo denominado microcalo, ao qual pode conter mais de 100 células para cada micrósporo envolvido no processo. O microcalo pode alcançar um tamanho de 2 mm por volta dos 30 a 50 dias, dependendo do genótipo, sendo este o momento mais adequado para iniciar o processo de regeneração de plantas (LENTINI et al., 1997).

Usualmente, a distância entre o colar da folha bandeira e a lígula da penúltima folha serve como guia morfológico para verificar a maturidade das anteras (BISHNOI et al., 2000).

- Pré- tratamento das anteras

O pré-tratamento mais comum utilizado em cultura de anteras consiste em manter as panículas de arroz no frio, de 8 a 10 °C por sete a dez dias no escuro (ZAPATA-ARIAS, 2003). Este tratamento incrementa a formação de calos como também a diferenciação de plantas verdes. Tratamentos com frio por mais de 14 dias reduz a capacidade de regeneração de plantas e incrementa a produção de plantas albinas (TSAY; CHEN, 1984).

Os efeitos do tratamento com frio e escuridão reduzem a atividade respiratória das anteras, prolongando a atividade biológica do arquespório que abrigam os grãos de pólen, mantendo a viabilidade dos mesmos, evitando a deiscência prematura das anteras em cultivo e retardando a senescência do pólen (SUNDERLAND, 1978).

- Albinismo

A produção de plantas albinas é um fenômeno comum entre os cereais obtidos através de cultura de anteras. Em arroz, a variação de ocorrência de plantas albinas varia de acordo com o genótipo. Em alguns casos, pode-se obter uma alta taxa de regeneração de plantas, porém, a porcentagem de plantas albinas pode variar desde 10 até 100% (TALEBI et al., 2007; TSAY et al., 1981).

O albinismo é particularmente predominante em plantas derivadas de pólen imaturo de híbridos interespecíficos ou de híbridos intraespecíficos entre as subespécies japonica e indica (TSAY et al., 1981).

Outro fator relacionado ao albinismo é a degeneração do DNA dos cloroplastos dos micrósporos no momento do cultivo e das condições de cultivo *in vitro*. Alguns estudos sugerem que a formação de plantas albinas se deve a alterações dos plastídios durante a microsporogênese *in vitro*. O albinismo está relacionado com a deteriorização do DNA dos cloroplastos (DAY; ELLIS, 1995) e com deficiências do RNA dos plastídios (CHEN et al., 1991). A produção de plantas albinas também pode ser devido a falta de expressão dos genes responsáveis pelo desenvolvimento normal dos cloroplastos e da síntese de clorofila nas condições de cultivo *in vitro* (LENTINI et al., 1997).

A frequência de plantas albinas pode ser afetada também por fatores como tamanho do calo, a temperatura da indução e regeneração das plantas, a concentração e o tipo de reguladores de crescimento, a concentração de sacarose na indução do meio de indução, a concentração dos sais minerais no meio de cultivo e o estado de desenvolvimento do pólen durante a coleta da panícula (CHEN et al., 1991).

- Meio de cultura

O início da divisão dos micrósporos podem ser independentes da composição nutricional do meio de cultivo, porém para as divisões subseqüentes são de extrema importância, pois influenciam na formação do calo e na diferenciação destas células em embriões e plantas. Normalmente são usados dois meios de cultura diferentes, um para a indução de calos a partir de pólen imaturo e outro para a regeneração de plântulas a partir de calos (LENTINI et al., 1997).

Vários estudos avaliam diferentes composições e combinações de nutrientes para uma melhor resposta em cultura de anteras (TABELI et al., 2007; SRIPICHTT et al., 2000; RAINA; ZAPATA, 1997). No entanto, o resultado pode ser muito diferente para cada experimento por influência do genótipo utilizado, as condições ambientais e fisiológicas da planta doadora, o estágio de desenvolvimento do grão de pólen e o pré-tratamento aplicado nas anteras (LENTINI et al., 1997).

O crescimento e a diferenciação dos calos estão determinados pelas concentrações de sais inorgânicos, especialmente por amônio. Sendo assim, a relação entre concentrações de amônio (NH_4^+) e de nitrato (NO_3^-) é um dos principais fatores na composição do meio (GRIMES; HODGES, 1990). As altas concentrações de amônio presentes no meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) inibem a formação de calos de micrósporos de arroz e de outros cereais. Baseados nesta observação Chu et al. (1975) desenvolveram o meio básico N₆, na qual é usado uma quantidade inferior de amônio, magnésio e cloreto, e superior de fosfato, potássio e sulfato em relação ao usado no meio MS.

Em relação aos reguladores de crescimento usados em cultura de anteras, as auxinas e as citocininas são as de maior importância. Para o desenvolvimento de calos, as auxinas em concentrações médias a altas, atuam sinergicamente com as

citocininas em baixas concentrações. Para a etapa de diferenciação, as auxinas a baixas concentrações estimulam o enraizamento, enquanto as citocininas em altas concentrações favorecem o desenvolvimento dos brotos, caules e folhas, inibindo o enraizamento (LENTINI et al., 1997).

No entanto, o meio de cultura N₆ foi bem adaptado para genótipos da subespécie japônica. Modificações nas doses de amônio e magnésio neste meio foram realizadas aumentando a frequência de indução de calos e de regeneração de plantas verdes em genótipos indica (HUANG et al., 1981). Destas modificações obteve-se o meio de cultura NL (LENTINI et al., 1994), na qual foi possível aumentar a produção de calos em 24 vezes para genótipos indica e 2 vezes para genótipos japônicos. O meio NL suplementado com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0,07 mg L⁻¹ de picloram, 1 mg L⁻¹ de cinetina, 5% de maltose e 10 mg L⁻¹ de AgNO₃ mostraram que os calos formados induziram uma maior formação de plantas verdes (LENTINI et al., 1994).

- Condições físicas de incubação para a indução de calos e diferenciação de plantas

A temperatura e a luz possuem um papel importante para a androgênese. Em arroz a temperatura adequada para os processos de formação de calos e de regeneração é de 24 a 26 °C. Temperaturas superiores a 28 °C faz com que as anteras sofram degeneração rapidamente, havendo uma diminuição da formação de calos e da taxa de regeneração de plantas e aumento da presença de plantas albinas (LENTINI et al., 1997).

A luz não se faz necessária para a fase de indução e crescimento de calos. No entanto, quando os calos são transferidos para o meio de regeneração é necessário a luz para o processo de fotossíntese no desenvolvimento de plantas verdes.

Fatores como a composição da atmosfera, recipiente de cultivo e densidade de anteras inoculadas, influenciam a resposta das anteras para a formação de calos. Em arroz, a densidade de 25 anteras por mL parece ser adequada para uma maior resposta *in vitro*, quando se utiliza meio líquido (PETERS et al., 1999)

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU, M.B.; TUCKER, E.S.; HARDING, S.S.; SESAY, J.S. Cultural practices to reduce iron toxicity in rice. **International Rice Research Newsletter**, v.14, p.19, 1989.

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.4, p.333-42, 2005.

ARAÚJO, L. G.; PRABHU, A. S.; SILVA, G. B. da. Virulence pattern of *Pyricularia grisea* isolates from farmers' fields on newly released upland rice cultivars. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.30, n.6, p. 623-628, 2005.

BAENZIGER, P. S.; SCHAEFFER, G. W.. Dihaploids via anthers cultures in vitro. In **Beltsville Symposia in Agricultural Research VII. Genetic Engineering: Applications to Agriculture**. Allanheld, New Jersey: Osmum Publishers, Totlva,1983, pp.269-284.

BAGHERI, N.; JELODAR, N.B. Combining Ability and Heritability Induction and Green-Plant Regeneration in Rice Anther Culture. **Biotechnology**, v.7, n.2, p.287-292, 2008.

BEACHELL, H.M.; KHUSH, G.S.; AQUINO, R.C. IRRI's International Program. In: International Rice Research Institute. **Rice Breeding**. Filipinas, 1972. p.89-104.

BECANA, M.; MORAN, J.F.; ITURBE-ORMAETXE, I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, v.201, p.137-147, 1998.

BIENFAIT, H. F. Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. **J.Bioenerg Biomembr**, v.17, p.73–83, 1985.

BISHNOI, U.; JAIN, R.K.; ROHILLA, J.S.; CHOWDHURY, V.K.; GUPTA, K.R.; CHOWDHURY, J.B. Anther culture of recalcitrant indica x Basmati rice hybrids. **Euphytica**, v.114, n.2, p.93-101, 2000

BONATO, A.L.V. **Efeito da radiação gama (^{60}Co) na cultura de anteras de arroz (*Oryza sativa* L.)**. 1994. 63p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BORLAUG, N.E. Contribution of conventional plant breeding to food production. **Science**. V.129, p.689-693, 1983.

BRIAT, J.F.; FOBIS-LOISY, I.; GRIGNON, N.; LOBRÉAUX, S.; PASCAL, N.; SAVINO, G.; THOIRON, S.; VON, W.N.; VAN, W.O. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. **Biol Cell**, v.84, p.69-81, 1995.

BRIAT, J.F.; LOBRÉAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in Plant Science**, v.2, n.5, 1997.

BRIAT, J.F.; CURIE, C.; GAYMARD, F. Iron utilization and metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.276-282, 2007.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Revista Estudos Avançados**. v.24, n. 70, p.149-164, 2010.

CASTRO, E.da M.; MORAIS, O.P. de; FARIA, J.C.de; PRABHU, A.S.; LOPES, A.de M.; UTUMI, M.; PEREIRA, J. de A.; CORDEIRO, A.C.; FONSECA, J.R.; SOARES, A.A.; SOUZA, N.R.G.de. 'BRS Colosso': Primeira Cultivar de Arroz Obtida por Cultura de Anteras no Brasil. **Comunicado Técnico 85.**, Santo Antonio de Goiás: EMBRAPA, 2004.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em. <www.conab.gov.br>. Acesso em 15/12/2010.

CHEN, C.C.; TSAY, H.S.; HUANG, C.R. Factors affecting androgenesis in rice (*Oryza sativa* L.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v.14, p. 193-215, 1991.

CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y.; BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments of the nitrogen source. **Scientia Sinica**, v.18, p.659-668, 1975.

COCKING, E. C. The tissue culture revolution. In: WITHERS, L. A., ALDERSON, P. G. (Eds.). **Plant Tissue Culture and its Agriculture**. London: Butterworths, 1986. p. 3-20.

DATTA, S.K. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. **Current Science**, v.89, n.1, p.1870–1878, 2005.

DAY, A.; ELLIS, T.H.N. Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. **Curr.Genet.**, v.9, n.8, p. 671-678, 1985.

DEVOS, K.M.; GALE, M.D. Genome Relationships: the grass model in current research. **Plant Cell**, v.12, p.637-646, 2000.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. Rice: Nutrient disorders and nutrient management. **The International Rice Research Institute**. Philippines: Oxford Graphic Printers, 2000. 191p.

DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiments in Plant Tissue Culture**. 2.ed. New York: Cambridge University Press, 1985. 232p.

DORNELES, L.T. **Regeneração de plantas através da cultura de anteras e panículas imaturas de arroz**. 1990. 72f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FANG, P.Y. Breeding new rice strains through anther culture. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer, 1991. p.216-229.

FERREIRA, M. A.; CALDAS L. S.; PEREIRA E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH. v. 1, p. 21-43, 1999.

FILIPPI, M. C. C.; PRABHU, A. S.; SILVA, G. B.; SILVA LOBO, V. L.; CASTRO, E. da M. de; MORAIS, O. P. de. Epidemia de brusone na cultivar de arroz de terras altas recém-lançada BRS Colosso. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ, 2006, Brasília, DF. **Anais II Congresso Brasileiro da cadeia produtiva do arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

GOFF, S. A.; RICKE, D.; LAN, T. H. A. draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). **Science**, v. 296, n. 5565, p. 92-100, 2002.

GRIMES, H.D.; HODGES, T.K. The inorganic NO₃:NH₄ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). **Journal Plant Physiology**, v.136, p.362–367, 1990.

HAN, H. Use of haploids in crop improvement. In: **Biotechnology in International Agricultural Research**. Filipinas: International Rice Research, 1985. p.76-95.

HE, T.; YANG, Y.; TU, S.B.; YU, M.Q.; LI, X.F. Selection of interspecific hybrids for anther culture of indica rice. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.86, p.271–277, 2006.

HUANG, H.S.; LING, T.H.; TSENG, P.L. et al. Studies on medium component in anther culture of *Oryza sativa* subsp. *hsien* by mathematical methods. In: **Plant Tissue Culture. Proceedings of the Beijing Symposium**. Pitman publishing: London, 1981. p.244-246.

IRGSP (The International Rice Genome Sequencing Project). The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.436, p.793-800, 2005.

JAHNE, A.; LORZ, H. Cereal microspore culture. **Plant Science**, n.109, p.1–12, 1995.

KENNEDY, G. ; BURLINGAME, B.; NGUYEN, N. Nutrient impact assessment of rice in major rice-consuming countries. **International Rice Commission Newsletter**, v.51, p.33-42, 2002.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452p.

LANNES, S.D. **Genética da regeneração *in vitro* de anteras de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.)**. 2000. 42f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia - Fitomelhoramento), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LENTINI, Z., MARTÍNEZ, C., ROCA, W. Cultivos de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. Cali: CIAT, 1997. 62p.

LENTINI, Z.; REYES, P.; MARTÍNEZ, C.; NÚÑEZ, V.; ROCA, W. **Mejoramiento del arroz con cultivo de anteras: aplicaciones en el desarrollo de germoplasma adaptado a ecosistemas latinoamericanos y el Caribe**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1994. 79p.

LIANG, S.; HUANG, S. Huayu 15, a high-yielding rice variety bred by anther culture. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlín: Springer, 1991. v.14, p.230-247.

LINDSAY W. L. **Chemical Equilibria in Soils**. New York: John Wiley & Sons, 1979. 449p.

LYNCH, P.T.; FINCH, R.P.; DAVE, M.R.; COCKING, E.C. Rice tissue culture and its application. In: KHUSH, G.S.; TOENNIESSEN, G.H. (Eds.). **Rice Biotechnology**. Inglaterra: Commonwealth Agricultural Bureaux International (CABI), 1991. p.135-156.

MACKILL, D.J. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. **Crop Science**, v. 35, n.3, p. 889–894, 1995.

MACKILL, D.J.; LEI, X.M. Genetic variation for traits related to temperate adaptation of rice cultivars. **Crop Science**, v.37, n.4, p.1340-1346, 1997.

MACKILL, D.J.; ZHANG, Z.; REDOÑA, E.D.; COLOWIT, P.M. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. **Genome**, v.39, n.5, p.969-977, 1996.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R.A. Técnicas de cultura de tecidos. In: MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R.A. **Principios de biotecnología em plantas: uma introdução a engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de genética, 1994. p.101-181.

MATSUO, M. Origin and differentiation of cultivated rice. In: MATSUO, T.; FUSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. (Eds.). **The Science of the Rice Plant**, v.3, Genetics, Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. Cap.3, p.69-88.

MIAH, M.A.A.; EARLE, E.D.; KUSH, G.S. Inheritance of callus formation ability in anther culture of rice, *Oryza sativa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.70, p.113–116, 1985.

MOCHIDA, K.; SHINOZAKI, K. Genomics and Bioinformatics Resources for Crop Improvement. **Plant Cellular Physiology**, v.51, p.497-523, 2010.

MOORE, G.; DEVOS, K.M.; WANG, Z.; GALE, M.D. Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. **Current Biology**. v.5, n.7, p.737-739, 1995.

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, 1999. v.2, p.569-612.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, 473-497, 1962.

NEDEL, J.L.; ASSIS, F.N. de; CARMONA, P.S. A planta de arroz: morfologia e fisiologia. In: PESKE, S.T.; NEDEL, J.L.; BARROS, A.C.S.A.B. (Eds.) **Produção de arroz irrigado**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1998, p.11-66.

NIIZEKI, H.; OONO, K. Induction of haploid rice plant from anther culture. **Proc.Jpn.Acad**, v.44, p.554-557, 1968.

NISHI, T.; MITSUOKA, S. Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant. **Jpn, J. Genet.**, v.44, p.341-346, 1969.

OKA, H.K.; MORISHIMA, H. Wild and cultivated rice. In: MATSUO, T.; FUSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. (Eds.). **The Science of the Rice Plant**, v.3, Genetics. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. Chap. 3, p.88-111.

OZAWA, K.; KAWAHIGASHI, H.; KAYANO, T.; OHKAMA, Y. Enhancement of regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) calli by the integration of the gene involved in regeneration ability of the callus. **Plant Science**, v.165, p.395-402, 2003.

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.

PENG, X.X.; YAMAUCHI, M. Ethylene production in rice bronzing leaves by ferrous iron. **Plant Soil**, v.149, n.2, p.227-234, 1993.

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-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1999, p.569-611.

PONNAMPERUMA, F.N. The chemistry of submerged soils. **Advances in Agronomy**, v.4, p.29-96, 1972.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. Lavras: Ed. UFLA, 2008. 464 p.

QUIMIO, C.A.; ZAPATA, F.J. Diallel analysis of callus induction and green-plant regeneration in rice anther culture. **Crop Science**, v.30, p.188–192, 1990.

RAINA, S.K. Doubled haploid breeding in cereals. **Plant Breeding**, v.16, p.141–186, 1997.

RAINA, S.K.; ZAPATA, F.J. Enhanced anther culture efficiency of indica rice (*Oryza sativa* L.) through modification of the culture media. **Plant Breed**, v.116, p.305–315, 1997.

RATERING, S.; SCHNELL, S. Localization of iron-reducing activity in paddy soil by profile studies. **Biogeochemistry**, v. 48, p.341–365, 2000.

RONG, N.; AUSMAN, L.M.; NICOLOSI, R.J. γ -Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. **Lipids**, v.32, n.3, p.303-309, 1997.

SAHRAWAT, K.L. Iron toxicity in Wetland rice and role of other nutrients. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, p.1471-1504, 2004.

SANTOS, E. K. dos. **Totipotência Celular e Cultura de Tecidos Vegetais**. In: FREITAS, L. B. de; BERED, F. (Eds.). **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2003. p. 415-444.

SHEN, J.; FANG, L.M.; QUAN, C.; HUA, Z.Z. Improving rice by anther culture. **Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement**. China: Science Press, 1983. P.183-205

SILVA, T.D. Indica rice anther culture: can the impasse be surpassed? **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.100, p.1–11, 2010.

SNAPE, J.W. Doubled haploid breeding: theoretical basis and its practical applications. In: MUJEEB-KAZI, A.Y.; SITCH, L.A. **Review of advances in plant biotechnology, 1985-1988**. Manila: IRRI, 1989, p.19-30.

SRIPICHITT, P.; OZAWA, T.; OTANI, M.; SHIMADA, T.; Improved method for anther culture of an indica rice cultivar of Thailand. **Plant Production Science**, v.3, n.3, p.254–256, 2000.

SUNDERLAND, N. Strategies in the improvement of yields in anther culture. In: **Proceedings of a Symposium on Plant Tissue Culture**. Beijing: Science Press, 1978. p.65-86.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TALEBI, R.; RAHEMI, M.R.; AREFI, H.; NOUROZI, M.; BAGHERI, N. In vitro plant regeneration through anther culture of some Iranian local rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.10, n.12, p.2056–2060, 2007.

TAKEDA, S.; MATSUOKA, M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. **Nature Reviews Genetics**, v.9, p.444-457, 2008.

TANAKA, A., YOSHIDA, S. Nutritional disorders of the rice plant. In: **Their method of identification, in Rice and Problem Soils in South and Southeast Asia**. Philippines: The International Research Institute, 1972. p.1–51.

TERRES, A. L.; GALLI, J.; FAGUNDES, P. R. R.; MACHADO, M. O.; MAGALHÃES JR., A. M. DE; MARTINS, J. F.; NUNES, C. D. M.; FRANCO, D. F.; AZAMBUJA, I. H. V. **Arroz irrigado no Rio Grande do Sul: generalidades e cultivares**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1998. 58p. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 14).

TSAY, H.S.; CHEN, L.J. The effects of cold shock and liquid medium on callus formation in rice anther culture. **Agricultural Research**, v.33, p.24-29, 1984.

TSAY, H.S.; TENG, Y.C.; LAI, P.C.; CHI, N.C. The culture of rice anthers of japonica x indica crosses. In: FUJIWARA, A. (Ed.). **Plant tissue culture**. Tokio: Maruzen, 1981. p.561-562.

VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. **Journal. Plant Physiology**, v.128, p.193-218, 1987.

VEERARAGHAVAN, R. A study on the comparison of anther culture response in different varieties of rice, *Oryza sativa* subspecies indica. MSc thesis, University of Colombo, 2007.

VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 633p.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L.A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.1184-1192, 2008.

XIA, M.; LING, W.H.; MA, J.; KITTS, D.; ZAWISTOWSKI, J. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein e deficient mice. **Journal of Nutrition**, v.133, n.3, p.744-751, 2003.

YAMAUCHI M., PENG X.X. Iron toxicity and stress-induced ethylene production in rice leaves. **Plant and Soil**, v.173, p.21–28, 1995.

YAN, J.; XUE, Q.; ZHU, J. Genetic studies of anther culture ability in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.45, p.253–258, 1996.

YU, J.; HU, S.; WANG, J.; WONG, G.K.; LI, S.; LIU, B.; DENG, Y.; DAI, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; CAO, M.; LIU, J.; SUN, J.; TANG, J.; CHEN, Y.; HUANG, X.; LIN, W.; YE, C.; TONG, W.; CONG, L.; et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. Ssp. *Indica*). **Science**, Washington, v.296, p.79-91, 2002.

ZAPATA-ARIAS, F.J. Laboratory protocol for anther culture techniques in rice. In: MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K.J.; FOSTER, B.P.; SZAREJKO, I. (Eds.). Doubled

haploid production in crop plants, a manual. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. P.109-116.

ZHANG, C.; QIFENG, C. Genetic studies of rice (*Oryza sativa* L.) anther culture response. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 34, p.177–183, 1993.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD C. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.849-868, 2002.

3. CAPITULO II

RESPOSTA DIFERENCIAL AO FERRO DE DUAS CULTIVARES DE ARROZ *IN VITRO*

3.1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura de grande importância mundial, principalmente por constituir uma fonte básica na alimentação humana. Diversos fatores influenciam a produtividade da cultura, dentre eles podemos destacar o excesso de ferro presente em solos inundados, que prejudica a absorção de diversos nutrientes pela planta e conseqüentemente reduz a produção.

O arroz é cultivado de duas formas, sequeiro e irrigado. A maior parte do arroz cultivado no Brasil é do tipo irrigado. No entanto, o alagamento do arroz irrigado causa acidificação do solo na qual diminui o oxigênio disponível, tornando o ambiente anóxico e bastante redutor. O ferro, que em ambiente aeróbico e de pH neutro encontra-se quelado na matéria orgânica do solo na forma Fe^{+3} , é reduzido a forma íons férrico (Fe^{+2}), a qual é mais solúvel e sendo assim, mais facilmente absorvido pelas raízes das plantas (PONNANPERUMA, 1972). O aumento da concentração de Fe^{+2} pode levar a uma absorção excessiva e a toxidez por ferro, que rapidamente é acumulado nas folhas (SAHRAWAT, 2004). O pH crítico varia de 3 a 7, e a concentração de Fe^{+2} em locais com problemas de toxidez é de 300-500 mg L⁻¹ na solução do solo (OTTOW et al., 1982), chegando a acumular de 300 a 600 mg Kg nas folhas mais jovens (TANAKA et al., 1966).

O grau de dano causado pela toxidez de ferro varia de acordo com a cultivar, e com a época do plantio, o manejo da água e a época de encharcamento. Os principais sintomas observados são: o bronzeamento das folhas, que adquirem coloração amarelada ou alaranjada, principalmente as mais velhas; inclusões marrons nas folhas mais jovens, causadas pela deposição de ferro, as quais se espalham para as nervuras durante a progressão da toxidez; raízes se tornam marrons (SAHRAWAT, 2004); baixa taxa de crescimento e esterilidade das

espiguetas, causando diminuição da produtividade e, em casos mais severos, morte da planta (PONNAMPERUMA et al., 1955).

Em cultura de tecidos os meios de cultura fornecem todos os nutrientes necessários para o crescimento das plantas *in vitro*. O sucesso da cultura de tecidos vegetais como meio de propagação de plantas é muito influenciada pela natureza do meio de cultura utilizado (GEORGE et al., 2008).

O ferro é um micronutriente essencial para os meios de cultura de tecidos vegetais e pode ser fornecido a partir de sais ferrosos ou férricos. O ferro pode não estar disponível para as células das plantas, a menos que o pH do meio caia o suficiente para trazer íons livres na solução (GEORGE et al., 2008).

Duas fontes de ferro utilizadas em cultura de tecidos são o sulfato férrico e o EDTA férrico. O sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) é um sal higroscópico, sendo que os produtos comerciais contêm aproximadamente 20% de água. O etilenodiaminotetracético férrico ($\text{FeSO}_4 \cdot \text{EDTA}$) é obtido pela combinação de ácido etilenodiaminotetracético dissódico com nitrato férrico (BUDAVARI, 1996).

Em cultura de tecidos o EDTA é acrescentado em uma concentração equimolar de ferro, formando um composto Fe-EDTA (DALTON et al., 1983). A influência de diferentes agentes quelantes sobre o crescimento e morfogênese tem sido observado em cultura de tecidos (GEORGE et al., 2008).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar duas fontes de ferro (EDTA férrico e sulfato férrico) em concentrações diferentes em meios de cultura líquido e verificar seu efeito no desenvolvimento *in vitro* de duas cultivares de arroz (Nipponbare e BRS Atalanta).

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas – UFPel. Foram utilizadas sementes das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta. A cultivar Nipponbare foi utilizada neste trabalho como sendo tolerante a toxidez por ferro, enquanto a cultivar BRS Atalanta como sensível.

As sementes foram desinfestadas com álcool 70% por um minuto, logo após com cloreto de mercúrio 0,6%, também por um minuto. Posteriormente, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada.

A germinação das sementes foi realizada em meio MS/2 modificado (Anexo I) (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescidos de 20 g L⁻¹ de sacarose e 6,5 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,7. Foram usados tubos de ensaio para a germinação das sementes.

Após 10 dias, as plântulas foram transferidas para os tratamentos com ferro. Os tratamentos utilizados neste estudo foram compostos por duas fontes de Fe: EDTA férrico (FeSO₄.EDTA) e sulfato férrico(Fe₂(SO₄)₃). O meio de cultura MS original possui como fonte de ferro sulfato ferroso (FeSO₄.7H₂O) associado com Na₂EDTA, sendo a concentração na solução estoque de 0,9 mM de ferro. Esta concentração foi utilizada como testemunha para este trabalho. As demais concentrações foram de 5x e 10x a concentração testemunha (4,5 mM e 9,0 mM, respectivamente), totalizando doze tratamentos (tabela 1). Utilizou-se o meio de cultura MS líquido com 20 g L⁻¹ de sacarose. pH foi ajustado para 5,4.

Os meios de cultura foram autoclavados em Erlenmeyer por 20 minutos a 1 kgf cm⁻² de pressão. Os meios de cultura foram distribuídos em potes de prolipropileno em câmara de fluxo laminar. Anteriormente, estes potes passaram por processo de lavagem com água destilada, secos em temperatura ambiente, e foram colocados em luz ultravioleta por 20 minutos. As plântulas permaneceram no tratamento por 21 dias, sendo os meios de culturas renovados a cada sete dias.

Utilizou-se 20 plântulas por tratamento, sendo estão o delineamento experimental constituído por quatro repetições com cinco plântulas em cada. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso.

As variáveis analisadas foram: comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), número de folhas (NF), massa fresca de parte aérea

(MFPA), massa fresca de raiz (MFR), massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR).

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação múltipla de médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o programa estatístico SAS versão 8.0 (SAS, 2002).

Tabela 1 – Genótipos, fontes e concentrações de ferro dos doze tratamentos testados em arroz em meio de cultura líquido *in vitro*. FAEM/UFPeI-CGF, 2011.

Tratamentos	Genótipos	Fontes	Concentrações
1	Nipponbare	EDTA férrico	0,9 mM (N)
2	Nipponbare	EDTA férrico	4,5 mM (5x)
3	Nipponbare	EDTA férrico	9,0 mM (10x)
4	Nipponbare	Sulfato férrico	0,9 mM (N)
5	Nipponbare	Sulfato férrico	4,5 mM (5x)
6	Nipponbare	Sulfato férrico	9,0 mM (10x)
7	BRS Atalanta	EDTA férrico	0,9 mM (N)
8	BRS Atalanta	EDTA férrico	4,5 mM (5x)
9	BRS Atalanta	EDTA férrico	9,0 mM (10x)
10	BRS Atalanta	Sulfato férrico	0,9 mM (N)
11	BRS Atalanta	Sulfato férrico	4,5 mM (5x)
12	BRS Atalanta	Sulfato férrico	9,0 mM (10x)

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise de variância (tabela 2) foi possível verificar que para as fontes de variação genótipo e fonte de ferro, todas as variáveis foram diferentes estatisticamente. A única variável que teve diferença significativa em todas as fontes de variação foi o comprimento de parte aérea. A interação tripla entre os fatores foi significativa para CPA, CR, NF, MFPA E MSR.

Tabela 2 – Análise de variância para os fatores de variação (FV) genótipo (G), fonte (F) e concentração (C) de ferro e as interação entre esses fatores para as variáveis analisadas comprimento de parte aérea (CPA) e raiz (CR), número de folhas (NF), massa fresca de parte aérea (MFPA) e raiz (MFR) e massa seca de parte aérea (MSPA) e raiz (MSR). FAEM/UFPEl-CGF, 2011.

F.V.	G.L.	Quadrado Médio						
		CPA	CR	NF	MFPA	MFR	MSPA	MSR
G	1	411.78*	174.61*	5,51*	0,0246*	0,0037*	0,000781*	0,000067*
F	2	220.12*	25.15*	4,60*	0,0214*	0,0052*	0,001205*	0,000107*
GxF	2	46.55*	11.43 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	0,0012 ^{ns}	0,000080 ^{ns}	5,74.10 ^{-5ns}
C	1	73.82*	22.73*	0,68*	0,0021 ^{ns}	0,0017*	0,000003 ^{ns}	0,000023*
GxC	2	74.62 *	46.71*	0,21 ^{ns}	0,0004 ^{ns}	8,95.10 ^{-5ns}	0,000015 ^{ns}	6,9.10 ^{-6ns}
FxC	1	102.25*	40.64*	1,84*	0,0097*	0,0017*	0,000207 ^{ns}	0,000027*
GxFxC	2	34.49*	10.80*	0,45*	0,0055*	0,0014 ^{ns}	0,000178 ^{ns}	0,000021*
Erro	36	7.87	2.99	0,11	0,0006	0,0005	0.000101	0.000006
Total	47							
Cv (%)		17.44	22,78	10,66	26,21	37,61	47,80	32,37
M.G.		16.08	7,59	3,13	0,0974	0,0597	0,021	0,0077

* Existem diferenças significativas a 5% de probabilidade. ^{ns} Não existem diferenças significativas a 5% de probabilidade.

Para a interação dupla entre genótipo e fonte de ferro somente foi significativa para a variável CPA, enquanto que para a interação entre genótipo e concentração de ferro foi significativa para CPA e CR. A interação entre fonte e concentração de ferro somente não foi significativa para a variável MSPA. Desta forma verifica-se que o potencial do sulfato férrico em se combinar com outros micronutrientes, podendo prejudicar o desenvolvimento da plantas, e a estabilidade do EDTA devido a sua potencialidade de agente quelante, afetou pouco as variáveis avaliadas.

O tratamento com EDTA férrico 4,5 mM causou menos efeito no desenvolvimento da parte aérea da cultivar Nipponbare (23,75 cm) enquanto o maior

efeito foi observado no tratamento com sulfato férrico 9,0 mM na cultivar BRS Atalanta (7,37 cm) (Figura 1).

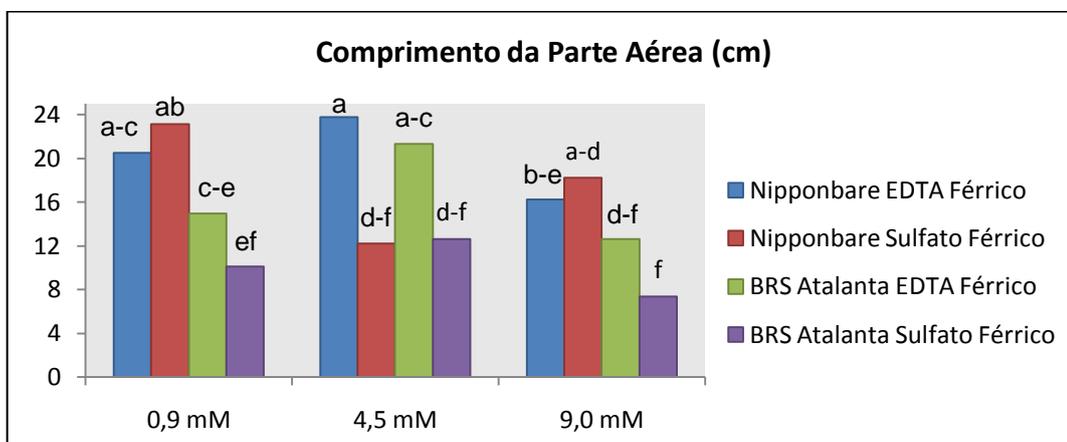


Figura 1 – Comparação de médias da variável comprimento de parte aérea das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro. FAEM/UFPel-CGF, 2011. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para a variável comprimento de raiz o tratamento que obteve o maior desenvolvimento de raiz foi sulfato férrico a 0,9 mM para a cultivar Nipponbare (12,32 cm). O menor desenvolvimento de sistema radicular foi observado para a cultivar BRS Atalanta (1,93 cm) para o tratamento com sulfato férrico 9,0 mM (Figura 2).

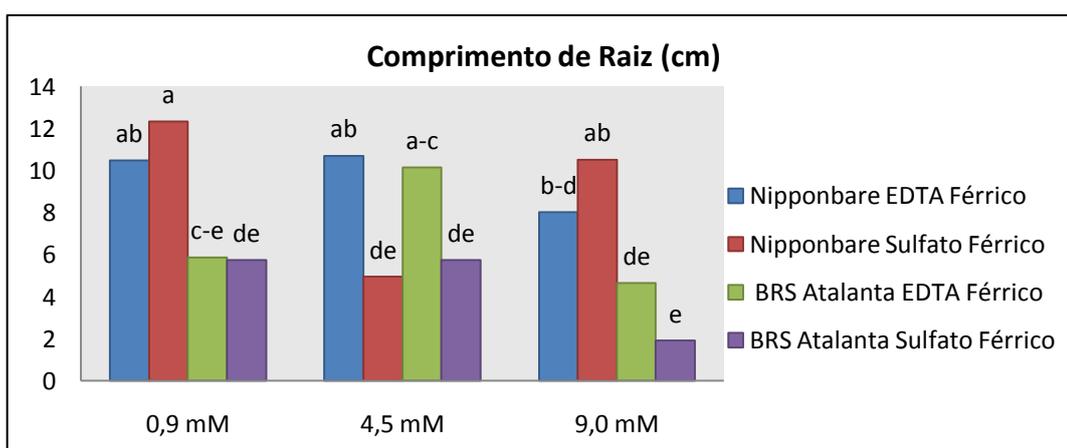


Figura 2 – Comparação de Médias da variável comprimento raiz das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro. FAEM/UFPel-CGF, 2011. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

O tratamento com sulfato férrico 9,0 mM afetou significativamente a cultivar BRS Atalanta em relação ao número de folhas (2,27). O menor efeito foi para a cultivar Nipponbare com EDTA férrico a 4,5 mM (4,25) (Figura 3).

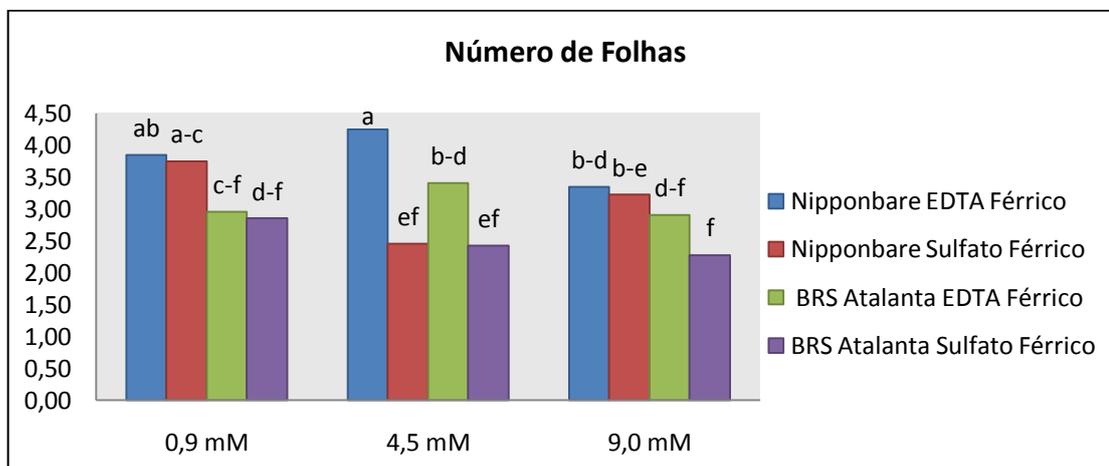


Figura 3 – Comparação de Médias da variável número de folhas das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro. FAEM/UFPel-CGF, 2011. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para a cultivar Nipponbare o menor efeito sobre a massa fresca de parte aérea foi no tratamento com 4,5 mM de EDTA férrico (0,19g), diferenciando significativamente dos demais tratamentos. Quanto a cultivar BRS Atalanta, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos testados (Figura 4).

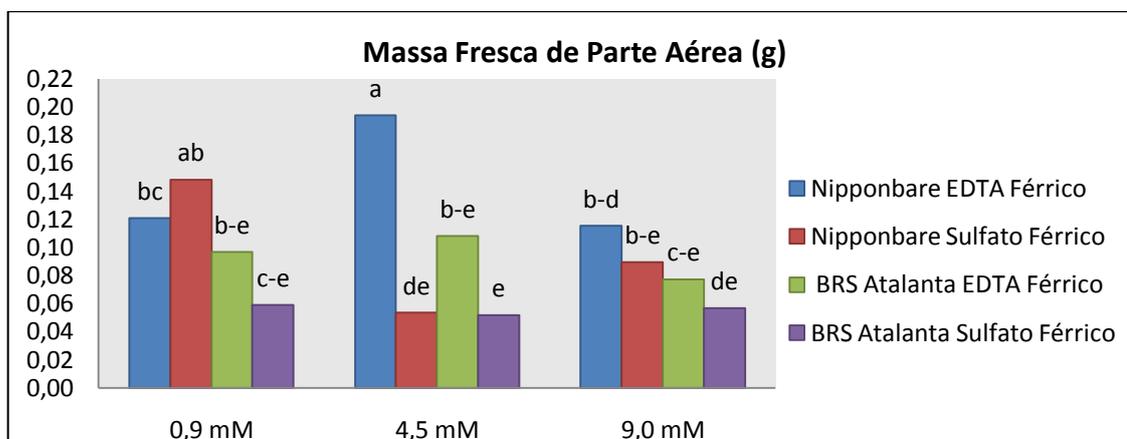


Figura 4 – Comparação de Médias da variável massa fresca de parte aérea das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro. FAEM/UFPel-CGF, 2011. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em relação a massa fresca de raiz o tratamento 9,0 mM de sulfato férrico fez com que a cultivar BRS Atalanta apresentasse a menor média (0,02), no entanto este efeito não foi significativamente diferente dos demais tratamentos (Figura 5).

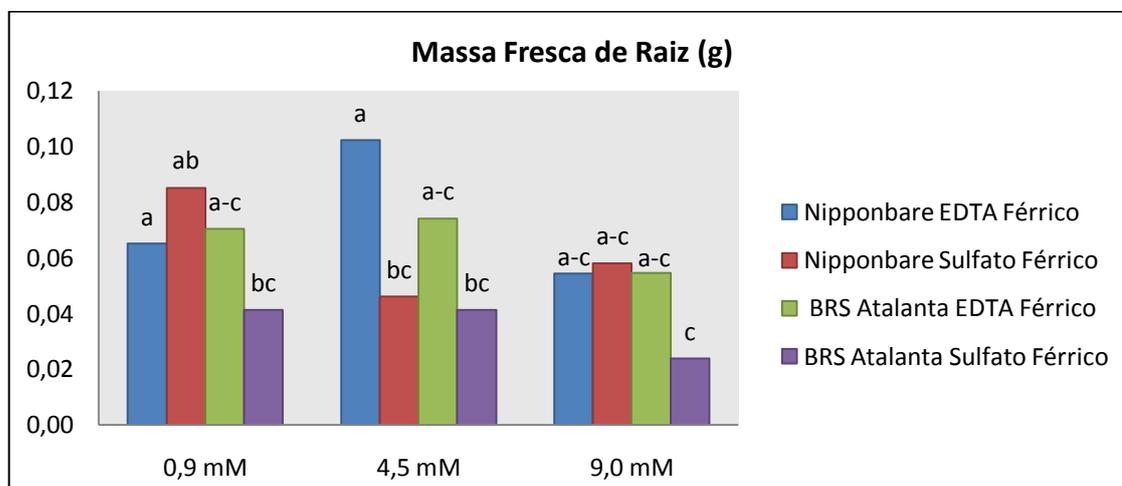


Figura 5 – Comparação de Médias da variável massa fresca de raiz das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro. FAEM/UFPel-CGF, 2011. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para as variáveis massa seca de parte aérea (Figura 6) e raiz (Figura 7) os tratamentos EDTA férrico 4,5 mM foi significativamente diferente do tratamento com 9,0 mM para as cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, respectivamente.

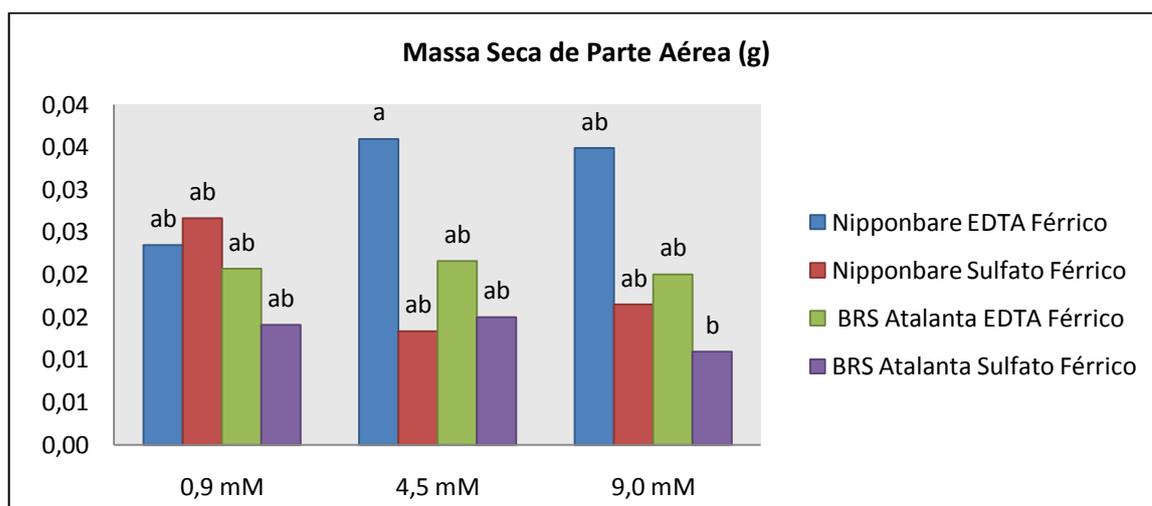


Figura 6 – Comparação de Médias da variável massa seca de parte aérea das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro. FAEM/UFPel-CGF, 2011. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

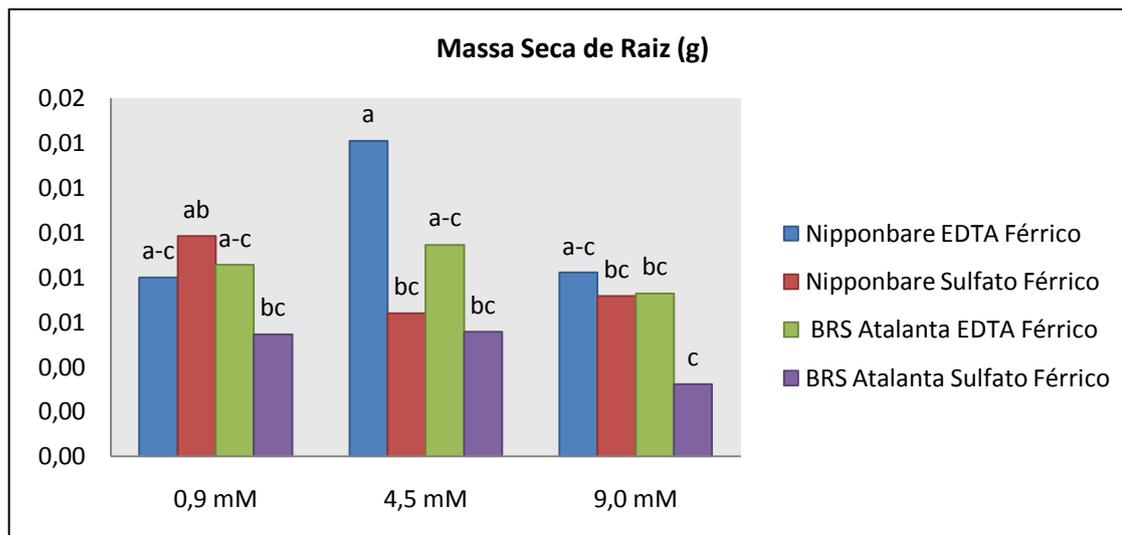


Figura 7 – Comparação de Médias da variável massa seca de raiz das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, nas diferentes fontes e concentrações de ferro. FAEM/UFPel-CGF, 2011. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em 1956 alguns pesquisadores já haviam começado a utilizar o EDTA em meio de cultura em experimentos com tabaco no meio de cultura MS conforme metodologia por Murashige e Skoog (1962). A disponibilidade de ferro aumentou quando foi adicionado Fe-EDTA ao meio. Sendo assim, os complexos Fe-EDTA passaram a ser reconhecidos como agentes contribuidores no desenvolvimento de diversos tipos de plantas em meio de cultura (NITSCH, 1969).

Os compostos quelantes, como o EDTA, em concentrações baixas exercem efeitos sobre o crescimento das plantas, que são semelhantes aos produzidos por auxinas (BURSTROM, 1960).

A cultivar BRS Atalanta é considerada em algumas situações de cultivo, sensível a toxidez ferro, na fase vegetativa (EMBRAPA, 2005). Neste trabalho sendo comparada com a cultivar Nipponbare, ela também mostrou-se mais sensível aos efeitos de toxidez ao ferro. Em trabalho realizado a campo em áreas com e sem toxidez de ferro, mostrou que a cultivar BRS Atalanta diminui o peso de matéria seca (g) da folha bandeira e da panícula em diferentes estádios de desenvolvimento do grão quando submetidos à toxidez (SOUZA et al., 2008).

Em relação a cultivar Nipponbare, foi possível verificar um menor efeito no crescimento das plantas aos tratamentos com ferro, principalmente na concentração de 4,5 mM de EDTA férrico. Desta forma, os resultados indicam que uma

concentração 5x maior que a utilizada no meio MS não prejudica o crescimento desta cultivar, sendo até em algumas variáveis o crescimento superior que nas demais concentrações (CPA, NF, MFPA, MSPA e MSR). No entanto, na literatura é possível verificar discordância em relação a classificação da cultivar Nipponbare quanto a toxidez por ferro. Wan et al. (2003) em trabalho realizado em sistema hidropônico, considerou a cultivar tolerante a toxidez por ferro. Entretanto, sob o mesmo sistema de cultivo, porém com o dobro da dose de ferro, a cultivar obteve comportamento classificado como sensível (BRESOLIN, 2010).

Os resultados contrastantes relatados indicam a necessidade de fazer novos estudos utilizando mais cultivares e outras fontes e concentrações de ferro, para assim uma melhor caracterização quanto a toxidez de ferro em arroz cultivado *in vitro*.

3.4. CONCLUSÃO

A concentração de 4,5 mM de EDTA férrico foi o que menos afetou o desenvolvimento das plantas de arroz em cultivo *in vitro*.

A cultivar Nipponbare foi mais tolerante aos tratamentos de ferro utilizados.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRESOLIN, A.P.S. **Caracterização morfológica e análise da expressão gênica em arroz (*Oryza sativa* L.) sob estresse por ferro.** 2010. 144f. Tese (Doutorado em Agronomia – Fitomelhoramento) Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

BUDAVARI, S. **The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.** Whitehouse Station, NJ: Merck, 1996.

BURSTROM, H. Influence of iron and gibberelic acid on the light sensitivity of roots. **Plant Physiology**, v.13, p.597-615, 1960.

DALTON, C.C.; IQBAL, K.; TURNER, D.A. Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. **Physiologia Plantarum**, v.57, p.472-476, 1983.

ALONÇO, A. dos S.; SANTOS, A.B. dos; GOMES, A. da S.; GRÜTZMACHER, A. D.; ANDRES, A.; PRABHU, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A.M.de; TERRES, A.; FERREIRA, C.M.; NUNES, C.D.; et al. **Cultivo do arroz irrigado no Brasil.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. (Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção 3).

GEORGE, E.F.; HALL, A.M.; DE KLERK, G.J. **Plant Propagation by Tissue Culture.** 3ed. Netherlands: Springer, 2008. 479p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, 473-497, 1962.

NITSCH, J.P. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. **Phytomorphology**, v.19, p.389-404, 1969.

OTTOW, J.C.G.; BENCKISER, G.; WATANABE, I. Iron toxicity of rice as a multiple nutritional soil stress. **Trop Agric. Res. Ser.**, v.15, p. 167-179, 1982.

PONNANPERUMA, F.N.;BRADFIELD, R.; PEECH, M. Physiological disease of rice attributable to iron toxicity. **Nature**, 1955.

PONNANPERUMA, F.N. The chemistry of submerged soils. **Advances in Agronomy**, v.24, p.29-96, 1972.

SAHRAWAT, K.L. Iron toxicity in Wetland rice and role of other nutrients. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, p.1471-1504, 2004.

SOUZA, T.M.; COLARES, D.; BARETTA, D.; SILVEIRA, S.; MEZZALIRA, I.; TESSMANN, E. W.; ALMEIDA, A.M de; CARVALHO, F.I.F.de; COSTA de OLIVEIRA, A. **Efeito do Fe²⁺ sobre parâmetros de crescimento de genótipos de arroz em condição de campo**. In: XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2008, Pelotas.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS) version 8.0 – getting started with the SAS learning edition. (SAS Institute Inc.: Cary, NC), 2002.

TANAKA, A.R.; NAVASERO, A. Some mechanisms involved in the development of iron toxicity symptoms in the rice plant. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 12, p. 158-164, 1966.

WAN, J.; ZHAI, H.; WAN, J.; IKEHASHI, H. Detection and analysis of QTLs for ferrous iron toxicity tolerance in rice, *Oryza sativa* L. **Euphytica**, v.131, p.201-206, 2003.

4. CAPITULO III

OBTENÇÃO DE DUPLO-HAPLÓIDES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) UTILIZANDO A TÉCNICA DE CULTURA DE ANTERAS

4.1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) possui papel fundamental na alimentação humana, fazendo parte da dieta básica de mais da metade da população mundial (KHUSH, 2001).

O principal método de cultivo de arroz na região Sul do Brasil é o sistema irrigado (CONAB, 2010). No entanto, esse sistema alaga o solo fazendo com que o oxigênio presente seja rapidamente esgotado pela respiração dos microrganismos e raízes de plantas. Desta forma, há ocorrência de redução de óxidos e hidróxidos de ferro na qual resulta no acúmulo de elevadas concentrações de ferro reduzido (Fe^{2+}) no solo, que pode ocasionar problemas de toxidez nas plantas (RATERING; SCHNELL, 2000).

Diante da importância da cultura do arroz, os centros de pesquisa através de programas de melhoramento desenvolvem periodicamente novas cultivares de arroz, visando atingir maior produtividade, como também resistência a fatores bióticos e abióticos (BERTAN, 2005). Sendo assim, o melhoramento genético de plantas surge como uma alternativa para ser utilizada para amenizar problemas no cultivo do arroz, como por exemplo, a toxicidade de ferro. A utilização de cultivares tolerantes a toxicidade por ferro é uma alternativa eficiente para evitar os efeitos da toxicidade por ferro em lavouras de arroz irrigado, cujos solos apresentam histórico de ocorrência do problema (MAGALHÃES Jr., 2005).

Entre as ferramentas biotecnológicas existentes, a cultura de tecidos é umas das que mais tem obtido resultados práticos e de impacto para o melhoramento vegetal (SANTOS, 2003). Um dos ramos da cultura de tecidos é a cultura de anteras, na qual, pode-se obter linhagens puras em apenas uma geração. Através da cultura de anteras é possível desenvolver rapidamente linhas homozigotas, aumentando a eficiência de seleção (SILVA, 2010).

A homozigose alcançada mediante a haploidização é uma interessante ferramenta para o melhoramento vegetal. Uma das vantagens no sistema de duplo-haplóide é a diminuição no tempo necessário para o estabelecimento de novas cultivares. Este sistema representa para os programas de melhoramento uma economia não só em relação ao tempo como também quanto aos custos de produção de novas linhagens (MORAES-FERNANDES, 1999). No processo convencional de melhoramento genético, após cruzamento intervarietal, são necessárias de sete a nove gerações para alcançar a homozigose, sendo então um processo demorado e trabalhoso (SANTOS, 2003).

Os determinantes críticos do sucesso da cultura e da produção de plantas são as condições fisiológicas da planta doadora, o genótipo, o tipo de pré-tratamento, a fase de desenvolvimento dos micrósporos, as condições de temperatura e luz do ambiente de incubação das anteras e desenvolvimento de gemas e a presença ou ausência de reguladores de crescimento suplementares no meio (ASAD et al. 2001; GREG; ROBERTA, 1991; MANTELL et al., 1994).

A maior eficiência da técnica de cultura de anteras em arroz é observada para subespécies japônica do que em relação a subespécies indica (KUSH; BRAR, 2002; RAINA, 1997). Para cultivares japônicas a cultura de anteras vem sendo a muito tempo utilizada como ferramenta em larga escala para o desenvolvimento de novas cultivares (BRAR; KUSH 2006; KUSH; BRAR 2002). No entanto, devido a baixa resposta de regeneração de genótipos do tipo indica, a técnica vem sendo otimizada para que se tenha melhores resultados (HE et al. 2006).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo obter plantas duplo-haplóides através da técnica de cultura de anteras, testando diferentes meios de cultura para a indução de calos e assim verificar a eficiência da técnica em genótipos provenientes de cruzamentos japônica x indica, indica x indica e de duas cultivares de arroz contrastantes quanto a toxidez ao ferro.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Centro de Genômica e Fitomelhoramento (UFPel), Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (UFPel) e Embrapa Clima Temperado Estação Terras Baixas (ETB) no período de agosto de 2009 a setembro de 2010.

Foram realizados três experimentos com material botânico diferente. No entanto a germinação, a coleta, o pré-tratamento, a desinfestação e os meios de cultura para regeneração de plantas e enraizamento foram os mesmos para os três trabalhos.

Os experimentos não foram realizados simultaneamente, sendo a distinção de experimento 1, 2 e 3 a ordem cronológica da realização destes.

4.2.1 Germinação

As sementes do primeiro experimento foram previamente tratadas com fungicida Vitavax – Tiran 200 Sc, princípio ativo carboxin/thiran na qual calcula-se 250 mL do produto para 100 Kg de sementes. Para os demais experimentos o tratamento da semente foi realizado com hipoclorito de sódio 1% por 24 horas.

Após os tratamentos, as sementes foram acondicionadas em caixas Gerbox com papel germinador e mantidas por sete dias em estufa incubadora BOD à 25°C. Após, as sementes foram transplantadas para vasos de oito litros contendo solo e mantidas em casa-de-vegetação.

4.2.2 Coleta do material

As panículas foram coletadas, entre 8:30 e 9:30h, de afilhos cuja distância entre as aurículas da folha bandeira e da penúltima folha encontrava-se entre 5 a 8 cm. As anteras nesse estágio apresentavam coloração amarelo-esverdeada, contendo grãos de pólen em sua maioria no estágio uninucleado (LENTINI et al., 1997).

4.2.3 Pré-tratamento das anteras

As panículas coletadas foram identificadas, lavadas com água destilada e acondicionadas em sacos plásticos. Posteriormente, foram armazenadas em geladeira, a aproximadamente 8°C, por um período de sete a dez dias.

4.2.4 Desinfestação do material

A desinfestação do material foi realizada passados os dias de tratamento no frio, com as soluções de álcool 70% e hipoclorito de sódio 5% na qual foi adicionado detergente líquido (3 gotas para cada 100 mL) e ácido clorídrico (HCL 1 N – 5 gotas para cada 100 mL).

Primeiramente, foi realizada a lavagem das panículas com álcool 70% por um minuto, após rápida lavagem com água destilada esterilizada. Posteriormente, foi acrescentada a solução de hipoclorito na qual foi mantida por sete minutos com agitação constante. Após, foram realizadas quatro lavagens com água destilada esterilizada. Todo este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

4.2.5 Incubação das anteras “*in vitro*”

Após a desinfestação do material, conforme descrito no item anterior as anteras foram removidas das espiguetas, com o auxílio de estilete, bisturi e pinça de ponta fina esterilizadas.

Em todos os experimentos, as anteras foram inoculadas em frascos de vidros de 200 mL, contendo cerca de 20 mL de meio de cultura líquido, e mantidas em estufa, no escuro, a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, por um período de 30 a 60 dias. Foram inoculadas 60 anteras por frasco.

Os meios de cultura utilizados variaram de composição em função de cada experimento.

4.2.6 Meio de cultura para regeneração de gemas, multiplicação e enraizamento de plantas

Em todos os experimentos realizados os meios utilizados foram os mesmos para a regeneração de gemas, multiplicação e enraizamento de plantas. O meio

mineral básico de MS modificado (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Anexo 1) foi usado em todos os meios de cultura, sendo o único diferencial o uso e tipo de reguladores e a quantidade de sacarose acrescentados ao meio.

No meio de indução de gemas foi acrescentado sacarose 30 g L^{-1} , mio-inositol 100 mg L^{-1} , e como reguladores de crescimento ANA 1 mg L^{-1} e cinetina 4 mg L^{-1} .

Os calos na qual formaram gemas verdes foram transferidos para o meio de multiplicação, com o objetivo de se obter mais amostras de plântulas para o estudo. A formação de gemas ocorreu entre 20-45 dias.

No meio de multiplicação foi acrescentado 3 mg L^{-1} de 6-benzilaminopurina (BAP) e sacarose (30 g L^{-1}). As plantas permaneceram de 30 a 45 dias neste meio de cultura. Para o enraizamento, foi adicionado ao meio MS, sacarose 8% (80 g L^{-1}), não sendo utilizado reguladores de crescimento. O enraizamento ocorreu entre 20-30 dias.

Os frascos com calos para a regeneração de gemas, multiplicação e enraizamento de plantas, foram incubados com fotoperíodo de 8 horas de escuro e 16 horas de luz e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, em sala de crescimento no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica – UFPel no primeiro experimento e nos demais sob as mesmas condições no Laboratório de Hidroponia e Duplo-haplóides do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF).

4.2.7 Aclimação e transferência das plantas para o solo

Após a formação do sistema radicular, as plantas passaram por um processo gradativo de aclimatização. Inicialmente, as plantas foram retiradas do meio de cultura e suas raízes foram lavadas em água corrente. Logo após, as plantas foram colocadas em frascos de 300 mL contendo cerca de 40 mL de água destilada. Os frascos foram tampados com papel alumínio e retornaram a sala de crescimento por sete dias (Figura 2 A). Após, as plantas foram levadas para serem transferidas para recipientes plásticos contendo solo (Figura 2 B). Os mesmos foram tapados com outro recipiente para continuar o processo de aclimatização por mais sete dias. Esta etapa foi realizada em casa de vegetação da Embrapa Clima Temperado – Estação Terras Baixas.

4.2.8 Avaliação dos calos e da regeneração das plantas

Foram avaliados o número de calos formados e o número de plantas verdes e albinas de cada experimento.

As avaliações dos calos foram efetuadas no momento da transferência para o meio de multiplicação de plantas. Contou-se o número de calos formados e obteve-se a porcentagem de calos para cada genótipo nos diferentes experimentos.

Para avaliar a regeneração das plântulas de arroz, contou-se o número de calos com plantas verdes e albinas, também obtendo-se a porcentagem para cada experimento.

A eficiência do processo, ou seja, a eficiência da cultura de anteras é calculada através do número de plantas verdes regeneradas pelo número de anteras inoculadas.

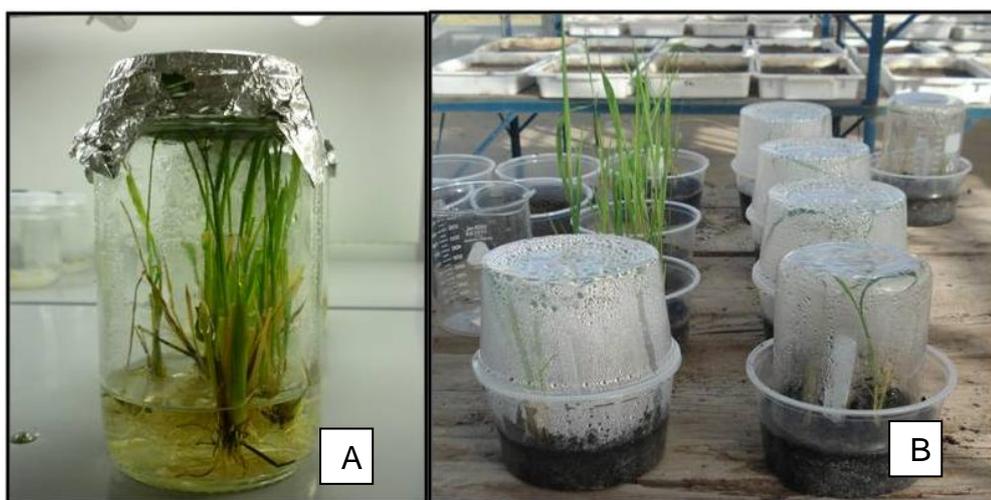


Figura 1 – A) Plantas de arroz obtidas pela técnica de cultura de anteras na primeira fase de aclimatização; B) Segunda fase de aclimatização em casa de vegetação. FAEM/UFPel-CGF, 2011.

4.2.9 Experimento 1

Foram utilizadas anteras em geração F_1 provenientes dos cruzamentos das cultivares Nipponbare X BRS Atalanta e BRS Firmeza X Epagri 107.

A cultivar Nipponbare é da subespécie japônica e usada como tolerante a toxidez por ferro neste trabalho. A cultivar BRS Atalanta é da subespécie indica e classificada como sensível a toxidez por ferro.

O outro cruzamento, BRS Firmeza X Epagri 107, as duas cultivares são da subespécie indica e classificadas como sensível e resistente a toxidez por ferro, respectivamente.

Para cada cruzamento foram realizadas nove épocas de plantio, com o espaçamento de sete dias entre cada época. Cada balde continha cinco plantas, sendo em cada época transplantadas 25 plantas, totalizando nas nove épocas 200 plantas por cruzamento (Figura 3). Neste experimento as plantas foram mantidas em casa de vegetação da Universidade Federal de Pelotas, até atingirem o estágio ideal de coleta como descrito no item 4.2.2.

Os meios utilizados neste experimento foram N₆ (CHU et al., 1975) (Anexo II) e NL (LENTINI et al., 1994) (Anexo III). Em todos meios de cultura a maltose foi utilizada como fonte de carboidrato (50 g L⁻¹). Na tabela 1 estão descritos os meios utilizados e os reguladores de crescimento.

Tabela 1 - Meios de cultura e reguladores de crescimento utilizados no experimento 1 com anteras de arroz, para a indução de formação de calos. FAEM/UFPel-CGF, 2011.

Meio de cultura 1	Meio de cultura 2	Meio de cultura 3
Meio N ₆ (CHU et al., 1975)	Meio NL (LENTINI et al., 1994)	Meio NL (LENTINI et al., 1994)
2,4 – D (0,5 mg mL ⁻¹)	2,4 – D (0,5 mg mL ⁻¹)	ANA (4 mg mL ⁻¹)
Picloran (0,07 mg mL ⁻¹)	Picloran (0,07 mg mL ⁻¹)	Cinetina (1 mg mL ⁻¹)
Cinetina (1 mg mL ⁻¹)	Cinetina (1 mg mL ⁻¹)	

2,4 – D: 2,4 diclorofenoxiacético; ANA: ácido naftaleno acético



Figura 2 – Plantas dos cruzamentos Nipponbare x BRS Atalanta nas diferentes épocas de semeadura utilizadas no primeiro experimento. Casa de Vegetação UFPel. FAEM/UFPel-CGF, 2011.

4.2.10 Experimento 2

Como material botânico para o segundo experimento, foram utilizadas sementes das cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, a fim de verificar a resposta a cultura de anteras das cultivares escolhidas para o cruzamento Nipponbare x BRS Atalanta. Foram semeadas em uma única época 20 plantas de cada cultivar em casa-de-vegetação pertencente a EMBRAPA - Estação Terras Baixas.

Este experimento foi realizado após obtido os resultados do primeiro experimento. Desta forma, optou-se por utilizar somente o meio de cultura NL (Anexo III), acrescidos de 4 ml L⁻¹ de ANA, 1 ml L⁻¹ de Cinetina e 50 g L⁻¹ de maltose.

4.2.11 Experimento 3

Neste experimento utilizou-se somente o cruzamento Nipponbare x BRS Atalanta. Foram utilizadas sementes em geração F₂. O transplante das plantas foi realizado em cinco épocas, sendo utilizados oito baldes por época com quatro plantas em cada, totalizando 160 plantas (Figura 4). As plantas permaneceram até o estágio ideal para coleta em casa-de-vegetação (EMBRAPA - Estação Terras Baixas).

O meio de cultura utilizado foi o NL (Anexo III), acrescidos de 4 ml L⁻¹ de ANA, 1 ml L⁻¹ de Cinetina e 50 g L⁻¹ de maltose.



Figura 3 – Plantas dos cruzamentos Nipponbare x BRS Atalanta utilizadas no segundo experimento. Casa de Vegetação Embrapa. FAEM/UFPel-CGF, 2011.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de calos através da cultura de anteras ocorreu entre trinta e sessenta dias em todos os experimentos.

O número de anteras inoculadas (Tabela 2) nos experimentos não foi igual devido à disponibilidade de material e também por eventuais problemas de contaminação, razão pela qual alguns frascos tiveram que ser descartados.

Os trabalhos realizados com o cruzamento entre as cultivares BRS Firmeza X Epagri 107 não obtiveram resultados positivos para a técnica de cultura de anteras. Isto pode ser explicado pelo fato de que as duas cultivares são da subespécie indica, onde são relatadas baixas frequências de formação de calos e regeneração de plantas (KHATUN et al., 2010; BAGHERI; JELODAR, 2008; JAVED et al., 2007).

O meio 2 testado no experimento 1 para o cruzamento BRS Firmeza X Epagri 107 não formou nenhum calo. O meio de cultura 1 e 3 formaram calos, apresentando uma taxa de regeneração de 0,23% e 1,4%, respectivamente. No entanto, esses calos não regeneraram plantas.

Em relação ao cruzamento Nipponbare X BRS Atalanta, no experimento 1, o meio de cultura 3 obteve o maior percentual de formação de calos de todos os demais experimentos (34,28%). A segunda maior taxa de regeneração foi seguida pelo meio de cultura 2 (13,57%) e meio de cultura 1 (7,71%).

No experimento 2, na qual foram avaliadas as cultivares Nipponbare e BRS Atalanta, a taxa de regeneração foi maior para a cultivar Nipponbare (2,06%) do que para a BRS Atalanta (0,06%). Estes resultados podem ser explicados pelo fato da cultivar Nipponbare ser da subespécie japônica e a BRS Atalanta da subespécie indica.

Em relação à formação de plantas verdes (Tabela 3), o cruzamento Nipponbare X BRS Atalanta no experimento 1 com o meio de cultura 1, apresentou a maior taxa de eficiência da técnica de cultura de anteras (0,11%), seguido da cultivar Nipponbare (0,09%) e Nipponbare X BRS Atalanta no experimento 1 com o meio de cultura 2 (0,08%).

A cultivar BRS Atalanta no experimento 2 teve uma taxa de regeneração de calos de 0,06%, porém sem formação de plantas.

O albinismo, um dos grandes problemas encontrados na cultura de anteras também foi observado neste trabalho. Os maiores índices ocorreram no experimento 1 meio de cultura 1 (0,13%), seguido do experimento 1 meio de cultura 2 (0,11%) e experimento 1 meio de cultura 3 (0,06%). No primeiro experimento, os híbridos Nipponbare x BRS Atalanta em todos os meios de cultura testados formaram mais plantas albinas do que verdes. Entretanto, nos experimentos 2 e 3 o contrário foi observado. A ocorrência deste fenômeno varia com a espécie, o genótipo, a composição do meio de cultura e com a temperatura de incubação (RAINA, 1989). Em geral, as plantas albinas contêm partes do genoma do plastídeo excluídas, variando com a espécie de gramínea (ZUBKO; DAY, 2002; HARADA, 1991). O tamanho e a localização das deleções diferem entre plantas. Os resultados indicam que em algumas plantas albinas ocorre a ausência da região codificadora para o gene *rbcL* no genoma do plastídeo. No entanto, mais estudos detalhados são necessários para elucidar a causa real do albinismo.

Levando em consideração o experimento 1, o qual foram testados diferentes reguladores de crescimento, foi possível verificar que o meio de cultura 1 (N₆) foi menos eficiente na formação de calo, mas em relação a regeneração de plantas verdes foi mais eficiente que os demais meios de cultura. Trabalhos demonstram que calos formados com o uso de ANA tem maior capacidade de regeneração do que calos formados na presença de 2,4 – D (HUANG et al., 1981). Zapata et al. (1983) relataram que o uso do regulador 2,4 – D acelera a produção de gemas em arroz e aumenta a síntese de citocinina endógena quando utilizada durante a formação de calos, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho.

O genótipo e a composição do meio de cultura são de primordial importância para obter plântulas verdes na cultura *in vitro* (KHANNA; RAINA 1998; BISHONI et al., 2000). Desta forma, a escolha por repetir o experimento com os híbridos de Nipponbare x BRS Atalanta se deve aos resultados obtidos no primeiro experimento. A escolha do meio de cultura NL para o terceiro experimento, foi devido a sua alta resposta de formação de calos. Foi levado em consideração o período em que o experimento 1 foi realizado (agosto 2009 a fevereiro 2010). Como as plantas de arroz estavam em casa de vegetação onde a temperatura não era controlada, o calor dos meses de dezembro 2009 a fevereiro de 2010 podem ter afetado o estágio morfológico da planta doadora de anteras, fator de grande relevância para a técnica de cultura de anteras (DATTA, 2005).

No experimento 3, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação entre os meses de março e agosto de 2010. No entanto, a casa de vegetação não foi a mesma utilizada no primeiro experimento. Desta forma, foi possível manter mais constante a temperatura ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) dentro da casa de vegetação, pois, ela possuía exaustor com resistência, na qual aumentava a temperatura interna, como também janelas que podiam ser abertas para aumentar a circulação do ar e assim diminuir a temperatura quando necessário.

Várias auxinas, tais como ácido naftaleno acético (ANA), ácido fenilacético (PAA), picloram e dicamba foram testadas isoladamente ou em combinação com 2,4-D, e verificada a eficiência na formação de calos (LENTINI et al. 1995). Estes estudos mostraram que a média da frequência de indução de calos podem ser aumentadas em até 28,7% em genótipos indica e japonica com a combinação de 2,4-D (2 mg L^{-1}) com picloram ($0,07\text{ mg L}^{-1}$), enquanto o 2,4-D (2 mg L^{-1}) combinado com ANA (2 mg L^{-1}), ou ANA (2 mg L^{-1}) sozinho foi muito menos eficaz e rendeu uma frequências de calos de 18,5 e 0,1%, respectivamente.

Experimentos de calogênese em anteras de *Triticum aestivum* utilizando ácido indol acético (AIA) e 2,4-D demonstram que o último é mais efetivo na indução de calos em anteras (BALL et al., 1993). Em anteras de *Cucumis sativus* L. cultivar Calypso, inoculadas em meio B5, suplementado principalmente com $2,5\ \mu\text{M}$ de 2,4-D, desenvolveram calos e embriões globulares em 4 semanas.

Avozani (1995) avaliou o efeito da aplicação de uréia nos vasos das plantas doadoras de anteras na angrogênese, tendo como resultado, um aumento na formação de calos quando adicionado 4,5g de uréia por vaso. Quando adicionado uréia no meio de cultura N_6 , o aumento na concentração de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ diminuiu a formação de calos e conseqüentemente a formação de gemas verdes.

Além disso, os carboidratos no meio de cultura satisfazem o requerimento de moléculas de carbono como fonte de energia e, em geral, altos índices de sacarose satisfazem à indução de calos em anteras (CHEN et al., 1991). Portanto, segundo Galletta (1983), um dos fatores determinantes da integridade dos grãos de pólen é a manutenção do equilíbrio osmótico entre o meio de cultura e o conteúdo dos grãos. Supõe-se que tal equilíbrio possa ser determinado pela relação entre a concentração de sacarose e as concentrações de substâncias como ácido bórico e nitrato de cálcio, de forma que o excesso ou a deficiência de qualquer um desses componentes poderá promover o rompimento dos grãos de pólen. Com relação à

fonte de carbono, resultados semelhantes foram observados em micrósporos de arroz e outros cereais (MENCK et al., 1999). Para anteras de café, a substituição de 5% de sacarose por 5% de maltose proporcionou um incremento significativo na indução de calos (LENTINI; MARTINEZ, 1992).

O estudo de duas cultivares indicas, quanto a temperatura de incubação das anteras indicam que a alternância de 30 °C para 20 °C, durante 14h/10h, respectivamente, permitiu verificar uma alta eficiência de regeneração de plantas verdes (4,3%) na cultivar Pokkali (JAVED et al., 2007).

Peters et al. (1999) afirmam que os meios de cultura assim como as condições de cultivo são quase específicas para cada genótipo. O estado fisiológico das plantas doadoras influencia nas respostas in vitro. As condições fisiológicas ideais para a cultura do arroz são obtidas com luminosidade, nutrição e temperatura satisfatória. Baixa luminosidade, falta de nitrogênio e temperatura baixa dificulta o desenvolvimento do micrósporo.

A modificação no meio de cultura melhora os resultados para as cultivares indicas, quanto a indução de calos e regeneração de plantas comparado com as cultivares japônicas, porém sem diferença significativa entre elas. Desta forma, o meio de cultura deve ser apropriado a cultivar ou ao cruzamento que se deseja regenerar (ALFONSO-RUBÍ et al., 1999).

Tabela 2 – Número de anteras inoculadas, calos formados, plantas verdes e albinas regeneradas nos três experimentos realizados testando diferentes meios de cultura. FAEM/UFPel-CGF, 2011.

Experimento 1									
Nipponbare x BRS Atalanta	Anteras inoculadas	Calos formados		Plantas verdes			Plantas albinas		
		nº	%	nº	%	Eficiência %	nº	%	Eficiência %
Meio de cultura 1	8.280	638	7,71	9	45	0,11	11	55	0,13
Meio de cultura 2	7.920	1.075	13,57	6	40	0,08	9	60	0,11
Meio de cultura 3	5.400	1.847	34,2	1	25	0,02	3	75	0,06
Total de anteras	21.600	3.560							
BRS Firmeza x Epagri 107									
Meio de cultura 1	2.160	5	0,23	0	-	-	0	-	-
Meio de cultura 2	3.600	0	0	0	-	-	0	-	-
Meio de cultura 3	23.760	333	1,4	0	-	-	0	-	-
Total de anteras	29.520	338							
Experimento 2									
Nipponbare	9.000	185	2,06	8	72,73	0,09	3	27,27	0,03
BRS Atalanta	9.720	5	0,06	0		-	0		-
Total de anteras	18.720	190							
Experimento 3									
Nipponbare x BRS Atalanta	64.800	418	0,65	17	68	0,03	8	32	0,01
Total de anteras nos três Experimentos	134.640	4.506							

4.4. CONCLUSÕES

A técnica de cultura de anteras de arroz é mais eficiente para a regeneração de plantas verdes com o uso do meio N₆ modificado adicionados de (2,4-D (0,5 mg mL⁻¹), Picloran (0,07 mg mL⁻¹) e Cinetina (1 mg mL⁻¹)).

A formação de calos é verificada em maior número com o uso do meio de cultura NL modificado (ANA (4 mg mL⁻¹) e Cinetina (1 mg mL⁻¹)).

A cultivar Nipponbare da subespécie japônica é mais eficiente tanto na formação de calos como na regeneração de plantas verdes.

O cruzamento entre Nipponbare x BRS Atalanta gera maior porcentagem de formação de calos e regeneração de plantas verdes do que o cruzamento BRS Firmeza X Epagri 107.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFONSO-RUBI, J.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. Parameters influencing the regeneration capacity of calluses derived from mature indica and japonica rice seeds after microprojectile bombardment. **Euphytica**, v.107, p.115-122, 1999.

ASAD, J.; QAZI, M.H.; TAHIRA, F.; TAYYAB, H. Tissue Culture response of Local Varieties of Rice (*Oryza sativa* L.) of NWFP. **Online Journal Biology Science**, v.1, p.387–90, 2001.

AVOZANI, O.A. **Obtenção de duplo-haplóides de arroz irrigado, através do cultivo de anteras**. 1995. 105f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BAGHERI, N.; JELODAR, N.B. Combining Ability and Heritability Induction and Green-Plant Regeneration in Rice Anther Culture. **Biotechnology**, v.7, n.2, p.287-292, 2008.

BALL, S.T.; ZHOU, H.; KONZAK, C.F. Sucrose concentration and its relationship to anther in wheat. **Crop Science**, v.32, p.149-154, 1992.

BERTAN, I. **Distância genética como critério para escolha de genitores em programas de melhoramento de trigo (*Triticum aestivum* L)**. 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Curso de Pós-Graduação em Agronomia, FAEM-UFPel, Pelotas.

BISHONI, U, Jain RK, CHOWDHURY VK, GUPTA KR, CHOWDHURY JB. Anther culture of recalcitrant indica x Basmati rice hybrids. **Euphytica**, v.114, p.93–101, 2000.

BRAR,D.S.; KUSH, G.S. Cytogenetic manipulation and germplasm enhancement of rice (*Oryza sativa* L.). In: SINGGH, R.J.; JAUHAR, P.P. (Eds.). **Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement**. v.2. US: CRC press, 2006. p.115-158.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em 15/12/2010.

CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y.; BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments of the nitrogen source. **Scientia Sinica**, v.18, p.659-668, 1975.

CHEN, C.C.; TSAY, H.S.; HUANG, C.R. Factors affecting androgenesis in rice (*Oryza sativa* L.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v.14, p.193-215, 1991.

DATTA, S.K. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. **Current Science**, v.89, n.1, p.1870–1878, 2005.

GALLETTA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Ed.). **Methods in fruit breeding**. Indiana: Purdue University Press, 1983. p.23-47.

HARADA, T.; SATO, T.; ASAKA, D.; MATSUKAWA, I. Large-scale deletions of rice plastid DNA in anther culture. **Theoretical and Applied Genetics**, v.81, p.157–161, 1991.

HE, T.; YANG, Y.; TU, S.B.; YU, M.Q.; LI, X.F. Selection of interspecific hybrids for anther culture of indica rice. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.86, p.271–277, 2006.

HUANG, H.S.; LING, T.H.; TSENG, P.L.; SHIEN, Y.L.; SHI, P. Studies on the medium components in anther culture of *Oriza sativa* subsp. hsien by mathematical methods. In: **Plant Tissue Culture: Proceedings of the Beijing Symposium**. London: Pitman publishing, 1981. p.244-246.

JAVED, M.A.; ISHII, T.; KAMIJIMA, O.; MISOO, S. The role of alternating culture temperatures and maltose in enhancing the anther culture efficiency of salt tolerant *indica rice* (*Oryza sativa* L.) cultivars, Pokkali and Nona Bokra. **Plant Biotechnology**, v.24, p.283-287, 2007.

KHATUN, R; SHAHINUL, I.; MIAH, B. Studies on Plant Regeneration Efficiency Through *in vitro* Micropropagation and Anther Culture of Twenty Five Rice Cultivars in Bangladesh. **Journal of Applied Sciences Research**, v.6, n.11, p.1705-1711, 2010.

KHANN, H.K.; RAINA, S.K. Genotype x culture media interaction effects on regeneration response of three indica rice cultivars. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.52, p.145-153, 1998.

KHUSH, G. Chair's introduction. In: GOODE, J.A.; CHADWICK, D. (Eds). **Rice Biotechnology: Improving Yield, Stress Tolerance and Grain Quality**. Chichester: Wiley, 2001. p. 11–12.

KUSH, G.S.; BRAR, D.S. Biotechnology for rice breeding: process and potential impact. The international rice commission – 20th sessions, Bangkok, Thailand, 2002.

LENTINI, Z., MARTÍNEZ, C., ROCA, W. Cultivos de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. Cali: CIAT, 1997. 62p.

LENTINI, Z.; REYES, P.; MARTÍNEZ, C.; NÚÑEZ, V.; ROCA, W. **Mejoramiento del arroz con cultivo de anteras: aplicaciones en el desarrollo de germoplasma adaptado a ecosistemas latinoamericanos y el Caribe**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1994. 79p.

LENTINI, Z.; REYES, P.; MARTINEZ, C.P.; ROCA, W.M. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. **Plant Science**, v.110, p. 127-138, 1995.

LENTINI, Z.; MARTINEZ, C.P. Applications of anther culture in rice breeding, in: CUEVAS-PEREZ, F. (Ed.). **Rice in Latin America: Improvement, Management and Marketing**. Cali, Colombia: International Center for Tropical Agriculture Press, 1992. p. 230-23.

MAGALHÃES JR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A.S; FRANCO, D. F.; SEVERO, A. Seleção de linhagens de arroz irrigado do programa de melhoramento da Embrapa á toxicidade por ferro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4 ; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 26, 2005, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 204-206.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R.A. Técnicas de cultura de tecidos. In: MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R.A. **Principios de biotecnologia em plantas: uma introdução a engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de genética, 1994. p.101-181.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. de. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPB, 1990. p. 311-332.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

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-SPI / EMBRAPA-CNPB, 1999. p.569-611.

RAINA, S.K. Doubled haploid breeding in cereals. *Plant Breeding*, v.16, p.141–186, 1997.

RAINA, S.K.; BALACHANDRAN, S.M.; VIRMANI, S.S.; ZAPATA, F.J. Improved medium for efficient anther culture of some *indica* rice hybrids. **International Rice Research Newsletter**, v.14, n.3, 1989.

RATERING, S.; SCHNELL, S. Localization of iron-reducing activity in paddy soil by profile studies. **Biogeochem**, v.48, p.341–365.

SANTOS, E. K. dos. Totipotência Celular e Cultura de Tecidos Vegetais. In: FREITAS, L.B. de; BERED, F. (Eds.). **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2003. p. 415-444.

SILVA, T.D. Indica rice anther culture: can the impasse be surpassed? **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.100, p.1–11, 2010.

KHATUN, R; SHAHINUL, I.; MIAH, B. Studies on Plant Regeneration Efficiency Through *in vitro* Micropropagation and Anther Culture of Twenty Five Rice Cultivars in Bangladesh. **Journal of Applied Sciences Research**, 6 (11): 1705-1711, 2010.

ZAPATA, F.J.; KRUSH, G.S.; CRILL, J.P.; NEU, M.H.; ROMERO, R.O.; TORRIZO, L.B.; ALEJAR, M. Rice anther culture at IRRIL. In: **Cell and Tissue Techniques for Cereal Crop Improvement**. Manila, Philippines: Science Press, 1983. p.27-46.

ZUBKO, M.K.; DAY, A. Differential regulation of genes transcribed by nucleus-encoded plastid RNA polymerase, and DNA amplification, within ribosome-deficient

plastids in stable phenocopies of cereal albino mutants. **Molecular Genetics Genomics**, v.267, p.27–37, 2002.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura de anteras é de grande interesse em programas de melhoramento. Embora a eficiência de regeneração de calos e plantas verdes não sejam altos, o fato de se poder obter plantas homozigotas em pouco espaço de tempo é muito valioso.

A obtenção de uma população de 150 plantas duplo-haplóides provenientes do cruzamento de genótipos contrastantes para a tolerância ao ferro possibilitará a construção de um mapa genético para o caráter. O desenvolvimento de pesquisas sobre QTLs que controlam a tolerância ao ferro em arroz, associado à tecnologia de duplo-haplóides, possibilitarão a seleção precoce de indivíduos tolerantes ao excesso de ferro. Essa contribuição será extremamente significativa para a eficiência na seleção de constituições genéticas superiores pelos programas de melhoramento genético.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

BAGHERI, N.; JELODAR, N.B. Combining Ability and Heritability Induction and Green-Plant Regeneration in Rice Anther Culture. **Biotechnology**, 7 (2): 287-292. Asian Network for Scientific Information, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em 15/12/2010.

DEWI, I.S.; PURWOKO, B.S.; ASWIDINNOOR, H.; SOMANTRI, I.H; CHOZIN, M.A. Plant Regeneration from Anther Culture of Several Genotypes of Indica Rice Tolerant to Aluminum Toxicity. **Indonesian Journal of Agriculture**, 2 (1), 1-5, 2009.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database, disponível em <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>, acessado em 15/12/2010.

INSTITUTO RIO-GRANDENSE DO ARROZ (IRGA). **Arroz irrigado no RS:** área cultivada, produção, nº de engenhos e beneficiamento. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br>. Acesso em: 2004.

JAVED, M.A.; ISHII, T.; KAMIJIMA, O.; MISOO, S. The role of alternating culture temperatures and maltose in enhancing the anther culture efficiency of salt tolerant *indica rice* (*Oryza sativa* L.) cultivars, Pokkali and Nona Bokra. **Plant Biotechnology**, 24, 283-287, 2007.

KHATUN, R; SHAHINUL, I.; MIAH, B. Studies on Plant Regeneration Efficiency Through *in vitro* Micropropagation and Anther Culture of Twenty Five Rice Cultivars in Bangladesh. **Journal of Applied Sciences Research**, 6 (11): 1705-1711, 2010.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. de. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1999. p. 311-332.

ROY, B., MANDAL, A. B. Anther culture response in indica rice and variations in major agronomic characters among the androclones of a scented cultivar, Karnal local. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 4 (3), pp. 235-240, 2005.

SAHRAWAT, K.L. Iron Toxicity in Wetland Rice and The Role of Other Nutrients. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, p.1471-1504, 2004.

SILVA, T.D. Indica rice anther culture: can the impasse be surpassed? **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 100: 1-11, 2010.

ANEXOS

**ANEXO I - Composição do meio de cultura MS modificado (MURASHIGE;
SKOOG, 1962)**

Sol.estoque	Vol.no meio	Compostos	Conc.na sol.estoque	Conc.final
A	20mL	NH ₄ NO ₃	82,5 g	1,650 g L ⁻¹
B	20 mL	KNO ₃	95 g	1,9 g L ⁻¹
C	5 mL	MgSO ₄ .7H ₂ O	74 g	370 mg L ⁻¹
		MnSO ₄ .H ₂ O	3,38 g	16,9 mg L ⁻¹
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,72 g	8,6 mg L ⁻¹
		CuSO ₄ .5H ₂ O	5 mg	0,025 mg L ⁻¹
D	5 mL	CaCl ₂	66,6 g	333 mg L ⁻¹
		ou CaCl ₂ .2H ₂ O	85,12 g	
E	5 mL	H ₃ BO ₃	1,24 g	6,2 mg L ⁻¹
		KH ₂ PO ₄	34 g	170 mg L ⁻¹
		KI	166 mg	0,83 mg L ⁻¹
		NaMoO ₄ .2H ₂ O	50 mg	0,25 mg L ⁻¹
		CoCl ₂ .6H ₂ O	5 mg	0,025 mg L ⁻¹
F	5 mL	EDTA Férrico	14,4 g	36 mg L ⁻¹
G	5 mL	Tiamina	200 mg	1 mg L ⁻¹
		Piridoxina	100 mg	0,5 mg L ⁻¹
		Ác.Nicotínico	100 mg	0,5 mg L ⁻¹
		Glicina	400 mg	2 mg L ⁻¹

ANEXO II - Composição do meio mineral N₆ modificado (CHU et al., 1975)

Solução estoque	Compostos	Concentração na solução estoque (g L ⁻¹)	Volume da solução estoque no meio de cultura (mL L ⁻¹)
1	(NH ₄) ₂ SO ₄	23,150	20
2	KNO ₃	141,500	20
3	KH ₂ PO ₄	80,000	5
	H ₃ BO ₃	0,320	
	KI	0,166	
4	CaCl ₂ 2 H ₂ O	33,200	5
5	MgSO ₄ 7H ₂ O	37,000	5
	MnSO ₄ H ₂ O	0,660	
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,300	
6	EDTA férrico	14,4	5
7	Tiamina	0,200	5
	Ácido Nicotínico	0,100	
	Piridoxina	0,100	
	Glicina	0,400	

ANEXO III - Composição do meio mineral NL modificado (LENTINI et al., 1994)

Solução estoque	Compostos	Concentração solução estoque	Volume no meio de cultura
1	(NH ₄) ₂ .SO ₄	232 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹
	KNO ₃	3134 mg L ⁻¹	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	186 mg L ⁻¹	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	150 mg L ⁻¹	
2	H ₃ BO ₃	6,0 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹
	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9 mg L ⁻¹	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	10 mg L ⁻¹	
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg L ⁻¹	
	*CuSO ₄ .5H ₂ O Estoque (2,5 mg/ml)	0,025 mg L ⁻¹	
	**CoCl ₂ .6H ₂ O Estoque (2,5 mg/ml)	0,025 mg L ⁻¹	
	KI	100 mg L ⁻¹	
3	Tiamina – HCL	2,5 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹
	Ácido Nicotínico	2,5 mg L ⁻¹	
	Piridoxina – HCL	2,5 mg L ⁻¹	
	Glicina		
4	KH ₂ PO ₄	540 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹
5	EDTA férrico	14,4 g L ⁻¹	36 mg L ⁻¹