

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA  
EDUARDO PRADI VENDRUSCOLO**

**CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS NO APOIO AO MELHORAMENTO  
GENÉTICO VEGETAL E À PRODUÇÃO MASSAL DE PLANTAS**

**FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA**

**2012**

**EDUARDO PRADI VENDRUSCOLO**

**CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS NO APOIO AO MELHORAMENTO  
GENÉTICO VEGETAL E À PRODUÇÃO MASSAL DE PLANTAS**

Trabalho de conclusão apresentado como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Engenheiro Agrônomo.

Centro de Ciências Agrárias, Universidade  
Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rosete Pescador

Supervisor: Dr. Gilmar Roberto Zaffari

Empresa: Epagri - EEI

**FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA**

**2012**

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**EDUARDO PRADI VENDRUSCOLO**

### **CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS NO APOIO AO MELHORAMENTO GENÉTICO VEGETAL E À PRODUÇÃO MASSAL DE PLANTAS**

Trabalho de conclusão apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Profª Drª Rosete Pescador  
Departamento de Fitotecnia / CCA- UFSC  
(Orientadora)

---

Dr. Gilmar Roberto Zaffari  
Pesquisador da Epagri  
(Supervisor do estágio)

---

MSc. Ramon Felipe Scherer  
Doutorando em Recursos Genéticos Vegetais  
(Convidado)

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais, irmã,  
familiares e amigos que me apoiaram e  
incentivaram durante esta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a toda minha família, em especial aos meus pais, Naudir José Vendruscolo e Anadir Elenir Pradi Vendruscolo, que me propiciaram a oportunidade de estudo em uma instituição com alta qualidade de ensino.

A todos os meus grandes amigos, que me acompanharam nas dificuldades e nos bons momentos desta importante etapa e de tantos outros momentos da minha vida.

À família do Sr. Domingos Sávio Eberhardt, pela hospitalidade durante todo o período do estágio obrigatório e pela grande amizade construída.

À ótima equipe do laboratório de biotecnologia da Epagri, Dilnei Souza Medeiros, Eliseu Emanuel dos Santos, Larissa Stadler Arruda Cantarotti, Barbará Penno Braga, pela paciência ao me instruir no desenvolvimento das atividades dentro e fora do laboratório.

Ao Dr. Gilmar Roberto Zaffari, pela sua disponibilidade e paciência ao me passar seus conhecimentos e também pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Profª Drª Rosete Pescador pelo seu carisma e por sanar minhas dúvidas frente às dificuldades encontradas ao final da graduação.

Enfim, a todos os que contribuíram tanto para a minha formação profissional como também para a minha formação pessoal.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi (1869 – 1948)

## RESUMO

O arroz (*Oryza sativa*) é uma gramínea pertencente à família Poacea. Juntamente com o milho e o trigo é o cereal de maior produção em nível mundial. Esse fator desperta interesse por parte de muitos países que investem em pesquisas para o desenvolvimento de cultivares com maior resistência a patógenos, pragas entre outros males que afetam negativamente a cultura. Presente em diversos países como constituinte básico da dieta populacional, o arroz deixa de ter apenas importância econômica, apresentando também uma forte importância cultural, como pode ser observado com maior intensidade em países asiáticos, China e Japão, por exemplo. Para que o Brasil permaneça competitivo no mercado mundial é preciso que pesquisas sejam desenvolvidas de forma contínua para que novos produtos sejam lançados frequentemente. Nesse âmbito entra o melhoramento genético e com ele a criação constante de novas ferramentas que auxiliam no desenvolvimento e aperfeiçoamento da cultura. O presente trabalho objetivou o estudo e a realização de um experimento relativo ao processo de obtenção de plantas duplo-haplóides de arroz através da cultura de anteras. O experimento foi realizado com o intuito de definir o melhor momento para a utilização das anteras, levando em conta o estágio de desenvolvimento das plantas de arroz e também dos micrósporos presentes nas anteras. A pesquisa consistiu do cultivo das anteras em meio de cultura N6 adicionado de diferentes concentrações de auxina 2,4-D (0,5; 2,0 e 4,0 mg/L). As anteras foram coletadas no estágio de emborrachamento da panícula, com 6 e 10 cm de distância entre o colar da folha bandeira e o colar da última folha, da linhagem SC 471. O estágio de desenvolvimento dos micrósporos presentes nas panículas do experimento foi determinado pela análise citológica em microscópio com diferentes períodos de maturação. Além, dos trabalhos com arroz, foram acompanhadas e desenvolvidas atividades visando à multiplicação de bananeiras, limpeza de vírus em citros e definição de novos protocolos para multiplicação, em ambiente asséptico, de diferentes espécies ornamentais. Os resultados alcançados serão importantes para futuras pesquisas pelo Laboratório de Biotecnologia, tanto para a obtenção de novas variedades pelo programa de melhoramento genético quanto para a obtenção de protocolos e multiplicação de mudas matrizes livres de vírus ou não de espécies de interesse do Estado de Santa Catarina.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta baixa do laboratório.....	17
Figura 2. Organograma do melhoramento genético convencional de arroz.....	21
Figura 3. Organograma da obtenção de uma cultivar através da cultura de anteras.....	30
Figura 4. Coleta do material no campo. a) Coleta dos colmos no plantio. b) Verificação da distância entre o colar da última folha e da folha bandeira. c) Remoção de tecidos mortos e outros materiais. d) Material em água destilada para evitar desidratação.....	32
Figura 5. Segmento do colmo usado como base para a coleta do material.....	32
Figura 6. Toalete. a) Medida de 10 cm para corte superior na primeira redução do material. b) Medida de 2 cm para corte inferior na primeira redução do material. c-d) Limpeza do colmo no sentido da base para as folhas. e) Enxágue em água corrente. f) Acondicionamento para fase de pré-tratamento.....	34
Figura 7. Material acondicionado em geladeira para pré-tratamento a frio.....	35
Figura 8. Redução e desinfestação do material. a) Redução do material após o pré-tratamento. b) material reduzido e depositado em água estéril. c) Material para trabalho em CFL. d) Soluções de NaOCl a 0,5% e etanol 70% usadas na desinfestação.....	36
Figura 9. Extração da panícula e excisão das anteras. a) Colmo aberto contendo a panícula. b) Extração da panícula. c) Excisão das anteras.....	37
Figura 10. Anteras em água estéril.....	37
Figura 11. Inoculação das anteras. a) Retirada das anteras da água estéril. b) Inoculação das anteras em meio de cultura.....	38
Figura 12. Incubação das anteras. a) Anteras inoculadas em meio de cultura. b) Detalhe da antera inoculada em meio de cultura. c) Prateleira para incubação em sela de crescimento.....	39
Figura 13. Calo pronto para transferência para o meio de cultura de regeneração.....	40
Figura 14. Regeneração das plantas verdes. a) Calo recém-transferido. b) Início da regeneração. c) estágio avançado de regeneração. d) Planta com parte aérea totalmente regenerada. (1) Planta albina. (2) Planta verde.....	41
Figura 15. Enraizamento de planta verde (vista inferior do frasco).....	41
Figura 16. Aclimatização. a) Retirada do meio de cultura. b) Planta pronta para transplante em substrato. c) Planta em substrato à base de casca de arroz queimada. d) Aclimatização em câmara úmida.....	42



Figura 17. Preparo para a análise citológica. a) Divisão da panícula em região apical (1), mediana (2) e basal (3). b) Beckeres contendo as anteras imersas em solução fixadora. c) Detalhe de anteras imersas em solução fixadora.....	43
Figura 18. Micrósporos de arroz. a) Micrósporo em estágio uninucleado. b) Micrósporo em estágio binucleado.....	48
Figura 19. Procedimentos para multiplicação asséptica de bananeira. a) Primeira redução, no campo. b) Material recebido no laboratório. c) Segunda redução, no laboratório. d) Material imerso em NaOCl. e) Material na CFL. f) Terceira redução, em CFL. g) Material pronto para inoculação. h) Inoculação do material.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos diferentes tratamentos utilizados no experimento.....	38
Tabela 2. Efeito do meio de cultura, reguladores de crescimento e da distância entre colares (DEC) sobre a formação de calos a partir do cultivo de anteras de arroz ( <i>Oryza sativa</i> ) cultivadas em meio N6 adicionado de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenoacético (ANA) e cinetina (KIN), incubados em sala de crescimento escura por um período de 90 dias.....	44
Tabela 3. Resultados parciais obtidos pelo Laboratório de Biotecnologia da Epagri acerca da produção de plantas DH de arroz ( <i>Oryza sativa</i> ) sobre a quantidade de anteras de três populações híbridas F1 (30, 44 e 57) inoculadas em três diferentes meios de cultura (A, B e C).....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus célsius

2,4-D – 2,4-diclorofenoxiacético

ABA – Ácido abscísico

ACARESC – Associação de Crédito e Assistência Rural de Santa Catarina

ACARPESC - Associação de Crédito e Assistência Pesqueira de Santa Catarina

AIA – ácido 3-indolacético

AIB – Ácido indol-3-butírico

ANA – Ácido naftalenoacético

BAP - Benzilaminopurina

CETREI – Centro de Treinamento da EPAGRI – Itajaí

CFL – Câmara de Fluxo Laminar

cm – centímetro

DEC – Distância entre colares

DH – Duplo-Haplóide

E EI – Estação Experimental de Itajaí

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EMPASC – Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

Fe - Ferro

g – grama

GA<sub>3</sub> - Ácido giberélico

HCl – Ácido clorídrico

HgCl<sub>3</sub> - Cloreto de mercúrio

KIN - Cinetina

L – litro

LS – Meio de Cultura Lisnmaier & Skoog (1965)

mg - miligrama

mm - milímetro

MS – Meio de Cultura Murashige & Skoog (1962)

NaOCl – Hipoclorito de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

pH – potencial hidrogeniônico

Pierik 1 – Meio de Cultura Pierik (1976) acrescido de 0,08 mg/l de 2,4D e 1,0 mg/l de Zeatina

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 CARACTERIZAÇÃO DA EPAGRI E DO LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA.....</b>	<b>16</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 OBJETIVO GERAL DO ESTÁGIO.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>4 CAPÍTULO 1 – MELHORAMENTO GENÉTICO DE ARROZ.....</b>	<b>19</b>
4.1 ORIGEM, GENÉTICA E MORFOLOGIA DAS PLANTAS DE ARROZ.....	19
4.2 MELHORAMENTO GENÉTICO CONVENCIONAL.....	20
4.3 CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS COMO APOIO AO MELHORAMENTO GENÉTICO.....	22
4.3.1 Cultura de tecidos.....	22
4.3.2 Produção de plantas haploides e duplo-haplóides in vitro.....	23
<b>5 CAPÍTULO 2 – ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO DOS MICRÓSPOROS DA ANTERA DE ARROS NA PRODUÇÃO DE DUPLO-HAPLÓIDES.....</b>	<b>29</b>
5.1 INTRODUÇÃO.....	29
5.2 METODOLOGIA.....	31
5.2.1 Material vegetal.....	31
5.2.2 Coleta do material a campo.....	31
5.2.3 Toaleta.....	33
5.2.4 Pré-tratamento a frio.....	34
5.2.5 Desinfestação do material.....	35
5.2.6 Extração das panículas e excisão das anteras.....	36
5.2.7 Meio de cultura para formação dos calos.....	37
5.2.8 Inoculação das anteras no meio de cultura.....	38
5.2.9 Incubação das anteras.....	38
5.2.10 Retirada dos calos e inoculação em meio de cultura de diferenciação.....	39
5.2.11 Regeneração das plantas.....	40
5.2.12 Aclimatização.....	42
5.3 ANÁLISE CITOLÓGICA DOS MICRÓSPOROS.....	42

	13
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
<b>5.4.1 Formação de calos.....</b>	<b>43</b>
<b>5.4.2 Resultados obtidos pelo laboratório de.....</b>	<b>45</b>
<b>5.4.3 Biotecnologia Análise citológica dos micrósporos.....</b>	<b>48</b>
5.5 CONCLUSÃO.....	48
<b>6 CAPÍTULO 3 – OUTRAS ATIVIDADES REALIZADAS EM LABORATÓRIO.....</b>	<b>50</b>
6.1 INTRODUÇÃO.....	50
6.2 ATIVIDADES.....	51
<b>6.2.1 Micropropagação de plantas ornamentais.....</b>	<b>51</b>
6.2.1.1 Aráceas e Dracena.....	51
6.2.1.2 Butiazeiro ( <i>Butia</i> sp.).....	52
6.2.1.3 Bromélias.....	53
6.2.1.4 Orquídea ( <i>Arundina bambusifolia</i> ).....	54
<b>6.2.2 Micropropagação de frutíferas.....</b>	<b>54</b>
6.2.2.1 Citros.....	54
6.2.2.2 Bananeira.....	55
6.3 CONCLUSÃO.....	56
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos de plantas vem, cada vez mais, tendo destaque na produção de plantas de interesse comercial. A partir dessa técnica é possível a produção de plantas livres de vírus, obtenção de clones, produção massal, realização de pesquisas em fisiologia vegetal, entre muitas outras aplicações.

Neste trabalho foram descritas algumas atividades acerca das diversas técnicas envolvidas na cultura de tecidos de plantas. Para tanto, foram utilizadas plantas de diferentes espécies ornamentais, frutíferas, para as quais se buscou criar ou aprimorar os protocolos de multiplicação em ambiente asséptico, porém a principal atividade foi desenvolvida com a cultura do arroz.

Sendo um constituinte básico de aproximadamente dois terços da população mundial, o arroz incita o interesse de vários países na área da pesquisa e desenvolvimento de tecnologias acerca da cultura, pois veem nesta uma cultura com potencial estratégico para diferentes países. (LANNES, S. et al., 2004).

Apesar dos avanços tecnológicos acerca da cultura do arroz, ainda podem ser constatados diversos problemas em sua cadeia produtiva. Esses problemas surgem na forma de doenças, pragas, intolerâncias nutricionais, entre outras. É nesse contexto complexo que o melhoramento vegetal vem sendo empregado, a fim de diminuir as perdas causadas pelos fatores adversos.

O melhoramento vegetal se compõe de inúmeras “ferramentas”, que se interligam e convergem para solucionar problemas encontrados nas culturas de interesse econômico. O desenvolvimento de plantas com diferentes ploidias busca, por meio da mutação, ressaltar ou ocultar genes de interesse agrônomo.

A homozigose alcançada mediante a haploidização torna a cultura de anteras uma interessante ferramenta para o melhoramento vegetal. No sistema convencional de melhoramento de autógamas, onde o método de cruzamentos é usado, são necessários de 7 a 8 ciclos de autofecundação para estabilizar o genótipo pela fixação de genes em homozigose. Além de ser um processo demorado e trabalhoso, a eficiência da seleção nas primeiras gerações é muito baixo devido, principalmente à ocorrência de alelos dominantes em homozigose. (KALTCHUK-SANTOS, 2002).

O presente trabalho visou à maximização da produção de plantas duplo-haplóides de arroz (*Oryza sativa*), identificando os diferentes estágios de desenvolvimento dos micrósporos presentes nas anteras e definindo qual o melhor momento para a inoculação destas, buscando a formação de calos e a regeneração de plantas verdes.

Também se buscou o aprimoramento e o desenvolvimento de protocolos para a cultura asséptica de diferentes espécies ornamentais. A importância destas atividades é dada pelo grande crescimento do mercado e também pela alta exigência por qualidade que é imposta pelos consumidores. Além da maior velocidade de propagação, a qual é permitida através da cultura de tecidos, a cultura asséptica do material permite que sejam mantidas características de interesse em sucessivas multiplicações sem a alteração do dos genes (PIERIK, 1974, tradução própria).

Todas as atividades presentes neste trabalho foram realizadas dentro da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) na Estação Experimental de Itajaí (EEI), mais especificamente nas dependências do Laboratório de Biotecnologia (LBIO).



## **1 CARACTERIZAÇÃO DA EPAGRI E DO LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA**

Fundada em 1991, a EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina está vinculada ao governo do Estado por meio da Secretaria de Estado da Agricultura e Pesca. Surgiu com a incorporação numa só instituição a Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária S.A. (Empasc), a Associação de Crédito e Assistência Rural de Santa Catarina (Acaresc), a Associação de Crédito e Assistência Pesqueira de Santa Catarina (Acarpesc) e o Instituto de Apicultura de Santa Catarina (Iasc). Essa união resultou na soma de décadas de experiências em extensão e pesquisa, fortalecendo assim o setor.

Ainda em 22 de junho de 2005, a EPAGRI incorporou o Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina - Instituto Cepa/SC. Na mesma data, a Assembleia de Acionistas aprovou a transformação da EPAGRI em empresa pública. A empresa tem como missão trabalhar em prol da população, buscando o desenvolvimento sustentável do meio rural a partir da extensão rural e da difusão de conhecimento e tecnologia.

Os principais objetivos institucionais são a promoção da preservação, recuperação, conservação e utilização sustentável dos recursos naturais. A busca pela competitividade da agricultura catarinense diante do grande mercado mundial, adequando os produtos às exigências dos consumidores e assim promover a melhoria da qualidade de vida do meio rural e pesqueiro.

Em 1975 foram lançadas as bases para a formação da Estação Experimental de Itajaí (EEI), nesta época o Agr. José Oscar Kurtz, representando a EMBRAPA, nomeou uma comissão que localizaria áreas apropriadas para a instalação de toda a estrutura onde seriam realizados estudos a cerca das culturas de arroz, cana-de-açúcar, mandioca, forrageiras e fruticultura de clima tropical.

Em 1981 foram concluídas as obras onde hoje se localiza a atual sede da EEI, as instalações são compostas por escritórios, biblioteca, auditório e laboratórios.

Atualmente a EEI realiza cerca de um terço das atividades da Epagri. Essas atividades de pesquisa vêm contribuindo para a geração de centenas de publicações técnicas e científicas.

Por concentrar uma grande quantidade de pesquisadores, a EEI se torna um ótimo lugar para a formação complementar de alunos do ensino fundamental, médio e superior. A empresa recebe a visita anual de mais de mil alunos e é um local favorável ao

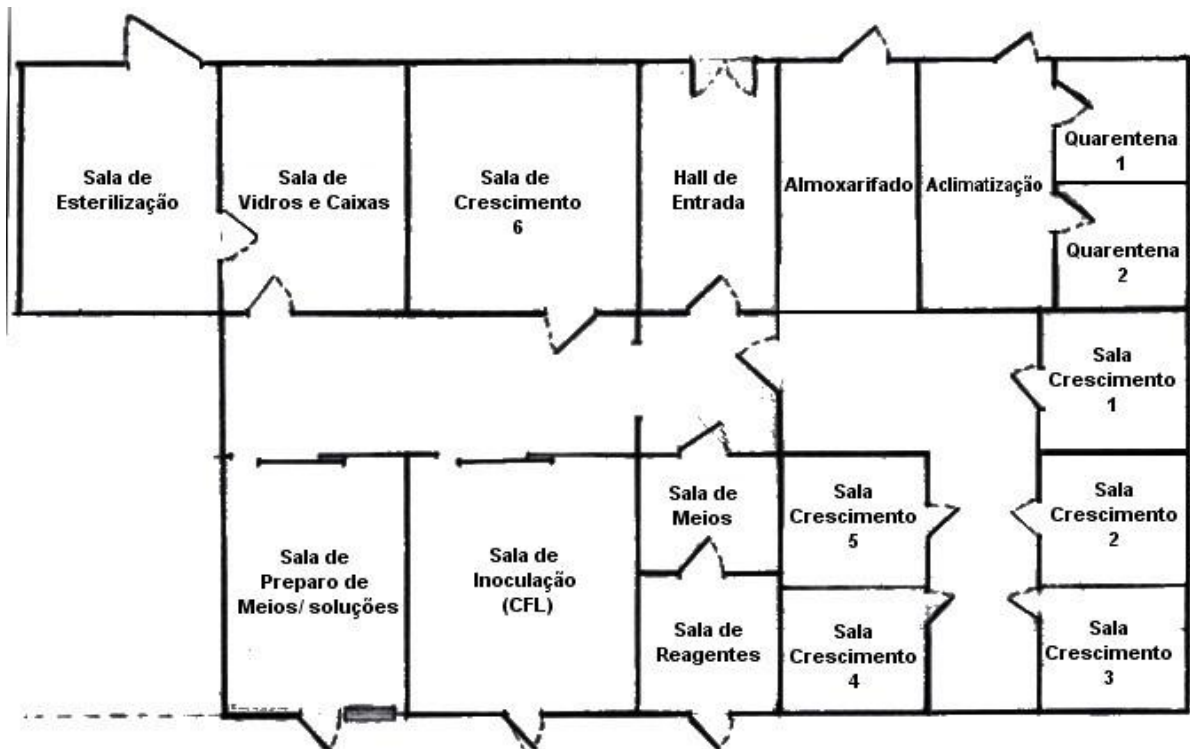
desenvolvimento de estágios e trabalhos de pesquisa para acadêmicos de diversos cursos superiores.

A Estação Experimental de Itajaí possui laboratórios com as mais diversas funções relacionadas à piscicultura e principalmente com relação às atividades que envolvem culturas vegetais.

O laboratório de biotecnologia, onde foi realizado este estágio, é responsável pelo desenvolvimento das atividades relacionadas à área de Cultura de Tecidos de Plantas. A demanda por essas atividades provém dos outros setores de pesquisa, de projetos desenvolvidos pelo pesquisador e também de demandas dos próprios produtores rurais.

As atividades exercidas são agrupadas em diferentes ambientes e se dividem em limpeza e esterilização (sala de lavagem e esterilização), preparo de material e meios de cultura (sala de preparo de meios), manipulação asséptica (sala de inoculação) e incubação das culturas (sala de crescimento) (Figura 1).

Figura 1. Planta baixa do laboratório de biotecnologia.



Fonte: Laboratório de Biotecnologia – Epagri, 2010.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Complementar a formação acadêmica, realizando a vivência dentro de uma empresa promotora de pesquisas na área de biotecnologia e melhoramento genético vegetal.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acompanhar atividades relacionadas à produção de plantas duplo-haplóides de arroz, englobando a coleta do material a campo, assepsia, inoculação de anteras, formação de calos, regeneração de plantas e aclimatização.
- Avaliar o estágio de desenvolvimento dos micrósporos de arroz para a formação de calos e regeneração de plantas *in vitro*.
- Identificar o estágio de desenvolvimento dos micrósporos de arroz pela análise citológica em microscópio.
- Colaborar para o desenvolvimento de novos protocolos para a maximização da produção, *in vitro*, de plantas ornamentais.
- Acompanhar e desenvolver atividades relacionadas à regeneração de plantas a partir do meristema apical caulinar em variedades copa de citros e da gema apical caulinar em bananeira.
- Realizar atividades laboratoriais cotidianas, ligadas à cultura de tecidos vegetais.

## 4 CAPÍTULO 1 – MELHORAMENTO GENÉTICO DE ARROZ

### 4.1 ORIGEM, GENÉTICA E MORFOLOGIA DAS PLANTAS DE ARROZ

O arroz é uma planta pertencente à classe Monocotyledonae, ordem Glumiflorae, família Poacea, subfamília Poaidae, tribo *Oryzae*, subtribo *Oryzinae*, gênero *Oryza*. A este gênero são pertencentes além do arroz outras vinte e cinco espécies que possuem diferentes características quanto ao local de ocorrência, estrutura e ploidia (diplóides e tetraplóides), também podem variar entre perenes e anuais. (EPAGRI, 2002).

Das espécies de arroz existentes apenas duas são cultivadas, *O. sativa* e *O. glaberrima* Steud. Há uma preferência pelo consumo e conseqüentemente pelo plantio de *O. sativa*. Isso leva a uma tendência de substituição gradual da *O. glaberrima* Steud mesmo em seu local de estabelecimento no norte da África. (EPAGRI, 2002).

Acredita-se que a espécie *O. sativa* seja oriunda do sudeste asiático, onde são registradas as mais variadas formas de cultivo, sendo que a espécie subdivide-se em diversos grupos ou subespécies, tendo como as mais importantes a Índica, que possui grãos longos e finos, a Japônica, que possui grãos curtos e arredondados e a Javânica que possui grãos longos e espessos. (EPAGRI, 2002).

Quanto à sua morfologia, a planta é dividida em parte vegetativa e reprodutiva, é ereta e com alta capacidade de perfilhamento. Apresenta aerênquima em suas raízes em condição de falta de O<sub>2</sub>. A parte vegetativa é composta por: Raízes – Seminal na germinação, e adventícia em estágio de plântula e planta; Caule - Colmo principal, primário, secundário e terciário. Os nós são maciços, os entrenós são ocos; Folha – Aurícula pilosa e amplexicaule, com lígula bem desenvolvida, e colar na junção da lâmina com a bainha. A parte reprodutiva é composta por: Panícula – Ráquis como eixo principal, apresentando ramificações; Espiguetas: se encontram nas ramificações da ráquis e protegem as flores. (FONSECA, 2008).

O colmo é caracterizado pela alternância de nós e entrenós, sendo que as características quanto ao comprimento e a coloração do colmo podem variar de acordo com a genética do material e a condição de cultivo em que a planta se encontra. Nos nós também estão fixadas as folhas e das axilas destas saem as gemas que dão origem aos perfilhos. (EPAGRI, 2002).

As folhas são constituídas de limbo (com ou sem pelos), lígula, bainha, aurícula, a junção entre bainha e limbo é chamada colo. São as folhas as responsáveis pela ação da fotossíntese da planta, podem variar em número e quantidade de acordo com a variedade. A

última folha é chamada folha bandeira e a folha com maior tempo de existência. (EPAGRI, 2002).

A inflorescência é do tipo panícula, fica situada no ápice do colmo e é composta por várias espiguetas. As espiguetas são compostas por glumelas, ráquila e brácteas. No centro desta estrutura está a flor formada por seis estames e um pistilo, os primeiros formam o órgão masculino enquanto o segundo é o órgão feminino. (EPAGRI, 2002).

A semente do arroz nada mais é do que o ovário maduro, fecundado, seco e indeiscente. A lema e a pálea e suas estruturas associadas formam a casca. Sob a casca encontra-se o grão formado pelo pericarpo, mesocarpo, camada de células, tégmen, camada de aleurona e embrião. (EPAGRI, 2002).

#### 4.2 MELHORAMENTO GENÉTICO CONVENCIONAL

Ao final dos anos 70 e início dos anos 80, as cultivares de arroz que apresentavam um maior porte foram substituídas por plantas mais baixas, caracterizando as cultivares modernas. E apesar de todos os esforços despendidos com o melhoramento genético da cultura, os ganhos se mostram de baixa magnitude. (RANGEL et al., 2000).

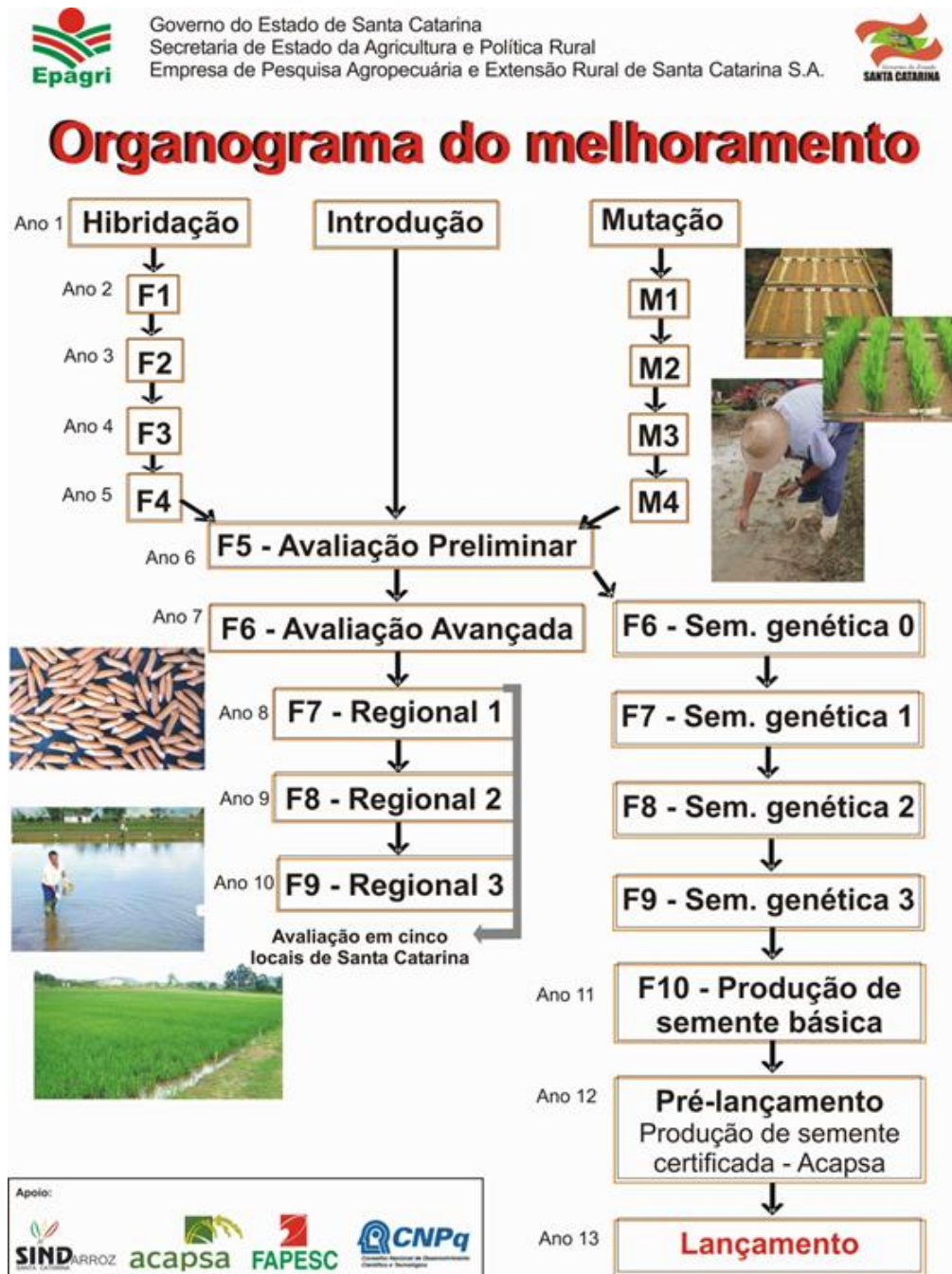
Os programas de melhoramento vegetal no Brasil buscam por meio de parcerias com instituições internacionais como o International Rice Research Institute (IRRI) e o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), germoplasmas de bancos genéticos especializados (FONSECA, 2006), pois a hibridação de materiais, juntamente com a mutação induzida, são ferramentas que ajudam a garantir uma maior variabilidade genética. (VIEIRA et al., 2007).

A eficiência de um plano de melhoramento genético vegetal é medida, basicamente, pela quantidade de cultivares lançadas para plantio. (RANGEL et al., 2000). Nesse sentido é indispensável que haja uma ampla base genética, pois este fator aumenta as chances de que combinações gênicas superiores sejam identificadas. (VIEIRA et al., 2007).

Hoje, em Santa Catarina a Epagri tem por objetivo principal de suas pesquisas acerca do melhoramento genético o desenvolvimento de cultivares de arroz, partindo principalmente da hibridação e mutação induzida, com tipo de planta “moderno”, que contenham boas características de grãos, resistência às doenças, alta produtividade, boas características agrônômicas e adaptadas ao sistema pré-germinado. (MARSCHALEK et al., 2008). Pois este sistema representa 100% do empregado no estado. (EPAGRI, 2008).

Para que uma nova cultivar seja lançada ela deve apresentar características superiores às daquelas que estão em uso e também deve haver sementes certificadas em quantidade suficiente para a implantação de um cultivo comercial, isto provavelmente ocorrerá apenas no 12º ano após a hibridação (MARSCHALEK et al., 2008) (Figura 2).

Figura 2. Organograma do melhoramento genético convencional de arroz.



Fonte: Epagri, 2010.

## 4.3 CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS COMO APOIO AO MELHORAMENTO GENÉTICO

### 4.3.1 Cultura de tecidos

George et al. (2008, tradução própria) definem a cultura de tecidos como a ciência que abrange o desenvolvimento de células, tecidos e órgãos vegetais isolados da planta mãe, em um meio artificial. Os mesmos autores ainda dividem a cultura de tecidos em duas rotas morfogênicas distintas, organogênese (direta e indireta) e embriogênese (direta e indireta).

A organogênese direta tem como característica a regeneração de brotos adventícios a partir da rediferenciação de determinadas células (GUERRA et al., 2006) dos tecidos inoculados *in vitro*, não havendo a necessidade da formação prévia de calos, para tanto podem ser usados tecidos de diferentes órgãos da planta matriz, tais como folhas, flores, caules, entre outros. Já na organogênese indireta os brotos adventícios, ou outros órgãos formados, são provenientes da diferenciação de um tecido que não àquele pertencente à planta doadora, mas sim de massas celulares desorganizadas, os calos, ou ainda de culturas de células isoladas. (GEORGE et al., 2008, tradução própria).

A rota morfogênica que compreende a embriogênese também é dividida em direta quando células embriogênicas competentes são selecionadas e ativadas. E indireta quando estas células têm necessidade de serem induzidas a continuar em um desenvolvimento similar ao da embriogênese zigótica.

Em literatura o processo da micropropagação de plantas é dividido em estágios numerados. Essa divisão é diferente dependendo do pesquisador que a desenvolve. Debergh e Maene (1981) têm sua proposta citada por George et al. (2008, tradução própria). Nessa proposta é adotada a numeração dos estágios de I a IV, porém um estágio anterior também é descrito (Estágio 0).

O Estágio 0 envolve a seleção de plantas matrizes com aspectos que favoreçam a criação de um material asséptico. Alguns destes aspectos são a escolha de plantas com aparência saudável, a realização de pré-tratamentos químicos e exposição da planta matriz a uma boa qualidade ambiental.

O Estágio I está ligado ao desenvolvimento de tecidos ou órgãos, *in vitro*, livres de vírus, bactérias, algas, fungos ou outros contaminantes. Também nesse estágio é desejado o desenvolvimento brotos ou calos a partir do material inoculado.

No Estágio II é induzida a produção de brotos ou embriões somáticos que sejam capazes de sobreviver e dar origem a uma nova e completa planta após a repicagem para um novo meio de cultura.

O Estágio III é a preparação da planta para a aclimatização, aumentando a taxa de sobrevivência desta. Neste estágio as plantas são induzidas ao desenvolvimento tanto da parte aérea como da parte radicular, isso facilita a absorção de nutrientes na fase *extra vitro*.

O Estágio IV é a aclimatização das mudas. Nessa etapa alguns cuidados devem ser tomados quanto à temperatura do ambiente, UR, luminosidade, entre outros fatores, pois a muda advinda de uma cultura *in vitro* não possui todas as características requeridas para a sobrevivência em ambiente natural, mas estas tendem a surgir em pouco tempo quando seguidos os cuidados.

Muitas das técnicas utilizadas na cultura de tecidos vegetais podem não estar ligadas à criação direta de novas cultivares, mas podem oferecer alternativas e até mesmo soluções únicas em algumas etapas ligadas ao melhoramento genético. (TORRES, 1998).

ROCA et al. (1991, tradução própria) destacam a importância dos cultivos *in vitro* também na conservação e no intercâmbio de germoplasmas, tendo em vista que a conservação deste material, dentre outros aspectos, é facilitada devido ao tamanho diminuto do material, à possibilidade de manipulação do desenvolvimento através das concentrações de nutrientes e hormônios no meio de cultura. Porém esta conservação é possível para aquelas plantas as quais é possível a regeneração completa.

Com a preservação de germoplasmas é possível resgatar características de plantas que, há muito tempo, deixaram de ser cultivadas, mas que em um determinado momento de um plano de desenvolvimento genético podem ser de muito interesse para o fornecimento de genes resistentes a doenças, pragas, entre tantas outras características.

Muitos autores ainda descrevem técnicas para a obtenção de cultivares resistentes a diferentes estresses, bióticos e abióticos, a partir da cultura de tecidos. Willadino (1994) descreve a possibilidade de se obter, dentre outras, cultivares de milho tolerantes à salinidade a partir da cultura de anteras.

#### **4.3.2 Produção de plantas haplóides e duplo-haplóides *in vitro***

Nas plantas superiores, as haplóides são esporófitos que possuem um número igual ao do gametófito. Mediante a duplicação espontânea ou artificial dos cromossomos é possível a obtenção de plantas totalmente homozigotas. Essas plantas são chamadas de Duplo-haplóides



(DH) e permitem aos melhoristas uma aceleração no processo de fixação de características genéticas desejadas em plantas de interesse comercial. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

A obtenção destas plantas é baseada em fertilização interespecífica ou intergenérica (via partenogênese ou pela redução cromossômica), seja pelo cultivo de anteras e pólen, seja pelo cultivo de ovários e óvulos. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

A cultura de anteras é a técnica pela qual é possível a produção de linhagens homozigotas a partir de populações segregantes, mediante a duplicação cromossômica do pólen haplóide e a regeneração de plantas, em um cultivo *in vitro*. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

Com a utilização desta técnica é possível se obter linhas homozigotas em apenas 8 ou 9 meses, em contraste com os meios convencionais de melhoramento que normalmente requerem seis gerações de autofecundação para alcançar a completa homozigose em plantas autógamas. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

Mas apesar das claras vantagens, no ganho de tempo para formação de novas cultivares, criadas pela utilização dos DH nos programas de melhoramento genético vegetal, existem muitas barreiras a serem superadas. Lentini et al (1997, tradução própria) comenta o fato de que plantas desenvolvidas através do cultivo de anteras não têm suas características previamente avaliadas ao contrário do que acontece no melhoramento convencional, onde os melhoristas estão a todo o momento buscando plantas que apresentem características desejadas, seja com relação à resistência às doenças ou pragas, qualidade de grão, tolerância a distintos fatores bióticos e abióticos ou ainda adaptação a um determinado ecossistema.

Para que seja obtida uma planta DH é preciso que muitas tentativas de regeneração sejam feitas, pois a chance de que todos ou a maioria dos genes tenham características de interesse. Para tanto existe uma preferência pela obtenção de plantas haplóides e, por consequência, plantas DH através da utilização de gametas masculinos (androgênese), pois estes se apresentam em maior quantidade, nas anteras, facilitando assim a sua obtenção e aumentando o sucesso da técnica. Essa técnica só é possível fora das condições naturais, pois visa à alteração do plano de divisão do micrósporo, fazendo com que este não siga o desenvolvimento normal. Assim, enquanto na natureza este micrósporo se tornaria um grão de pólen, artificialmente é formado um meristema que dará origem a plantas haplóides (TERMIGNONI, 2005), plantas DH entre outras.

Os materiais DH possuem uma alta estabilidade genética, que é mantida por várias gerações, também é observado que cerca de 90% das plantas DH apresentam uniformidade. A

eficiência na seleção de caracteres qualitativos e quantitativos dobra em plantas DH quando comparadas com plantas diploides. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

Para que haja sucesso na obtenção de um bom material DH muitos pontos devem ser observados. A resposta da cultura *in vitro*, por exemplo, possui forte relação com a origem genética do material que está sendo trabalhado. Chen et al (1991) citado por Lentini (1997, tradução própria) observa que materiais de procedência Japônica respondem melhor à regeneração de calos, em compensação materiais de procedência Índica respondem melhor à formação de plantas verdes.

Também a qualidade do material regenerado a partir da cultura de anteras depende de vários fatores, dentre eles está a condição em que a planta doadora de anteras se encontra. O ideal seria que essa planta doadora se encontrasse em condições ótimas, ambientalmente, que se caracterizaria pela alta radiação nos dois meses antecedentes à coleta, baixa precipitação pluviométrica, temperaturas variando entre 19°C durante a noite e 29°C durante o dia e deficiência de nitrogênio durante o cultivo. (YING, 1986a *apud* LENTINI et al., 1997, tradução própria).

Ainda há outros procedimentos que podem interferir na resposta *in vitro* do material, como a coleta do material nas primeiras horas do dia, o tratamento a frio das panículas por 7 a 8 dias em temperaturas de 8 a 10°C e a identificação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos.

Sunderland (1978) citado por Lentini et al. (1997, tradução própria) descreve os benefícios do tratamento com baixas temperaturas, segundo ele há uma redução nas atividades respiratórias das anteras, diminuindo o consumo das reservas presentes nesse tecido, diminuindo a atividade do tecido que abrigam os grãos de pólen, mantendo a viabilidade dos mesmos, evitando a deiscência prematura das anteras no cultivo e retardando a senescência do pólen.

É importante que sejam tomadas as devidas precauções quanto à senescência do pólen, através da redução das atividades respiratórias, pois a fase de incubação das anteras representa um curto período de tempo. Logo, se o período de viabilidade dos micrósporos for pequeno, menores são as chances para a obtenção dos calos.

Outro fator muito importante para a obtenção dos calos são os meios de culturas utilizados para este fim. As combinações entre nutrientes e hormônios interferem em todas as fases de desenvolvimento das plantas DH. No início a divisão celular é independente dos aditivos nutricionais, mas estes são requeridos para as divisões subsequentes, que envolvem a formação de calos e a diferenciação destas células em meristemas e plantas. Normalmente se

utilizam dois meios de cultura, um para a indução de calos a partir do pólen imaturo e outro para a regeneração de plantas a partir dos calos. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

Os meios de cultura são formados basicamente por dois grandes grupos de substâncias. O primeiro grupo, o meio basal, é formado por nutrientes inorgânicos (macro e microelementos), hidratos de carbono, vitaminas e em alguns casos, outros aditivos orgânicos. O segundo grupo de substâncias é constituído pelos reguladores de crescimento do tipo hormonal. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

Dentre os reguladores de crescimento se destacam os grupos das auxinas e das citocininas. Dentro do grupo das auxinas destacam-se os sintetizados e que apresentam analogia ao AIA, são eles o ANA, o 2,4D, o AIB, o Picloram e o Dicamba, já no grupo das citocininas destacam-se o BAP, 2 iP, a cinetina, a zeatina e o thiadazuron. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

As auxinas têm como papel principal estimular o alongamento do coleóptilo e de segmentos caulinares, mas também afetam outros processos como divisão celular em cultura de calos em presença de citocininas, formação de raízes adventícias em folhas ou caules excisados e outros fenômenos do desenvolvimento relacionados com a ação do AIA (TAIZ & ZIEGER, 2004).

As citocininas são responsáveis pela divisão celular, assim são elas que estimulam a diferenciação das células dos calos, fazendo com que plantas verdes sejam regeneradas (TAIZ & ZIEGER, 2004). Skoog e Miller (1965) citados por Taiz e Zieger (2004) concluem que a regeneração em raízes ou parte aérea é definida pela razão auxina: citocininas, sendo que uma baixa razão levará à formação de parte aérea enquanto uma alta razão estimula a formação de raízes.

O cultivo de anteras se desenvolve em duas etapas principais, a indução de microcalos e a regeneração de plantas verdes. Na primeira etapa temos a indução a partir da exposição das anteras a um meio de cultura cuja composição estimule a divisão mitótica dos micrósporos. Esse meio deve conter altas concentrações de auxinas. Ao alcançarem cerca de 2 mm de diâmetro, os microcalos passam para a etapa de regeneração de plantas quando são transferidos para um outro meio de cultura que possua baixas concentrações de auxinas e altas concentrações de citocininas, que estimularão a diferenciação celular dos calos em brotos, talos e folhas. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

Após a transferência dos calos para o meio de diferenciação as células destes sofrem algumas alterações quanto a sua rota de divisão, tornando-se células DH. Lentini et al. (1997, tradução própria) cita duas principais causas da formação das plantas DH, *in vitro*:

Primeira: a) Fusão nuclear – quando são utilizados micrósporos na fase uninucleada média ou tardia, fazendo com que a membrana celular não se desenvolva nas primeiras divisões mitóticas e assim há a fusão dos núcleos gerando um calo DH ou poliploide.

b) Fusão nuclear – quando são utilizados micrósporos binucleados no estágio cedo, pois assim o núcleo vegetativo se funde ao generativo e gera um calo DH.

Segunda: Endoreduplicação – quando não há separação dos cromossomas duplicados, formando um só núcleo.

Observam-se vários obstáculos para a regeneração de plantas DH, um dos principais é o aparecimento de plantas albinas, que em algumas situações pode representar um grande percentual do material regenerado, isto pode estar ligado à falta de expressão dos genes responsáveis pelo desenvolvimento dos cloroplastos e pela baixa síntese de clorofila devido às condições de cultivo *in vitro*. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

Chen et al (1991) citado por Lentini (1997, tradução própria) também considera outros fatores que podem colaborar com o aparecimento de plantas albinas como a idade do calo (>2 mm de diâmetro); a temperatura na indução e na regeneração das plantas (>26°C); a classe e a concentração dos reguladores de crescimento (2,4D > 2 mg/l); a concentração de sacarose no meio de indução (>6%); a concentração dos sais no meio de cultivo (<0,4 mM de Fe<sup>2</sup>) e o estágio de desenvolvimento do pólen utilizado para a cultura de anteras (> uninucleado tardio).

As características das salas de crescimento onde se iniciam a obtenção de calos e também o desenvolvimento de plantas verdes têm influência direta sobre todo o processo. Para a obtenção de plantas com boas qualidades morfológicas e fisiológicas e uma maior produção de calos, devem ser atendidas algumas necessidades.

Na fase de formação dos calos o ambiente deve ser escuro e deve ser mantida uma temperatura de 24 a 26°C. Já na fase de regeneração de plantas, mantem-se a temperatura, porém nesta a luz se faz necessária para o processo da fotossíntese das plantas verdes. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

Em plantas DH regeneradas em cultura de anteras observamos uma grande variação genética, visto que cada grão de pólen proveniente de plantas híbridas de uma geração F1 representa um gameta diferente. Com isso se deduz que a população de plantas DH formada a partir destes micrósporos irá apresentar a mesma variabilidade genética de uma geração F2, mas com a vantagem de que cada indivíduo terá um genótipo homocigoto, isto é, fixado definitivamente. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

Com relação à frequência genotípica em uma população F<sub>2</sub>, tendo os genes de interesse como dominantes, a identificação de um determinado gene recessivo é dificultada devido sua baixa proporção (0,25). O contrário acontece em uma população DH, onde o gene recessivo aparece com uma frequência maior (0,50). (LENTINI et al., 1997, tradução própria). Isso facilita a seleção do material de interesse e mostra que a técnica de utilização dos DH torna o processo duas vezes mais rápido do que aquele que usa apenas plantas diploides.

Em vários estudos é possível a constatação de que a variabilidade das características quantitativas e qualitativas em populações de DH é similar à obtida em populações selecionadas por métodos convencionais, mas com a vantagem de ser desenvolvida em um tempo mais curto. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

Apesar dos estudos realizados acerca da obtenção de plantas com características desejáveis, muitas vezes há o aparecimento de plantas com ploidias indesejadas ou homocigotas para características sem interesse, que afetam seu potencial agrônomo. Há trabalhos que demonstram que cerca de 40 a 70% das plantas obtidas podem ser haplóides, triploides e tetraploides, e esse fator pode significar uma grande complicação para o desenvolvimento de DH.

A ploidia pode ser confirmada através de testes laboratoriais como a contagem de cromossomos. Outra maneira de diferenciá-las é apontada por Dunwell (2009, tradução própria) cujo autor, relaciona o tamanho das células em nível de ploidia da planta. Dessa maneira é possível identificar a ploidia através da observação de indivíduos adultos, plantas haplóides, por exemplo, serão menores que suas equivalentes duplo-haploides.

Para que haja eficiência em um programa de regeneração de plantas duplo-haploides é necessário que se crie toda uma estrutura, pois essa é uma atividade que exige, entre muitos fatores, mão de obra qualificada, laboratórios, equipamentos, recursos para o desenvolvimento das pesquisas e principalmente o cultivo de um elevado número de anteras por material de interesse.

## 5 CAPÍTULO 2 – ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO DOS MICRÓSPOROS DA ANTERA DE ARROZ NA OBTENÇÃO DE PLANTAS DUPLO-HAPLÓIDES

### 5.1 INTRODUÇÃO

O melhoramento genético vegetal convencional utilizado para a obtenção de cultivares homocigotas na cultura do arroz demanda mão-de-obra qualificada, grandes áreas para implantação de experimentos e sucessivos retrocruzamentos, o que torna o processo muito demorado.

Visando à obtenção de resultados em menores áreas e em curto período de tempo, o melhoramento genético vegetal pode se utilizar da micropropagação de plantas como ferramenta biotecnológica, como auxílio ao programa de melhoramento. A cultura de anteras é uma das formas pelas quais é possível a obtenção de plantas duplo-haplóides, totalmente homocigotas, em um período extremamente reduzido (Figura 3) quando comparado ao do melhoramento convencional. Por outro lado, a cultura de anteras também exige que alguns fatores sejam atendidos para que então se possa chegar ao resultado esperado.

A origem do genótipo, a condição da planta matriz, a composição dos meios de culturas, as condições ambientais de temperatura e luminosidade da sala de crescimento das culturas, o pré-tratamento de frio e principalmente o estágio de desenvolvimento do micrósporo são fatores determinantes para a obtenção das plantas duplo-haplóides. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

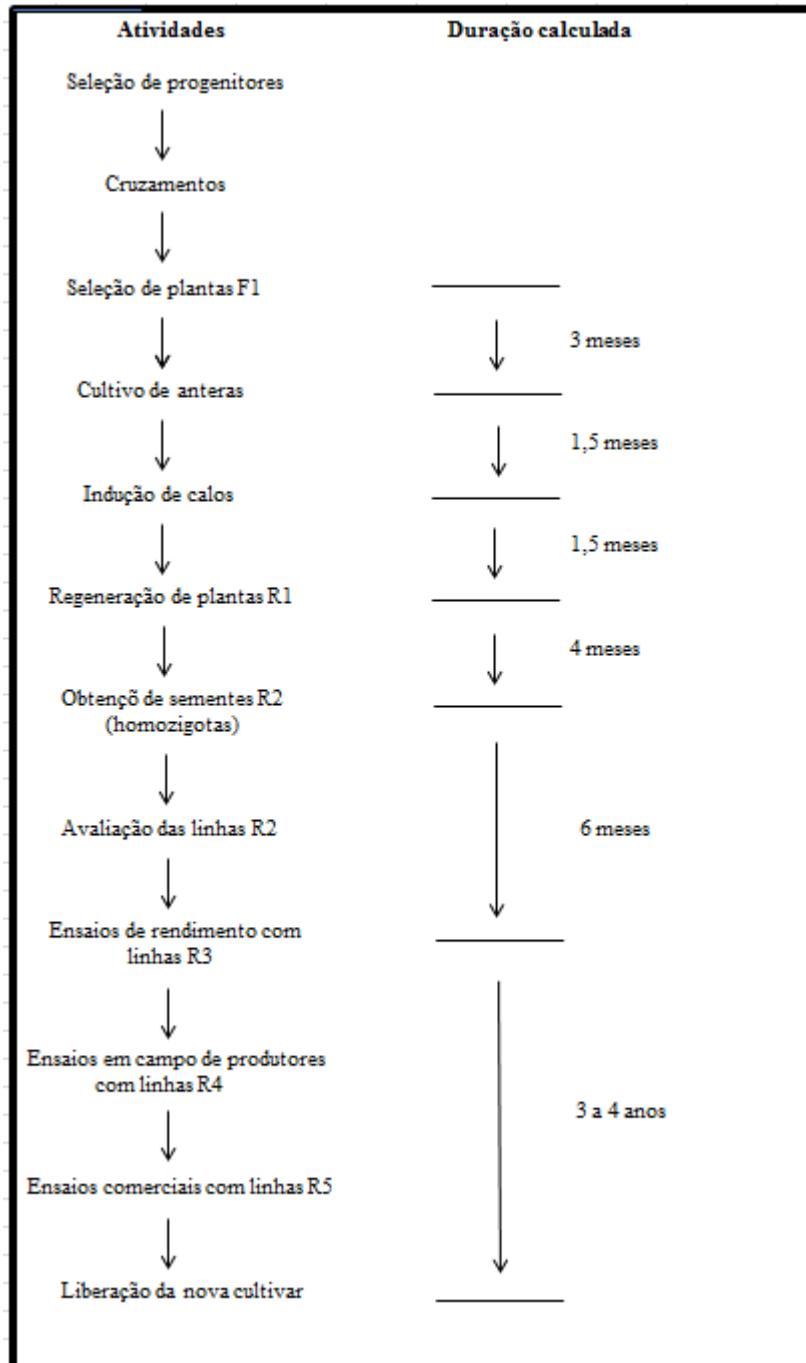
Há preferência pela utilização da androgênese na obtenção de plantas DH, pois os micrósporos se apresentam em quantidades muito maiores quando comparados a óvulos e ovários. (TERMIGNONI, 2005). Porém é preciso que esses micrósporos apresentem-se em um estágio de desenvolvimento apropriado para que haja maior resposta *in vitro*. Segundo Termignoni (2005),

Os estágios iniciais do desenvolvimento das flores, com anteras jovens e micrósporos ou grãos de pólen uni ou binucleados, são os mais recomendados para iniciar as culturas, pois neste estágio há uma repressão do desenvolvimento gametofítico e, a tendência do processo de divisões mitóticas é seguir um rumo diferente do normal na gametogênese.

Busca-se, portanto, através de testes e experimentos conhecer e avaliar o melhor estágio de desenvolvimento dos micrósporos para sua utilização na cultura de anteras e a

formulação de meios de cultura que ofereçam as melhores condições de desenvolvimento, tanto para a formação de calos como para regeneração de plantas verdes DH.

Figura 3. Organograma da obtenção de uma cultivar através da cultura de anteras



Fonte: modificado de LENTINI, 1997, tradução própria.

## 5.2 METODOLOGIA

### 5.2.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado foi anteras da linhagem SC471, de arroz (*Oryza sativa* L.) do tipo índica. Este material foi desenvolvido na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), pela Estação Experimental de Itajaí, localizada na cidade de Itajaí, Santa Catarina.

A linhagem SC471 foi obtida através do melhoramento genético convencional, cujas características apresentadas são de interesse agrônomo, com grandes possibilidades, pelas várias avaliações, ser lançada como cultivar.

### 5.2.2 Coleta do material no campo

Em um plantio de arroz no estágio fenológico de emborrachamento da panícula (formação do colar da folha bandeira), foram coletados colmos ,contendo as panículas, entre 9h 50min e 10h 10min da manhã (Figura 4, a). Com a ajuda de uma tesoura de poda, o corte do colmo foi realizado logo acima do colo da planta. Imediatamente após o corte do colmo foi realizada, a medida da distância entre os colares (DEC) da última folha e da folha bandeira (Figura 5) e uma primeira limpeza para a retirada de tecido morto e de outros restos de material que se encontrassem aderidos à planta (Figura 4, c).

Foram realizadas seis coletas de material, sendo três delas de colmos que apresentavam uma DEC de 6 a 6,5 cm, e três coletas de colmos onde a distância medida foi de 10 a 10,5 cm.

Os colmos possuindo de 3 a 5 folhas e previamente limpos foram depositados em um recipiente contendo água destilada, a fim de evitar a desidratação do material (Figura 4, d) e então levados imediatamente ao laboratório para a realização da toaleta.



Figura 4. Coleta do material no campo. a) Coleta dos colmos no plantio. b) Verificação da distância entre o colar da última folha e da folha bandeira. c) Remoção de tecidos mortos e outros materiais. d) Material em água destilada para evitar desidratação.

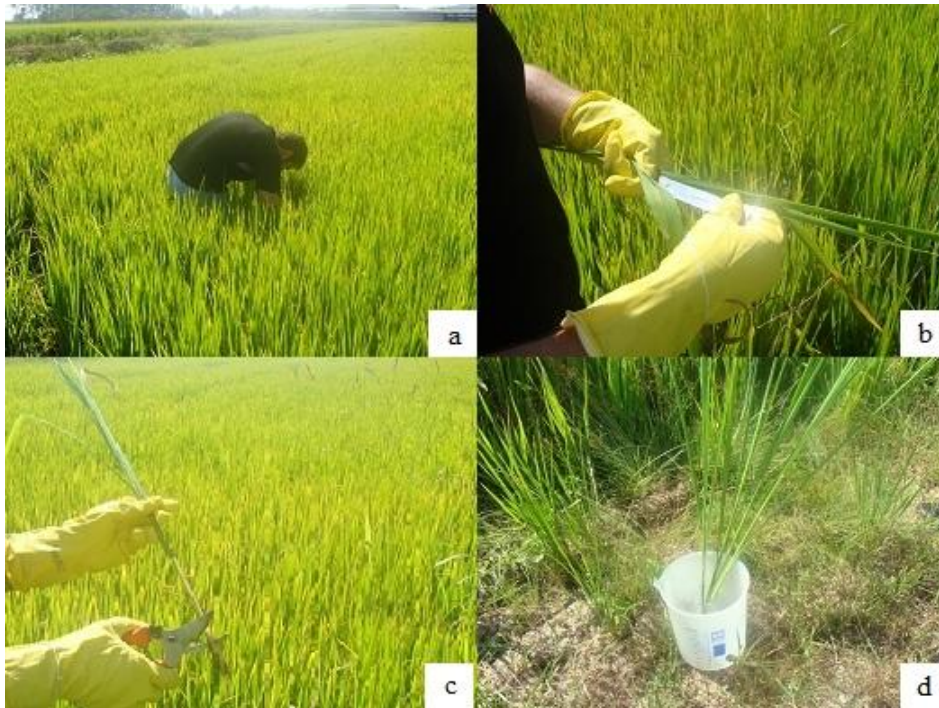
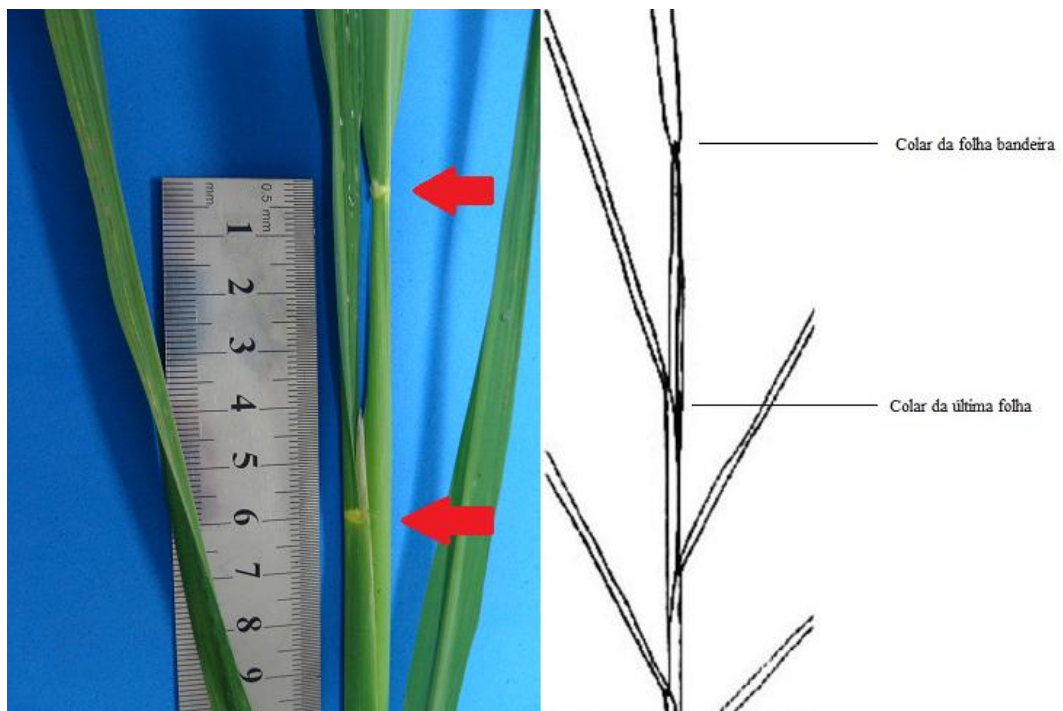


Figura 5. Segmento do colmo usado como base para a coleta do material.



### 5.2.3 Toaleta

No laboratório, após a devida higienização do local de trabalho e das ferramentas, deu-se início à fase da toaleta (Figura 6), com a retirada das folhas e suas bainhas, deixando apenas a folha bandeira e a última folha. Fez-se um corte 10 cm acima do colar da folha bandeira e 2 cm abaixo do nó, onde está fixada a bainha da última folha. Quando feitos corretamente, os cortes não danificam a estrutura onde se encontra a panícula, mantendo-a isolada do meio externo.

Foi realizada a pré-asepsia dos colmos com auxílio de uma esponja e detergente neutro no sentido dos pelos presentes no colmo, para que não houvesse destruição do tecido e após lavagem passado em água corrente para a remoção do detergente. Em seguida foi transferido para outro recipiente, identificado, contendo água destilada, foi embalado com saco plástico transparente, formando um ambiente com alta UR, e submetida a pré-tratamento a frio.

Figura 6. Toalete. a) Medida de 10 cm para corte superior na primeira redução do material. b) Medida de 2 cm para corte inferior na primeira redução do material. c-d) Limpeza do colmo no sentido da base para as folhas. e) Enxágue em água corrente. f) Acondicionamento para fase de pré-tratamento.



#### 5.2.4 Pré-tratamento a frio

Os materiais identificados e embalados foram acondicionados em geladeira, regulada a uma temperatura de 10°C, por um período de 7 dias. Após esse período, os colmos foram levados para a desinfestação do material (Figura 7).

Figura 7. Material acondicionado em geladeira para pré-tratamento a frio.



### 5.2.5 Desinfestação do material

Ao serem retirados do pré-tratamento, os colmos passaram por nova redução de seu tamanho, deixando-se apenas a região da inflorescência onde se encontra a panícula. Esse material foi imerso em água esterilizada e levado para a câmara de fluxo ( Figura 8 a, b e c).

Na câmara de fluxo laminar foi realizada a desinfestação dos colmos. Primeiramente, retirou-se a água esterilizada de dentro dos tubos onde se encontravam os colmos e em seguida os tubos foram preenchidos com álcool 70% por 1 minuto. Após esse período o etanol 70% foi descartado e o tubo foi novamente preenchido com hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5% por um período de 20 minutos. Ao término do período foram realizados 2 enxágues e ao fim da desinfestação os colmos foram mantidos submersos em água esterilizada.

Figura 8. Redução e desinfestação do material. a) Redução do material após o pré-tratamento. b) Material reduzido e depositado em água estéril. c) Material para trabalho em CFL. d) Soluções de NaOCl a 0,5% e etanol 70% usadas na desinfestação.



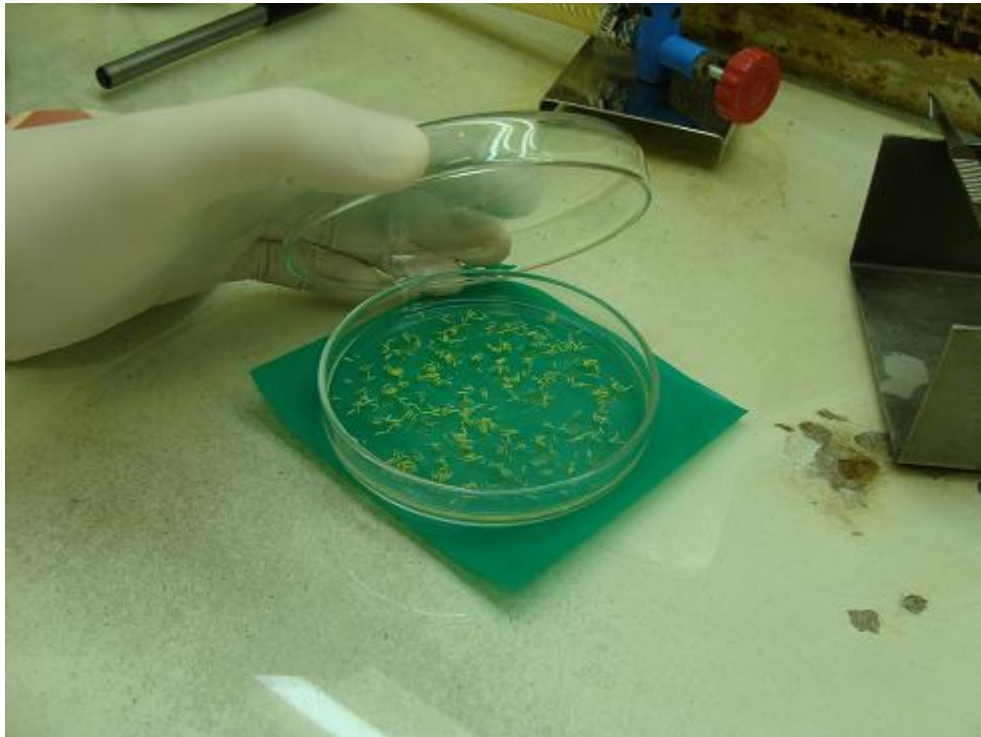
### 5.2.6 Extração das panículas e excisão das anteras

Um corte foi feito ao longo do colmo por onde foram retiradas as panículas e após destacar a espiguetta da panícula foi realizado um corte no lado oposto à inserção das anteras, evitando cortá-las (Figura 9). Com a espiguetta aberta as anteras são excisadas com a ajuda de um bisturi e depositadas em uma placa de Petri contendo uma fina lâmina de água esterilizada. Permaneceram nesta até o momento em que foram inoculadas no meio de cultura (Figura 10).

Figura 9. Extração da panícula e excisão das anteras. a) Colmo aberto contendo a panícula. b) Extração da panícula. c) Excisão das anteras.



Figura 10. Anteras em água estéril.



### 5.2.7 Meio de cultura para formação dos calos

Para o experimento foi utilizado o meio N6 (CHU, 1975) (ver anexo 1) com três diferentes concentrações da auxina 2,4 D (0,5 mg/L; 2,0 mg/L; 4,0 mg/L), combinadas com concentrações iguais de ANA e KIN, sendo estas 2,0 mg/L e 0,5 mg/L respectivamente. Também ao meio é acrescida sacarose (50g/L) e ágar (6,5g/L).

A combinação dos meios modificados e as anteras de colmos com as duas diferentes DEC's formam os seis tratamentos.

Tabela 2. Composição dos diferentes tratamentos utilizados no experimento.

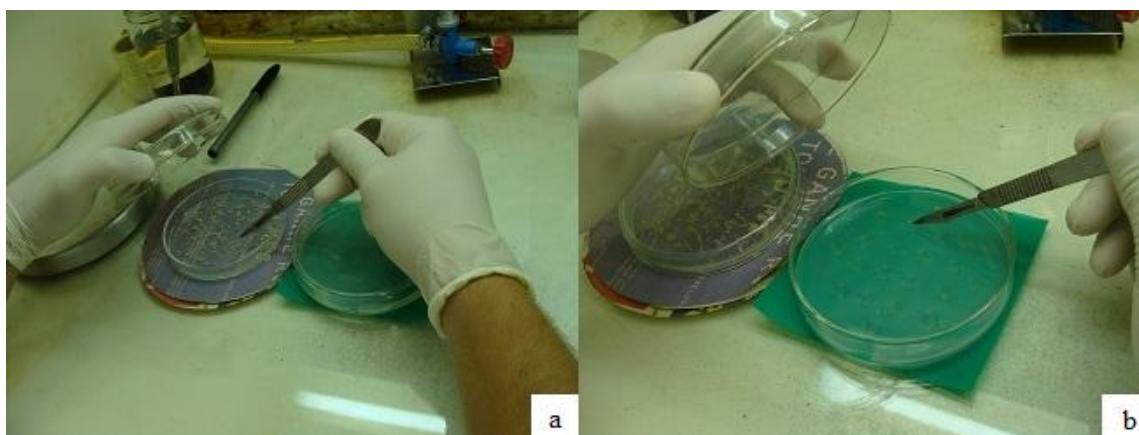
Tratamento	Hormônios mg/L			Sacarose (g/L)	Ágar (g/L)	DEC (cm)
	2,4 D	ANA	KIN			
T1	0,5	2	0,5	50	6,5	6
T2	2	2	0,5	50	6,5	6
T3	4	2	0,5	50	6,5	6
T4	0,5	2	0,5	50	6,5	10
T5	2	2	0,5	50	6,5	10
T6	4	2	0,5	50	6,5	10

### 5.2.8 Inoculação das anteras no meio de cultura

Com o auxílio de um bisturi, as anteras foram retiradas da água esterilizada e então inoculadas em outra placa de Petri, desta vez contendo o meio de cultura apropriado para a formação dos calos (Figura 11).

O trabalho foi facilitado com o uso de um gabarito plástico, que indica a posição em que as anteras devem ser dispostas no meio, evitando o acúmulo de anteras em apenas uma porção do meio.

Figura 11. Inoculação das anteras. a) Retirada das anteras da água estéril. b) Inoculação das anteras em meio de cultura.

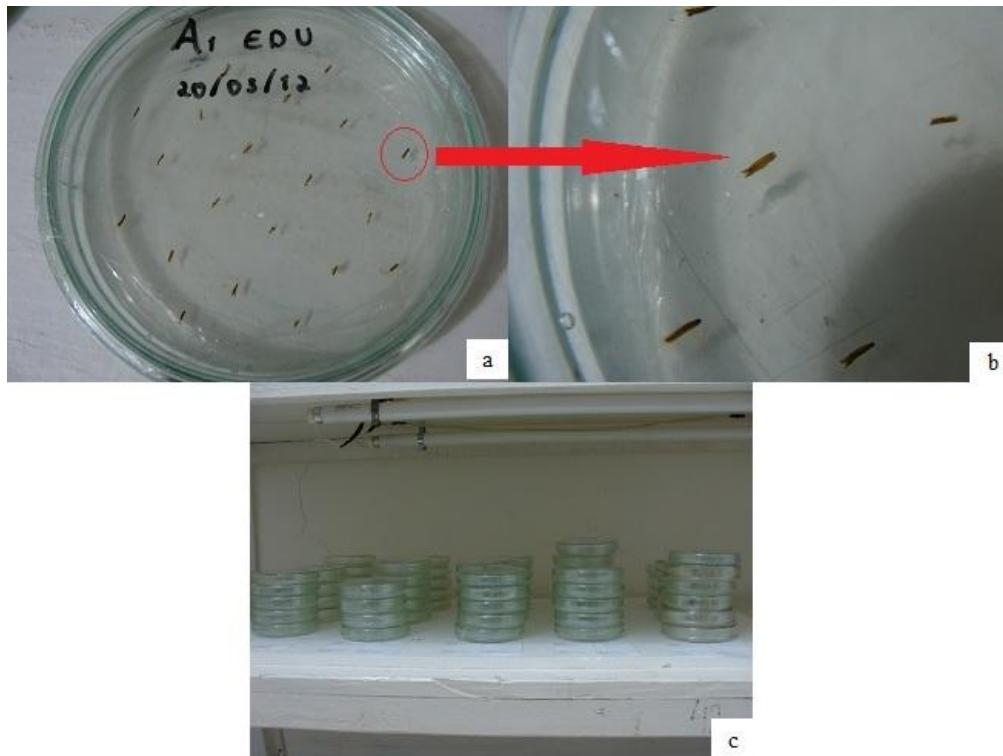


### 5.2.9 Incubação das anteras

As placas contendo o meio com as anteras são mantidas em uma sala de crescimento escura, com uma temperatura variando entre 24 e 26°C e UR de 60% (Figura 12).

As anteras permanecem em incubação na sala de crescimento por no máximo 120 dias. Após esse período o material é descartado por não apresentar mais viabilidade para formação dos calos.

Figura 12. Incubação das anteras. a) Anteras inoculadas em meio de cultura. b) Detalhe da antera inoculada em meio de cultura. c) Prateleira para incubação em sala de crescimento.



#### 5.2.10 Retirada dos calos e inoculação em meio de cultura de diferenciação

Placas contendo anteras que apresentassem formação de calos com mais de 2 mm de diâmetro (Figura 13) foram retiradas para que os calos fossem repassados a um meio de crescimento específico para a diferenciação celular e regeneração das plantas, voltando, logo após, para a sala de crescimento.



Figura 13. Calo pronto para transferência para o meio de cultura de regeneração.



### 5.2.11 Regeneração das plantas

Os calos retirados do meio das placas foram inoculados em MS acrescentado de 1 mg/L de ANA, 1 mg/L de BAP e 1 mg/L de KIN para que ocorresse a diferenciação celular e desenvolvimento de parte aérea (Figura 14). Com a parte aérea já estabelecida as plantas foram transferidas para o meio MS modificado a 50% de sua concentração original para que ocorresse o enraizamento desta (Figura 15).

Figura 14. Regeneração das plantas verdes. a) Calo recém-transferido. b) Início da regeneração. c) estágio avançado de regeneração. d) Planta com parte aérea totalmente regenerada. (1) Planta albina. (2) Planta verde.

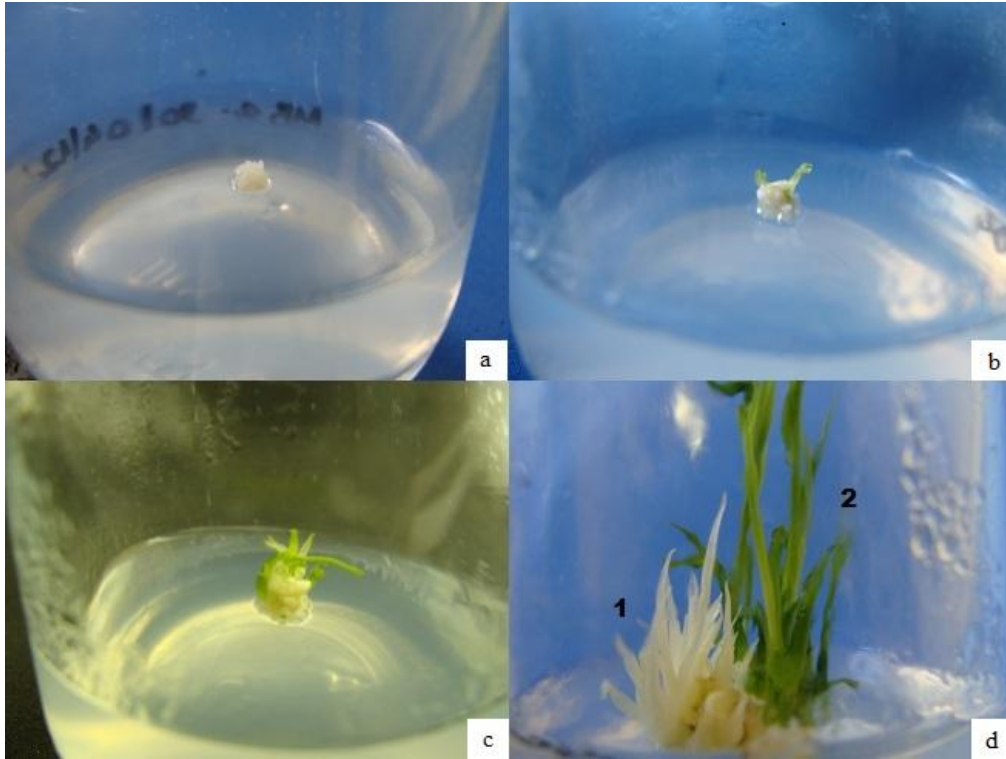


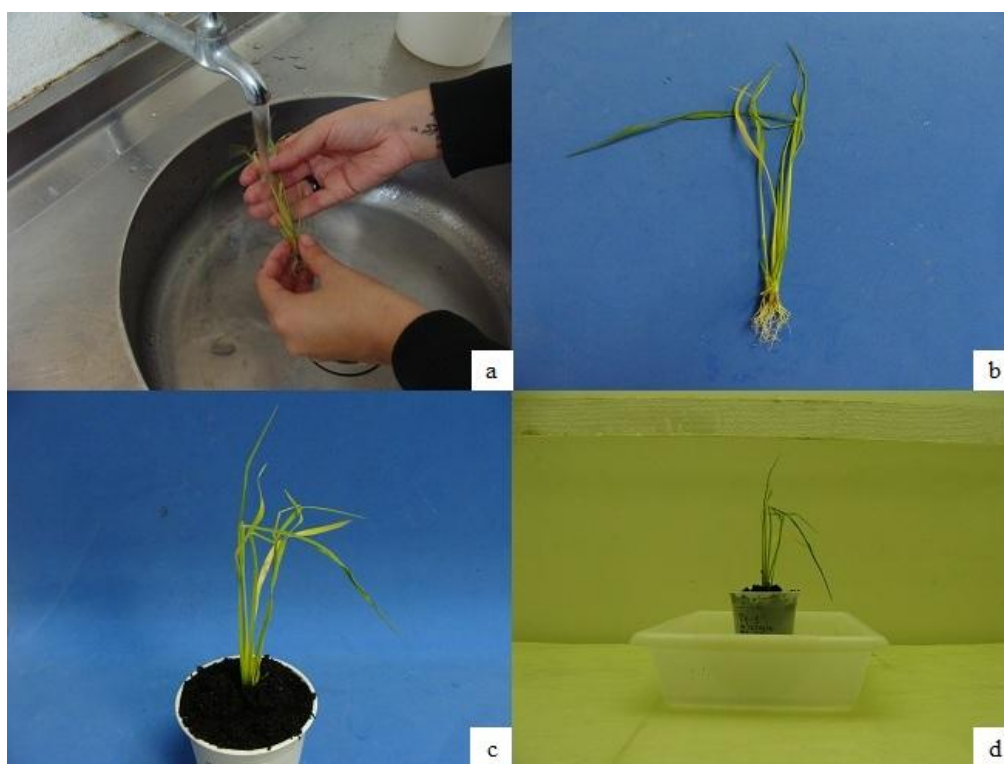
Figura 15. Enraizamento de planta verde (vista inferior do frasco).



### 5.2.12 Aclimatização

As plantas regeneradas e enraizadas foram lavadas em água corrente, separadas e transferidas para recipientes contendo substrato composto principalmente por casca de arroz queimada, então foram acondicionadas em câmara úmida, onde permaneceram até atingir o tamanho ideal para serem transferidas a uma casa de vegetação (Figura 16).

Figura 16. Aclimatização. a) Retirada do meio de cultura. b) Planta pronta para transplante em substrato. c) Planta em substrato à base de casca de arroz queimada. d) Aclimatização em câmara úmida.



### 5.3 ANÁLISE CITOLÓGICA DOS MICRÓSPOROS

Um teste foi realizado com o intuito de observar o estágio de desenvolvimento em que se encontravam os micrósporos, pois há estudos que indicam a importância desse estágio em relação à formação de calos e plantas verdes.

Além dos materiais com DEC de 6 e 10 cm, utilizados no experimento, também foi testado um material intermediário com 8 cm para fins de comparação. E para que houvesse uma maior precisão dos dados todas as panículas foram divididas em parte apical, mediana e

basal (Figura 17). Esta separação se deve ao fato de que uma panícula não possui uniformidade no desenvolvimento das diferentes regiões que a forma.

Para a realização deste teste usou-se como base o protocolo desenvolvido por LENTINI et al. (1997, tradução própria) que é dividido em três momentos:

1 - As anteras são encubadas em uma solução fixadora por 24 horas. A solução é composta por três partes de etanol absoluto e uma parte de ácido acético glacial, na qual é acrescentado cloreto férrico em uma proporção de 0,5% (Figura 17).

2 - As anteras são maceradas com ajuda de ferramentas simples como a cabeça de um prego ou outro material acessível no laboratório. A maceração pode ser feita em uma base lisa e higienizada ou diretamente sobre a lâmina, a qual será levada ao microscópio. Ao material macerado é acrescentado o corante, acetocarmím a 0,5%.

3 - ao final o material devidamente preparado deve ser colocado em um microscópio com uma capacidade de aumento de 40X – 100X, onde, então, serão visualizados e avaliados os estágios de desenvolvimento dos micrósporos.

Figura 17. Preparo para a análise citológica. a) Divisão da panícula em região apical(1), mediana (2) e basal (3). b) Beckeres contendo as anteras imersas em solução fixadora. c) Detalhe de anteras imersas em solução fixadora.



## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.4.1 Formação de calos

Os primeiros calos regenerados a partir dos micrósporos foram visualizados durante a 5ª avaliação, após 42 dias da implantação da cultura de anteras, no tratamento T3. O cultivo de anteras, nos meios contendo diferentes concentrações da auxina 2,4D e também diferentes DEC, proporcionou a formação de calos em todos os tratamentos, com exceção do T2. (TABELA 1).

Tabela 3. Efeito do meio de cultura, reguladores de crescimento e da distância entre colares (DEC) sobre a formação de calos a partir do cultivo de anteras de arroz (*Oryza sativa*) cultivadas em meio N6 adicionado de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenoacético (ANA) e cinetina (KIN), incubados em sala de crescimento escura por um período de 90 dias.

Tratamento	N° de explantes inoculados	DEC (cm)	Meio inicial: N6 (mg/L)			Início da formação de calos (dias)	Formação de calo (%)	Coloração	Consistência do calo	Diâmetro (mm)
			2,4-D	ANA	KIN					
T1	280	6	0,5	2,0	0,5	42	0,36	Branco	Friável	< 1mm
T2	280	6	2,0	2,0	0,5	-	0	-	-	-
T3	160	6	4,0	2,0	0,5	49,0	1,88	Creme	Friável	< 1mm
T4	360	10	0,5	2,0	0,5	56,0	0,28	Branco	Friável	< 1mm
T5	260	10	2,0	2,0	0,5	63,0	1,15	Branco + Creme	Friável	< 1mm
T6	300	10	4,0	2,0	0,5	63	1,00	Branco	Friável	< 1mm

Quando comparado com outros experimentos realizados no LBIO, observou-se precocidade no tempo de formação de calos, porém constataram-se baixas taxas de formação e um desenvolvimento celular mais lento.

Apesar de observada a desdiferenciação celular, ou seja, a formação de calos, foi possível a confirmação de que os micrósoros responderam positivamente à ação da auxina em suas diferentes concentrações. Porém devido à dificuldade para a formação dos calos, outros fatores que podem ter interferido no processo devem ser considerados.

A excisão das anteras deve ser feita em um período específico, e curto, do desenvolvimento dos micrósoros. Vasil & Nitsch (1975), citados por Torres et al. (1999) definem a mitose do micrósporo como a fase crítica para a excisão das anteras, pois nesse período há a sintetização da maior parte do rRNA e do tRNA. Ao final da mitose os genes responsáveis pela síntese destes ácidos nucleicos são desligados, portanto as anteras devem ser excisadas e inoculadas em um momento anterior, posterior ou durante a mitose.

O fator genótipo, segundo Lentini et al. (1997, tradução própria), tem muita influência sobre a formação de calos e também sobre a regeneração de plantas verdes, assim variedades de arroz de origem Índica são as que possuem menor resposta à formação de calos.

Também segundo Lentini et al. (1997, tradução própria) os níveis de radiação que a planta doadora recebe nos últimos 2 meses antes da coleta do material interfere consideravelmente na resposta *in vitro*, observando que quanto maior este nível, melhor esta resposta. Como a coleta do material utilizado neste trabalho teve início no mês de março, quando já se tinha um declínio do fotoperíodo, era esperado que os resultados tivessem valores inferiores ao encontrados em literatura.

Outro fator que pode ter contribuído para essa baixa formação de calos foram as quedas na temperatura da sala de incubação causadas por defeitos no equipamento. As baixas temperaturas possuem efeito negativo sobre o desenvolvimento celular, observando que a temperatura adequada está entre 24 e 26°C. (LENTINI et al., 1997, tradução própria).

#### **5.4.2 Regeneração de plantas verdes, enraizamento e aclimatização**

Devido ao curto período do estágio e às baixas taxas de crescimento dos calos obtidos no experimento, estas etapas não puderam ser realizadas, porém houve o acompanhamento do trabalho realizado pelo LBIO acerca do projeto de melhoramento de arroz irrigado através da obtenção de plantas DH de populações híbridas F1 com características de interesse agrônomo e de seus resultados (Tabela 2).

Os procedimentos abordados nestas etapas são os mesmos descritos nos itens 5.2.10, 5.2.11 e 5.2.12.

Tabela 4. Resultados parciais obtidos pelo Laboratório de Biotecnologia da Epagri acerca da produção de plantas DH de arroz (*Oryza sativa*) sobre a quantidade de anteras de três populações híbridas F1 (30, 44 e 57) inoculadas em três diferentes meios de cultura (A, B e C).

Inoculação			Formação de Calo		Regeneração de Plantas verdes		Aclimação	
Híbrido F1	MEIO	Anteras	Nº	%	Nº	%	Nº	%
30	A	1000	-	-	-	-	-	-
	B	1000	5	0,5	-	-	-	-
	C	1000	-	-	-	-	-	-
44	A	1000	2	0,2	-	-	-	-
	B	1000	17	1,7	4	0,4	-	-
	C	1000	8	0,8	2	0,2	-	-
57	A	1000	3	0,3	-	-	-	-
	B	1000	9	0,9	2	0,2	-	-
	C	1000	3	0,3	1	0,1	6	0,6
<b>TOTAL</b>		<b>9000</b>	<b>47</b>		<b>8</b>		<b>6</b>	

Fonte: Laboratório de Biotecnologia – Epagri, 2012.

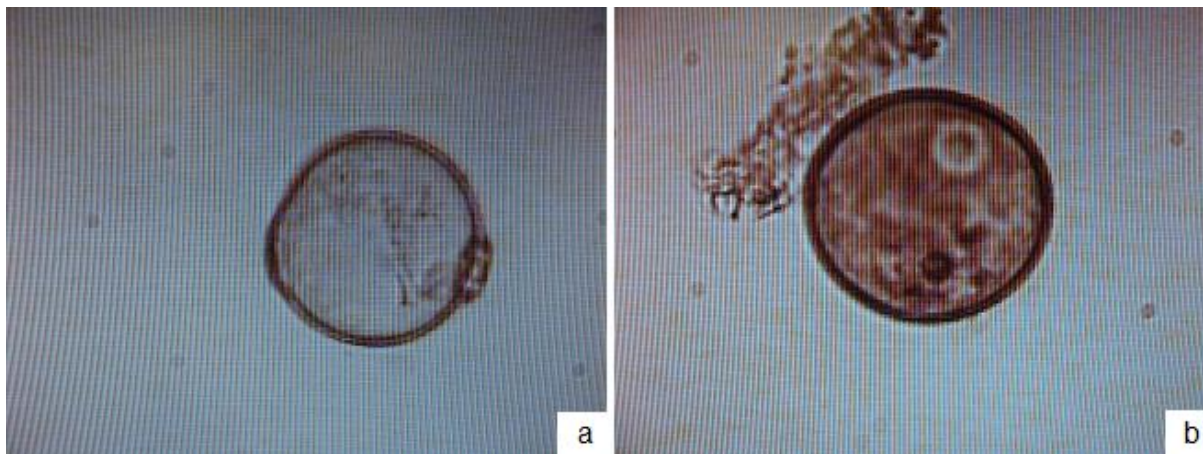


### 5.4.3 Análise citológica dos micrósporos

A partir da análise citológica dos micrósporos foi possível a constatação da diferença do desenvolvimento em cada material utilizado. O material vegetal com DEC de 6 cm apresentou 100% dos micrósporos, no estágio caracterizado como uninucleado (Figura 18a) precoce e uninucleado tardio. O material de 8 cm apresentou 95% dos micrósporos ainda em estágio uninucleado, precoce e tardio, e apenas 5% de binucleados (Figura 18b) precoces. Para o material de 10 cm verificou-se que 89,5% dos micrósporos apresentavam estágio binucleado, precoce e tardio, e 10,5% em estágio uninucleado tardio.

A influência e a definição dos melhores estágios de desenvolvimento dos micrósporos para sua utilização na cultura de anteras são descritos por Lentini et al. (1997, tradução própria) e também por Termignoni (2005). Segundo esses autores os melhores estágios para utilização dos micrósporos são os estágios uni ou binucleado. Sobre esse aspecto é possível afirmar que as anteras inoculadas continham micrósporos com desenvolvimento semelhante ao citado por estes autores.

Figura 18. Micrósporos de arroz. a) Micrósporo em estágio uninucleado. b) Micrósporo em estágio binucleado.



### 5.5 CONCLUSÃO

Apesar de ter sido desenvolvido em um curto período, o estágio permitiu o acompanhamento de todas as atividades acerca da produção de plantas DH, desde a coleta do material no campo até a aclimatização das plantas regeneradas em meio asséptico.

No presente trabalho foi possível a formação de calos nos diferentes tratamentos aplicados. Porém devido aos diversos fatores anteriormente citados houve uma baixa taxa de formação dos calos e, portanto dispensou-se uma análise estatística dos dados obtidos.

Através da análise citológica foi possível a definição do estágio de desenvolvimento dos micrósporos presentes nas anteras de arroz, em plantas que se encontravam em diferentes etapas de desenvolvimento fenológico.

## 6 CAPÍTULO 3 – OUTRAS ATIVIDADES REALIZADAS EM LABORATÓRIO

### 6.1 INTRODUÇÃO

Durante o período de realização do estágio foram desenvolvidas várias atividades que não aquelas relacionadas à cultura do arroz. Foram acompanhadas e colocadas em pratica atividades relacionadas com a micropropagação de plantas ornamentais, de variedades copa de citros e bananeira.

A importância da micropropagação dentro da floricultura é indiscutível, pois os produtos gerados através desta, estão ligados a um mercado extremamente exigente, que busca a todo o momento lançar novidades e produtos com melhor qualidade.

TOMBOLATO (1998) cita o emprego das mais avançadas técnicas, da produção à comercialização, para que as exigências do mercado possam ser atendidas e é na produção que as técnicas de propagação *in vitro* têm sua maior importância.

A micropropagação de mudas permite uma maior agilidade em processos que levariam muito tempo para serem realizados de maneira convencional, alguns dos principais são a propagação massal de uma nova variedade de interesse, a limpeza de vírus, a manutenção de germoplasmas e sua possível utilização em programas de melhoramento genético. (PIERIK, 1974, tradução própria).

No caso específico das Aráceas existe a dificuldade de se obter plantas com as mesmas características das suas parentais, já que esta é uma espécie de fecundação cruzada e assim gera sementes que darão origem a uma progênie muito heterogênea, neste contexto tem-se a importância da produção de mudas propagadas vegetativamente. (TOMBOLATO, 1998), incluindo-se neste processo a micropropagação *in vitro*.

AMMIRATO et al. (1990, tradução própria) descrevem a possibilidade de obter-se a regeneração de plântulas a partir de calos provenientes de diferentes tecidos da planta doadora, incluindo explantes de lâmina foliar, pistilo, pedúnculo floral, espata e espádice.

Em frutíferas, especialmente em citros, o grande potencial da micropropagação se dá por conta da certificação de mudas. As técnicas aplicadas para a regeneração de plantas saudáveis são as culturas de células, de meristemas ou microenxertia. (TORRES et al., 1990). Porém na cultura da bananeira a micropropagação é utilizada mais amplamente como ferramenta de multiplicação massal de mudas em grande escala.

Na cultura dos citros há grande interesse na obtenção de plantas livres de vírus por meio da cultura do meristema apical, pois este apresenta características que favorecem o

cultivo *in vitro*. Duas dessas características se destacam. A primeira citada por Termignoni (2005), é a ausência de feixes vasculares neste tecido devido a idade deste e o segundo, citado por TORRES et al. (1998), é em relação à organização estrutural do tecido, que permite o desenvolvimento da parte aérea sem a necessidade de passar pela fase de calo. Outras características favoráveis à cultura do meristema apical também citadas por Termignoni (2005) são a facilidade de obtenção, pelo número inicial de explantes obtidos da planta-mãe, pela viabilidade *in vitro* e pelo rápido crescimento.

## 6.2 ATIVIDADES

### 6.2.1 Micropropagação de plantas ornamentais

#### 6.2.1.1 Aráceas e *Dracena goldieana*

As atividades realizadas em laboratório com as culturas de plantas da família das Aráceas e da espécie *Dracena goldieana* visaram ao estabelecimento de cultivo asséptico a partir de material vegetativo, neste caso foram utilizadas partes das lâminas foliares, preferencialmente partes que continham nervuras de maior espessura, para a obtenção de calos e posteriormente a regeneração de mudas com carga genética idêntica a da planta doadora, ou seja, clones. Da espécie *Dracena goldieana* também foram usados segmentos caulinares para a regeneração de plantas a partir de meristemas axilares e apical.

A pré-asepsia se deu através da lavagem do material com detergente neutro e água corrente, em seguida foi passado um algodão embebido em etanol 70% sobre toda a superfície material que logo após foi reduzido a pedaços circulares com 1 cm de diâmetro e imersos numa solução fungicida, Kasumim a 0,008% onde permaneceram de 16 a 22 horas. No caso da *Dracena* o material foi mantido por cerca de uma hora em água corrente antes de ser imerso em Kasumim.

Na câmara de fluxo laminar, cada um, dos seis materiais da família das Aráceas foi submetido a seis tratamentos (T1, T2, T3, T4, T5 e T6). Os procedimentos adotados para cada tratamento foram os seguintes:

T1 – Imersão em etanol 70% por 1 min, imersão em HgCl<sub>2</sub> 0,3% por 1 min, realização de três enxágues, redução do material para 0,6 cm de diâmetro e inoculação em meio MS (ver anexo 1) modificado com 2 mg/l de 2,4D.

T2 – Imersão em etanol 70% por 1 min, imersão em NaOCl 0,5% por 20 min, realização de três enxágues, redução do material para 0,6 cm de diâmetro e inoculação em meio MS modificado com 2 mg/l de 2,4D.

T3 – Imersão em etanol 70% por 2 min, imersão em NaOCl 0,5% por 20 min, realização de três enxágues, redução do material para 0,6 cm de diâmetro e inoculação em meio MS modificado com 2 mg/l de 2,4D.

T4 – Imersão em etanol 70% por 1 min, imersão em HgCl<sub>3</sub> 0,3% por 1 min, realização de três enxágues, redução do material para 0,6 cm de diâmetro e inoculação em meio Pierik1.

T5 – Imersão em etanol 70% por 1 min, imersão em NaOCl 0,5% por 20 min, realização de três enxágues, redução do material para 0,6 cm de diâmetro e inoculação em meio Pierik1.

T6 – Imersão em etanol 70% por 2 min, imersão em NaOCl 0,5% por 20 min, realização de três enxágues, redução do material para 0,6 cm de diâmetro e inoculação em meio Pierik1.

Para a assepsia do material de *Dracena goldieana* foi realizado apenas um tratamento, tanto para explantes foliares quanto para os segmentos caulinares. Em CFL, os materiais foram imersos em etanol 70% por 2min, em HgCl<sub>3</sub> 0,3% por 4min e em NaOCl 1% por 10min, em seguida foram realizados quatro enxágues com água estéril. Os explantes foram inoculados em meio MS acrescido de 0,5 mg/l de 2,4D.

Os segmentos caulinares de *Dracena* foram incubados em sala de crescimento e permaneceram expostos a um fotoperíodo de 16 horas de luz, enquanto os materiais de *Aráceas* e os explantes foliares de *Dracena* foram incubados em sala de crescimento no escuro. A sala de crescimento possui temperatura média de 25°C e UR de 60%.

#### 6.2.1.2 Butiazeiro (*Butia* sp.)

Os trabalhos realizados com o butiá tiveram dois objetivos. O primeiro visou à formação de calos a partir da cultura asséptica de explantes foliares e radiculares e a segunda atividade tinha como propósito a regeneração de plantas a partir da cultura asséptica do meristema apical presente nas mudas.

Os materiais usados foram plantas jovens contendo uma ou duas folhas. Esse material foi retirado do telado, onde se encontrava em vasos contendo substrato de casca de arroz, e levado ao laboratório.

Na pré-asepsia os materiais foram lavados com esponja, detergente neutro e água corrente, em seguida o material foi dividido em três partes, raiz, folha e segmento caulinar, onde se encontrava o meristema apical. Os três materiais foram reduzidos, colocados em frascos separados e mantidos em água corrente por cerca de uma hora.

Após a pré-asepsia os materiais foram colocados em frascos contendo água estéril e assim levados para a CFL para que se procedesse a assepsia.

Foram realizados dois tratamentos envolvendo a zona do meristema. No primeiro tratamento (T1) o material foi imerso sequencialmente em Manzate 5g/l por 20 min, NaOCl 1% por 30 min e em ácido cítrico 150 mg/l por 30min. No segundo tratamento (T2) os explantes foram imersos em etanol 70% por 1 min e logo após em NaOCl 1,5% por 30 min. Ambos os tratamentos foram seguidos por três enxágues com água estéril. Concluídas as assepsias os materiais foram inoculados em meio de cultura MS, a um pH de 5,8, contendo 10 mg/l da auxina 2,4D e 0,3 g de carvão ativado. O material foi levado para a sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas para incubação a uma temperatura de 25°C.

Os explantes foliares e radiculares também foram submetidos a dois tratamentos. No primeiro (T1) os materiais foram imersos sequencialmente em NaOCl 2,6% por 20 min e em ácido cítrico por 20min. No segundo tratamento (T2) os explantes foram imersos em etanol 70% por 1 min, em seguida em NaOCl 1,5% por 30 min e por fim foram realizados 3 enxágues com água estéril. Feitas as assepsias foi realizada nova redução dos explantes, os quais foram inoculados em meio MS modificado com 0,7% de ágar, 10 mg/l de 2,4D e 3 mg/l de BAP. O material foi levado para a sala de crescimento em câmara escura para incubação a uma temperatura de 25°C.

### 6.2.1.3 Bromélias

Os trabalhos a cerca da cultura de bromélias do gênero *Guzmania* se resumiram a atividade de repicagem dos materiais para a obtenção de uma quantidade maior de plantas.

Os procedimentos realizados em CFL constituíam da retirada do aglomerado de plantas que se formou em um frasco, divisão destes em aglomerados menores ou, quando uma planta apresentava maior tamanho, separação do indivíduo e inoculação em novo meio de cultura para continuação do desenvolvimento.

O meio utilizado para a nova inoculação do material foi o meio MS líquido, modificado com 0,4 mg/l de ANA e 0,9 mg/l de BAP. O material foi levado a uma sala de

crescimento para incubação a uma temperatura de 25°C, UR de 60% e 16 horas luz de fotoperíodo.

#### 6.2.1.4 Orquídeas (*Arundina bambusifolia*)

Assim como as atividades realizadas com a cultura de bromélias, com as plantas de orquídeas da espécie *Arundina bambusifolia* também se resumiram à repicagem do material visando a um aumento na quantidade de plantas produzidas.

Após a retirada dos frascos e divisão das plantas, o material foi inoculado em meio MS modificado com 2 mg/l de BAP e as culturas foram mantidas em sala de crescimento para incubação a uma temperatura de 25°C, UR de 60% e 16 horas luz de fotoperíodo.

### 6.2.2 Micropropagação de frutíferas

#### 6.2.2.1 Citros

Foram acompanhadas atividades relacionadas à limpeza de vírus, por meio da regeneração de plantas a partir do meristema apical com diversas variedades de citros.

O processo que visa ao desenvolvimento de plantas saudias a partir do meristema apical foi dividido em várias etapas:

- Coleta: retirada de brotações com aproximadamente 2 cm e imersão das mesmas em água destilada para evitar desidratação.

- Retirada do meristema apical: com ajuda de uma lupa, bisturis e pinças reduziu-se o material deixando o meristema com apenas dois primórdios foliares e então realizou-se o corte para separação do meristema. Imediatamente após o corte de separação o meristema foi depositado em uma placa de Petri contendo água estéril.

- Assepsia: em CFL os meristemas foram imersos em NaOCl a uma concentração de 0,5% por um tempo de 15 segundos, em seguida foram realizados três enxágues.

- Inoculação: com a ajuda de um bisturi os meristemas foram, cuidadosamente, inoculados no meio de cultura para regeneração da nova planta.

- Incubação: O material foi encubado em sala de crescimento a uma temperatura de 25°C, UR de 60% e fotoperíodo de 16 horas luz.

#### 6.2.2.2 Bananeira

As atividades acompanhadas com relação à cultura da banana foram r ligadas à obtenção de mudas através da cultura asséptica do meristema apical de plantas jovens. O procedimento foi dividido em três etapas principais:

A primeira etapa foi realizada a campo, onde os materiais foram coletados, reduzidos, lavados com água corrente, reduzidos novamente e colocados em NaOCl a uma concentração de 0,5% por um período de 12 a 24 horas em um recipiente escuro para evitar a oxidação e consequentemente o escurecimento do tecido a ser trabalhado no laboratório.

A segunda e a terceira etapas foram realizadas em laboratório, são elas a pré-asepsia em bancada e a asepsia em CFL seguida pela inoculação do material em meio de cultura. A pré-asepsia iniciou com o recebimento do material vindo do campo ainda imerso em NaOCl a 0,5%. Esse material foi retirado da solução e novamente reduzido, sendo, após esta, colocado novamente em NaOCl com concentração de 0,5% e levado para a CFL. A asepsia consistiu na imersão do material em etanol 70% por 5 min e imersão em NaOCl 1,0% por 30 min seguido por três enxágues com água estéril. Realizada a asepsia o material sofreu nova redução preservando-se apenas uma pequena porção do material que envolve o meristema apical, inoculando-o em seguida em um meio de cultura específico para o desenvolvimento do mesmo.

O material inoculado foi mantido durante 7 dias em ambiente escuro, após este período foi transferido para uma sala de crescimento com fotoperíodo de 16h de luz, temperatura variando entre 24 e 25°C e UR de 60%.



Figura 19. Procedimentos para multiplicação asséptica de bananeira. a) Primeira redução, no campo. b) Material recebido no laboratório. c) Segunda redução, no laboratório. d) Material imerso em NaOCl. e) Material na CFL. f) Terceira redução, em CFL. g) Material pronto para inoculação. h) Inoculação do material.



### 6.3 CONCLUSÃO

A realização destas atividades teve sua importância no sentido de acrescentar conhecimento prático com relação aos procedimentos adotados nos trabalhos de multiplicação de diferentes espécies vegetais a partir da cultura de tecidos, observando-se suas peculiaridades.

Tendo em vista que o mercado florístico apresenta clara ascensão, o desenvolvimento de tecnologia e conhecimento acerca deste deve ser tomado como essencial para que as demandas por qualidade e quantidade sejam atendidas, buscando sempre que possível a otimização dos processos.

A regeneração *in vitro* de mudas de citros livres de vírus representa toda uma base para a cadeia produtiva destas frutas, pois sem esse processo seria muito difícil a formação de

matrizeiros certificados e pomares com alta produtividade, livres de infestação por viroses ou outras enfermidades.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente às informações tratadas neste e em diversos outros trabalhos pôde-se observar o grande potencial que envolve a micropropagação de plantas e especialmente a obtenção de duplo-haplóides, quando ligada às áreas de produção e do estudo das plantas em todos os seus aspectos, haja vista que apesar de uma considerável quantidade de material literário sobre a cultura de tecidos de plantas, o campo da produção de duplo-haplóides ainda carece de estudos para o seu aperfeiçoamento. Para tanto as dificuldades encontradas durante os mais diversos processos são fontes de novas pesquisas geradoras de conhecimentos.

O desenvolvimento do estágio em uma empresa cujo objetivo é a geração e a difusão de tecnologia e conhecimento nas mais diferentes linhas de pesquisa fez com que os pensamentos formados durante a graduação fossem, em alguns casos, confirmados ou em sua maioria, confrontados com experiências que os remodelaram ao mundo profissional.

A Epagri, em especial o L BIO, proporcionou grande quantidade de informações, práticas e teóricas, que julgo de extrema relevância para minha vida profissional como Engenheiro Agrônomo. O acompanhamento de uma equipe à qual pude recorrer, sem receios, para sanar quaisquer dúvidas que surgissem durante todo o período, permitiu que os objetivos iniciais deste estágio fossem alcançados.

## REFERÊNCIAS

- DUNWELL, Jim M. **Haploids in flowering plants: origins and exploitation.** – Reading, UK ; Plant Biotechnology Journal (2010) 8, pp. 377–424; School of Biological Sciences, University of Reading, Whiteknights.
- EMBRAPA. Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil . Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/index.htm>>. Acesso em: 27 março 2012.
- Epagri. **Histórico da produção de arroz irrigado.** 2008. Disponível em: <[http://www.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=84](http://www.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=84)>. Acesso em: 04 de maio 2012.
- EVANS, D. E. et al. **Plant cell culture. The Basics (BIOS Scientific Publishers) The basics from background to bench.** 2003.
- FONSECA, J. R. **Descritores botânicos, agronômicos e fenológicos do arroz (Oryza sativa L.)** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2008
- FONSECA, J. R. et al. **Comportamento de linhagens de arroz irrigado introduzidas do CIAT /–** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 12 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão).
- JUNGHANS, T. G. **Aspectos práticos da micropropagação de planta** / editores Tatiana Góes Junghans, Antônio da Silva Souza; autores Ana Cecília Ribeiro de Castro... [ et al.]. – Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 385p.
- KALCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI M. H. Andrandrogênese: Uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.165-173, 2002.
- LANNES, S. et al. Regeneração *in vitro* de anteras de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) e mapeamento de QTL associado, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1355-1362, set-out, 2004.
- LENTINI, Z. et al. **Mejoramiento del arroz con cultivo de anteras: aplicaciones en el desarrollo de germoplasma adaptado a ecosistemas latinoamericanos y el Caribe.** Cali: CIAT, 1994. 79p.
- LENTINI, Z. ; MARTÍNEZ, C. ; ROCA, W. **Cultivo de anteras de arroz em el desarrollo de gesmoplasma.** – Cali, Colômbia ; Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1997. 57p. Ilus. (Publicación CIAT ; no, 293).
- MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Princípios debiotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas.** Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344 p.

MARSCHALEK, R. et all. **Melhoramento genético de arroz irrigado em Santa Catarina.** Agropecuária Catarinense. v.21, n.3, nov. 2008.

MURASHIGE, T. **1990 Plant propagation by tissue culture:** a practice with unrealized potential. In *Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 5: Ornamental Plants*, eds Ammirato, P.V., Evans, D.A, Sharp, W.R. & Bajaj, YP.S. pp. 3-9. New York: McGraw Hill.

PIERIK, R.L.M., et all. **Plant formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lind.** *Sientia Hort.* 2: 193 – 198. 1974.

RANGEL, P. H. N. et al., **Ganhos na produtividade de grãos pelo melhoramento genético do arroz irrigado no meio norte do Brasil.** *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.35, n.8, p.1595-1604, ago. 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, Eduardo., et al. **Fisiologia vegetal.** Trad. Eliane Romanato Santarém 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TERMIGNONI, Regina Ramos. **Cultura de Tecidos Vegetais.** Porto Alegre, Editora da UFRGS, 2005. 182 p.

TOMBOLATO, A. F. C. **Micropropagação de plantas ornamentais**, por Antonio Fernando Caetano e Ana Maria Molini Costa (coords.). Campinas, Instituto Agronômico, 1998.

TORRES, Carlos Antonio; CALDAS, Linda Styler; BUSO, José Amauri. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Editado por Antonio Carlos Torres, Linda Styler Caldas. Brasília, ABCTP/Embrapa-CNPH, 1990, 433 p.

TORRES, Carlos Antonio; CALDAS, Linda Styler; BUSO, José Amauri. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Editado por Antonio Carlos Torres; Linda Styler Caldas; José Amauri Buso. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa-CNPH. 1998. 2v. (864p.).

VIEIRA, J. et all. **A hibridação no melhoramento genético do arroz irrigado em Santa Catarina.** *Agropecuária Catarinense.* v.20, n.2, jul. 2007.

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R.; SANTOS, M.A.; TORNE, J.M. **1994. Obtenção de uma linhagem de milho tolerante ao estresse salino mediante a cultura de anteras.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 30:1313-1318.

**ANEXO A - CONCENTRAÇÕES, EM MG/L, DOS MEIOS DE CULTURAS BASAIS UTILIZADOS NO TRABALHO.**

<b>Componentes</b>	<b>Murashige &amp; Skoog (1962). Sais em mg/l</b>	<b>N6 (Chu). Sais em mg/l</b>	<b>Pierik (1976). Sais em mg/l</b>
<b>Macronutrientes</b>			
Nitrato de Potássio	1900	2830	950
Nitrato de Amônio	1650	n/c	825
Cloreto de Cálcio Anidro	332	125	332
Sulfato de Magnésio Anidro	181	90	181
Fosfato de Potássio Monobásico	170	400	85
Sulfato de Amônio	n/c	463	n/c
<b>Micronutrientes</b>			
Sulfato de Manganês - H <sub>2</sub> O	16,9	3,3	16,9
Sulfato de Zinco - 7H <sub>2</sub> O	8,6	1,5	8,6
Ácido Bórico	6,2	1,6	6,2
Iodeto de Potássio	0,83	0,8	0,83
Sulfato Cúprico Anidro	0,025	n/c	0,025
Molibdato de Sódio - 2H <sub>2</sub> O	0,25	n/c	0,25
Cloreto de Cobalto Anidro	0,025	n/c	0,025
Na <sub>2</sub> - EDTA - 2H <sub>2</sub> O	37,2	37,2	37,2
Sulfato Ferroso - H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8
<b>Vitaminas</b>			
Ácido Nicotínico	0,5	0,5	0,5
Cloridrato de Piridoxina	0,5	0,5	0,5
Cloridrato de Tiamina	0,1	1	0,1
Glicina	2	2	2
myo-Inositol	100	n/c	100