

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Arroz e Feijão  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

## **Documentos 285**

# **Cultivo *in vitro* do arroz (*Oryza sativa* L.): conceitos básicos e protocolo**

*Rosângela Bevitori*

Embrapa Arroz e Feijão  
Santo Antônio de Goiás, GO  
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

### **Embrapa Arroz e Feijão**

Rod. GO 462, Km 12  
Caixa Postal 179  
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO  
Fone: (0xx62) 3533 2110  
Fax: (0xx62) 3533 2123  
www.cnpaf.embrapa.br  
cnpaf.sac@embrapa.br

### **Comitê de Publicações**

Presidente: *Camilla Souza de Oliveira*  
Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*  
Membros: *Ana Lúcia Delalibera de Faria*  
*Flávia Aparecida de Alcântara*  
*Heloisa Célis Breseghello*  
*Henrique César de Oliveira*  
*Luís Fernando Stone*  
*Márcia Gonzaga de Castro Oliveira*

Supervisor editorial: *Camilla Souza de Oliveira*  
Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*  
Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*  
Tratamento de ilustrações: *Fabiano Severino*  
Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

### **1ª edição**

Versão online (2013)

### **Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Arroz e Feijão**

---

Bevitori, Rosângela.

Cultivo *in vitro* do arroz (*Oryza sativa* L.) : conceitos básicos e protocolo / Rosângela Bevitori. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2013. 68 p. - (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 285)

1. Arroz – Cultura de tecido. 2. Arroz – Micropropagação. I. Título. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

---

CDD 633.18233 (21. ed.)

© Embrapa 2013

# **Autores**

## **Rosângela Bevitori**

Engenheira agrônoma, Ph.D. em Agronomia,  
pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão,  
Santo Antônio de Goiás, GO,  
[rosangela.bevitori@embrapa.br](mailto:rosangela.bevitori@embrapa.br)



# Apresentação

O arroz, além de sua importância econômica no Brasil e no mundo, destaca-se também por ser planta modelo para estudos moleculares da família Poaceae.

O seu cultivo *in vitro* para produção de embriões somáticos e regeneração de plantas é uma ferramenta valiosa para os programas de melhoramento genético do arroz, podendo auxiliar no aumento da variabilidade genética.

Sua aplicação também se estende aos estudos de caracterização funcional de genes provenientes de estudos de genômica funcional. Portanto, um sistema de cultivo *in vitro* eficiente, meios otimizados e genótipos adequados são de extrema importância.

Nesse sentido, esta publicação apresenta conceitos básicos da teoria e da prática do cultivo de tecidos de arroz, e adicionalmente descreve cada etapa de protocolo para o cultivo *in vitro* das cultivares de arroz BRS Primavera e BRS Bonança.

*A autora*



# Sumário

<b>Introdução</b> .....	9
<b>Fatos Importantes na História da Cultura de Tecidos de Arroz</b> .	12
<b>Cultivo <i>in vitro</i> do Arroz e suas Aplicações no Melhoramento Genético</b> .....	13
Cultura de anteras para produção de haplóides .....	14
Variação somaclonal para aumento de variabilidade genética .....	14
Produção de plantas transgênicas.....	15
<b>Noções Básicas de Cultura de Tecidos de Arroz</b> .....	16
Escolha do explante .....	17
Tipos de explantes .....	18
Raiz .....	19
Antera.....	21
Protoplastos .....	21
Embrião imaturo .....	21
Embrião maduro.....	22
<b>Indução de Calos a partir de Embrião Maduro de Arroz</b> ....	22
<b>Composições dos Meios de Cultivo de Arroz <i>in vitro</i></b> .....	25
Requerimentos nutricionais dos calos .....	26
Macronutriente .....	26
Micronutrientes .....	27
Constituintes orgânicos .....	28
Aminoácidos .....	29
Reguladores de crescimento ou hormônios .....	29
Agentes gelificantes.....	30

<b>Meios Utilizados para Indução e Regeneração de Calos ...</b>	<b>31</b>
Preparação de solução estoque de macronutrientes e micronutrientes .	32
<b>Protocolo de Cultivo <i>in vitro</i> de Arroz a partir de Sementes</b>	
<b>Maduras.....</b>	<b>33</b>
<b>Apêndice.....</b>	<b>41</b>
<b>Estabelecimento de um Laboratório de Cultura de Tecidos ...</b>	<b>41</b>
Procedimentos de assepsia da câmara de fluxo .....	48
Preparo de soluções estoque de reguladores de crescimento.....	49
Preparo dos meios para cultivo <i>in vitro</i> .....	50
<b>Referências .....</b>	<b>54</b>

# Cultivo *in vitro* do arroz (*Oryza sativa* L.): conceitos básicos e protocolo

---

*Rosângela Bevitori*

## Introdução

Em meados dos anos 50, estudos pioneiros sobre o cultivo *in vitro* de arroz foram iniciados em vários laboratórios do mundo. Estes estudos constituíram fundação para subseqüentes avanços na área de cultura de células e de tecidos e incorporação destas técnicas em diversos programas de melhoramento de arroz.

Mais recentemente, no contexto da biotecnologia, as ferramentas genômicas, que incluem técnicas de sequenciamento em larga escala, genética reversa e engenharia genética, prometem trazer impactos profundos no melhoramento de plantas, seja pela identificação de genes ou pela incorporação desses genes no desenvolvimento de novas cultivares por transgenia. A partir da identificação de genes em outras espécies, os mesmos podem ser incorporados em plantas-modelo para que uma avaliação dos efeitos da sua introdução, ou de variações na sua expressão, possa ser realizada em um sistema mais simples, antes da sua introdução na planta-alvo, geralmente um processo mais complexo, laborioso, longo e oneroso (KOORNNEEF; MEINKE, 2010). Essa validação final trará informações importantes sobre a provável função biológica do gene-candidato em estudo.

Já a engenharia genética, por meio da transformação de células, possibilita a transferência de genes isolados de qualquer organismo para outras espécies resultando o desenvolvimento da variabilidade não disponível pelos métodos clássicos de melhoramento convencional (JONES; CASSELLS, 1995). Essas tecnologias utilizam técnicas de cultivo *in vitro* nos seus diferentes processos fazendo com que venham ganhando relevante papel no desenvolvimento de ferramentas aplicáveis ao estudo de função gênica e transformação de plantas.

O arroz destaca-se também por ser planta modelo para estudos moleculares da família Poaceae (DEVOS; GALE, 2000) devido ao pequeno tamanho de seu genoma 430 Mbp (ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991), facilidade na manipulação genética e molecular, similaridade genômica com outras monocotiledôneas, ampla disponibilidade de ESTs (Expressed Sequence Tags), acesso a sequências genômicas e mapa molecular saturado (GALE; DEVOS, 1998). Além disso, por sua importância econômica no Brasil e no mundo, a obtenção de uma linhagem transgênica de arroz, que possua características agronômicas desejáveis, é essencial para reduzir o número de retrocruzamentos para transferir genes exógenos entre cultivares de arroz. Entretanto, o desenvolvimento de uma planta transgênica é fortemente dependente do genótipo e da disponibilidade de um método eficiente de regeneração e transformação de plantas. Portanto, a identificação de genótipos de arroz para formação de calos e subsequente regeneração *in vitro* são passos chave para a aplicação da biotecnologia nos programas de melhoramento genético (HOQUE; MANSFIELD, 2004).

Um grande progresso tem sido feito na área de transformação de arroz mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (RASHID et al., 1996; HIEI et al., 1997; TOKI et al., 2006; SU et al., 2008). No entanto, a aplicação desta tecnologia é altamente dependente de um protocolo eficiente para induzir calos embriogênicos, além de meios de cultivo e de genótipos com alta capacidade de indução de calos e regeneração de plantas. Assim, é amplamente relevante conduzir estudos de otimização desses fatores para que um sistema eficiente de cultura *in vitro* de arroz seja estabelecido antes de sua utilização como uma ferramenta

da transformação genética e estudo de função de genes, que são processos mais complexos.

A identificação de um genótipo de arroz e um protocolo de transformação genética adequados é determinante, pois a indução de calos e regeneração de plantas ainda é dependente da resposta do genótipo específico na cultura *in vitro*.

Apesar da disponibilidade de muitos relatos de sucesso de protocolos para a cultura de tecidos de arroz (HIEI et al., 1994; KHALEDA; AL-FORKAN, 2006; TOKI et al., 2006; RAFIQUE et al., 2011), nenhum procedimento parece ser universalmente adaptável quando um novo genótipo é considerado para a manipulação *in vitro* (MAGGIONI et al., 1989). Ainda existem dificuldades no estabelecimento de um sistema de cultivo *in vitro* que possa ser amplamente utilizado, sem modificações, para os diversos tipos de explantes e genótipos de arroz, a julgar pelo imenso número de artigos publicados a esse respeito. Além disso, a adoção da metodologia de desenvolvimento de um laboratório para outro muitas vezes não é reproduzível devido à dificuldade na simulação de condições exatas de experimentação (VISARADA; SARMA, 2004).

Neste cenário, um sistema altamente eficiente para a produção de boa quantidade de calos embriogênicos com alto potencial de regeneração é necessário para o desenvolvimento do arroz transgênico. Além disso, pode ser de grande interesse transformar cultivares elites de arroz, que possuam características agrônomicas desejáveis a serem mantidas, visando reduzir retrocruzamentos e introduzir genes de interesse agrônomico.

Diante do exposto, esta publicação irá considerar algumas questões básicas relacionadas à cultura de tecidos *in vitro* de arroz (*Oryza sativa* ssp. japônica), particularmente os meios de cultura utilizados para regenerar plantas a partir de sementes maduras de arroz, e disponibilizar dois protocolos de cultivo para as cultivares de arroz BRS Primavera e BRS Bonança. Estas foram escolhidas por serem responsivas à indução de calos nos meios de cultivo ora apresentados.

Objetivou-se também apresentar noções e conceitos gerais propiciando ao leitor o estímulo ao entendimento do cultivo do arroz *in vitro* e motivar a participação e/ou interesse individual sobre um tema cada dia mais atual. Para aqueles leitores que estão iniciando as atividades em cultivo *in vitro* encontram-se disponibilizados, no Apêndice deste documento, os seguintes tópicos: estabelecimento de um laboratório de cultura de tecidos, procedimentos de assepsia, preparo de soluções estoques e meios de cultura. Espera-se assim facilitar a consulta a esses assuntos que são de importância tanto para o arroz quanto para o cultivo *in vitro* de qualquer espécie de planta.

## Fatos Importantes na História da Cultura de Tecidos de Arroz

Inúmeras descobertas contribuíram para construir a base da cultura de tecidos de plantas e que foram incorporados ao desenvolvimento do cultivo *in vitro* do arroz. Pode-se citar a descoberta de que a célula era a unidade básica dos organismos e que ela era capaz de se desenvolver quando as condições ideais eram fornecidas (SCHLEIDEN, 1938; SCHWANN, 1839), citados por Sathyanarayana e Varghese, (2007), a descoberta do regulador de crescimento auxina (KOGH et al., 1934), citados por Torres et al., 1998), a descoberta do fitohormônio citocinina (MILLER et al., 1955), dentre muitas outras.

Os pioneiros no cultivo *in vitro* de tecidos de arroz foram Fujiwara e Ojima (1955). Eles utilizaram raízes cortadas da planta e verificaram a necessidade da suplementação do meio de cultivo com vitaminas para crescimento das raízes *in vitro*. No ano seguinte, Amemiya et al. (1956) mostraram que a fonte de nitrogênio na forma de nitrato era a mais adequada para o desenvolvimento *in vitro* de embriões imaturos de arroz. Utilizando 2,4-D, Maeda (1965) demonstrou com sucesso a indução de calos derivados de plântulas de arroz e, em 1967, obteve calos de sementes maduras de arroz.

Yatazawa et al. (1967) induziram calos a partir de raízes intactas de plântulas de arroz. Porém, a regeneração de calos derivados de raízes

de arroz foi subsequentemente relatada por Kawata e Ishihara (1968). Ainda no mesmo ano, brotos foram obtidos de calos iniciados a partir de embriões de arroz (TAMURA, 1968).

A cultura de células também contribuiu para a ocorrência de variação das características fenotípicas das plantas regeneradas a partir do cultivo *in vitro*. Plantas de arroz regeneradas desses cultivos apresentando variações fenotípicas como nanismo e retorcimento das plantas, foram descritas primeiramente por Nishi et al. (1968). Larkin e Scowcroft (1981) propuseram o termo variação somaclonal para descrever a variação detectada nestas plantas. A totipotência de protoplastos de arroz foi primeiro demonstrada por Fujimura et al. (1985) que obtiveram plantas a partir de protoplastos de calos provenientes de semente madura e do embrião imaturo dos calos.

No final dos anos 60, no caso específico do arroz, iniciou-se uma década de pesquisas sem precedentes dedicadas ao desenvolvimento de técnicas de cultivo, meios nutritivos, sistemas de cultivo *in vitro* e identificação de cultivares mais adequadas à indução e regeneração de plantas. Inicialmente, as técnicas se concentraram na cultura de anteras (NIIZEKI; OONO, 1968; NISHI; MITSUOKA, 1969; CHUNG, 1975) e de protoplastos (MAEDA, 1971; DEKA; SEN, 1976). A partir dos anos 80, vários explantes de arroz, de genótipos e de sistemas de cultivo *in vitro* foram utilizados para regeneração de arroz (LI; LIU, 1982; YAN; ZHAO, 1982; ABE; FUTSUHARA, 1985; KYOZUKA et al., 1988; KOETJE et al., 1989; MASUDA et al., 1989; TOKI, 1997; AZRIA; BHALLA, 2000; SAIKA; TOKI, 2010).

## **Cultivo *in vitro* do Arroz e suas Aplicações no Melhoramento Genético**

No início dos estudos da cultura de tecidos em geral, os experimentos eram conduzidos no sentido de se manter indefinidamente os calos obtidos a partir de diferentes explantes de diversas espécies de plantas.

A partir do conhecimento gerado por vários cientistas da época verificou-se que as pesquisas pioneiras deram aos cientistas a capacidade de controlar a organogênese do arroz, como também de outras espécies. Os resultados dessa pesquisa foram, então, a fundação de sucessivos avanços no cultivo *in vitro* dessa planta com consequente aplicação em vários segmentos do desenvolvimento do arroz.

## **Cultura de anteras para produção de haplóides**

A produção de plantas haplóides de arroz por cultura de anteras/micrósporos tem importante aplicação para o melhoramento do arroz. Os haplóides expressam genes recessivos que se tornam fixados quando o cromossoma complementar é duplicado. Para tal, o indivíduo haplóide é submetido a tratamento com colchicina formando o duplo haplóide, que é 100% homocigoto.

A duplicação de cromossoma complementar do material haplóide pode induzir a homocigose rapidamente, encurtando, desse modo, o tempo requerido para o desenvolvimento de novas cultivares. No processo convencional de melhoramento genético, após o cruzamento intervarietal, são necessárias de sete a nove gerações para alcançar a homocigose, o que torna o processo demorado e trabalhoso (MORAES-FERNANDES; PICARD, 1983; LENTINI et al. 1994; SANTOS, 2003). No Brasil, a primeira cultivar de arroz duplo haplóide, desenvolvida com a cultura de anteras, foi a BRS Colosso, lançada em 2004 (FONSECA et al., 2004).

## **Varição somaclonal para aumento de variabilidade genética**

Em 1981, Larkin e Scowcroft (1981) propuseram o termo variação somaclonal para descrever as variações induzidas em plantas cultivadas *in vitro*. As causas prováveis que provocam esse fenômeno são várias e de natureza bastante distintas, como: variação pré-existente, (LARKIN; SCOWCROFT, 1981), mutação nuclear ou citoplásmica (EVANS et al., 1984; BRETTELL et al., 1986), poliploidia ou outras aberrações cromossômicas (AHLOOWALIA, 1982; ORTON, 1983), recombinação mitótica (LARKIN; SCOWCROFT, 1981), dentre outras. Um fator importante que pode afetar a variação somaclonal é a composição química do meio de cultura (YEOMAN; FORCHE, 1980).

Para obtenção dos somaclones, a cultura de tecidos é essencial dentro de um programa de melhoramento, uma vez que o processo de seleção é dependente da variação genética induzida pelas condições do cultivo. Variantes somaclonais em arroz já foram obtidas para resistência a doenças, para vários tipos de grãos e, também, para características complexas como resistência à seca, (ZAPATA et al., 1983; ARAÚJO et al., 2000), porém nenhuma dessas cultivares foi comercializada.

## **Produção de plantas transgênicas**

Desde os anos 80, várias metodologias foram utilizadas para transformar geneticamente o arroz, como por exemplo, a eletroporação, o PEG (polietilenoglicol), o bombardeamento de partículas e a *A. tumefaciens*, utilizando protoplastos, sementes maduras e embrião imaturo (TORIYAMA et al., 1988; HAYASHIMOTO et al. 1990; CHRISTOU et al., 1991; HIEI et al., 1994; HIEI; KOMARI, 2008).

A transformação mediada por *Agrobacterium* tornou-se muito popular devido às vantagens que oferece em relação às demais tecnologias como, por exemplo, alta eficiência de transformação, integração de uma cópia do T-DNA (DNA de transferência) no cromossoma e transferência de grandes segmentos de DNA. O arroz vem sendo modificado geneticamente com vários objetivos como para adquirir resistência a insetos, aumentar o valor nutricional, e resistência à seca, conforme detalhado a seguir.

Com respeito à resistência a insetos, destaca-se o arroz Bt que foi modificado para expressar o gene *cry1A(b)* da bactéria *Bacillus thuringiensis* que confere resistência a vários insetos inclusive à broca-do-arroz (CHENG et al., 1998; TU et al., 2000). O Irã foi o primeiro país a aprovar comercialmente o plantio de arroz Bt produzindo quatro milhões de ha no ano de 2005 ([http://www.gmo-compass.org/eng/agri\\_biotechnology/gmo\\_planting/194.docu.html](http://www.gmo-compass.org/eng/agri_biotechnology/gmo_planting/194.docu.html)). A China, em 2009, foi autorizada a comercializar o arroz Bt, e testes de campo iniciados em 2010 (WALTZ, 2010) ainda estão em andamento (JAMES, 2011).

Quanto ao valor nutricional, o arroz foi modificado para aumentar o teor de vitamina A. O "Golden Rice", ou arroz dourado, foi desenvolvido

pelo Dr. Ingo Potrykus e seu grupo (YE et al., 2000). Atualmente a companhia Syngenta mantém os direitos de distribuição comercial do arroz dourado. Espera-se aprovação de seu cultivo comercial desse arroz transgênico nas Filipinas em 2013/2014 (JAMES, 2011). Países como China, Vietnam e Bangladesh estão avaliando o produto com vista à implementação comercial (JAMES, 2011).

Um número crescente de linhagens de arroz transgênico vem sendo avaliado para outras características tais como tolerância à seca (GARG et al., 2002; FUKUOKA et al., 2009) e resistência à *Magnaporthe oryzae* (PRASAD et al., 2008; JHA et al., 2009). Recentemente, o arroz foi utilizado como um bioreator para a produção da albumina humana (HE et al., 2011), porém a produção ainda não foi iniciada em escala comercial.

## Noções Básicas de Cultura de Tecidos de Arroz

Por cultivo *in vitro*, ou cultura de tecidos, ao qual também se faz referência como cultivo *in vitro*, entende-se o conjunto de metodologias que permitem o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta (explante) sobre um meio nutritivo e em condições assépticas e ambientais de iluminação e temperatura controladas.

O princípio da cultura de tecidos se fundamenta em dois conceitos que são centrais para a compreensão da cultura de células e regeneração de plantas: plasticidade e totipotência. A plasticidade é a capacidade da planta de alterar seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento para se adaptar e sobreviver às condições ambientais (PRICE et al., 2003). Já a totipotência é a capacidade de uma única célula se dividir e produzir células diferenciadas e organizadas. Assim, no caso de vegetais, a planta tem a capacidade de regenerar organismos inteiros, idênticos à matriz doadora, a partir de células únicas (HABERLANDT, 1902), citado por Krikorian e Berquam (1969). Consequentemente, a plasticidade e a totipotência permitem que plantas inteiras sejam regeneradas a partir de qualquer parte da planta.

Nesse sentido, o conceito de explante é introduzido e definido como qualquer tecido retirado da planta original e transferido para um meio artificial para crescimento ou manutenção. O tecido, célula, ou órgão de uma planta de arroz servem para iniciar cultivos *in vitro* e regenerar novas plantas.

## Escolha do explante

Como as características de cada espécie ou cultivar são únicas e determinadas por fatores genéticos, as necessidades para seu cultivo *in vitro* também tendem a ser únicas. As capacidades de regeneração e crescimento *in vitro* parecem estar associadas não apenas ao genótipo, mas também a planta-matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos. O verdadeiro desafio, portanto, está no material vegetal e na sua manipulação antes de excisar o explante inicial. Esta manipulação inclui o manejo da planta-matriz, as características do explante utilizado, o procedimento de subcultura adotado, as condições ambientais e microambientais dentro do frasco de cultura e o transplante. Todas estas etapas são influenciadas por diversas variáveis imponderáveis, que frequentemente restringem a repetição dos resultados, dificultando a determinação de um protocolo universal (YEOMAN; MACLEOD, 1977; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Portanto, os fatores que afetam as plantas no campo também têm grande influência no posterior comportamento dos explantes no cultivo *in vitro* afetando a formação, o desenvolvimento e o estabelecimento do explante e conseqüentemente a indução de calos.

Entre estes fatores, pode-se citar o estado fisiológico da planta matriz, a época do ano em que é feita a coleta e as condições gerais da planta doadora ou matriz (MURASHIGE, 1974). Plantas saudáveis que crescem vigorosamente são as mais adequadas para o cultivo *in vitro*, principalmente se as sementes forem utilizadas como explantes. Explantes de plantas submetidas ao estresse hídrico normalmente não crescem bem no cultivo *in vitro*.

A condição fitossanitária da planta matriz é importante porque irá determinar a facilidade em descontaminar o explante antes do cultivo.

As plantas contaminadas no campo por doenças ou insetos são mais difíceis de serem descontaminadas e usualmente levam a contaminação para dentro da placa de cultivo, pois diversos microrganismos de natureza endógena não são expostos aos agentes desinfetantes e devem ser controlados já na planta-matriz. Adicionalmente, ferimentos de insetos permitem a entrada de microrganismos dificultando também a desinfestação do explante.

Um importante fator, principalmente quando a semente é utilizada como explante, diz respeito à pureza genética da semente. Para evitar cruzamentos com outras cultivares de arroz, a produção da planta-matriz deve ser conduzida em casa de vegetação ou fitotron, pois as condições dos diversos fatores podem ser controladas.

## Tipos de explantes

Vários explantes tem sido utilizados para regenerar plantas de arroz, tais como embrião maduro ou sementes maduras (WANG et al., 1987; MASUDA et al., 1989; RASHID et al., 1996; HIEI et al., 1997; SERAJ et al., 1997; TOKI, 1997; AZRIA; BHALLA, 2000; BEVITORI, 2005; SAIKA; TOKI, 2010; WANI et al., 2011); protoplasto (BISWAS; ZAPATA, 1993; KHATUN; DESAMERO, 2005), embrião imaturo (LI; LIU, 1982; KOETJE et al., 1989; SERAJ et al., 1997), antera e micrósporo (MAH et al., 1985; GUPTA; BORTHAKUR, 1987; LENTINI et al., 1995; LEE et al., 2004; raiz (KAWATA; ISHIHARA, 1968; ABE; FUTSUHARA, 1985; STICKLEN, 1991; MUKHOPADHYAY et al., 1997; MANDAL et al., 2003; HOQUE; MANSFIELD, 2004; CARSONO; YOSHIDA, 2006), lâmina foliar (YAN; ZHAO, 1982; RAMESH et al., 2009), ápices caulinares (TAVARES et al., 2004), epicótilo (CHAND; SAHRAWT, 1997; KHATUN; DESAMERO, 2005) e mesófilo (REY et al., 2010).

É necessário identificar explantes de arroz adequados para a produção de calos embriogênicos em condições de cultura para maximizar a produção de calo com regeneração de plântulas elevada. A procura por explantes com essas características tem sido uma constante nos estudos de cultura *in vitro* do arroz, podendo-se citar o epicótilo, os ápices caulinares, a lâmina foliar e o mesófilo. Entretanto, são poucos os relatos na literatura a respeito do uso desses explantes.

Brevemente, serão discutidas a utilização dos explantes raiz, antera, embrião imaturo, protoplastos e embrião maduro, por serem os mais utilizados no cultivo *in vitro* do arroz.

### *Raiz*

Calos embriogênicos podem ser induzidos da raiz principal ou adventícia de plântulas de arroz crescidas em condições estéreis (Figura 1).

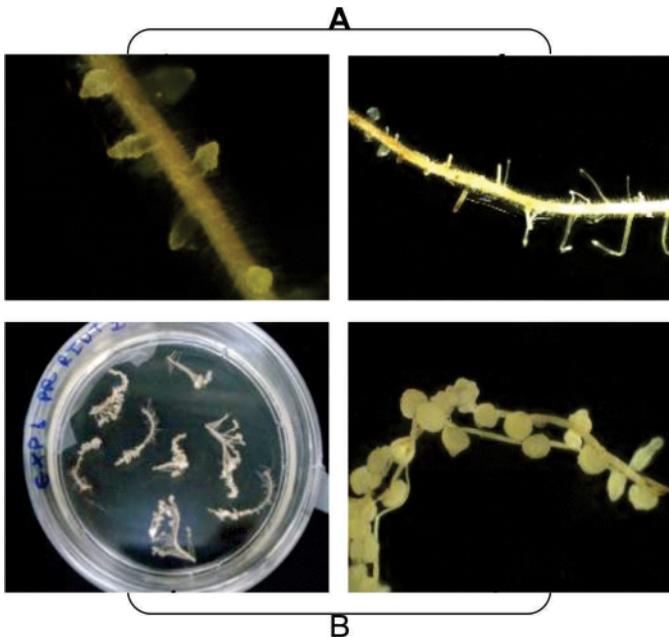
As raízes foram muito utilizadas como explantes de arroz no início dos estudos do cultivo *in vitro* do arroz, porém, até hoje, não foi estabelecido um protocolo reprodutível a ser utilizado em experimentos de transformação genética.

Mukhopadhyay et al. (1997) mostraram que o desenvolvimento de calos a partir de raízes é precedido pela formação de raízes adventícias que são diferenciadas após o contato com meio MS suplementado com auxina. Estes resultados foram corroborados por Mandal et al. (2003), Carsono e Yoshida (2006) e Akter e Al-Forkan (2010). No laboratório da Embrapa Arroz e Feijão estes resultados também foram observados, porém utilizou-se o meio basal N6. Neste meio, 77% das raízes formaram calos, em contraste com 40% a 60% relatados pelos outros autores.

Hoque e Mansfield (2004) utilizaram raízes inteiras e verificaram que aquelas provenientes de plântulas crescidas por 3-5 dias foram mais eficientes na indução de calos do que as mais velhas ao contrário de Carsono e Yoshida (2006), que utilizaram raízes de 5-7 dias de crescimento para indução de calos. Portanto, a diferença em dias não se reflete muito no tamanho das raízes devido à grande variação existente nessa característica nos diferentes genótipos. Em nossos estudos, após inoculação das raízes em meio de cultivo contendo auxina, observam-se calos de vários tipos ao longo das raízes, sendo alguns agrupados e outros isolados (Figura 1). Os oblongos, e os rizogênicos, porém, não são embriogênicos. Os calos primários são mucilaginosos, porém, após dois a três subcultivos eles se tornam friáveis, a mucilagem vai se perdendo e o calo se torna mais seco. Calos compactos, redondos e de cor creme são embriogênicos. Estes resultados foram observados também por Mandal et al. (2003).

A capacidade embriogênica dos calos oriundos de raízes resulta na regeneração de plântulas. Bano et al. (2005), apesar de relatarem a regeneração dos calos, não a quantifica. Calos provenientes de raízes foram utilizados na transformação genética via *A. tumefaciens*. Chan et al. (1992) obtiveram 37,5% de frequência de transformação de calos provenientes de raiz.

A vantagem de se utilizar raiz como explante é que o tempo requerido para se obter plântulas é menor do que aquele necessário quando se utiliza sementes maduras. Mandal et al. (2003) relatam que esta redução é uma grande vantagem para se iniciar cultura *in vitro* de arroz. Outra vantagem, é que raízes são disponíveis ao longo do ano, ao contrário de outros explantes. Uma desvantagem é que, apesar de produzir muitos calos, o protocolo de regeneração de raízes em plantas ainda não está bem estabelecido.



**Figura 1.** A: Raízes inteiras da BRS Primavera após três dias de cultivo *in vitro* em meio NB. B: Raízes inteiras com calos aos 21 dias após incubação em meio N6.

## *Antera*

A maior dificuldade da aplicação da cultura de anteras consiste na adequação do meio de cultura, para que ocorra a divisão celular, o processo de ativação e desativação dos genes no momento apropriado, visando à diferenciação celular e, conseqüentemente, a obtenção de uma planta (SALOMON, 2003).

Segundo Mantel et al. (1994), os determinantes críticos do sucesso da cultura de anteras e da regeneração em plantas são: condições fisiológicas da planta doadora, tipo de pré-tratamento aplicado aos botões florais removidos da planta, fase de desenvolvimento do pólen e presença ou ausência de reguladores de crescimento suplementares no meio. Desde que sejam providas condições ótimas às plantas e aos explantes, pode-se obter 1-2% de plantas haplóides do total de pólen cultivado, dentro das anteras ou como grãos isolados.

## *Protoplastos*

São células vegetais desprovidas da parede celular que ainda conservam as potencialidades de células vegetais completas (CARNEIRO et al., 1998). Apesar de ser possível o isolamento de protoplastos de vários tecidos, as suspensões celulares provenientes desses tecidos são ultimamente mais utilizadas pela facilidade de manipulação e alta eficiência no isolamento. A frequência de regeneração de protoplastos de arroz isolados a partir de suspensão de células derivadas de embriões imaturos pode chegar de 70% a 77% (BISWAS; ZAPATA, 1993), dependendo do meio.

## *Embrião imaturo*

Por sua grande resposta ao cultivo *in vitro*, embriões imaturos são adequados para indução de calos e regeneração das plantas. Porém esse tipo de explante apresenta algumas limitações quanto à obtenção dos embriões. Por exemplo, para obter o embrião imaturo durante todo o ano é necessário cultivar as plantas em casa de vegetação. As panículas imaturas são removidas das plantas aos 8-12 dias após a polinização (HIEI; KOMARI, 2008), portanto, estão disponíveis

somente durante um tempo restrito de crescimento do ciclo do arroz. Adicionalmente, a preparação de um grande número de panículas imaturas é muito laboriosa e tem limitações sazonais.

### *Embrião maduro*

O embrião maduro é considerado por muitos autores o melhor explante (AL-FORKAN et al., 2005; KHALEDA; AL-FORKAN, 2006), pois estes estão sempre disponíveis em quantidade e podem ser armazenados para uso ao longo do ano. Os calos embriogênicos induzidos pelo cultivo deste explante são usados com sucesso para transformação genética.

## **Indução de Calos a partir de Embrião Maduro de Arroz**

Calos são massas celulares desorganizadas que se originam da proliferação desordenada a partir de tecidos ou órgãos cultivados *in vitro*. Sob o estímulo de nutrientes ou de reguladores de crescimento adicionados ao meio, o metabolismo celular dos calos, que se encontram quiescentes, é modificado iniciando-se uma divisão ativa.

Durante o processo, a diferenciação e a especialização celular são revertidas e o explante origina um novo tecido que é composto de células meristemáticas e não especializadas. Na fase de indução dos calos, ocorre um metabolismo ativo com células de tamanho constante e ocorre também a síntese de proteínas e DNA e a preparação das células para divisão (GUHA; MAHESHWARI, 1966).

Um aspecto crítico da transformação genética de arroz é a indução de calos adequados para regeneração. Na teoria, toda semente capaz de germinar pode ser utilizada, entretanto, a resposta das sementes à indução de calos é altamente dependente do genótipo de arroz. Por exemplo, para a cultivar Nipponbare, cultivar modelo do grupo japônica, as condições de cultivo são altamente reproduzíveis e muito bem estabelecidas. Entretanto, muitos genótipos são recalcitrantes para a

indução de calos e muito esforço tem sido necessário para desenvolver ou aperfeiçoar técnicas, meios e protocolos de cultura de tecidos (HIEI; KOMARI, 2008).

No calo do arroz a embriogênese somática é o processo padrão pelo qual novos indivíduos se originam a partir de células simples, que não são produtos da fusão de gametas e que não apresentam conexões vasculares com os tecidos maternos (HACCIUS, 1978; POLITO et al., 1989).

Calos embriogênicos de arroz apresentam a formação de pequenos embriões somáticos capazes de regenerar plantas completas, com raiz e parte aérea, visto que os mesmos são bipolares. Normalmente são secos, leitosos, compactos e com aparência nodular. A cor, o tamanho, a forma, a aparência e o número de calos variam entre os genótipos de arroz, dependendo ainda do tipo do meio basal, indicando que a indução de calos de arroz de alta qualidade é influenciada pelo genótipo e também pela interação com o meio (LEE et al., 2002).

Calos induzidos de embriões maduros diferem consideravelmente quanto a morfologia, podendo ser esféricos ou nodulares, achatados, semiesféricos, amorfos ou ainda invaginados. Quanto à consistência, podem ser compactos, duros, soltos, friáveis ou dissociados (Figura 2). Em arroz, sete diferentes tipos de calos são induzidos a partir de sementes maduras (VISARADA et al., 2002), sendo que eles diferem entre si pelas características morfológicas e pelo potencial de regeneração de plantas (NABORS et al., 1983):

Tipo I: branco ou cremoso, compacto com células organizadas;

Tipo II: amarelo com células organizadas;

Tipo III: amarelo ou marrom com calo não organizado;

Tipo IV: branco, amarelo ou marrom altamente desorganizado;

Tipo V: branco translúcido e sem consistência, aquoso e formado por um tecido esponjoso. São chamados de calos hídricos e não se

regeneram;

Tipo VI: mucilaginosos. São encontrados principalmente no escutelo da semente. Eles são redondos, porém não se regeneram.

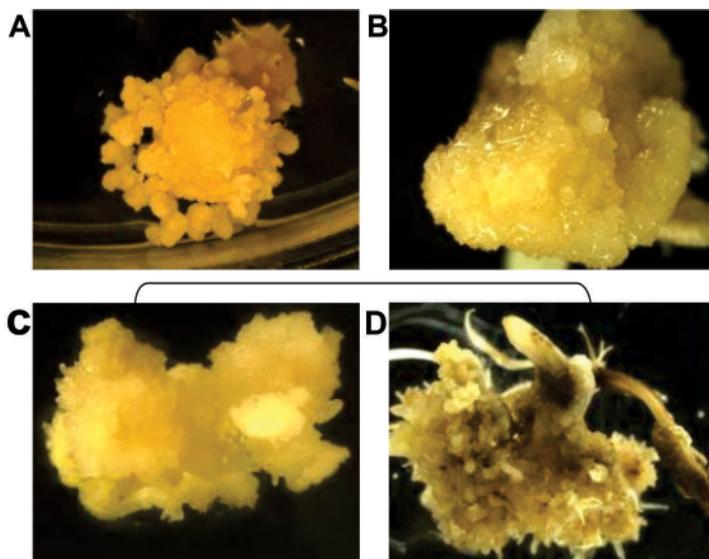
Tipo VII: rizogênicos: formam pequenas raízes e não se regeneram.

Os calos tipo I e II são embriogênicos e se regeneram.

Os calos III e IV são escuros e necróticos, não embriogênicos e não regeneram.

A semente ou embrião maduro do arroz é cultivada em placa de Petri por 3-4 semanas, dependendo do genótipo e do meio. Durante este tempo, o calo cresce devagar e há formação de gases que podem fazer com que o calo fique marrom, podendo vir a necrosar e morrer. ADKINS et al. (1990, 1993) demonstraram que alguns genótipos de arroz produzem dióxido de carbono, etanol e etileno em resposta ao consumo de oxigênio pelos calos. Nestas condições, os calos cresceram muito pouco, outros se tornaram necróticos e alguns morreram. Para facilitar estas trocas gasosas, durante a indução de calos recomenda-se usar placas de Petri mais altas (100mm x 20mm) e usar Parafilm® em vez filme de plástico tipo Zap.

Os calos, não embriogênicos (Figuras 2A-B) são descartados e os embriogênicos (Figuras C-D), depois de formados e isolados dos explantes, podem ser cultivados para proliferação. Isto é feito transferindo-os para o mesmo meio de indução, porém fresco. No entanto, as características morfológicas e a consistência dos calos mudam facilmente durante o subcultivo, podendo estes virem a morrer após três ou quatro passagens, devido à exaustão de metabólitos vitais. Portanto, a idade dos calos é muito importante por afetar a sua regeneração. Por essas desvantagens, recomenda-se no máximo dois subcultivos para manter sua viabilidade. Quando subcultivados, os calos crescem muito rapidamente devendo permanecer no meio por 7 a 10 dias. Após este período, devem ser transferidos para meio de pré-regeneração ou utilizados para transformação genética.



**Figura 2.** Distinções morfológicas entre calos não embriogênicos (A e B) da cultivar de arroz BRS Talento e embriogênicos (C e D) da cultivar de arroz BRS Primavera cultivados em meio de indução por 30 dias.

## Composições dos Meios de Cultivo de Arroz *in vitro*

Os meios para o cultivo *in vitro* são definidos pela sua composição e combinações de macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, reguladores de crescimento, agentes solidificantes e outros suplementos orgânicos. Existem ainda os elementos opcionais que são os aminoácidos e amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas. Os meios fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão do desenvolvimento *in vitro* (TORRES et al., 1998).

Um dos fatores mais importantes que regem o crescimento e morfogênese de tecidos vegetais *in vitro* é a composição do meio de cultura. Apesar da disponibilidade de vários meios utilizados para indução de calos e regeneração em plantas a partir de sementes

maduras de arroz, como por exemplo, os meios White (1934), Murashige e Skoog (1962), Linsmaier e Skoog (1965), Gamborg et al. (1968), Nitsch e Nitsch (1969), Chu et al. (1975), dentre outros, não existe um meio universal para todos os genótipos de arroz. Ao utilizar um genótipo de arroz pela primeira vez, o importante é escolher um meio de cultivo que já tenha sido desenvolvido para outros genótipos e adaptá-lo para as suas condições ou a seu genótipo. Em arroz, os meios basais mais utilizados tem sido o MS e N6, desenvolvidos por Murashige e Skoog (1962) e Chu et al. (1975), respectivamente. Para alcançar a máxima taxa de crescimento, a concentração ótima de cada nutriente pode variar consideravelmente.

## Requerimentos nutricionais dos calos

*Macronutrientes* - são os nutrientes requeridos em maiores concentrações (mM), pois fornecem sais inorgânicos ao meio nutritivo tais como nitrogênio, (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), e enxofre (S). Os macroelementos essenciais para o cultivo *in vitro* de arroz são:

Nitrogênio: tanto a forma de nitrato quanto a de amônio são utilizadas, porém os resultados são melhores quando se utiliza conjuntamente ambas as formas de nitrogênio. É constituinte de aminoácidos, nucleotídeos e coenzimas, tendo importância na síntese protéica e sendo, portanto, essencial para a embriogênese somática, bem como para a diferenciação da parte aérea (AMMIRATO, 1983).

Potássio: usado na forma de nitrato ou fosfato. Ativador de várias enzimas do metabolismo de carboidratos e proteínas. É necessário para a embriogênese somática (AMMIRATO, 1983) e a sua deficiência pode conduzir a hiper-hidricidade e decréscimo na taxa de absorção de fosfato.

Enxofre: incorporado ao meio na forma de sulfato ou na forma de aminoácidos (cistina, cisteína e metionina). Envolvido no metabolismo energético na formação do fosfosulfato de adenosina, constituinte da tiamina, biotina e coenzima A. Sua absorção é relacionada à assimilação do nitrogênio e, independentemente, do pH.

Cálcio: usado na forma de nitrato ou cloreto. Está envolvido na divisão celular, uma vez que um dos componentes da lamela média é o pectato de cálcio. Mantém a integridade da membrana celular.

Magnésio: usado na forma de sulfato de magnésio. É um dos componentes da clorofila; cofator importante para várias reações enzimáticas que atuam sobre substratos fosforilados.

*Micronutrientes* - da mesma forma, porém exigidos em pequenas concentrações ( $\mu\text{M}$ ), os micronutrientes também são necessários para um ótimo crescimento dos explantes nos respectivos meios. Os microelementos essenciais para o cultivo *in vitro* de arroz são: ferro, (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), boro (B), cobre (Cu) e molibdênio (Mo).

A concentração ótima de cada nutriente para alcançar taxas de crescimento máximo varia conforme o meio e o genótipo. Não somente a presença como também a concentração dos nutrientes nos meios é importante para a manipulação do crescimento padrão e desenvolvimento da cultura de tecido in vitro

Ferro: envolvido nas reações de oxirredução nos organismos vivos. Essencial para a síntese da clorofila é integrante do grupo protéico (heme) das porfirinas. Etilenodiaminotetra-acético (EDTA) é geralmente utilizado em conjunto com o sulfato de ferro formando o quelato FeEDTA. Os complexos de EDTA com o ferro permitem a liberação lenta e contínua do ferro para o meio. Ferro não complexado pode precipitar para fora do meio como óxido férrico.

Manganês: adicionado como sulfato de manganês. Essencial no metabolismo para a reação de Hill na fotossíntese, quando a molécula de água é quebrada produzindo elétrons e oxigênio.

Zinco: é usado como sulfato de zinco. Importante nas reações de oxirredução das plantas. Cofator de enzimas anidrase carbônica.

Cobre: usado como sulfato de cobre. É um cátion que em dose acima do normal é fitotóxico às culturas. Constituinte da enzima plastocianina que é importante componente do transporte de elétrons.

Molibdênio: adicionado na forma de molibdato de sódio. É cofator da redutase do nitrato.

Cloro: essencial para a fotossíntese, sendo requerido durante a reação de Hill.

Cobalto: usado como cloreto de cobalto e está envolvido na expansão foliar.

Boro: usado na forma de ácido bórico. Está envolvido no metabolismo de carboidratos e ácidos nucléicos.

## **Constituintes orgânicos**

Os compostos orgânicos importantes são os carboidratos, substâncias reguladoras de crescimento, vitaminas e aminoácidos.

### *Carboidratos*

O carboidrato é uma fonte importante de energia e carbono, e atua como um agente osmótico no meio e constitui o esqueleto de todos os compostos orgânicos. A suplementação aos meios de cultivo de arroz, geralmente se dá pela adição de açúcar na forma de sacarose, universalmente utilizada pela maioria dos meios de cultura de tecidos também de outras espécies. Outras formas desta fonte de carbono são glicose, e maltose. Em certo período do cultivo, utiliza-se glicose. Certos genótipos de arroz respondem melhor a formação de calos quando o meio é suplementado com maltose.

### *Vitaminas*

Vitaminas são compostos orgânicos que, em baixas concentrações, desempenham funções reguladoras catalíticas no metabolismo celular. As vitaminas utilizadas no meio de cultivo do arroz *in vitro* são tiamina (B1), ácido nicotínico (B3) e piridoxina (B6).

Tiamina (Vit. B1): cofator essencial no metabolismo de hidratos de carbono e está diretamente envolvida na biossíntese de alguns aminoácidos.

Ácido nicotínico (niacina ou vitamina B3): componente das coenzimas NAD (nicotina-adenina-dinucleotídeo) e NADP (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato), importantes na transferência de nitrogênio.

Piridoxina: faz parte do piridoxalfosfato, coenzima importante no metabolismo de aminoácidos. Tem importante papel nas reações de transaminação e descarboxilação.

Myo-inositol: comumente incluída em muitas soluções estoques de vitaminas, porém é um carboidrato e não vitamina. Estimula o crescimento das células.

## **Aminoácidos**

A suplementação de aminoácidos ao meio pode ser realizada pela inclusão de uma proteína hidrolisada. Os aminoácidos e amidas aumentam as respostas morfogênicas, proporcionando maior crescimento e facilitando a diferenciação no sentido da regeneração. As amidas L-glutamina e L-asparagina são benéficas na obtenção de embriões somáticos, e a cisteína é incluída, às vezes, como agente redutor. Já a prolina é um aminoácido efetivo na iniciação e manutenção de calos embriogênicos e está envolvida no processo de divisão celular.

## **Reguladores de crescimento ou hormônios**

São compostos orgânicos naturalmente sintetizados em pequenas quantidades pelas plantas. Formas sintéticas foram desenvolvidos e são correspondentes aos compostos naturais que são as auxinas, citocininas e ácido abscísico. O balanço entre a auxina e a citocinina é importante no controle da morfogênese *in vitro*. O balanço de auxinas/citocininas favorece o enraizamento ou promove a formação de parte aérea. Concentrações iguais promovem a produção de calos.

Auxina: induz divisão, alongamento celular e estimula formação de calo.

O composto mais frequentemente utilizado no cultivo *in vitro* do arroz é o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Outras formas de auxinas são ANA (ácido  $\alpha$ -naftaleno acético), AIA (ácido 3-indolacético), AIB (ácido indolbutírico), e Picloram (4-amino-3,5,6- ácido tricloropicolínico).

Os vários tipos de auxinas variam quanto a sua atividade fisiológica. Embora 2,4-D seja muito utilizado nos meios de cultivo do arroz, deve-se evitar o seu uso prolongado, pois isso resulta na supressão da atividade morfogênica.

Citocinina: tem importância na formação da parte aérea e na inibição de raízes. Zeatina, cinetina e isopentenil adenina, 6- $\gamma$ - $\gamma$ -dimetilaminopurina (2iP), tidiazuron (TDZ) e 6- benziladenina (BA) ou 6- benzilaminopurina (BAP) são exemplos de citocininas, sendo o BAP a forma de citocinina mais utilizada para estimular o crescimento e desenvolvimento no cultivo *in vitro* de arroz. Zeatina e 2iP ocorrem naturalmente nas plantas enquanto cinetina e BA são citocininas sintéticas. O tipo de morfogênese que ocorre depende muito da proporção entre auxina e citocinina e também da concentração dos mesmos nos meios.

Ácido abscísico: na cultura de tecido seu papel não é bem estabelecido, embora tenha efeito na embriogênese somática. Em arroz, estimula a formação de parte aérea das plântulas.

### **Agentes gelificantes**

A cultura *in vitro* do arroz se dá em meio sólido proporcionado pela utilização de agentes gelificantes que funcionam como um suporte para a semente e para os calos. Uma característica desejável destes materiais é que não devem reagir com o resto dos componentes do meio ou ser assimilado pelo explante.

Os agentes gelificantes mais usados em arroz são:

Ágar: é um polissacarídeo extraído de algas marinhas (*Gelidium amansii*, dentre outras). A sua concentração no meio depende tipo de meio a ser utilizado, da marca e de sua procedência. A sua composição varia com a espécie e a maturidade da alga de que foi extraído, e também dos processos de obtenção e purificação do ágar, que podem afetar o seu conteúdo de impureza. O ágar não deve ser utilizado se o meio de cultivo

for ácido, pois a autoclavagem pode hidrolisá-lo fazendo com que perca firmeza. O pH ótimo está entre 5,4-5,7. A principal característica que faz o ágar ser um agente gelificante é que dissolve em água ao ser aquecido a 85-100 °C, solidifica em torno dos 35 °C, pode ser autoclavado, e produz um gel translúcido. Adicionalmente, produz um gel estável por períodos prolongados e não interfere com o meio.

Agarose tipo 1: normalmente é utilizada no meio de regeneração para promover uma pequena desidratação dos calos (RANCE et al., 1994), que conseqüentemente promove a formação de embrião somático (VEGA et al., 2009). Assim como o ágar produz um gel estável e não interfere com o meio.

Gelrite: produzido pela bactéria *Pseudomonas elodea*, é usado em menor quantidade (2,5 g/l); uma vez solidificado, é transparente, o que facilita a visualização do explante e dos calos, dos focos de contaminação, além de ser mais puro que o ágar. Produz um gel mais rígido com menor concentração do produto que o ágar e agarose.

Fitagel: é um polissacarídeo aniônico obtido por fermentação bacteriana. Dissolve-se e gelifica em resposta a mudança de temperatura, da mesma forma que o ágar. Os explantes cultivados em meio contendo fitagel absorvem os nutrientes com muita facilidade, o que permite um crescimento mais rápido. O gel produzido é transparente, o que facilita acompanhar o crescimento do explante e visualizar focos de contaminação. Assim como o gelrite, produz um gel mais rígido com menor concentração do produto que o ágar e agarose.

Os agentes gelificantes podem induzir hiper-hidricidade (vitrificação) nos brotos ou plântulas obtidas. A hiper-hidricidade é uma anomalia do tecido, na qual este fica rígido e quebradiço, havendo malformação de estômatos na plântula e dificuldade para enraizar. É um fenômeno complexo e depende também de outros fatores como umidade, amônia, citocinina, pH, etc.

Cada um destes produtos tem vantagens e desvantagens e devem ser escolhidos de acordo com sua aplicação e preço.

## Meios Utilizados para Indução e Regeneração de Calos

Antes do preparo dos meios, recomenda-se montar estoques de sais minerais (conjuntos de macronutrientes e micronutrientes), FeEDTA, misturas orgânicas e reguladores de crescimento para facilitar o preparo final dos meios de cultivo. Feito isto, as soluções são mantidas em geladeira por um período não superior a 30 dias para a maioria das soluções estoques.

A utilização das soluções estoque reduz o número de operações repetitivas envolvidas na preparação dos meios e, portanto, reduz a possibilidade de erro humano ou experimental. Além do mais, alguns nutrientes requerem uma quantidade muito pequena (miligramas ou microgramas) fazendo com que a pesagem direta dos componentes no meio final não possa ser efetuada com precisão suficiente para o trabalho de cultura de tecidos. Para estes componentes, a preparação de soluções estoque concentradas e diluição subsequente para os meios finais é um procedimento padrão. Além disso, as soluções concentradas de alguns materiais são mais estáveis e podem ser armazenados durante períodos mais longos do que soluções mais diluídas.

### Preparação de solução estoque de macronutrientes e micronutrientes

As soluções estoque de macronutrientes podem ser armazenados com segurança por várias semanas em temperatura entre 2-4 °C. As soluções estoque de micronutrientes são geralmente feitas em 100 vezes (100X) a sua concentração final. Recomenda-se que os estoques de micronutrientes sejam armazenados em geladeira ou congelador. Soluções de micronutrientes podem ser armazenadas em geladeira por até um ano sem deterioração apreciável.

Para preparar uma solução estoque de macro e micronutrientes deve-se pesar a quantidade necessária do (s) composto (s) e colocá-los num becker limpo contendo 60% de água bidestilada e deixar sob agitação até completar todos os nutrientes que compõem a solução estoque. É prática comum para fazer uma solução estoque de 10x ou 100x,

dependendo da solubilidade do composto. Em seguida, adiciona-se lentamente água até atingir o volume adequado. É importante rotular o frasco com o nome da solução estoque e das datas de preparação.

As vitaminas são preparadas como soluções nas concentrações de 100X ou de 1000X e armazenadas no congelador (-20 °C) até serem utilizadas. Essas soluções podem ser armazenadas com segurança no congelador durante dois a três meses, mas devem ser descartadas após esse tempo.

ANA e 2,4-D são consideradas estáveis e podem ser armazenadas a 4 °C durante vários meses ou indefinidamente a -20 °C; AIA deve ser armazenada a -20 °C. As soluções estoque de auxina são geralmente preparadas em 100X ou 1000X.

As citocininas são consideradas estáveis e podem ser armazenadas a -20 °C. As soluções estoque são geralmente preparadas em concentrações de 100X ou 1000X. Para facilitar a dissolução das citocininas deve-se adicionar gotas de HCL 1N, NaOH, KOH, ou em DMSO.

## **Protocolo de Cultivo *in vitro* de Arroz a partir de Sementes Maduras**

O protocolo básico do cultivo *in vitro* de plantas de arroz, descrito nesse documento, consiste na indução de calos a partir de sementes maduras de arroz em meio apropriado contendo 2,4-D. Após quatro semanas de cultivo, unidades embriogênicas são formadas a partir dos calos primários originados das sementes e posteriormente transferidas para meio adequado para proliferação dos calos por sete dias. Quando atingem o tamanho ideal, são transferidas para o meio de pré-regeneração e, em seguida, para o meio de regeneração. Após 30 dias, as plântulas são então transferidas para meio de enraizamento. Uma vez enraizadas, as plântulas são aclimatadas e transferidas para casa de vegetação. De modo geral, o tempo de cultura para atingir as diferentes etapas da obtenção de plantas de arroz é de 130 dias (Tabela 1).

**Tabela 1.** Condições e tempo de cultivo para regeneração completa dos calos em plantas.

<i>Etapa/Meio</i>	<i>Condição/Período</i>
Indução de calos (NB)	28 °C, escuro, 3-4 semanas
Proliferação das UEs (NB)	28 °C, escuro, 7-10 dias
Pré-regeneração (PR)	28 °C, escuro, 1 semana
Regeneração (RN)	28 °C, escuro, 2 dias
	28 °C, 16 h fotoperíodo, 3-4 semanas
Enraizamento (ER)	28 °C, 16 h fotoperíodo, 3-4 semanas
Aclimação	15-21 dias

### Protocolo para BRS Primavera

Os meios utilizados aqui, para o cultivo *in vitro* da BRS Primavera, são aqueles descritos por Sallaud et al. (2003): indução (NB), pré-regeneração (PR), regeneração (RN) e enraizamento (ER). A composição de cada um se encontra nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7. As soluções estoques para o preparo desses meios estão descritas no Apêndice deste documento (Tabelas 8-15). Neste documento, este meio foi denominado Meio 1, para diferenciar do meio modificado para a cultivar BRS Bonança (Meio 2).

#### Material necessário

Sementes de arroz;

Solução de etanol 70% (v/v);

Solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% (v/v);

Tween® 20;

Água destilada, esterilizada por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos;

Meios de cultura para embriogênese somática de arroz: NB, PR, RN, ER.

Sistema de filtração (filtro e frasco) de 150 mL, com membrana com 50 mm de diâmetro e com poros de 0,2 µm, graduado e estéril;

Placas de Petri de 100x20mm e 100x10mm;

Filme plástico do tipo Parafilm® M;

Soluções-estoque de 2,4-D; ABA; BAP e ANA;

Capela de fluxo laminar;

Mistura solo: vermiculita (1:1), esterilizada por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos.

### **Desinfestação das sementes maduras**

Colocar as sementes dentro de um becker autoclavado e adicionar 20 ml de água estéril e duas gotas de Tween® 20. Agitar rapidamente, descartar a água cuidadosamente e enxaguar, sempre com água estéril, por quatro vezes. Transferir as sementes para outro becker e adicionar 50 ml de álcool 70%. Agitar por 1 minuto. Descartar o álcool cuidadosamente e enxaguar duas vezes com água autoclavada. Adicionar hipoclorito de sódio 2,5%, agitar levemente por 20 minutos. Descartar o hipoclorito cuidadosamente e lavar as sementes com água estéril por oito vezes. No último enxague, deixe o mínimo de água em contato com as sementes.

### **Procedimento**

1. Distribuir dez sementes descascadas e desinfestadas em placas de Petri (100x20mm) contendo meio de indução de calos **NB**. Selar as placas com Parafilm® e incubá-las no escuro a 27 °C, durante três a quatro semanas (Figura 3A).

**Nota:** a região do embrião da semente deve estar fortemente em contato com o meio e voltado para cima. Caso contrário, poderá haver germinação do embrião e/ou formação de raízes em vez de calos embriogênicos. Após a distribuição das sementes, deixar as placas abertas no fluxo por 15 minutos. Isso é necessário para evitar condensação ou excesso de umidade dentro das placas. Dessa forma, o risco de contaminação por bactérias é reduzido.

2. Após sete a dez dias, observa-se um inchaço na região do escutelo da semente do arroz (Figura 3B) e dentro de três a quatro semanas, é possível observar, na região escutelar do embrião, a formação de calo primário, de 0,5 a 1 cm de diâmetro, podendo haver também formação de diversos tipos e formas de calos (Figura 3C). A partir de alguns calos primários são formadas as pequenas unidades embriogênicas (UEs) individualizadas, que são nódulos esféricos e compactos de 0,5 a 1 mm de diâmetro que normalmente estão na superfície do meio.

3. Os nódulos pequenos e compactos de 0,5 a 1 mm de diâmetro (Figura 3D) devem ser retirados e transferidos para meio fresco NB em placas de Petri de 100x15 mm, distribuindo de 30 a 50 unidades por placa e incubadas a 28 °C por 7-10 dias, quando então, serão posteriormente utilizadas.

**Nota:** O calo primário pode ser transferido para meio fresco **NB** para ser utilizado novamente.

4. Após este período, três tipos de estruturas deverão ser observados: (A) UEs de tamanho inferior a 1 mm que podem eventualmente ser transferidas para novo meio NB (15 UEs por placa) para uma nova incubação de oito a dez dias; (B) UEs esféricas que apresentam superfície rugosa com tamanho em torno de 3 a 5 mm e que serão transferidas para meio PR; e (C) UEs de formato ramificado e de tamanho superior a 5 mm que deverão ser eliminadas por estarem muito diferenciadas.

5. As unidades embriogênicas são selecionadas baseadas nos critérios abaixo:

**Tamanho:** as unidades selecionadas devem ter tamanho entre 3-5 cm. Os calos muito pequenos tendem a necrosar.

**Forma:** as unidades selecionadas devem ter o formato esférico e apresentar uma superfície rugosa. Os calos de forma mais complexa apresentam uma superfície lisa e branca, sinais de diferenciação que devem ser evitados. As unidades devem ser opacas. Os calos translúcidos brancos devem ser eliminados pois são hídricos e não regeneram.

**Textura:** os calos devem ser compactos, firmes e resistentes à pressão da pinça. Os calos macios devem ser evitados.

### **Pré-regeneração dos tecidos selecionados (meio PR)**

6. Selecionar delicadamente com uma pinça as unidades globulares embriogênicas proliferadas no meio **NB** e transferi-las para meio **PR**

em placa de 100x20mm. Incubar no escuro, a 27-28 °C, por uma semana.

**Nota:** unidades globulares embriogênicas aumentam de tamanho e têm uma aparência compacta, cor branco-esverdeada e aspecto rugoso, de estrutura lobada e invaginada, enquanto unidades não-embriogênicas apresentam-se translúcidas, de cor bege e consistência mais mole ou aquosa. Estas devem ser descartadas.

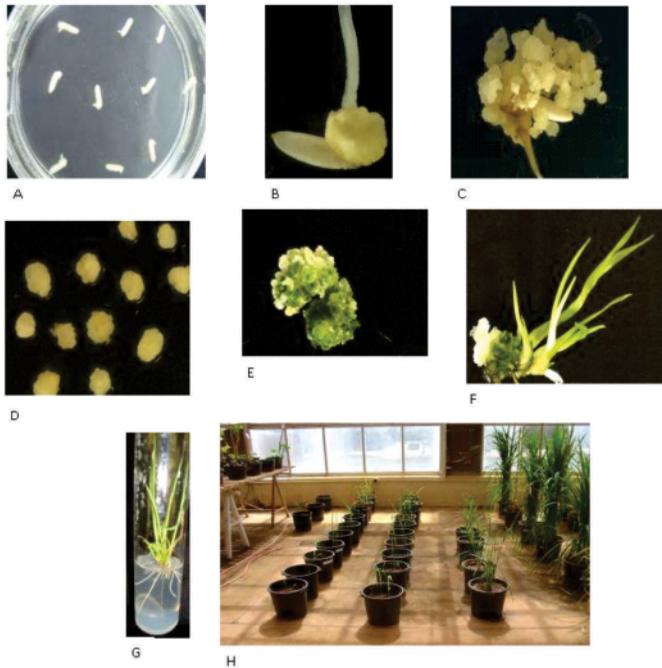
### **Regeneração dos brotos (meio RN)**

7. Selecionar as unidades globulares embriogênicas do meio **PR** e inocular em meio **RN**, com uma densidade de quatro a cinco unidades por placa de 100x20mm. Incubar por dois dias no escuro, a 27-28 °C. Transferir as placas para sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27-28 °C e empilhá-las de modo que recebam luz indireta (baixa luminosidade). Após dois dias, espalhar as placas na prateleira para que passem a receber luz direta, por três a quatro semanas. Após esse período, as unidades embriogênicas tornam-se verdes e se diferenciam em brotos (Figura 3E e F).

### **Enraizamento (meio ER) e aclimação das plântulas**

8. Separar cuidadosamente os brotos do tecido original quando estes atingirem aproximadamente 2 cm de altura e transferi-los para tubo de ensaio contendo 25 mL de meio **ER**. Cultivar os brotos (Figura 3G) por três a quatro semanas em fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27-28 °C.

Após esse período, transferir as plântulas com sistema radicular vigoroso para copos plásticos furados, contendo mistura solo: vermiculita. Manter em casa de vegetação em condições de alta umidade e baixa intensidade de luz. Após duas semanas, retirar a plantas do sistema de aclimação e transferi-las para potes grandes com solo (Figura 3H).



**Figura 3.** Etapas da indução de calos e regeneração das cultivares de arroz BRS Primavera e BRS Bonança.

### Protocolo para BRS Bonança

Para a cultivar de arroz BRS Bonança, por ter apresentado requerimentos nutricionais diferentes daqueles requeridos pela BRS Primavera, o meio de indução descrito por Sallaud et al. (2003) foi modificado, constituindo assim o Meio 2. Em primeiro lugar, incluímos os aminoácidos arginina e asparagina. A inclusão destes aminoácidos foi baseada no fato de que os mesmos proporcionam o aumento de embriões somáticos. Ogawa et al. (1999) verificou que a baixa resposta de formação de calos de alguns genótipos estava relacionada à baixa atividade de nitrato redutase e que a adição de aminoácidos melhorava esta resposta. Hiei e Komari (2008) incluíram arginina e asparagina em meio de indução de calos,

porém a resposta inicial das sementes dos genótipos utilizados não foi satisfatória. Para contornar esta situação, as sementes foram cultivadas em meio não suplementado com estes aminoácidos durante sete dias e posteriormente subcultivados em meio contendo aminoácidos.

Outra modificação realizada para a BRS Bonança foi a substituição da sacarose por maltose. A maltose apresenta taxa de hidrólise extracelular menor do que aquela da sacarose. Isto significa que a maltose é absorvida e hidrolisada internamente mais devagar. O uso da maltose resulta no aumento da indução de calos de micrósoros de arroz provocando a aceleração inicial da divisão celular. Adicionalmente, o número de plantas regeneradas de arroz indica (BISWAS; ZAPATA, 1993) e japônica foram maiores do que quando se utilizou sacarose em meio de cultura de protoplasto.

O meio de indução de calos para a cultivar BRS Bonança (Meio 2) encontra-se descrito na Tabela 6 e as soluções estoques para preparar este meio estão descritas no Apêndice desse documento (Tabelas 15 a 17). Os demais meios, seja pré-regeneração, regeneração e enraizamento são os mesmos descritos para BRS Primavera. A composição das soluções estoques NB macro, FeEDTA e B5 micro descritos para o Meio 1 é a mesma para o meio 2.

A manipulação dos calos durante o processo de indução e regeneração em plantas é a mesma para ambas cultivares. Deve-se enfatizar que a utilização de semente de excelente qualidade é fundamental para a reprodutibilidade deste protocolo.

A: sementes inoculadas em meio de indução. B: calo desenvolvido a partir do escutelo da semente aos dez dias após inoculação em meio de indução. C: calo embriogênico aos 30 dias após inoculação em meio de indução. D: Unidades embriogênicas retirados dos calos primários. E: início da regeneração do calo embriogênico. F: formação do broto sem raiz. G: plântula enraizada. H: plantas transferidas para vasos em casa-de-vegetação.

**Tabela 2.** Meio NB-Básico.

<i>Componentes</i>	<i>1000 ml</i>
N6 macro*	50 ml
FeEDTA*	10 ml
B5 vitaminas*	10 ml
B5 micro	10 ml
Myo-inositol	0,1 g
Prolina	0,5 g
Glutamina	0,5 g
Hidrolisado de caseína	0,3 g

**Tabela 3.** Composição do meio de indução de calos (NB).

<i>Componentes</i>	<i>1 L</i>
NB básico	50 ml
Sacarose	30 g
2,4-D (1 mg/ml)	2,5 ml
Phytigel	2,6g

pH= 5,8

**Tabela 4.** Composição do meio pré-regeneração (PR).

<i>Componentes</i>	<i>1 L</i>
NB básico	50 ml
Sacarose	30 g
ABA (5 mg/ml)	5 mg/L
BAP (1 mg/ml)	2 mg/L
ANA (1mg/ml)	1 mg/L
Agarose tipo I	7 g

pH= 5,8

**Tabela 5.** Composição do meio de regeneração (RN).

<i>Componentes</i>	<i>1 L</i>
NB básico	50 ml
Sacarose	30 g
BAP	3 mg/L
ANA	0,5 mg/L
Fitigel	4,5 g

pH= 5,8

**Tabela 6.** Composição do meio de enraizamento (ER).

<i>Componentes</i>	<i>1 L</i>
Macro MS	100 ml
Micro MS	20 ml
FeEDTA	20 ml
Vitaminas MS	2,5 ml
Sacarose	50 g
Phytigel	2,6 g

**Tabela 7.** Meio 2. Composição do meio de indução de calo do Meio 2(NB2).

<i>Componentes</i>	<i>900 ml</i>
N6 macro *	50 ml
FeEDTA *	10 ml
B5 vitaminas *	10 ml
B5 micro	10 ml
Myo-inositol	0,1 g
Prolina	0,5 g
Glutamina	0,5 g
Hidrolisado de caseína	0,3 g
2,4-D 1 (mg/ml)	2,5 ml
Maltose	30 g

pH= 5,8

\*Mesmo estoque do meio 1.

Após autoclavagem, adicionar 100 ml de aminoácidos (Tabela 17).

## Apêndice

### Estabelecimento de um Laboratório de Cultura de Tecidos

As técnicas de cultura de tecidos de plantas são conduzidas em ambientes essencialmente livres de contaminação onde procedimentos de assepsia devem ser mantidos. Um espaço reservado para abrigar as estruturas necessárias para a condução dos trabalhos é de extrema importância para evitar contaminação e perda do material a ser trabalhado.

A decisão de estabelecer um laboratório de cultura de tecidos requer um estudo e uma análise crítica da finalidade e da necessidade de construir uma estrutura destinada a suportar equipamentos especializados e necessários ao desenvolvimento dos trabalhos *in vitro* em condições assépticas, além de garantir a segurança neste ambiente.

As características físicas de um laboratório de cultura de tecidos, tais como o tamanho, a montagem e a organização, dependem dos objetivos a que se propõe e do número de pessoas que nele vão trabalhar. Pode ser pequeno, porém deve ser localizado em ambiente limpo, e livre de corrente de ar de modo a evitar contaminações.

A distribuição das dependências do laboratório deve ser funcional de modo a facilitar o deslocamento das pessoas e dos equipamentos. Geralmente, este tipo especializado de laboratório é composto por salas que devem estar distribuídas em uma seqüência natural pelas instalações. Isso permite que as atividades sejam distribuídas sequencialmente, de tal forma que uma operação que suceda imediatamente a outra, seja realizada ao lado dela. Dessa forma, se economiza tempo e trabalho, o que resulta em economia de recursos financeiros (TEIXEIRA; TORRES, 1998) além de promover a segurança no ambiente de trabalho.

Um laboratório de cultura de tecidos padrão possui salas separadas com diferentes particularidades:

### **Sala de limpeza**

Local destinado à lavagem de vidraria, autoclavagem de água, de meios de cultura e de utensílios diversos. Ao mesmo tempo, é o local onde é autoclavado, para descarte, meios e utensílios contaminados. Apesar de se chamar sala de limpeza, a assepsia deste local é baixa devendo por isso ficar mais afastada da sala de transferência/inoculação ou sala de cultivo. É importante ter duas autoclaves: uma para esterilizar material limpo e outra para esterilizar os descartes. Essa sala deve ter exaustor para eliminação dos vapores desprendidos pela autoclave. Também deve ser dotada de bancada, armários e prateleiras para estocagem de material, além de uma pia grande e bancada para secagem de vidrarias.

Os equipamentos necessários na sala de limpeza são:

*Autoclave:* a autoclave é formada por um cilindro metálico resistente, vertical ou horizontal, onde geralmente fica a resistência que aquecerá a água. Possui uma tampa que apresenta parafusos de orelhas e permite fechá-la hermeticamente. Em cima da tampa estão as válvulas de segurança e de ar. Apresenta também uma chave de comando para controlar temperatura e um registro indicador de temperatura e pressão.

É utilizada para esterilização de meio de cultura, vidraria, água e outros materiais. O processo de autoclavagem consiste em manter o material contaminado em contato com um vapor de água em temperatura elevada, por um período de tempo suficiente para matar todos os microrganismos. A autoclave também produz calor seco, porém o úmido é mais eficiente para a esterilização. A pressão para esterilização é de 1,05 kgf/cm<sup>2</sup>, o que resulta numa temperatura de 121 °C. Existem autoclaves horizontais, verticais, cilíndricas, quadradas, grandes e pequenas. A escolha depende do volume do material a ser esterilizado, recursos, espaço, etc. Por motivo de segurança, o trânsito de pessoas na sala de limpeza deve ser limitado.

*Estufa para esterilização:* é um tipo de forno elétrico que pode alcançar temperaturas maiores que 160 °C para esterilizar vidrarias por calor seco.

*Estufa de secagem:* semelhante à estufa de esterilização que produz calor seco, suficiente para secagem rápida de vidraria e outros materiais que não líquidos.

*Destilador:* equipamento utilizado para eliminar sais minerais da água e, acoplado ao deionizador fornece água de melhor pureza. Outro equipamento utilizado para este mesmo fim é o *Sistema de Osmose Reversa*.

*Forno de micro-ondas:* utilizado para fusão de ágar ou de outros agentes gelificantes.

*Máquina de lavar vidraria:* funciona como uma máquina de lavar louças e é eficiente para lavagem de vidraria de laboratório. Dependendo do volume de vidraria é dispensável.

*Suporte para secagem de vidraria:* consiste de uma placa de plástico ou madeira na qual hastes presas numa inclinação de 45° permitem o escoamento de água das vidrarias. A placa é afixada á parede tomando pouco espaço.

*Bancadas:* para guardar pequenos utensílios, baldes, filmes de plástico, pinças, espátulas, atílios de borracha, tampas de vidraria, barbante, etc.

*Carrinho de laboratório:* utilizado no transporte de vidraria de um ponto ao outro do laboratório.

## **Sala de preparo**

Local destinado ao preparo de meios de cultura e de soluções. Há uma grande movimentação de pessoal nesta sala uma vez que reagentes, água, e alguns equipamentos estão localizados em diferentes pontos

da sala ou mesmo do laboratório. Por isto, deve-se ter muita atenção com a assepsia. Deve possuir armários para guardar os reagentes e as vidrarias.

Os equipamentos necessários na sala de limpeza são:

*Geladeira:* para armazenamento de soluções-estoques, reagentes e reguladores de crescimento. Os meios de cultura ficam mais bem conservados a 4 °C que em temperatura ambiente, sendo conveniente que esta sala contenha uma câmara fria de 1,5 m x 1 m com prateleiras onde serão armazenados os meios de cultivo.

*Freezer:* armazenamento de reagentes que exigem temperaturas abaixo de zero grau centígrado

*pHmetro:* para determinação e ajuste do pH das soluções e dos meios de cultura e deve ter precisão de 0,1 unidade.

*Agitador magnético:* usado para auxiliar na dissolução de reagentes e na determinação do pH.

*Balança:* geralmente de capacidade até cerca de 4 kg, e precisão de 0,1 g.

*Balança analítica:* geralmente de capacidade até 200 g, e precisão de 0,1 mg.

*Agitador orbital:* necessário para cultivo em meio líquido que necessitam ficar sob agitação constante.

*Dispensador de meio de cultura:* bomba aspirante que auxilia na distribuição do meio de cultura nos frascos, de uma só vez, no volume desejado.

*Dessecador:* para manutenção de frascos de certos reagentes muito higroscópicos, em pó, após abertos.

## Sala de manipulação ou transferência

Local de manipulação asséptica dos tecidos vegetais. Nesta sala, os explantes ficam expostos por vários minutos e por isso a sala e os equipamentos que a compõem devem ser livres de contaminação.

Os equipamentos necessários na sala de manipulação ou transferência são:

*Câmara de fluxo laminar:* equipamento desenvolvido para criar ambientes limpos em pequenas áreas de trabalhos, independentemente das condições do ambiente que o rodeia. São unidades compactas recomendadas para obtenção de uma área muito limpa. É utilizada nas aplicações que requerem ambientes livres de contaminação por microrganismos. Então, todo o trabalho de cultura de células deve ocorrer dentro deste equipamento. A contaminação causada por bactérias, fungos e leveduras pode destruir todo o material, além de afetar o crescimento das plântulas, calos, ou explantes. É extremamente importante manter limpo o ambiente dentro da câmara de fluxo laminar.

*Bancadas, mesas, gavetas:* para estocagem temporária de meios de cultura e demais materiais destinados à manipulação dos tecidos vegetais e outros materiais já autoclavados, destinados ao uso imediato. Nela, os materiais biológicos são transferidos em condições de esterilidade.

*Bandejas:* para o acondicionamento de frascos contendo meios, vidrarias, e para facilitar a movimentação de pequenos utensílios de uma sala para outra.

*Agitador orbital:* equipamento que dispõe de bandeja dotada de suportes para *Erlenmeyers*: de 150-250 ml e necessário para agitação do meio líquido com ciclos maiores que 150 rpm.

*Vortex:* equipamento de agitação rápida de pequenos volumes

*Lupa:* é um instrumento óptico munido de uma lente com capacidade de imagens virtuais ampliadas. É utilizada para observar com mais detalhe superfícies de calos.

*Esterilizador com esferas de vidros:* para esterilização de alças, tubos, tesouras, pinças, etc., evitando contato direto com a chama de fogo. A introdução dos instrumentos metálicos dentro do tubo com as pérolas de vidro e temperatura elevada (350 °C) permite uma instantânea esterilização devido à completa destruição dos microrganismos e esporos em segundos. Também pode ser utilizado o Bico-de-bunsen ou lamparina de álcool.

*Pisseta:* é um frasco plástico no qual se armazenam compostos de diversas naturezas. Normalmente utiliza-se a pisseta para por água destilada ou água desmineralizada. Seu uso destina-se a laboratórios para descontaminação, lavagem de materiais ou utensílios de laboratório em geral, também para lavagem de eletrodos de medidores de pH.

*Proveta:* recipiente quase cilíndrico de medida para líquidos. Possui uma escala de volumes razoavelmente rigorosa e é muito utilizada quando se prepara os meios de cultivo

*Outros materiais:* lâminas de bisturi, papel toalha, filme plástico tipo Parafilme®, placas de Petri, papel alumínio, filtro de disco, tubos tipo eppendorfs, ponteiras, pipetas, seringas descartáveis, suporte para diversos tipos de tubos.

### **Sala de incubação e crescimento dos cultivos**

Local contendo estantes de aço com prateleiras iluminadas onde os explantes *in vitro* são mantidos até serem retirados dos recipientes e transferidos para a sala de aclimação. O acesso de pessoas deve ser limitado, reduzindo a chance de entrada de poeira e contaminação. Deve possuir comutador eletrônico para controle de fotoperíodo, temperatura e ar condicionado. Para arroz, a temperatura da sala é mantida em torno de 27-28 °C e o fotoperíodo de 16h. No caso de haver necessidade de compartilhamento da prateleira com culturas que necessitam de escuro, estas podem ser cobertas com um tecido preto.

### *Condições ambientais na sala de incubação*

A luminosidade e a temperatura são fatores que devem ser considerados quando se pretende estabelecer um laboratório de cultura de tecidos. Com relação ao ambiente interno no qual o explante irá se desenvolver, trocas gasosas e acúmulo de produtos tóxicos no interior das placas ou tubos também são importantes. Existe um microclima dentro das placas de Petri ou tubo de ensaio contendo o meio e o explante, calos ou plântulas. Conseqüentemente há acúmulo de CO<sub>2</sub> em altas concentrações o que pode levar à anaerobiose, fermentação e produção de álcoois. Por essas razões, o tamanho e a altura das placas e tubos, e a permeabilidade do lacre da placa (Parafilme®) são importantes para evitar a necrose ou mesmo morte dos tecidos.

*Luz:* a luz deve ser controlada para que as plantas possam ter desenvolvimento adequado. Dependendo do período do cultivo, a luz é importante para promover a diferenciação dos calos, fotossíntese e fototropismo. Para o arroz, a luz é fornecida através de luz branca fluorescente (luz fria) por um período de 16 horas de luz e oito de escuro. De modo geral, a luz branca emite luz nas regiões do vermelho (430 nm) e azul (660) e influenciam os processos morfogênicos. Idealmente, a intensidade da luz deve ser mais forte do que 60.000 lux.

Deve-se lembrar de que a luz pode promover o aquecimento das prateleiras e conseqüentemente, dos meios. Para contornar essa situação, uma alternativa é isolar as prateleiras com isopor, pedaços de madeira ou piso de plástico sobre as prateleiras para evitar condensação das placas de Petri contendo os meios.

*Temperatura:* Em geral, nas salas de cultura, a temperatura a ser usada para o arroz varia entre 26 - 30 °C, dependendo do protocolo de cultivo *in vitro*. A sala de cultivo deve contar com um sistema de refrigeração e termostato para manter a temperatura sob controle.

## Procedimentos de assepsia da câmara de fluxo

Antes de utilizar a câmara

1. Ligar a luz ultravioleta (UV) por 15 minutos. A luz UV tem função germicida, entretanto, não se deve descartar a limpeza da câmara de fluxo laminar.
2. Ligar o ventilador.
3. Limpar a superfície do interior da câmara com água sanitária 0,5% (tem a função de oxidar os compostos celulares de microrganismos).

**NOTA:** nunca ligar a UV depois de passar a água sanitária devido à formação de gases de cloro. Deve-se também evitar olhar para a luz UV, pois pode ocasionar queimaduras, principalmente nos olhos. Havendo necessidade, uma proteção deve ser utilizada.

4. Borrifar o interior da câmara com álcool 70% (evitando atingir o filtro da câmara). O álcool tem a função de desnaturação de proteínas e solubilização de lipídios de microrganismos. Esperar aproximadamente 5 min antes de iniciar o próximo passo.
5. Limpar a superfície do interior da câmara com álcool 70% (assoalho, paredes e torneiras).
6. Tudo o que entrar no interior da câmara (pipetadores, vidraria, caixa de ponteiras) deve ser limpo com etanol 70%.

Durante o trabalho

7. Não deixar acumular material no interior da câmara (gabinete) principalmente recipiente para descarte. As áreas de trabalho devem estar livres de objetos desnecessários.
8. Trazer somente os itens específicos do procedimento para dentro da câmara para evitar congestionar o espaço de trabalho. Sempre que derramar algo no gabinete, limpar imediatamente com etanol 70%.
9. Durante o trabalho, limpar a superfície da câmara com etanol 70%. As mãos devem ser lavadas com água e sabão antes de iniciar o procedimento. Limpar também as mãos com esta solução frequentemente.

10. Não bloquear a passagem de ar. Manter a entrada de ar (furinhos na parte inferior e de trás do gabinete) livre de caixas, vidros, papéis, etc. Se esta ventilação for bloqueada, o ar externo contaminado entrará no gabinete.

### Depois do trabalho

11. Limpar o interior da câmara com etanol 70%.
12. Desligar o ventilador e qualquer luz.
13. Não deixar nada no interior da câmara.

### Preparo de soluções estoque de reguladores de crescimento

**BAP- 6-benzilaminopurina** (1 mg/ml): pesar 100 mg e adicionar 2 gotas de 1 N KOH até a completa dissolução do pó. Depois, ajustar o volume para 100 ml com água bidestilada.

**ANA- ácido naftaleno acético** (1 mg/ml): dissolver 100 mg de ANA em 1 ml de etanol absoluto, adicione 3 ml de KOH 1 N e ajustar o volume a 100 ml com água bidestilada.

**ABA- ácido abscísico** (5 mg/ml): pesar 100 mg de ABA, adicione 2 gotas de KOH 1 N até dissolver o pó, depois ajustar o volume de 20 ml com água bidestilada. Esterilizar por filtração. Proteger da luz.

**2,4-D- ácido 2,4 diclorofenoxiacético** (1 mg/ml): pesar 100 mg de 2,4-D e dissolva em 4-5 ml de álcool absoluto, depois ajustar o volume para 100 ml com água bidestilada e conservar a 4 °C.

A água é o componente de maior quantidade no meio e deve ser de excelente qualidade, livre de impurezas, destilada ou bidestilada. É uma fonte potencial de impurezas que podem afetar o crescimento de tecidos *in vitro*.

### Armazenamento das soluções estoque

As condições de armazenamento para a maioria das soluções de ações já foram descritas, no entanto, alguns pontos adicionais podem ser

ressaltados. Por conveniência, alíquotas das soluções estoques podem ser preparadas em quantidade suficiente para preparar 1-10 litros de meio; estas alíquotas são armazenadas em pequenos frascos ou sacos de plástico num congelador. Esse procedimento evita o inconveniente de ter que descongelar um grande volume de estoque cada vez que um meio é preparado.

## **Preparo dos meios para cultivo *in vitro***

### **Procedimento**

1. Em um becker, adicionar 60% do volume de água necessário para fazer o meio.
2. Adicionar a sacarose e aos poucos adicionar os outros componentes sólidos.
3. Adicionar o volume necessário de cada solução estoque.
4. Completar com água o volume desejado.
5. Fazer a leitura do pH.6 - Autoclavar.

### **Cuidados durante a autoclavagem dos meios**

Os meios são esterilizados por autoclavagem a 121 °C (1 kg.cm<sup>2</sup>) por 15-20 minutos antes de serem distribuídos nos frascos ou vasilhames de cultura.

6. as garrafas devem conter apenas a metade dos meios para evitar que o meio transborde durante a ebulição. Por exemplo, ao preparar um litro de meio, e distribuir 500 ml em cada garrafa de 1000 ml.

7. As tampas das garrafas não devem ser fortemente fechadas, pois os meios nos recipientes podem explodir devido à libertação rápida e forçada de pressão. Caso o recipiente não tenha tampa, fechar com folha dupla de papel alumínio e fechar ligeiramente com fio de plástico tipo Zap. Não exceder o tempo de autoclavagem quando o meio contiver açúcar ou ágar, pois poderá ocorrer caramelização e sua degradação pode favorecer a formação hidroxiacetonas, dihidroxiacetona, furano, 2-metilfurano, 2,5-dimetilfurano e maltol (AMMIRATO, 1983). Estes compostos formam melanoidinas que são compostos de coloração amarronzada, de alto peso molecular, podendo inibir o crescimento celular.

## Esterilização por filtração

Alguns reguladores de crescimento, aminoácidos e vitaminas são instáveis e destruídos pelo calor quando autoclavados. A esterilização então é efetuada utilizando uma seringa de volume apropriado acoplada a um filtro de poro de tamanho 0.22  $\mu\text{m}$ . Caso o volume seja maior, pode-se recorrer à filtração a vacum utilizando-se também o filtro 0.22  $\mu\text{m}$ . A glicose deve ser esterilizada a frio, por filtragem. Embora as vitaminas sejam adicionadas ao meio antes da autoclavagem, a esterilização a frio é recomendada.

## Composição dos meios de cultura

**Tabela 8.** Solução estoque para macronutrientes N6 do Meio 1.

<i>Componentes</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>mg/L final</i>	<i>Estoque 1000 ml 20 X (g)</i>
$\text{KNO}_3$	101,1	2.830,0	56,6
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	132,1	463,0	9,26
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136,1	400,0	8,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,0	165,0	3,3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,5	185,0	3,7

**Tabela 9.** Solução estoque para micronutrientes N6 do Meio 1.

<i>Componentes</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>mg/L final</i>	<i>Estoque 1000 ml 100 X (mg)</i>
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169,0	10,0	758
$\text{H}_3\text{BO}_3$	61,8	3,0	300
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287,5	2	200
$\text{KI}^a$	166,0	0,75	75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}^b$	241,9	0,25	25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}^c$	249,7	0,025	2,5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^c$	237,9	0,025	2,5

**Tabela 10.** Solução estoque para vitaminas B5.

<i>Componentes</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>mg/L final</i>	<i>Estoque 1000 ml 100 X (mg)</i>
Ácido nicotínico	123,1	1	100
Tiamina-HCl	205,6	10	1000
Piridoxina	337,3	1	100

**Tabela 11.** Solução estoque para FeEDTA.

<i>Componentes</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>mg/L final</i>	<i>Estoque 1000 ml 100 X (g)</i>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	278	27,8	2,78
Na <sub>2</sub> EDTA	372	37,3	3,72

**Tabela 12.** Solução estoque para micronutrientes B5.

<i>Componentes</i>	<i>Peso Molecular (PM)</i>	<i>Estoque 500 ml 100 X (g)</i>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	169,0	0,379
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,8	0,150
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	287,5	0,100
KI	166,0	Estoque a
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	241,9	Estoque b
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	249,7	Estoque c
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	237,9	Estoque c

### Estoque a

Dissolver 0,2 g de KI em 20 ml de água em um tubo Falcon de 50 ml. Vortexar.

### Estoque b

Dissolver 0,2 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O em 20 ml de água em um tubo Falcon de 50 ml. Vortexar.

### Estoque c

Dissolver 0,01 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O em 1 ml de água em um tubo tipo Eppendorf.

Dissolver 0,01 g de CoCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O em 1 ml de água em um tubo tipo Eppendorf.

**Tabela 13.** Solução estoque para macronutrientes MS.

<i>Componentes</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>Estoque 1000 ml 10 X (g)</i>
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136,09	1,7
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	80,04	16,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,5	3,7
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,0	4,4

**Tabela 14.** Solução estoque para micronutrientes MS.

<i>Componentes</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>Estoque 1000 ml 50 X (g)</i>
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169,0	1,11
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287,5	0,43
$\text{H}_3\text{BO}_3$	61,8	0,31
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249,7	0,00125
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241,9	0,00125

**Tabela 15.** Solução estoque para vitaminas MS.

<i>Componentes</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>Estoque 1000 ml 20 X (mg)</i>
Ácido nicotínico	123,1	200
Tiamina-HCl	205,6	400
Piridoxina	337,3	200
Glicina	75,06	800

**Tabela 16.** Solução estoque para micronutrientes N6 do Meio 2.

<i>Componentes</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>Estoque 1000 ml 100 X (g/L)</i>
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169,0	0,379
$\text{H}_3\text{BO}_3$	61,8	0,160
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287,5	0,150
KI <sup>a</sup>	166,0	0,08

\*vide página 52.

**Tabela 17.** Solução estoque para vitaminas do Meio 2.

<i>Componentes</i>	<i>Peso Molecular (PM)</i>	<i>Stock 1000 (100X) g/L</i>
Ácido nicotínico	123,1	0,05
Piridoxina	205,6	0,05
Tiamina-HCL	337,3	0,1

**Tabela 18.** Solução estoque para aminoácidos do Meio 2.

<i>Aminoácidos</i>	<i>Peso Molecular</i>	<i>Estoque 40 X (g/L)</i>
Glutamina	205,6	8,76
Glicina	75,07	0,075
Asparagina	132,1	2,66
Arginina	174,2	1,74

Esterilizar por filtração

## Referências

ABE, T.; FUTSUHARA, Y. Efficient plant regeneration by somatic embryogenesis from root callus tissues of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 121, n. 2, p. 111-118, 1985.

ADKINS, S. W.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; GRAY, S. J.; ADKINS, A. L. Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 269, p. 1829-1835, Dec. 1993.

ADKINS, S. W.; SHIRAIISHI, T.; MCCOMB, J. A. Rice callus physiology: identification of volatile emissions and their effects on culture growth. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 78, n. 4, p. 526–531, April 1990.

AHLOOWALIA, B. S. Plant regeneration from callus culture in wheat. **Crop Science**, Madison, v. 22, n. 2, p. 405-410, Mar./Apr. 1982.

AKTER, P.; AL-FORKAN, M. Assessment of somatic embryogenesis and plant regeneration potentiality from coleoptile and root tissues of *Jhum* rice (*Oryza sativa* L.). **Indian Journal of Agricultural Research**, Haryana, v. 44, n. 2, p. 8895, 2010.

AL-FORKAN, M.; RAHIM, M. A.; CHOWDHURY, T.; AKTER, P.; KHALEDA, L. Development of highly *in vitro* callogenesis and regeneration system for some salt tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars of Bangladesh. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 4, n. 3, p. 230-234, 2005.

AMEMIYA, A.; AKEMINE, H.; TORIYAMA, K. Studies on the embryo culture in rice plant. 1: cultural conditions and growth of immature embryo in rice plant. **Bulletin of the National Institute of Agricultural Science, Série D**, Tokyo, v. 6. p. 1-40, 1956.

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: MacMillan, 1983. v. 1, p. 82-123.

ARAÚJO, L. G. de; PRABHU, A. S.; FREIRE, A. de B. Development of blast resistant somaclones of the upland rice cultivar Araguaia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 2, p. 357-367, fev. 2000.

ARUMUGANATHAN K.; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 9, n. 3, p. 208-218, 1991.

AZRIA, D.; BHALLA, P. L. Plant regeneration from mature embryo-derived callus of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 51, n. 2, p. 305-312, 2000.

BANO, S.; JABEEN, M.; RAHIM, F.; ILAHI, I. Callus induction and regeneration in seed explants of rice (*Oryza sativa* cv. Swat-II). **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 37, n. 4, p. 829-836, Dec. 2005.

BEVITORI, R. **Meios de cultivo in vitro e transformação genética de arroz (*Oryza sativa*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. 23 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 18).

BISWAS, G. C. G.; ZAPATA, F. J. High-frequency plant regeneration from protoplasts of indica rice (*Oryza sativa* L.) using maltose. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 141, n. 4, p.470–475, Apr. 1993.

BRETTELL, R. I. S.; DENNIS, E. S.; SCOWCROFT, W. R.; PEACOCK, W. J. Molecular analysis of somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 202, n. 2, p. 235-239, Feb. 1986.

CARNEIRO, V. T. de C.; CONROI, T.; BARROS, L. M. G.; MATSUMOTO, K. Protoplastos: cultura e aplicações. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMRAPA-SPI, 1998. v. 1, p. 413-458.

CARSONO, N.; YOSHIDA, T. Identification of callus induction potential of 15 Indonesian rice genotypes. **Plant Production Science**, Tokyo, v. 9, n. 1, p. 65-70, Jan. 2006.

CHAN, M. T.; LEE, T. M.; CHANG, H. H. Transformation of *indica* rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 33, n. 5, p. 577-583, Jul. 1992.

CHAND, S.; SAHRAWAT, A. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from coleoptile tissue of indica rice. **Rice Biotechnology Quarterly**, West Lafayette, v. 32, p. 17-18, Oct. 1997.

CHENG, X. Y.; SARDANA, R.; KAPLAN, H.; ALTOSAAR, I. *Agrobacterium* transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 6, p. 2767-2772, Mar. 1998.

CHRISTOU, P.; FORD, T. L.; KOFRON, M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. **Bio-Technology**, New York, v. 9, n. 10, p. 957-962, Oct. 1991.

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

CHUNG, G. S. Studies on tissue culture in rice *Oryza sativa*. **Korean Journal of Crop Science**, Seoul, v. 20, p. 1-26, 1975.

DEKA, P. C.; SEN, S. K. Differentiation in calli originated from isolated protoplast of rice through plating technique. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 145, n. 3, p. 239-243, 1976.

DEVOS, K. M.; GALE, M. D. Genome relationships: the grass model in current research. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 5, p. 637-646, May 2000.

EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; MEDINA FILHO, H. P. Somaclonal and gametoclonal variation. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 71, n. 6, p. 759-774, June 1984.

FONSECA, J. R.; MORAIS, O. P. de; CASTRO, E. da M. de; SANTIAGO, C. M.; COLLICHIO, E. **Recomendações de cultivares de arroz de terras altas para o Estado do Tocantins**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2004. 7 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Circular técnica, 66).

FUJIMURA, T.; SAKURAI, M.; AKAGI, H. Regeneration of rice plants from protoplasts. **Plant Tissue Culture Letters**, Tokyo, v. 2, p. 74-75, 1985.

FUJIWARA, A.; OJIMA, K. Physiological studies of plant roots: I. Influences of some environmental conditions on the growth of isolated roots of rice plant and wheat. **Journal of Science Soil and Manure**, Tokyo, v. 28, p. 9-12, 1955.

FUKUOKA, S.; SAKA, N.; KOG, H.; ONO, K.; SHIMIZU, T.; EBANA, K.; HAYASHI, N.; TAKAHASHI, A.; HIROCHIKA, H.; OKUNO, K.; YANO, M. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. **Science**, Washington, v. 325, n. 5943, p. 998-1001, Aug. 2009.

GALE, M. D.; DEVOS, K. M. Comparative genetics in the grasses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 5, p. 1971-1974, Mar. 1998.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, n. 1, p. 151-158, Apr. 1968.

GARG, A. K.; KIM, J. K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; DO CHOI, Y.; KOCHIAN, L. V.; WU, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 25, p. 15898–15903, Dec. 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. A. Micropropagação. In. TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1998. v. 1, p. 183-260.

GUHA, S.; MAHESHWARI, S. C. Cell division and differentiation of embryos in pollen grains of *Datura in vitro*. **Nature**, London, v. 212, n. 5057, p. 97-98, Oct. 1966.

GUPTA, H. S.; BORTHAKUR, D. N. Improvement rate of callus induction from rice anther culture following microscopic staging of microspores in iron alum-hematoxylin. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 74, n. 1, p. 95–99, 1987.

HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, New Delhi, v. 28, n. 1, p. 74-81, 1978.

HAYASHIMOTO, A.; LI, Z.; MURAI, N. A polyethylene glycol-mediated protoplast transformation system for production of fertile transgenic rice plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 93, n. 3, p. 857-863, July 1990.

HE, Y.; NING, T. T.; XIE, T. T.; QIU, Q. C.; ZHANG, L. P.; SUN, Y. F.; JIANG, D. M.; FU, K.; YIN, F.; ZHANG, W. J.; SHEN, L.; WANG, H.; LI, J. J.; LIN, Q. S.; SUN, Y. X.; LI, H. Z.; ZHU, Y. G.; YANG, D. C. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 47, p. 19078-19083, Nov. 2011.

HIEI, Y.; KOMARI, T. Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 5, p. 824–834, 2008.

HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUBO, T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 1/2, p. 205-218, Sept. 1997.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant Journal**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 271-282, Aug. 1994.

HOQUE, M. D.; MANSFIELD, J. W. Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of Indica rice genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 78, n. 3, p. 217-223, Sept. 2004.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops**: 2011. Ithaca: ISAAA, 2011. 30 p. (ISAAA. Brief, 43).

JHA, S.; TANK, H. G.; PRASAD, B. D.; CHATTOO, B. B. Expression of Dm-AMP1 in rice confers resistance to *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. **Transgenic Research**, London, v. 18, n. 1, p. 59-69, Feb. 2009.

JONES, P. W.; CASSELLS, A. C. Criteria for decision making in crop improvement programs - technical considerations. **Euphytica**, Wageningen, v. 85, n. 1/3, p. 465-476, 1995.

KAWATA, S. I.; ISHIHARA, A. The regeneration of rice plant, *Oryza sativa* L., in the callus derived from the seminal root. **Proceedings of the Japan Academy**, Tokyo, v. 44, p. 549-553, 1968.

KHALEDA, L.; AL-FORKAN, M. Genotypic variability in callus induction and plant regeneration through somatic embryogenesis of five deepwater rice (*Oryza sativa* L.) cultivars of Bangladesh. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 5, n. 16, p. 1435-1440, Aug. 2006.

KHATUN, M. M.; DESAMERO, N. V. Callus induction and plant regeneration from rice Epicotyl. **Plant Tissue Culture**, Tokyo, v. 15, n. 1, p. 51-56, June 2005.

KOETJE, D. S.; GRIMES, H. D.; WANG, Y. C.; HODGES, T. K. Regeneration of indica rice (*Oryza sativa* L.) from primary callus derived from immature embryos. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 135, n. 2, p. 184-190, Oct. 1989.

KOORNNEEF, M.; MEINKE, D. The development of Arabidopsis as a model plant. **Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 6, p. 909-921, Mar. 2010.

KRIKORIAN, A. D.; BERQUAM, D. L. Plant cell and tissue cultures: the role of Haberlandt. **Botanical Review**, Bronx, v. 35, n. 1, p. 59-67, 1969.

KYOZUKA, J.; OTOO, E.; SHIMAMOTO, K. Plant regeneration from protoplasts of *indica* rice: genotypic differences in culture response. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 76, n. 6, p. 887-890, 1988.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 60, n. 4, p. 197-214, 1981.

LEE, K. S.; JEON, H. S.; KIM, M. Y. Optimization of a mature embryo-based in vitro culture system for high-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from *japonica* rice cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, n. 3, p. 237-244, Dec. 2002.

LEE, S. Y.; KIN, H. S.; KWON, T. O. Variation in anther culture response and fertility of backcrossed hybrids between *indica* and *japonica* rice (*Oryza sativa*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 79, n. 1, p. 25–30, Oct. 2004.

LENTINI, Z.; REYES, P.; MARTÍNEZ, C.; NUÑEZ, 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, 1994. 79 p.

LENTINI, Z.; REYES, P.; MARTINEZ, C. P.; ROCA, W. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. **Plant Science**, Limerick, v. 110, n. 1, p. 127–138, Sept. 1995.

LI, K. L.; LIU, L. F. Induction and plant regeneration callus from immature embryos of rice plant (*Oryza sativa* L.). **Japanese Journal of Crop Science**, Tokyo, v. 51, n. 1, p. 70-74, 1982.

LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 18, n. 1, p. 100-127, 1965.

MAEDA, E. Callus formation and isolation of single cells from rice seedlings. **Proceedings of the Crop Science Society of Japan**, Tokyo, v. 34, p. 139-147, 1965.

MAEDA, E. Isolation of protoplast from seminal roots of rice. **Proceedings of the Crop Science Society of Japan**, Tokyo, v. 40, p. 397-398, 1971.

MAGGIONI, L.; LUSRDI M, C.; LUPOTTO, E. Effect of culture condition callus induction and plant regeneration from mature and immature embryos of rice varieties (*Oryza sativa* L.). **Journal of Genetics of Breeding**, Rome, v. 43, p. 99-106, 1989.

MANDAL, A. B.; MAITI, A.; BISWAS, A. Somatic embryogenesis in root derived callus of *indica* rice. **Plant Tissue Culture**, Tokyo, v. 13, n. 2, p. 125–133, Dec. 2003.

MANTELL, S. H.; MATHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas**: uma introdução a engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344 p.

MASUDA, K.; KUDO-SHIRATORI, A.; INOUE, M. Callus transformation and plant regeneration from rice protoplasts purified by density gradient centrifugation. **Plant Science**, Limerick, v. 62, n. 2, p. 237–246, 1989.

MIAH, M. A. A.; EARLE, E. D.; KHUSH, G. S. Inheritance of callus formation ability in anther cultures of rice, *Oryza sativa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 70, n. 2, p. 113-116, 1985.

MILLER, C. O.; SKOOG, F.; VONSALTZA, M. H.; STRONG, F. M. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. **Journal of the American Chemical Society**. Easton, v. 77, n. 5, p. 1392–1393, 1955.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. de; PICARD, E. Viability of haploid production by anther culture using brazilian wheat genotypes. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 2, p. 261-277, June 1983.

MUKHOPADHYAY, A.; MINHAS, D.; GROVER, A. Callusing from rice root explants: adventitious root formation precedes callus initiation response. **Current Science**, Bangalore, v. 73, n. 5, p. 465-469, Sept. 1997.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

NABORS, M. W.; HEYSER, J. W.; DYKES, T. A.; DeMOTT, K. J. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. **Planta**, Berlin, v. 157, n. 5, p. 385-391, 1983.

NIIZEKI, H.; OONO, K. Induction of haploid rice plants from anther culture. **Proceedings of the Japan Academy**, Tokyo, v. 44, n. 6, p. 554-557, 1968.

NISHI, T.; MITSUOKA, S. Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plants. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, v. 44, n. 6, p. 341-346, 1969.

NISHI, T. Y.; YAMADA, Y.; TAKAHASHI, E. Organ redifferentiation and plant restoration in plants. **Nature**, London, v. 219, n. 5153, p. 508-509, Aug. 1968.

NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, Washington, v. 163, n. 3862, p. 85-87, 1969.

OGAWA, T.; FUKUOKA, H.; YANO, H.; OHKAWA, Y. Relationships between nitrite reductase activity and genotype-dependent callus growth in rice cell cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, n. 7/8, p. 576–581, Mar. 1999.

ORTON, T. J. Experimental approaches to the study of somaclonal variation. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 1, n. 2, p. 67-76, 1983.

POLITO, V. S.; GALE, M.; PINNEY, K.; LESLIE, C. Origin of somatic embryos from repetitively embryogenic cultures of walnut (*Juglans regia* L.): Implications for Agrobacterium-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 8, n. 4, p. 219-221, Jul. 1989.

PRASAD, B. D.; JHA, S.; CHATTOO, B. B. Transgenic *indica* rice expressing *Mirabilis jalapa* antimicrobial protein (Mj-AMP2) shows enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Plant Science**, Limerick, v. 175, n. 3, p. 364-371, Sept. 2008.

PRICE, T. D.; QVARNSTROM, A.; IRWIN, D. E. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. **Proceedings of the Royal Society. Section B-Biological Sciences**, Edinburgh, v. 270, n. 1523, p. 1433–1440, July 2003.

RAFIQUE, M. Z.; RASHID, H.; CHAUDHARY, M. F.; CHAUDHRY, Z.; CHEEMA, N. M. Study on callogenesis and organogenesis in local cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 43, n. 1, p. 191-203, 2011.

RAMESH, M.; MURUGIAH, V.; GUPTA, A. K. Efficiency in vitro plant regeneration via leaf base segments of indica rice (*Oryza sativa* L.). **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 47, n. 1, p. 68-74, Jan. 2009.

RANCE, I. M.; TIAN, W.; MATHEWS, H.; KOCHKO, A. D.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Partial desiccation of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of indica rice. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, n. 11, p. 647-651, Aug. 1994.

RASHID, H.; YOKOI, S.; TORIYAMA, K.; HINATA, K. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *indica* rice. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, n. 10, p. 727-730, June 1996.

REY, M. dos S.; PINHO, D. S. de; VIEIRA, A. P.; BRAGA, E. J. B.; PIEROBOM, C. R.; PETERS, J. A. Organogênese direta de mesocótilos de arroz (*Oryza sativa* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 521-526, jul/set. 2010.

SAIKA, H.; TOKI, S. Mature seed-derived callus of the model indica rice variety Kasalath is highly competent in *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 12, p. 1351-1364, Dec. 2010.

SALLAUD, C.; MEYNARD, D.; VAN BOXTEL, J.; GAY, C.; BES, M.; BRIZARD, J. P.; LARMANDE, P.; ORTEGA, D.; RAYNAL, M.; PORTEFAIX, M.; OUWERKERK, P. B. F.; RUEB, S.; DELSENY, M.; GUIDERDONI, E. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 8, p. 1396–1408, May 2003.

SALOMON, M. V. **Trigo**: avaliação de linhagens diplóides obtidas via cultura de anteras. 2003. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SANTOS, E. K. dos. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B. de; BERED, F. (Org.). **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2003. p. 415-444.

SATHYANARAYANA, B. N.; VARGHESE, D. B. **Plant tissue culture**: practices and new experimental protocols. New Delhi: I. K. International, 2007. p. 1-9.

SERAJ, Z. I.; ISLAM, Z.; FARUQUE, M. O.; DEVI, T.; AHMED, S. Identification of the regeneration potential of embryo derived calluses from various indica rice varieties. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 48, n. 1, p. 9-13, 1997.

STICKLEN, M. B. Direct embryogenesis and fertile plants from rice root culture. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 138, n. 5, p. 577–580, Sept. 1991.

SU, Y.; HUANG, S. J.; LIN, W. H.; XIAO, L. T. Study of rice high-speed transformation by *Agrobacterium* infection. **Chinese Agricultural Science Bulletin**, Beijing, v. 24, n. 5, p. 83-86, 2008.

TAMURA, S. Shoot formation in calli originated from rice embryo. **Proceedings of the Japan Academy**, Tokyo, v. 44, n. 6, p. 544-548, 1968.

TAVARES, L. F. da S.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M. de; PETERS, J. A. Organogênese indireta de explantes de arroz da região meristemática de ápices caulinares. **Revista Brasileira de Agrobiologia**, Pelotas, v. 10, n. 2, p. 203-207, abr./jun. 2004.

TEIXEIRA, S. L.; TORRES, A. C. Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1998. v. 1, p. 71-86.

TOKI, S. Rapid and efficient Agrobacterium mediated transformation in rice. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 15, n. 1, p. 16-21, Mar. 1997.

TOKI, S.; HARA, N.; ONO, K.; ONODERA, H.; TAGIRI, A.; OKA, S.; TANAKA, H. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. **Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 6, p. 969-976, Sept. 2006.

TORIYAMA, K.; ARIMOTO, Y.; UCHIMIYA, H.; HINATA, K. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. **Bio-Technology**, New York, v. 6, n. 9, p. 1072-1074, Sept. 1988.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1998. v. 1, p. 11-20.

TU, J.; ZHANG, G. A.; DATTA, K.; XU, C. G.; HE, Y. Q.; ZHANG, Q. F.; KHUSH, G. S.; DATTA, S. K. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 10, p. 1101-1103, Oct. 2000.

VEGA, R.; VÁSQUEZ, N.; ESPINOZA, A. M.; GATICA, A. M.; VALDEZ-MELARA, M. Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* cv. 5272). **Revista de Biologia Tropical**, San José, v. 57, n. 1, p. 141-150, Nov. 2009.

VISARADA, K. B. R. S.; SARMA, N. P. Transformation of indica rice through particle bombardment: factors influencing transient expression and selection. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 48, n. 1, p. 25-31, 2004.

VISARADA, K. B. R. S.; SAILAJA, M.; SARMA, N. P. Effect of callus induction media on morphology of *Embryogenic calli* in rice genotypes. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 45, n. 2, p. 495-502, 2002.

WALTZ, E. China's GM rice first. **Nature Biotechnology**, New York, v. 28, n. 1, p. 8, Jan. 2010.

WANG, M. S.; ZAPATA, F. J.; CASTRO, D. C. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* Moench). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 6, n. 4, p. 294-296, Jul. 1987.

WANI, S. H.; SANGHERA, G. S.; GOSAL, S. S. An efficient and reproducible method for regeneration of whole plants from mature seeds of a high yielding Indica Rice (*Oryza sativa* L.) variety PAU 201. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 28, n. 4, p. 418-422, Jul. 2011.

WHITE, P. R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 9, n. 3, p. 585-600, July 1934.

YAN, C. J.; ZHAO, Q. H. Callus induction and plantlet regeneration from leaf blade of *Oryza sativa* L. subsp *indica*. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 198-192, 1982.

YATAZAWA, M.; FURUHASHI, K.; SHIMIZU, M. Growth of callus tissue from rice-root *in vitro*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 8, n. 3, p. 363-373, 1967.

YE, X.; AL-BABILI, S.; KLÖTI, A.; ZHANG, J.; LUCCA, P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science**, Washington, v. 287, n. 5451, p. 303-305, Jan. 2000.

YEOMAN, M. M.; FORCHE, E. Cell proliferation and growth in callus culture. In: PERSPECTIVE in plant cell and tissue culture. New York: Academic Press, 1980. p. 1-24.

YEOMAN, M. M.; MACLEOD, A. J. Tissue (callus) cultures techniques. In: STREET, H. E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. 2. ed. Berkeley: University of California, 1977. p. 31-59.

ZAPATA, F. J.; KHUSH, G. S.; CRILL, J. P.; HEU, M. H.; ROMERO, R. O.; TORRIZO, L. B.; ALEJAR, M. Rice anther culture at IRRI. In: WORKSHOP ON POTENTIALS OF CELL AND TISSUE CULTURE TECHNIQUES IN THE IMPROVEMENT OF CEREAL CROPS, 1981, Beijing, China. **Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement**: proceedings. Beijing: Science Press; Manila: International Rice Research Institute, 1983. p. 27-46.