

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE CULTIVARES
BRASILEIROS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)
A PARTIR DE PROTOPLASTOS DE CALOS DE
EMBRIÕES MADUROS

DANIEL SCHERER DE MOURA

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Akihiko Ando

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoria de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

M929r Moura, Daniel Scherer de
Regeneração de plantas de cultivares brasileiros de
arroz (*Oryza sativa* L.) a partir de protoplastos de
calos de embriões maduros. Piracicaba, 1994.
141p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Arroz - Genética 2. Arroz - Regeneração 3. Proto
plasto de arroz I. Escola Superior de Agricultura Luiz
de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.18

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE CULTIVARES
BRASILEIROS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)
A PARTIR DE PROTOPLASTOS DE CALOS DE
EMBRIÕES MADUROS

DANIEL SCHERER DE MOURA

Aprovada em: 22.11.1994

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Akihiko Ando

ESALQ/USP

Dr. Francisco Javier Zapata-Arias

ESALQ/USP

Dr. Marcos Machado

IAC



Prof. Dr. Akihiko Ando
Orientador

O autor gostaria de agradecer às seguintes pessoas e instituições:

Ao Professor Dr. Akihiko Ando, orientador, pelo constante estímulo, aconselhamento e amizade no transcorrer da elaboração desta dissertação, bem como por todo o empenho para que o trabalho se realizasse da melhor forma possível.

Ao Dr. Francisco Javier Zapata-Arias, co-orientador, por toda a dedicação, conhecimentos, incentivo e amizade transmitidos, e, principalmente, pela orientação dos trabalhos no laboratório, indispensável para o êxito desta dissertação.

Ao Dr. K. Syono e Dr. T. Hodges pela gentileza em fornecerem as linhagens celulares Oc e IR52, respectivamente.

Ao Centro de Biotecnologia da UFPEL, nas pessoas dos Professores Dr. José Antônio G. Aleixo, Dr. Carlos Gil Turnes e Antônio Costa de Oliveira, pelo auxílio na obtenção da bolsa de mestrado e constante estímulo à pesquisa e ao trabalho.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética que tive oportunidade de conviver, agradeço indistintamente pela amizade e companherismo manifestados durante o curso.

Aos funcionários do Departamento de Genética e do CENA, em especial a Inês F. P. Rodrigues e Wlamir de A. Godoy por todo o apoio durante a realização do trabalho.

Ao Departamento de Genética da ESALQ/USP e a todos os seus professores pelos conhecimentos e experiência transmitidos.

Ao CENA/USP, em especial a seção de Radiogenética, pela acolhida e cessão do laboratório para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e ao grupo de funcionários anônimos pertencente a esta instituição que fazem com que grande parte da pesquisa deste País seja levada adiante, agradeço pela concessão da bolsa e atenção as reivindicações feitas durante o curso.

Ao programa RHAE e aos seus idealizadores um especial agradecimento pela oportunidade de ter participado deste programa.

A FAPESP por proporcionar a vinda de pesquisadores visitantes que tanto podem colaborar para a melhoria da ciência nacional.

A minha família e esposa por todo o apoio e compreensão que tiveram durante a realização do trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
SUMMARY.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1. Arroz no mundo.....	05
2.2. Arroz no Brasil.....	07
2.3. Arroz no estado de São Paulo.....	09
2.4. Indução de calos.....	11
2.5. Suspensão celular.....	15
2.6. Isolamento e cultivo de protoplastos.....	17
2.7. Regeneração de plantas.....	19
2.8. Efeito da maltose no cultivo e na regeneração de plantas.....	21

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Cultivares.....	23
3.2. Seleção das sementes.....	25
3.3. Assepsia das sementes.....	26
3.4. Indução de calos.....	27
3.4.1. Experimento 1.....	28
3.4.2. Experimento 2.....	28
3.4.3. Experimento 3.....	29
3.4.4. Experimento 4.....	29
3.5. Início e manutenção de suspensões celulares....	31
3.6. Isolamento de protoplastos.....	33
3.6.1. Calos.....	33
3.6.2. Suspensões celulares.....	36
3.7. Cultivo de protoplastos.....	37
3.8. Uso de células auxiliares ("nurse cells").....	39
3.9. Eficiência de plaqueamento.....	40
3.10. Regeneração de plantas.....	42
3.11. Crescimento das plantas.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1. Assepsia das sementes.....	44
4.2. Explante.....	45
4.3. Escolha dos cultivares.....	46
4.3.1. Experimento 1. Avaliação do comportamento "in vitro".....	46

4.4. Indução de calos.....	56
4.4.1. Experimento 2. Avaliação do efeito dos meios básicos N ₆ , MS e B5, em dois níveis de 2,4-D na indução de calos.....	56
4.4.2. Experimento 3. Avaliação do efeito da caseína hidrolisada e da L-prolina na indução de calos.....	62
4.4.3. Experimento 4. Avaliação do número de calos com porção embriogênica e da produção, peso fresco, de calos selecionados para isolamento no cultivar IAC-201.....	74
4.5. Início e manutenção de suspensões celulares....	79
4.6. Isolamento de protoplastos.....	82
4.6.1. Calos primários.....	82
4.6.2. Suspensões celulares.....	85
4.7. Cultivo de protoplastos	87
4.7.1. Calos.....	87
4.7.2. Suspensões celulares.....	94
4.8. Regeneração de plantas a partir de calos derivados de protoplastos isolados diretamente de calos.....	95
5. CONCLUSÕES.....	100

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....101

APÊNDICE.....113

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Câmara de Neubauer, campos de contagem dos protoplastos.....35
- Figura 2. A) Metodologia para a tomada da eficiência de plaqueamento. B) Cálculo do volume médio de uma visada em uma ocular (aumento 10x)....41
- Figura 3. Gráfico: dose de 2,4-D vs. número de calos induzidos, Experimento 1. A) Cultivares de sequeiro. B) Cult. irrigados.....48
- Figura 4. Indução de calos em arroz. A) Calo de origem escutelar induzido a partir de embrião maduro. B) Calo com porção embriogênica (E) e não embriogênica (NE). C) Estruturas semelhantes a embrióides (setas). D) Calos selecionados para o isolamento de protoplastos.....83
- Figura 5. Formação de colônias embriogênicas a partir de protoplastos. A) Protoplastos recém-isolados. B) 3 dias após o isolamento. C) Célula com mudança de forma e atividade citoplasmática (seta). D) 1ª divisão. E) 2ª divisão. F) Colônia embriogênica.....89
- Figura 6. Cultivo de microcalos e calos derivados de protoplastos. A e B) Microcalos immobilizados em blocos de agarose (20 dias após o isol.). C e D) Calos multiplicando-se em meio semi-sólido (35 dias após o isol.).....93

Figura 7. Regeneração e crescimento de plantas derivadas de protoplastos. A) Calos em meio de regeneração com pontos verdes e pequenas plântulas. B) Plântulas em meio líquido. C) Plântulas em meio semi-sólido. D) Plantas crescendo na casa de vegetação em solução nutritiva.....99

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Ecossistema, ano de lançamento e cruzamento de origem dos 7 cultivares usados na dissertação.....24
- Tabela 2. Quadro de análise da variância do Experimento 1. Variável número de calos.....46
- Tabela 3. Quadro de análise da variância do Experimento 01. Variável número de calos embriogênicos, transformada segundo $\sqrt{(x+k)}$49
- Tabela 4. Número médio de calos (CALOS), qualidade e número médio de calos embriogênicos (CAEMB) induzidos para os 7 cultivares do Experimento 1.....50
- Tabela 5. Efeito da concentração de 2,4-D no número de calos e no número de calos embriogênicos induzidos no Exp. 1, considerando os dois cultivares.....51
- Tabela 6. Informações sobre os cultivares mais importantes do estado de São Paulo.....53
- Tabela 7. Quadro de análise da variância do Experimento 2. Variável número de calos induzidos.....56

Tabela 8.	Quadro de análise da variância do Experimento 2. Variável número de calos embriogênicos, transformada segundo $\sqrt{(x+k)}$	57
Tabela 9.	Número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos para os cultivares IAC-201 e IAC-165 no Exp. 2.....	58
Tabela 10.	Número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos para os diferentes meios básicos no Exp. 2, considerando os dois cultivares.....	59
Tabela 11.	Número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos para as diferentes doses de 2,4-D no Exp. 2 considerando os dois cultivares.....	60
Tabela 12.	Número médio de calos embriogênicos induzidos e qualidade dos calos nas diferentes combinações de meio básico e dose de 2,4-D no Experimento 2.....	61
Tabela 13.	Quadro de análise da variância do Experimento 3. Variável número de calos induzidos. Cultivar IAC-201.....	63
Tabela 14.	Quadro de análise da variância do Experimento 3. Variável número de calos embriogênicos induzidos. Cultivar IAC-201.....	63

Tabela 15. Efeito dos aditivos no número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos no Experimento 3. Cultivar IAC-201.....	64
Tabela 16. Efeito do meio no número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos no Experimento 3. Cultivar IAC-201.....	65
Tabela 17. Médias do número de calos embriogênicos induzidos para cada meio, combinado com cada um dos aditivos e avaliação da qualidade dos calos embriogênicos. Cultivar IAC-201.....	66
Tabela 18. Quadro de análise da variância do Exp. 3. Variável número de calos induzidos. Cultivar IAC-165.....	67
Tabela 19. Quadro de análise da variância do Exp. 3. Variável número de calos embriogênicos induzidos. Cultivar IAC-165.....	68
Tabela 20. Efeito dos aditivos no número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos no Exp. 3. Cultivar IAC-165.....	68
Tabela 21. Efeito do meio no número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos no Exp. 3. Cultivar IAC-165.....	69

Tabela 22. Médias de indução de calos embriogênicos por meio, combinado com cada um dos aditivos e avaliação da qualidade dos calos embriogênicos. Cultivar IAC-165.....	70
Tabela 23. Quadro de análise da variância do Exp. 4. Variável número de calos induzidos com porções embriogênicas.....	74
Tabela 24. Quadro de análise da variância do Exp. 4. Variável peso fresco de calos selecionados para o isolamento.....	75
Tabela 25. Médias do número de calos com porções embriogênicas e do peso dos calos selecionados para o isolamento do Exp. 4....	76
Tabela 26. Número médio de protoplastos obtidos por cultivar e por meio de indução de calos.....	82
Tabela 27. Número médio de protoplastos por grama de suspensão celular (peso fresco) em diferentes meios de pré-tratamento.....	85
Tabela 28. Tempo de vida em meio de cultivo e ocorrência de divisão celular de protoplastos derivados diretamente de calos em diferentes meios com diferentes agentes osmóticos.....	90
Tabela 29. Eficiência de plaqueamento de protoplastos derivados diretamente de calos em três variações do meio R2.....	92

Tabela 30. Número de calos inoculados, número de calos com plantas e número de plantas regeneradas a partir de calos primários em diferentes meios de regeneração, para cada um dos cultivares trabalhados.....96

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABA abscisic acid

BAP 6-benzylaminopurine

CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical

2,4-D 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GA3 gibberellic acid

IAC Instituto Agronômico de Campinas

IRGA Instituto Rio Grandense do Arroz

IRRI International Rice Research Institute

KIN kinetin

MES 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid

NAA α -naphthaleneacetic acid

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE CULTIVARES
BRASILEIROS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)
A PARTIR DE PROTOPLASTOS DE CALOS DE
EMBRIÕES MADUROS

Aluno: DANIEL SCHERER DE MOURA

Orientador: PROF.DR. AKIHIKO ANDO

Co-orientador: DR. FRANCISCO J. ZAPATA-ARIAS

RESUMO

Estabeleceu-se um sistema rápido para regeneração de plantas a partir de protoplastos derivados de calos primários de dois cultivares de arroz brasileiros, IAC-165 e IAC-201.

Após uma série de experimentos em indução de calos, foi possível produzir uma quantidade suficiente de calos embriogênicos derivados de semente nos meios B5 (GAMBORG *et al.* , 1968) e N₆ (CHU, 1978) suplementados com 2 e 4 mg/l de 2,4-D, acrescidos de 576 e

288 mg/l de L-prolina para os cultivares IAC-165 e IAC-201, respectivamente.

Os calos embriogênicos primários derivados de sementes foram utilizados para isolamento direto de protoplastos ou para o início de suspensões celulares. Linhagens de células em suspensão foram estabelecidas para ambos cultivares sendo capazes de produzir uma grande quantidade de protoplastos em 4 a 6 meses.

Os protoplastos derivados de calos induzidos a partir de sementes foram plaqueados em blocos de agarose e formaram colônias embriogênicas, visíveis ao olho nu, em 15 - 16 dias após o plaqueamento. Este tipo de colônia formou pequenos calos que foram plaqueados em meio de regeneração. Mais de 100 plantas foram regeneradas a partir de diferentes meios de regeneração testados. A melhor frequência de regeneração foi 22,2%.

O presente sistema possibilitará fazer-se transformação genética em não mais do que 120 dias. Isto torna o sistema mais rápido do que o sistema tradicional de obtenção de protoplastos derivados de suspensões celulares e, devido a isto, torna-o competitivo com a biolística.

Existem somente dois trabalhos que relatam a regeneração de plantas a partir de protoplastos derivados de calos primários, ambos usaram calos embriogênicos induzidos a partir de embriões

imaturos. O presente trabalho relata, pela primeira vez, regeneração de plantas de cultivares de arroz brasileiros utilizando sementes para a indução de calos.

PLANT REGENERATION OF BRAZILIAN RICE
CULTIVARS (*Oryza sativa* L.) FROM PROTOPLASTS OF
MATURE EMBRYO CALLI

Author: DANIEL SCHERER DE MOURA

Adviser: PROF. DR. AKIHIKO ANDO

Co-Adviser: DR. FRANCISCO J. ZAPATA-ARIAS

SUMMARY

We established a rapid system for regenerating plants from protoplasts derived from primary calli of two Brazilian rice cultivars, IAC-165 and IAC-201.

After a exhaustive study of callus induction we were able to product a suficient amount of a seed derived embryogenic calli in B5 (GAMBORG *et al.*, 1968)and N₆ (CHU, 1978)medium supplemented with 2 and 4 mg/l of 2,4-D, added 576 and 288 mg/l of L-proline for IAC-165 and IAC-201 respectively.

Seed derived embryogenic calli were used for protoplast isolation or to cell suspension initiation. Cell suspension lines

were established for both cultivars, and they were able to produce thousands of protoplasts in 4 to 6 months.

Protoplasts derived from seed calli were plated in agarose beads and formed embryogenic colonies visible to the naked eye in 15 - 16 days after plating. This kind of colonies formed small callus that was plated on regeneration medium. More than 100 plants have been regenerated and different kinds of regeneration medium were tested. The best frequency of regeneration was 22,2%.

The present system will allow to do genetic transformation in no more than 120 days. This system is faster than the traditional protoplast derived from cell suspension culture and due this became competitive with biolistic.

There are only two other reports on plant regeneration from protoplast derived from primary callus, both used embryogenic callus induced from immature embryos. Here we present the first work which obtains plant regeneration from brazilian rice cultivars and that used mature seeds to induced embryogenic callus.

1. INTRODUÇÃO

Por milênios o homem tem sido agente selecionador das diversas culturas que lhe fornecem alimento para sua subsistência. A princípio, a variabilidade era tanta que bastava selecionar materiais mais adaptados ou mais produtivos. Com o crescente aumento da demanda por alimentos, tornou-se necessário acelerar a expressão da variabilidade genética das espécies e novas combinações gênicas passaram a ser obtidas por intermédio de cruzamentos intra-específicos. Novas metodologias, como a da utilização de híbridos e novos cultivares responsivos a altas doses de fertilizantes, deram um grande impulso à produção mundial de cereais.

No entanto, apesar do progresso alcançado, os ganhos anuais vêm diminuindo gradativamente e problemas de escassez de variabilidade genética têm sido referidos com relativa frequência pelos melhoristas.

Os estudos na área da biologia molecular e biotecnologia dão início a especulações sobre a possível transferência de genes entre espécies não relacionadas, quebrando barreiras relativas a incompatibilidade sexual. O que outrora era simples potencial, hoje é realidade expressa na busca do isolamento de novos genes e sistemas de transformação genética eficientes.

Torna-se importante salientar que um forte programa de melhoramento é pré-requisito para a aplicação das novas tecnologias no melhoramento de arroz. Todos os sucessos obtidos com biotecnologia somente ocorreram quando houve uma forte integração com melhoristas. A biotecnologia pode possibilitar aos pesquisadores obterem resultados mais rápidos e com uma maior eficiência.

No Brasil, mais de 4 milhões de hectares são plantados sob condições de sequeiro, sendo que aproximadamente 70% dos produtores possuem menos do que 2 ha de arroz. A produtividade média é em torno de 2 ton/ha, diferindo enormemente da obtida no sistema irrigado, que é da ordem de 5 ton/ha. O maior impecilho para uma maior produtividade do sistema de sequeiro é o complexo seca-brusone. A seca caracteriza-se, principalmente, por um período de estiagem, geralmente nas épocas da floração e enchimento de grãos; a brusone é uma doença causada pelo fungo *Magnaphorte grisea* que se agrava em períodos de seca. Entende-se que a solução para qualquer um destes problemas geraria um impacto muito grande na

produção de grãos do país, principalmente pela extensa área de cultivo abrangida por este ecossistema.

Na busca de soluções para problemas como estes, têm-se alocado recursos em pesquisas na área de biotecnologia. Investimentos têm sido feitos em cultivo de anteras, busca de variantes somaclonais, isolamento de genes e desenvolvimento de sistemas de transformação genética.

Protoplastos ou células desprovidas de parede são, até o presente momento, o modo mais eficiente de propiciar transformação genética. Desde os primeiros trabalhos tentativas têm sido feitas para melhorar a eficiência de regeneração, encurtar o tempo requerido para o processo e minimizar os problemas com variação genética decorrente do emprego da técnica (variação protoclonal).

O desenvolvimento de metodologia para isolamento, cultivo e regeneração de plantas a partir de protoplastos de cultivares brasileiros de arroz irá, definitivamente, contribuir para estudos futuros de transformação. Genes que conferem resistência a estresses abióticos e a doenças têm sido encontrados, isolados e estudados quanto a sua expressão, quando inseridos em plantas via transformação genética.

Este trabalho teve o objetivo de adaptar ou desenvolver as técnicas já existentes para a obtenção de um sistema de

isolamento, cultivo e regeneração de plantas de arroz a partir de protoplastos derivados de cultivares brasileiros, visando futuros estudos em transformação genética.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Arroz no Mundo

O arroz, conhecido no mundo há mais de 5000 anos, é fonte primária de alimentação para mais de um terço da população mundial. Cultura de grande importância para os países em desenvolvimento, especialmente os do continente asiático, o arroz além de constituir-se na base da dieta da população, é também a base da economia destes países.

A produção mundial de arroz é, atualmente, de 518 milhões de toneladas, ocupando uma área de aproximadamente 150 milhões de hectares. A China e a Índia possuem em torno de 50% da área plantada com arroz no mundo, sendo responsáveis por 56% da produção mundial (FAO - QUATERLY BULLETIN OF STATISTICS, 1993).

Cultura característica de subsistência, apresenta somente 5% da sua produção mundial comercializada internacionalmente. A

Tailândia é o país que atualmente domina o mercado das exportações, contribuindo com 40% do arroz exportado.

Mais de 50% da área cultivada com arroz no mundo é irrigada, contribuindo este ecossistema com mais de 70% da produção mundial. Em contraste, a área cultivada em sistema de sequeiro corresponde a 23%, sendo responsável por 17% da produção. Isto é devido, em parte, a adoção no sistema irrigado de cultivares modernas responsivas a doses elevadas de fertilizantes.

2.2. Arroz no Brasil

No Brasil o cultivo do arroz é praticado desde o sul até o norte. O país ocupa a nona posição quanto a produção mundial, ficando a frente de países como os E.U.A. e Filipinas. O estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor, sendo o estado do Maranhão o de maior área cultivada.

A primeira notícia de cultivo de arroz no Brasil data de 1832 na capitania de São Vicente, porém a primeira lavoura de arroz irrigado foi implantada no Rio Grande do Sul, no município de Pelotas, no ano de 1904 (RIO GRANDE DO SUL, SECRETARIA DA AGRICULTURA, 1946).

Os dois sistemas predominantes de cultivo no Brasil são o irrigado - encontrado em sua maioria nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina - e o de sequeiro, encontrado no sudeste, centro-oeste e nordeste do país.

O Brasil é o maior produtor de arroz da América Latina, o que não o impede de ser também o maior importador. Dos quase 7 milhões de ha cultivados com arroz na América Latina, cerca de 4,5 milhões são brasileiros.

O cultivo do arroz irrigado, principalmente no Rio Grande do Sul, é caracterizado por lavouras extensas e por produtores de alta capacidade de investimento. São lavouras dotadas de sistemas modernos de sistematização e irrigação. Os principais cultivares são provenientes de cruzamentos realizados no CIAT, envolvendo material genético do IRRI, que foram selecionados em estações experimentais do IRGA e EMBRAPA.

O sistema de sequeiro, embora muito superior em área quando comparado ao irrigado, apresenta níveis de produtividade da ordem de 2,0 t/ha. A grande maioria dos produtores são pequenos e descapitalizados e, geralmente, não tem acesso a irrigação e níveis de fertilidade do solo adequados. A maioria dos cultivares são provenientes do Instituto Agronômico de Campinas/IAC ou do Centro Nacional de Pesquisas em Arroz e Feijão/EMBRAPA-CNPAF, sendo os mais tradicionais provenientes do primeiro.

2.3. Arroz no estado de São Paulo

O arroz no estado de São Paulo vem decrescendo em importância no cenário econômico. Em 1960 o Estado possuía a maior área plantada com arroz no Brasil, 600 mil ha (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1961). Atualmente a área plantada com arroz não ultrapassa os 200 mil ha. Parte disto é atribuído à baixa qualidade comercial do grão dos cultivares de sequeiro, não sendo competitivo com o tipo de arroz plantado nos estados do sul; outra razão seria a baixa remuneração da cultura quando comparada a cultivos de exportação como o soja.

O IAC, órgão responsável pela pesquisa de arroz no Estado, intensificou seus trabalhos experimentais com este cereal em 1935. Com um programa de melhoramento que vem sendo desenvolvido a mais de 40 anos, o IAC tem contribuído de maneira significativa para o progresso do arroz, não só no estado de São Paulo mas também em estados do Centro-Oeste e Nordeste do país.

Tendo conhecimento dos problemas de competitividade comercial do arroz plantado no Estado, as pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de cultivares de sequeiro com tipo de grão chamado agulhinha. Neste sentido, o lançamento do cultivar IAC-201 poderá ser um marco na colocação dos cultivares de

sequeiro em nível de competição com os cultivares sulistas irrigados.

O Estado apresenta atualmente cerca de 180 mil ha plantados em sistema de sequeiro e, aproximadamente 20 mil, em sistema irrigado.

2.4. Indução de calos

Vários meios de indução de calos, diferindo principalmente quanto a fonte de nitrogênio, são utilizados em arroz. GRIMES & HODGES (1990) concluíram que a proporção de nitrogênio inorgânico oxidado e reduzido (NO_3^- : NH_4^+) no meio N_6 (CHU, 1978) afetou a indução de calos, a regeneração de plantas e a sensibilidade a auxina 2,4-D.

O regulador 2,4-D é extensivamente utilizado para a indução de calos em arroz, quando não, é considerado essencial (MENDOZA & FUTSUHARA, 1992). O aumento da concentração desta auxina geralmente está associado a uma redução do número de regenerantes (KOETJE *et al.*, 1989), embora altas doses (8 mg/l) não tenham prejudicado taxas de regeneração da ordem de 56,8% em protoplastos isolados a partir de calos derivados de embriões maduros (TORRIZO & ZAPATA, 1992).

Tem sido obtida regeneração de plantas através de suspensões celulares estabelecidas a partir de calos derivados de embriões maduros (FUJIMURA *et al.*, 1985; DATTA *et al.*, 1992), base de folhas (ABDULLAH *et al.*, 1986), anteras (TORIYAMA & HINATA, 1985; TORIYAMA *et al.*, 1986; GHOSH BISWAS & ZAPATA, 1991, SU *et al.*, 1992), raízes (ZIMNY & LORZ, 1986), embriões imaturos (KYOZUKA

et al., 1987; OZAWA & KOMAMINE, 1989), pólen (DATTA *et al.*, 1990), inflorescência imatura (SUN *et al.*, 1989; GHOSH BISWAS & ZAPATA, 1990).

A adição de suplementos orgânicos tais como caseína hidrolisada aumentou a formação de calos embriogênicos em arroz (KOETJE *et al.*, 1989).

NAKAMURA & MAEDA (1989) realizaram um estudo das características ultra-estruturais da cultura de calos em arroz. Utilizando microscopia eletrônica de varredura, foram observadas estruturas globulares (nódulos) na superfície dos calos, quando estes estavam já com 7 a 10 dias de cultivo. Os autores também se referem a heterogeneidade de estruturas formadas na superfície dos calos e observam que os nódulos apresentam tanto superfície lisa quanto rugosa, sendo esta última encontrada em nódulos pequenos. Uma membrana revestindo estes nódulos também é reportada.

ADKINS *et al.* (1990), realizando estudos sobre a fisiologia dos calos de arroz, observaram a produção de dióxido de carbono, etileno e etanol, acompanhada da utilização de oxigênio. Neste trabalho foi verificada uma tolerância genótipo-dependente das condições de atmosfera rica em dióxido de carbono, etanol e etileno. O carácter avaliado foi necrose dos tecidos. Quando os calos foram submetidos a uma atmosfera onde o ar era renovado, nenhuma diferença significativa foi observada entre cultivares

susceptíveis e tolerantes a condição de acúmulo de substâncias tóxicas.

Um aumento da quantidade de calos induzidos, porém não da qualidade, foi obtido em cultivo de anteras de arroz com a utilização de L-prolina no meio de indução (ALDEMITA & ZAPATA, 1991).

EMONS *et al.* (1993), estudando os efeitos da aplicação de fatores externos aos meios de indução de calos e maturação de embriões somáticos provenientes de suspensões celulares em milho, constataram que a percentagem de calos mostrando maturação de embriões, o número de embriões desenvolvidos por calo, a supressão da formação e crescimento de raízes foram influenciadas por combinações de sacarose, manitol, L-prolina, ABA e GA3.

RENSBURG *et al.* (1993) estudaram o acúmulo de prolina como um critério de seleção para tolerância à seca em fumo. Expondo quatro cultivares a condições de estresse hídrico, foi observada uma correlação entre a capacidade de resistir ao estresse e a capacidade de acumular prolina, confirmando a função osmoprotetora deste aminoácido.

WU & ZAPATA (1992), isolando protoplastos diretamente de calos primários induzidos a partir de embriões imaturos, obtiveram taxas de regeneração de plantas de até 97,1%. Os calos foram

induzidos em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) solidificado com ágar ou agarose Sigma tipo VII, e em frascos erlenmeyer vedados com tampões de algodão, permitindo trocas gasosas.

GHOSH BISWAS & ZAPATA (1993) utilizaram embriões maduros como explante para indução de calos. Ao meio de indução R2 (OHIRA, et al., 1973) foi adicionado 1 g/l de caseína hidrolisada, e subcultivos com seleção para calos embriogênicos foram realizados a cada duas semanas, durante seis semanas.

2.5. Suspensão celular

Suspensões celulares embriogênicas são caracterizadas por células de alta taxa de multiplicação, as quais são pequenas, pouco vacuoladas, esféricas e de parede celular delgada (ABDULLAH *et al.*, 1986; DATTA *et al.*, 1990). Estas suspensões têm sido estabelecidas em diferentes meios: AA (ABDULLAH *et al.*, 1986), GM (LI & MURAI, 1990), R2 (GHOSH BISWAS & ZAPATA, 1993), N₆ (LEE *et al.*, 1989; OZAWA & KOMAMINE, 1989) e MS (BOISSOT *et al.*, 1990). As fontes de nitrogênio, aminoácidos, nitrato e amônia assim como, a proporção entre nitrato e amônia, afetam o crescimento e a qualidade das suspensões (TORIYAMA & HINATA, 1985; THOMPSON *et al.*, 1986).

AMINO & TAZAWA (1988), trabalhando com suspensões celulares de arroz, investigaram alguns aspectos da assimilação de carbono e de sua preferência na utilização de um ou outro açúcar. Foi observado que em suspensões celulares a fonte de carbono, seja sacarose, frutose ou glucose, não implica crescimento diferencial.

SCHMITZ & LÖRZ (1990), investigando a influência de diversos fatores na absorção de nutrientes em suspensões celulares de arroz, concluíram que a proporção inóculo:meio, o tipo de frasco, a troca gasosa e o tempo de subcultivo devem ser rigorosamente fixados para não comprometer a reprodutibilidade de um determinado sistema de estudo da cinética do crescimento.

O uso de L-prolina no estabelecimento de suspensões celulares em arroz tipo indica foi requerido para obtenção de células embriogênicas (ELLA & ZAPATA, 1993).

GHOSH BISWAS & ZAPATA (1993), para início de suspensões celulares, utilizaram uma relação de 1:15 (calo : meio líquido), reposição de meio a cada 3 - 5 dias nos primeiros 30 dias e seleção de células embriogênicas a partir do estabelecimento de pequenos agregados com células de aspecto embriogênico. Os agregados celulares selecionados são mantidos com subcultivos semanais acompanhados de constante seleção. Os mesmos autores utilizaram o meio R2 para início das suspensões celulares acrescido de 1 mg/l de 2,4-D, 5 mM de L-prolina e 3% de maltose.

2.6. Isolamento e cultivo de protoplastos

Para o isolamento de protoplastos, após a introdução do método enzimático (COCKING, 1960), combinações enzimáticas envolvendo celulase e pectoliase, ou, celulase e Macerozyme, têm sido extensivamente utilizadas (ABDULLAH *et al.*, 1986; KYOZUKA *et al.*, 1987; MASUDA *et al.*, 1989; DATTA *et al.*, 1992; GHOSH BISWAS & ZAPATA, 1993).

Fatores tais como tempo de digestão, "osmoticum", concentração e tipo de enzimas influem no isolamento de protoplastos (COCKING, 1980). Em arroz, as enzimas mais utilizadas são Cellulase RS, 1 a 4%, e Pectolyase Y-23, 0,02 a 0,5%. Concentrações baixas de Pectolyase Y-23 geralmente estão acompanhadas de Macerozyme R-10, 0,5 a 1% (LEE *et al.*, 1989; WANG *et al.*, 1989; MASUDA *et al.*, 1989; DATTA *et al.*, 1990; WU & ZAPATA, 1992; TORRIZO & ZAPATA, 1992). Estas concentrações são válidas tanto para obtenção de protoplastos derivados de suspensões celulares, quanto derivados de calos.

O uso de células auxiliares ("nurse cells") da divisão na etapa de cultivo de protoplastos tem sido considerado essencial para a obtenção de alta eficiência na formação de colônias (KYOZUKA *et al.* 1988; LEE *et al.* 1989; SHILLITO *et al.* 1989; GHOSH BISWAS & ZAPATA, 1993); embora outros autores tenham conseguido obter

resultados positivos sem a sua utilização (DATTA *et al.*, 1990; DATTA *et al.*, 1992).

Divisões e formação de colônias a partir de protoplastos têm sido obtidas usando-se meios complexos como o de KAO & MICHAYLUK (1975) ou derivados (LEE *et al.*, 1989; WU & ZAPATA, 1992; SU *et al.*, 1992) e também com meios simples, N₆ (DATTA *et al.*, 1992) e R2 (GHOSH BISWAS & ZAPATA, 1993).

2.7. Regeneração de plantas

A regeneração de plantas tem sido obtida tanto em genótipos do tipo japônica (FUJIMURA *et al.*, 1985; ABDULLAH *et al.*, 1986; COULIBALY & DEMARLY, 1986; TORIYAMA *et al.*, 1986; YAMADA *et al.*, 1986; KYOZUKA *et al.*, 1987; OGURA *et al.*, 1987; KANDA *et al.*, 1988; MASUDA *et al.*, 1989; WU & ZAPATA, 1992) quanto do índica (KYOZUKA *et al.*, 1988; LEE *et al.*, 1989; WANG *et al.*, 1989; SUN *et al.*, 1989; TORRIZO & ZAPATA, 1992; GHOSH BISWAS & ZAPATA, 1993). Regenerantes em cultivares norte-americanas foram também obtidas (WANG *et al.*, 1989; LI *et al.*, 1992).

OZAWA & KOMAMINE (1989) constataram que altas concentrações de auxina mostram efeito inibitório da regeneração em suspensões celulares de arroz; porém também foi observado que em meios de regeneração livres de auxina os calos seguidamente apresentam necrose.

GUPTA & PATTANAYAK (1993) obtiveram regeneração de plantas a partir de protoplastos derivados de mesófilo foliar. A respeito deste trabalho, GHOSH BISWAS *et al.* (1994) relataram não ter sido possível sua repetição.

GHOSH BISWAS *et al.* (1994), em trabalho inédito, regeneraram plantas a partir de protoplastos derivados diretamente

de tecido escutelar de embriões imaturos. Foram obtidas 47 plantas do cultivar Basmati 370 e 7 plantas do IR43.

Exitem somente dois trabalhos que relatam a regeneração de plantas a partir de protoplastos derivados de calos: LEE *et al.* (1989) regeneraram 158 plantas a partir de calos derivados de embriões imaturos do cultivar IR54 e WU & ZAPATA (1992), também utilizando embriões imaturos, regeneraram mais de 2000 plantas de 4 cultivares do tipo japônica.

2.8. Efeito da maltose no cultivo e na regeneração de plantas

AMINO & TAZAWA (1988), investigando a assimilação de carbono em protoplastos de arroz, observaram uma absorção preferencial por frutose e glucose, o que foi creditado à perda da atividade da enzima invertase associada a parede celular.

A respeito do uso de maltose em meios de regeneração, LAST & BRETTELL (1990), pesquisando a produção de embriões derivados de cultivo de anteras, observaram que o uso de maltose como única fonte de carbono, produziu um maior número de embriões comparado àquele obtido com sacarose. Os autores descartam a hipótese do aumento do número de embriões ser devido a hidrólise reduzida da maltose em relação à sacarose.

ELLA & ZAPATA (1992), investigando o efeito da utilização de maltose e do agente gelificante no cultivo de protoplastos de arroz, observaram um aumento da eficiência de plaqueamento quando foi utilizado 13% de maltose e 0,5% de agarose "Sea Plaque" adicionado ao meio N₆.

TORRIZO & ZAPATA (1992), isolando protoplastos do cultivar IR58, regeneraram mais de 900 plantas utilizando meio MS acrescido de 3% de maltose e 0,6% de agarose Sigma tipo VII. A alta taxa de regeneração obtida, 56,8%, foi atribuída ao uso do agente

gelificante de extrema qualidade, a fonte de carbono e a seleção do tipo de calo a ser inoculado para a regeneração.

GHOSH BISWAS & ZAPATA (1993) utilizaram os meios N₆ e R2 para cultivo dos protoplastos. A estes meios foram adicionados 1 mg/l de 2,4-D, 0,4 M maltose e 0,6% agarose (Sigma tipo VII). Este autores obtiveram mais de três mil plantas quando utilizaram meio R2 acrescido de 5 mg/l de cinetina, 1 mg/l de NAA e 30 g/l de maltose. Eles concluíram que o meio R2 foi superior aos comumente utilizados, MS e N₆, para regeneração de plantas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivares

A escolha dos cultivares para o trabalho foi feita levantando-se informações relativas a área de cultivo, produtividade, características comerciais, estabilidade de produção ao longo dos anos, potencial para utilização em transformação genética, impacto junto ao setor orizícola e comportamento "in vitro". Este último item foi avaliado através da indução de calos.

O cruzamento de origem dos 7 cultivares iniciais do trabalho, o ano de seus lançamentos e o ecossistema a que são destinados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Ecossistema, ano de lançamento e cruzamento de origem dos 7 cultivares usados na dissertação.

Cultivar	Ecossistema	Lançam.	Cruzamento
IAC-25	Sequeiro	1974	Dourado Precoce/IAC-1246
IAC-100	Irrigado	1991	5738//3224/Costa Rica
IAC-101	Irrigado	1991	5738//3224/Costa Rica
IAC-165	Sequeiro	1980	Dourado Precoce/IAC-1246
IAC-201	Sequeiro	1992	IAC-165/Labelle
IAC-242	Irrigado	1987	5685//3250/IRAT 8
IAC-4440	Irrigado	1982	CICA-4F1//IR-665-23-3-1/TETEP)

3.2. Seleção das sementes

Todas as sementes utilizadas para o trabalho foram cedidas pela equipe de melhoristas de arroz do Instituto Agronômico de Campinas/IAC, Campinas, São Paulo.

As sementes foram pré-selecionadas de acordo com ZAPATA & ELLA (1988). Tomou-se lotes de até 300 sementes, que foram colocados no topo de uma solução salina (NaCl) de gravidade específica igual a 0,75. A gravidade específica foi medida através do densímetro ANTON PAAR mod. DMA 46. Após vigorosa agitação, a solução contendo as sementes foi deixada em repouso para que as mesmas se posicionassem de acordo com a gravidade específica. As sementes que se depositaram no fundo do frasco foram coletadas, lavadas em água destilada e deixadas para secar em temperatura ambiente. Este procedimento foi adotado para todos os experimentos exceto o de avaliação do comportamento "in vitro".

A seguir, procedeu-se a retirada da casca e fez-se uma seleção visual para eliminar sementes defeituosas, contaminadas com fungos ou que apresentassem dano mecânico no embrião.

3.3. Assepsia das sementes

As sementes foram colocadas em tratamento com etanol 70% por 1 minuto sob agitação, seguido de 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 2%, sob agitação e vácuo (50 cm.Hg). A solução de hipoclorito foi obtida pela diluição do hipoclorito comercial 12%, acrescido de duas gotas do detergente Tween 20 a cada 100 ml.

Após estes tratamentos, as sementes foram lavadas em água destilada estéril, 3 a 4 vezes, no fluxo laminar. A água excedente foi retirada e as sementes inoculadas imediatamente em placas de Petri com meio de indução de calos.

3.4. Indução de calos

Todos os calos foram induzidos a partir de embriões maduros (sementes). Utilizaram-se placas de Petri de vidro (90x15mm), tendo cada uma aproximadamente 30 ml de meio semi-sólido. Em cada placa foram inoculadas 10 sementes em disposição radial, sem considerar a posição do embrião em relação ao meio. Utilizou-se como único regulador de crescimento a auxina sintética 2,4-D. As placas foram colocadas no escuro em incubadoras tipo B.O.D., à temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$. O período de incubação variou de 30 a 40 dias. A avaliação da qualidade dos calos foi feita atribuindo-se nota de 0 a 3, baseada em avaliações semanais dos calos sob estereoscópio (ZEISS 47.50.57 ou ZEISS 47.50.03-9902). Para atribuição da nota foi considerado o tipo do calo embriogênico. Observou-se a superfície (lisa ou irregular), presença de pequenas estruturas globulares, coloração (branco ou amarelo) e calo de aspecto seco ou úmido. O calo de maior nota apresenta superfície lisa, estruturas globulares, coloração branca e aspecto seco. As notas devem ser consideradas relativas e particulares a cada experimento e cultivar. As avaliações do número de calos e número de calos embriogênicos foram feitas sob estereoscópio.

A análise estatística foi feita através do programa Statistics Analysis System/SAS (SAS INSTITUTE INC., 1985). A

transformação da variável número de calos embriogênicos foi feita devido a heterogeneidade das variâncias de cada tratamento, que por sua vez, é conseqüência do elevado número de repetições com nenhum calo embriogênico induzido. O teste de comparação de médias adotado foi o DMRT (Duncan Multiple Range Test) ao nível de 0,05% de probabilidade.

3.4.1. Experimento 1

Para a avaliação do comportamento "in vitro", fez-se um experimento de indução de calos utilizando 04 concentrações de 2,4-D acrescidas ao meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Foram testados os cultivares IAC-25, IAC-100, IAC-101, IAC-165, IAC-201, IAC-242 e IAC-4440. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, tendo quatro repetições, cada repetição sendo uma placa. Foram avaliados o número de calos induzidos, o número de calos embriogênicos e a qualidade destes calos.

3.4.2. Experimento 2

No experimento de avaliação do meio de indução foram testados três meios básicos, MS, N₆ (CHU, 1978) e B5 (GAMBORG, *et al.*, 1968). Cada meio foi testado com 2 e 4 mg/l de 2,4-D, mais o controle da germinação das sementes sem regulador. Os cultivares utilizados foram o IAC-165 e o IAC-201. O experimento foi

inteiramente casualizado em esquema fatorial, tendo cinco repetições, cada repetição sendo uma placa. Foram avaliados o número de calos induzidos, o número de calos embriogênicos e a qualidade do calo.

3.4.3. Experimento 3

Para a avaliação do efeito do uso de caseína hidrolisada (hidrólise ácida) e L-prolina, fez-se um experimento acrescentando-se aos três melhores meios do experimento anterior, duas concentrações de cada um dos aditivos, 500 e 1000 mg/l de caseína hidrolisada e 288 (2,5 mM) e 576 (5 mM) mg/l de L-prolina. Utilizou-se os mesmos cultivares do Experimento 2. O experimento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, com 9 repetições, cada repetição sendo uma placa. Para efeito de análise estatística, cada concentração de um ou outro aditivo e o controle (sem aditivo) foram considerados aditivos diferentes. Foram avaliados o número de calos induzidos, o número de calos embriogênicos e a qualidade do calo.

3.4.4. Experimento 4

O experimento para avaliação do peso fresco das porções embriogênicas e do número de calos com tais porções foi feito com 12 repetições, sendo cada repetição uma placa. Para este experimento utilizou-se o cultivar IAC-201. O delineamento

utilizado foi o inteiramente casualizado. As avaliações foram feitas aos 40 dias após a inoculação. Para a tomada do peso fresco das porções selecionadas, uma balança foi instalada dentro do fluxo e os calos pesados em placas estéreis. As variáveis número de calos embriogênicos e número de calos com porções embriogênicas diferenciam-se pelo fato da primeira contar somente os calos inteiramente embriogênicos, e a segunda todo e qualquer tipo de calo desde que apresente uma parte de aspecto embriogênico.

3.5. Início e manutenção de suspensões celulares

As suspensões celulares foram iniciadas com calos primários ou subcultivados. Foram tomados aproximadamente 2 g de calos embriogênicos selecionados sob estereoscópio. Estes foram colocados em frascos erlenmeyer de 250 ml com aproximadamente 30 ml de meio. Os frascos foram colocados em agitador orbital a 100 rpm, no escuro a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Para início das suspensões foram utilizados os meios GM (LI & MURAI, 1990) e R2 (OHIRA, et al., 1973), acrescidos de 2 mg/l de 2,4-D. Durante os 30 primeiros dias, fase de estabelecimento, nenhum tipo de seleção foi aplicada nas suspensões, sendo somente feita a retirada de 20 ml de meio e a subsequente reposição com meio fresco a cada 5 ou 7 dias. A retirada do meio é feita deixando-se o frasco em repouso e retirando-se o sobrenadante. Macerações dos calos através da passagem forçada por peneiras de metal (60 mesh) ou por intermédio de bastões de vidro foram utilizadas nesta fase. Após os 30 dias, as suspensões celulares foram mantidas sob constante seleção para células de aspecto embriogênico, ou seja, células esféricas e de citoplasma denso. A seleção foi praticada a cada subcultivo, retirando-se as células do fundo do frasco após este permanecer por 1 a 2 minutos em repouso. A retirada das células foi feita utilizando-se pipetas de 10 ml com ponta de boca larga. Um volume de aproximadamente 3 ml de células era posto em um novo frasco contendo 30 ml de meio fresco. Todo o trabalho com suspensões

celulares foi acompanhado através da visualização de amostras em microscópio invertido (ZEISS Axiovert 35), objetivando a avaliação do estabelecimento e eficiência da seleção. Durante a etapa de seleção, os subcultivos foram feitos a intervalos de 7 a 10 dias. Quando o volume de células selecionadas excedia a 4 ml, o volume era dividido em dois frascos novos. As suspensões celulares foram mantidas sob constante seleção.

3.6. Isolamento de protoplastos

3.6.1. Calos

Aproximadamente 1 g (peso fresco) de calos embriogênicos primários, selecionados sob estereoscópio, foi colocado em uma placa de Petri plástica (90x15mm) contendo 11 ml de solução enzimática composta de 2% de Cellulase RS (Yakult Honsha Co., Tokio, Japão), 0,05% de Pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical Co., Tokio, Japão), 0,5 M de manitol, 5 mM de MES, sais de CPW (FREARSON *et al.*, 1973) ajustado a pH 5,6 antes de filtro esterilizar (Millipore 0,22 μ m). Após os calos serem levemente macerados com espátula, a placa foi vedada com filme plástico e posta em agitador orbital, 30 rpm, no escuro a $26\pm 1^\circ\text{C}$, por 5 h. Findo este tempo, à mistura solução enzimática e protoplastos foi adicionado um igual volume de CPW 13M, e então peneirada em malhas de nylon de 60, 30, 25 e 20 μ m. A solução peneirada foi então centrifugada a 1000 rpm por 8 minutos. Os protoplastos precipitados foram colocados em suspensão com 8 ml de CPW 13M, de onde retirou-se uma amostra para contagem em câmara de Neubauer. Após nova centrifugação, os protoplastos precipitados são homogenizados com o meio de cultivo. O meio de cultivo consiste do meio propriamente dito em dupla concentração, misturado minutos antes a um mesmo volume de uma solução aquecida de 1,2% de agarose Sigma tipo II. O

meio somente foi misturado aos protoplastos quando atingiu uma temperatura de 25 a 30°C.

Na contagem dos protoplastos somente foram considerados aqueles esféricos e que apresentavam vacúolos pequenos. O número de protoplastos por mililitro foi a média do número encontrado nos 10 campos da câmara (FIGURA 1) multiplicado pelo fator 10^4 . Este fator é utilizado uma vez que cada campo de contagem representa um volume de $0,1 \text{ mm}^3$ ou 10^{-4} cm^3 , e 1 cm^3 é igual a 1 ml.

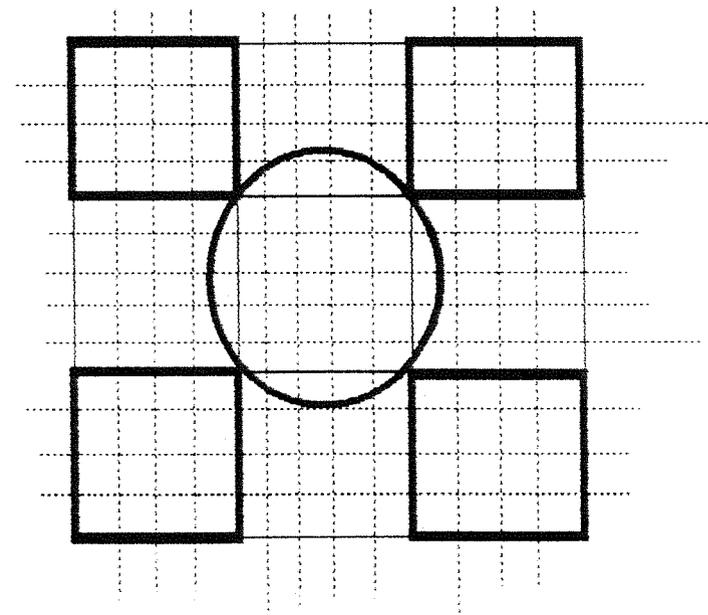
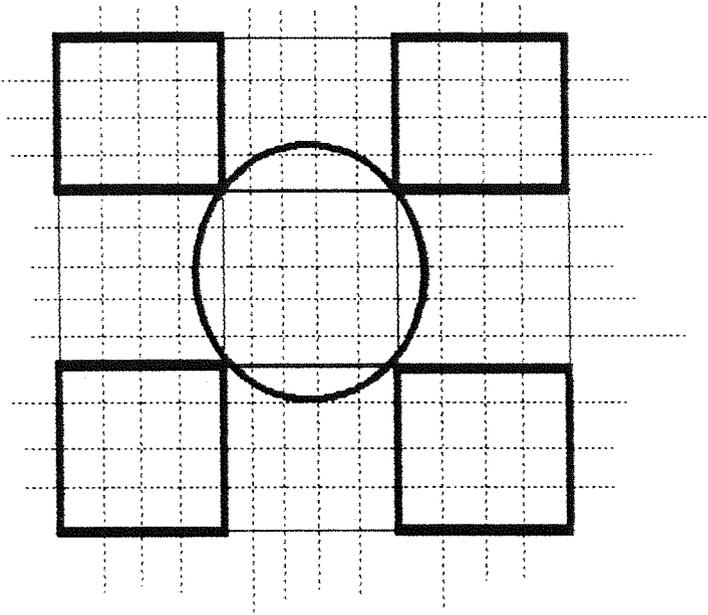


Figura 1: Câmara de Neubauer, campos de contagem dos protoplastos.

3.6.2. Suspensões celulares

Suspensões de 4 dias após o subcultivo em meio de manutenção ou de pré-tratamento foram utilizadas para isolamento de protoplastos. Os meios adotados para pré-tratamento das suspensões foram AA (MÜLLER & GRAFE, 1978) e R2 com diferentes concentrações de L-prolina. Aproximadamente 1 g (peso fresco) de células foi colocado em uma placa de Petri plástica (90x15mm) contendo 11 ml solução enzimática composta de 1% de Cellulase RS (Yakult Honsha Co. Tokio, Japão), 0,2% de Pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical Co., Tokio, Japão), 0,5 M de manitol, 5 mM de MES, sais de CPW e pH ajustado para 5,6, antes da filtro-esterilização. A metodologia posterior é a mesma descrita para isolamento diretamente de calos.

3.7. Cultivo de protoplastos

Os protoplastos foram cultivados em meio R2, N₆, GM e de KAO & MICHAYLUK (1975) com as modificações propostas por WU & ZAPATA (1992). O regulador osmótico utilizado nos meios, a exceção do de KAO & MICHAYLUK (1975), foi tanto maltose quanto sacarose a 0,4 M. Após serem misturados com o meio de cultivo, os protoplastos foram colocados em placas de Petri plásticas (60x15mm) utilizando-se o método de imobilização dos protoplastos em gota de agarose (SHILLITO *et al.*, 1983) com o uso de células auxiliares (KYOZUKA *et al.*, 1987). Uma única gota de aproximadamente 2 ml foi dispensada no centro de cada placa. Após a solidificação do meio foram adicionados 100 mg (peso fresco) de células auxiliares em 5 ml do mesmo meio de cultivo, porém líquido.

A seguir, as placas foram colocadas em agitador orbital (30 rpm), no escuro a 26±1°C. Após 8 a 10 dias as células auxiliares foram retiradas, os blocos de agarose lavados com meio de cultivo líquido e 2 ml de meio de cultivo líquido fresco foram adicionados. Passados mais 20 dias, a eficiência de plaqueamento foi tomada e os blocos de agarose foram partidos em quatro partes e colocados em meio R2 acrescido de 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina e 100 mg/l de inositol, semi-sólido (0,6% agarose Sigma tipo II) ou líquido, no escuro a 26±1°C, para posterior crescimento dos calos. Para a tomada de eficiência foi considerado o volume

médio padrão segundo cálculo descrito no item eficiência de plaqueamento. Quando em meio líquido foram utilizados frascos erlenmeyer de 250 ml que foram colocados em agitador orbital, 30 rpm. Após 15 a 20 dias os calos de tamanho superior a 1 mm foram postos em meio de regeneração.

3.8. Uso de células auxiliares ("nurse cells")

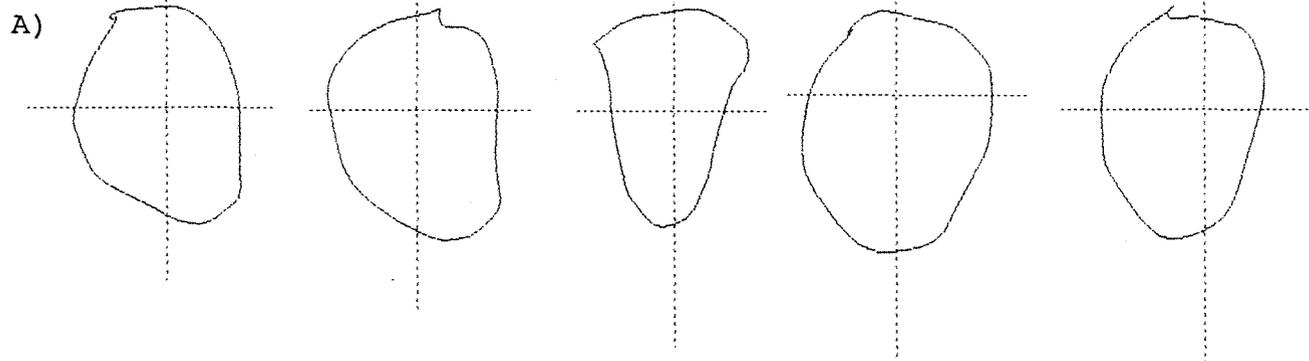
Como células auxiliares foram utilizadas as linhagens celulares Oc (BABA, *et al.*, 1986) e IR52, gentilmente cedidas pelo Dr. K. SYONO, Universidade de Tokio, Japão, e pelo Dr. T. HODGES, Universidade de Purdue, EUA, respectivamente.

A linhagem celular Oc foi mantida com subcultivos semanais (3 ml de suspensão celular em 30 ml de meio) em meio MS líquido com 1 mg/l de 2,4-D. A linhagem IR52 foi cultivada em meio líquido LS (LINSMAIER & SKOOG, 1965) com 4 mg/l de 2,4-D e 0,5 g/l de caseína hidrolisada, com o mesmo regime de subcultivo.

3.9. Eficiência de plaqueamento

Para a tomada da eficiência de plaqueamento foi estimado o volume médio que era abrangido por uma ocular (aumento 10X) do microscópio invertido. Para tal tomou-se amostras (FIGURA 2 A) de 5 gotas de agarose do mesmo volume utilizado nos plaqueamentos normais. Atentou-se para tomar 5 gotas representativas dos formatos de gotas mais comumente encontrados quando do plaqueamento. As amostras do volume foram tomadas usando pipeta Pasteur de mesmo diâmetro que a ocular (2 mm), pressionadas perpendicularmente ao gel. A altura do cilindro formado na ponta da pipeta foi medida utilizando-se lupa com escala graduada. Foram tomadas de cada gel um mínimo de 20 amostras. O cálculo do volume é feito por intermédio do conhecimento da altura do cilindro, h , e do diâmetro da ocular, ϕ , (FIGURA 2.B). Sabendo-se o volume compreendido em uma visada pela ocular (volume calculado = $4,5 \mu\text{l}$), do topo a base do bloco de agarose, pode-se estimar, através da densidade de plaqueamento, o número de protoplastos que se encontram ali plaqueados. Desta maneira, a tomada da eficiência é feita através da contagem rápida e precisa do número médio de colônias existentes em "n" campos de contagem por gel, de acordo com o esquema amostral da FIGURA 2.A. O cálculo da eficiência é feito de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Ef. Plaq. (\%)} = \frac{\text{número médio de colônias}}{\text{nº de protoplastos plaqueados em } 4,5 \mu\text{l}} \times 100$$



..... tomada de amostras



géis de agarose

B) Volume médio = $\phi \cdot h_{\text{média}}$

$h_{\text{média}} = h_1 + \dots + h_5$ (altura média de "n" cilindros de agarose)

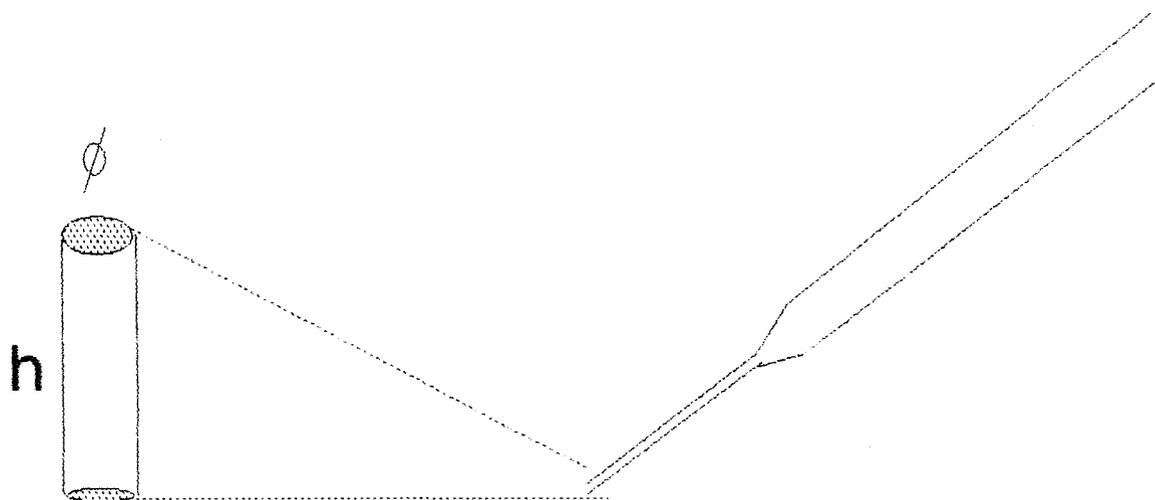


Figura 2. A) Metodologia para a tomada da eficiência de plaqueamento. B) Cálculo do volume médio de uma visada em uma ocular (aumento 10X).

3.10. Regeneração de plantas

Para a regeneração de plantas foram testados diferentes meios básicos (MS, N₆ e R2), com diferentes concentrações de NAA, KIN e BAP. Também foi avaliado o efeito da utilização de ágar (8 g/l) ou agarose Sigma tipo II (0,6 g/l). Os calos foram inoculados em tubos de ensaio com tampões de algodão ou em placas de Petri plásticas (90x15mm) seladas com filme plástico. Os calos, após a inoculação, foram deixados no escuro por um período de 6 dias e, então, passados a condição de luz fornecida por quatro lâmpadas "Daylight F30T8D - General Electric, 30 W", obedecendo um fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro, a uma temperatura de 26±1°C. Após 20 dias os calos com pontos verdes ou pequenas plântulas foram transferidos para meio MS à metade da sua concentração de sais, vitaminas e sacarose, acrescido de 0,5 mg/l de NAA e 2 mg/l de KIN. Passados mais 15 dias, foi avaliado o número de calos com plantas; estas foram colocadas no mesmo meio MS, líquido ou semi-sólido (0,8 mg/l ágar) sem reguladores para melhor crescimento e enraizamento. Após 50 a 60 dias do isolamento, as plantas foram colocadas em solução nutritiva em casa de vegetação.

3.11. Crescimento das plantas

As plantas, a princípio, foram colocadas em solução de Hoagland e Snyder diluída 5 vezes (HEWITT, 1966). Cerca de 50 plantas foram colocadas em 40l de solução nutritiva por um período de 20 dias; durante este período a água perdida por evapotranspiração foi repostada diariamente. Por vezes foi necessária a suplementação de ferro durante este período. A solução foi mantida permanentemente sob aeração através de bombeamento forçado de ar.

Com sistemas radiculares bem desenvolvidos, as plantas foram transferidas para vasos com uma mistura esterilizada em autoclave, de terra, areia, esterco e vermiculita (2:1:0,5:0,25) para que cresçam até o final do ciclo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Assepsia das sementes

O sistema utilizado para a assepsia manteve níveis em torno de 2 a 4% de contaminação das sementes inoculadas. Tais níveis foram considerados não prejudiciais para a execução dos experimentos de indução de calos. Em virtude da ausência de dados estatísticos de eficiência das medidas assépticas adotadas por outros autores, o confronto com outros dados não pode ser feito.

Confrontando-se com a literatura, a concentração de cloro ativo e o tempo de contato com a solução, bem como o uso de vácuo, são considerados excessivos; porém deve-se considerar que a maior parte dos trabalhos relata a utilização de sementes oriundas de casa de vegetação, e não do campo, de onde, naturalmente, deve-se esperar uma maior fonte de inóculo contaminante. Saliencia-se que as medidas adotadas nunca implicaram danos ao embrião, observando-se em todos os casos a germinação normal das sementes em meio MS sem a presença de reguladores (meio controle da germinação).

4.2. Explante

Para a indução de calos podem ser utilizados, entre outros, embriões imaturos, panículas imaturas, anteras, embriões maduros (sementes), raízes e bases de folhas. Todos os explantes oriundos de fases intermediárias do ciclo da planta foram evitados devido as condições climáticas regionais, principalmente dos meses de junho, julho e agosto. As temperaturas baixas destes meses implicariam um estresse para as plantas que, além de dificultar o perfeito desenvolvimento das mesmas, adicionariam mais uma variável para o estudo em questão. Todos estes explantes são dependentes do estado fisiológico da planta doadora. Portanto, restaram os embriões maduros, as raízes e as folhas de plântulas crescidas "in vitro". Estes dois últimos, devido a dificuldade de manipulação, tempo e material dispendido, foram também descartados. O uso de embriões maduros traz a vantagem de encurtar o período de obtenção de calos, uma vez que não é necessária a espera do florescimento das plantas, e diminui os problemas de perda de material inicial devidos à dificuldade de estabelecimento de medidas adequadas para assepsia de materiais imaturos.

4.3. Escolha dos cultivares

4.3.1. Experimento 1. Avaliação do comportamento "in vitro".

Pretendia-se com este experimento fornecer mais subsídios para a escolha dos cultivares a serem trabalhados.

De acordo com o quadro de análise da variância (Tabela 2), para a variável número de calos induzidos, ocorreram diferenças altamente significativas pelo teste F, para cultivares e dose de 2,4-D usada.

Tabela 2. Quadro de análise da variância do Experimento 1.
Variável número de calos.

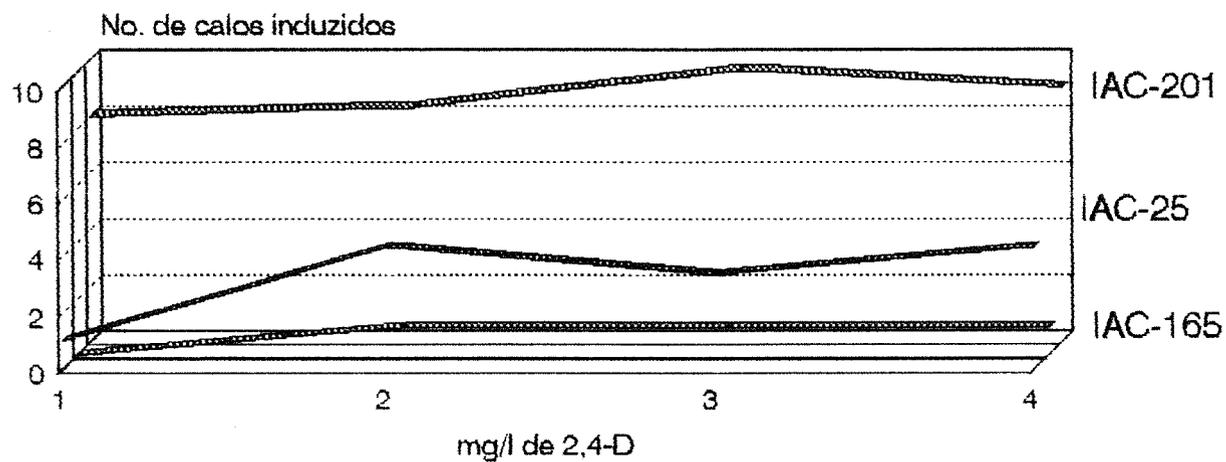
F.V.	GL	Soma Quadr.	Quadr.Médio	Valor F	Pr > F
CULT	6	703.23	117.20	81.37	0.0001
DOSE	3	103.94	34.64	24.05	0.0001
C*D	18	59.14	3.28	2.28	0.0098
Erro	56	80.66	1.44		
Total	83	946.98			
C.V. 29.91 Média 4.01					

O teste F foi utilizado para comparar variâncias ou seus respectivos desvios padrões. Partindo-se da hipótese de que todos os tratamentos foram iguais, as estimativas da variância dos

tratamentos e do erro estimam um mesmo parâmetro, variância. Sendo estimativas de um mesmo parâmetro, elas não devem diferir a não ser por acaso. O valor de F , sendo igual ou inferior ao valor de F tabelado, é indicativo de que há uma grande probabilidade, geralmente 95 ou 99%, das estimativas serem iguais, portanto de que as diferenças encontradas são devidas ao acaso, e que a hipótese da igualdade entre tratamentos deve ser aceita. Valores de F superiores ao F tabelado indicam a existência de uma probabilidade significativa das estimativas serem diferentes, portanto a hipótese dos tratamentos serem iguais pode ser rejeitada com um certo nível de probabilidade. A probabilidade do valor F ser superior ao F tabelado por simples obra do acaso, está nas tabelas sob a coluna $Pr > F$. Portanto valores como 0,0001 observados na Tabela 2, querem dizer que existe uma probabilidade de 99,99% das diferenças observadas não serem ao acaso, e sim existirem realmente. Informações mais detalhadas sobre a análise estatística podem ser obtidas em STEEL & TORRIE (1960).

A significância do teste F indica que os cultivares e as doses de 2,4-D apresentaram respostas diferentes quanto ao número de calos induzidos. A significância observada para a interação Cultivar * Dose 2,4-D, indica que os cultivares comportaram-se diferentemente nos níveis do regulador (Figura 3).

A)



B)

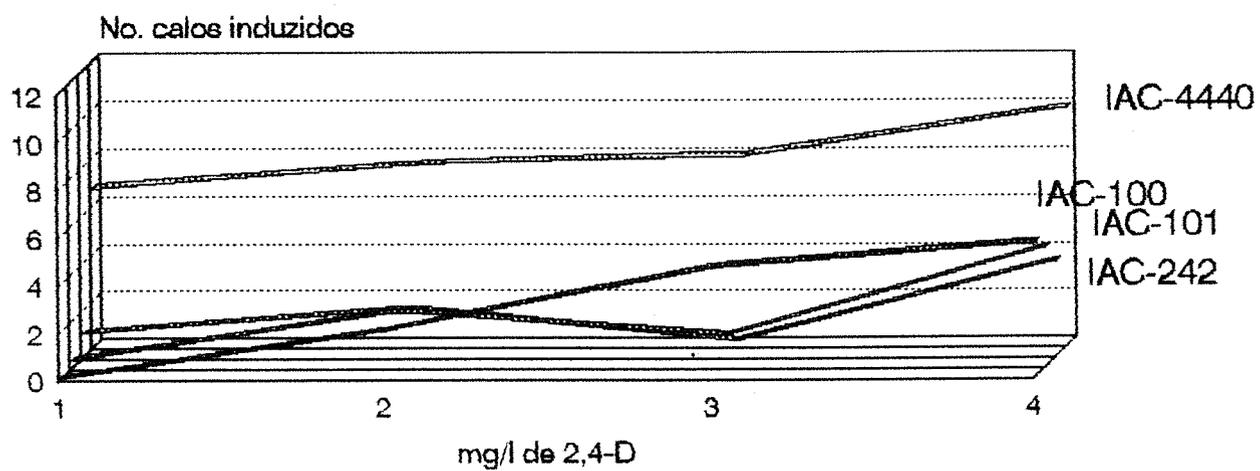


Figura 3. Gráfico: dose de 2,4-D vs. número de calos induzidos, Experimento 1. A) Cultivares de sequeiro. B) Cultivares irrigados.

Tabela 3. Quadro de análise da variância do Experimento 1.
Variável número de calos embriogênicos, transformada
segundo $\sqrt{(x+k)}$.

F.V.	GL	Soma Quadr.	Quadr.Médio	Valor F	Pr > F
CULT	6	1.96	0.32	3.54	0.0048
DOSE	3	1.40	0.46	5.06	0.0036
C*D	18	3.26	0.18	1.96	0.0289
ERRO	56	5.18	0.09		
TOTAL	83	11.83			
C.V.	21.51	Média	1.41		

A variável número de calos embriogênicos também mostrou diferenças estatisticamente significativas, tanto para cultivares quanto para dose de 2,4-D, evidenciando que, com relação a indução de calos embriogênicos, existem respostas diferenciadas dentro de cultivares e dentro de doses de 2,4-D.

As diferenças encontradas asseguram que a seleção dentro de cultivares e dentro de doses do regulador pode ser praticada com a segurança de dados estatísticos que afirmam, com probabilidade conhecida, que os comportamentos diferenciados não são ao acaso.

Tabela 4. Número médio de calos (CALOS), qualidade e número médio de calos embriogênicos (CAEMB) induzidos para os 7 cultivares do Experimento 1.

CULTIVAR	Obs	-----CALOS-----			-----CAEMB-----			
		Média	± DP	DMRT	Média	± DP	DMRT	Qualidade
IAC-25	12	3.25	2.09	B	1.38	0.43	A	1
IAC-100	12	3.08	2.53	B	1.39	0.38	A	1
IAC-101	12	2.25	2.00	BC	1.52	0.44	A	1
IAC-165	12	0.75	0.75	D	1.10	0.18	B	0
IAC-201	12	8.75	1.21	A	1.40	0.34	A	2
IAC-242	12	1.91	1.56	C	1.45	0.38	A	2
IAC-4440	12	8.08	1.67	A	1.64	0.22	A	1

DMRT - Médias na coluna com a mesma letra, não diferem significativamente para um valor de Alpha = 0,05.

DP - Desvio padrão

Como pode ser observado nos dados estatísticos da Tabela 4, os melhores cultivares quanto a indução de calos foram o IAC-201 e IAC-4440. O cultivar IAC-165 teve o pior comportamento, induzindo calos satisfatoriamente somente com 4 mg/l de 2,4-D. Os calos foram perceptíveis a partir de 7 dias da inoculação. O cultivar IAC-201 mostrou-se mais atrasado, sempre apresentando calos menores do que os demais cultivares. Aos 35 - 40 dias todos os cultivares, em pelo menos um nível de 2,4-D, apresentaram calos de no mínimo 8 mm de diâmetro.

O experimento sendo feito em esquema fatorial, todos os cultivares em todos os níveis de 2,4-D, possibilita o isolamento

do efeito da dose de 2,4-D. Os dados estatísticos de tal análise estão na Tabela 5.

Tabela 5. Efeito da concentração de 2,4-D no número de calos e no número de calos embriogênicos induzidos no Experimento 1, considerando os dois cultivares.

Regulador de Cresc. 2,4-D (mg/l)	Obs	-----CALOS-----			-----CAEMB-----		
		Média ± DP	DMRT		Média ± DP	DMRT	
1	21	2.42	3.34	C	1.26	0.34	B
2	21	3.95	3.12	B	1.39	0.39	B
3	21	4.09	3.52	B	1.37	0.33	B
4	21	5.57	2.97	A	1.62	0.37	A

DMRT - Médias na coluna com a mesma letra não diferem significativamente para um valor de Alpha = 0,05.

DP - Desvio padrão.

Quanto a resposta aos diferentes níveis do regulador, a concentração de 4 mg/l de 2,4-D induziu o maior número de calos. Foi observado um gradiente de formação de raízes e parte aérea decrescente, a medida que se aumentava a concentração da auxina. Somente nos cultivares IAC-201 e IAC-4440 não foi observada a presença de raízes e parte aérea normais em nenhum tratamento. Isto evidencia a sensibilidade destes materiais a ação da auxina. A

respeito da segunda variável, observa-se que somente uma dose elevada (4 mg/l) conseguiu induzir um número estatisticamente superior de calos embriogênicos.

Todos os cultivares, a exceção do IAC-165, apresentaram comportamento similar para a indução de calos embriogênicos, não se diferenciando pelo teste DMRT. Provavelmente, a significância apontada pelo teste F para variância dentro de cultivares foi influenciada pelos valores do cultivar IAC-165. A avaliação do número de calos embriogênicos é extremamente dependente do avaliador, sendo de difícil padronização. Portanto, somente grandes diferenças são possíveis de serem mensuradas no princípio do trabalho. A avaliação da qualidade dos calos embriogênicos mostra os cultivares IAC-201 e IAC-242 superiores aos demais, principalmente na concentração de 2 mg/l de 2,4-D. Como um erro de avaliação poderia conduzir a eliminação de um cultivar, a tendência foi praticar-se uma avaliação não rigorosa, e, em se tratando de um processo de aprendizagem, é esperado que esta se modifique a medida que o conhecimento do material aumenta.

De posse das informações dadas por este experimento preliminar e das demais dispostas na Tabela 6, procedeu-se a análise para a escolha dos cultivares.

Tabela 6. Informações sobre os cultivares mais importantes do estado de São Paulo.

Cult.	Área cult	Prod. t/ha	Caract. Comerciais ^a	Estab. Prod. ^a	Potencial p/Transfor. ^b	Impacto ^b
IAC-25	**	3,12	**	**	Médio	Baixo
IAC-100	**	5,66	**	**	Baixo	Baixo
IAC-101	**	6,30	Boas	Boa	Médio	Baixo
IAC-165	>Seq.	3,52	Boas	Ótima	Médio	Alto
IAC-201	**	3,05	Ótimas	**	Alto	Alto
IAC-242	**	5,61	**	**	Baixo	Baixo
IAC-4440	>Irrig	5,32	**	**	Médio	Médio

** : Informação não obtida ou sem relevância para o cultivar.

a: Ruim>Bom>Ótimo

b: Baixo>Médio>Alto

Para a atribuição do conceito no item potencial para utilização em transformação genética foram avaliados principalmente os defeitos que o cultivar apresentava, e se seria possível sua correção pela transformação genética. No caso do IAC-201, sua susceptibilidade a doença fúngica conhecida como brusone, confere a este cultivar alto potencial para estudos de transferência de genes que oferecem resistência a fungos. Estes genes, codificadores de proteínas que apresentam atividade contrária a ação de insetos e patógenos ("thionins", quitinases, β -glucanases), estão sendo estudados e discutidos quanto ao seu futuro papel em defesa vegetal (RYAN, 1990; BOHLMANN, 1994).

Com relação ao item impacto, avaliou-se o conhecimento dos cultivares por parte dos produtores e melhoristas e sua permanência no cenário orizícola como cultivar e/ou linhagem em cruzamentos. O cultivar IAC-165, atualmente, é um dos mais conhecidos cultivares de sequeiro no Brasil, sendo utilizado como testemunha em ensaios de competição. Já o cultivar IAC-201, recentemente lançado, promete uma vida longa como tal e, pelas suas características comerciais, deverá ser utilizado como linhagem em cruzamentos no Instituto Agrônomo de Campinas/IAC.

Os critérios adotados para a seleção dos cultivares a serem utilizados nos estudos de isolamento e cultivo de protoplastos foram considerados satisfatórios. O êxito obtido no que diz respeito a regeneração de plantas, bem como a importância dos cultivares dentro do cenário de arroz de sequeiro brasileiro, confirmam a eficiência da metodologia de escolha.

Tendo-se escolhido os cultivares IAC-165 e IAC-201, foi assegurada importância, objetividade, atualidade e potencialidade para o trabalho desenvolvido. Importância respaldada pela estabilidade de produção do IAC-165 e características comerciais do IAC-201; objetividade, principalmente para o cultivar IAC-201, que apresenta problemas de baixa resistência a brusone. Atualidade devido ao cultivar IAC-201 ter sido recentemente lançado, 1992. E, por último, potencialidade por se tratarem de dois materiais que têm problemas de intolerância a seca, média ou baixa resistência a

doenças epidêmicas do ecossistema e com grande capacidade de expansão de área de cultivo, uma vez solucionados estes problemas.

4.4. Indução de calos

4.4.1. Experimento 2. Avaliação do efeito dos meios básicos N₆, MS e B5, em dois níveis de 2,4-D na indução de calos.

Após a eleição dos cultivares, buscava-se um meio indutor de calos mais eficiente, principalmente para o cultivar IAC-165, o qual não mostrou, no Experimento 1, um bom comportamento na indução com o meio MS. Para tanto, testou-se 3 dos meios mais utilizados na indução de calos em arroz (MS, N₆ e B5), combinado com 2 concentrações de 2,4-D.

Tabela 7. Quadro de análise da variância do Experimento 2. Variável número de calos induzidos.

F.V.	G.L.	Soma Quadr.	Quadr.Médio	Valor F	Pr > F
CULTIVAR	1	43.35	43.35	32.11	0.0001
MEIO	2	1.43	0.71	0.53	0.5915
2,4-D	1	25.35	25.35	18.78	0.0001
C*M	2	4.90	2.45	1.81	0.1739
C*2,4-D	1	0.81	0.81	0.60	0.4405
M*2,4-D	2	1.90	0.95	0.70	0.4998
C*M*2,4-D	2	8.03	4.01	2.98	0.0605
Erro	48	64.80	1.35		
Total	59	150.58			
C.V.	16.40	Média	7.08		

Através do quadro de análise da variância da variável número de calos induzidos (Tabela 7) observa-se que houve comportamento diferenciado entre os cultivares, e que, a exemplo do Experimento 1, o efeito da dose de 2,4-D também produz diferenças estatísticas significativas. Com relação aos três meios básicos as diferenças encontradas são não significativas pelo teste F, indicando que os meios comportam-se de forma semelhante quanto a indução de calos. Este resultado pode ser consequência da insensibilidade do teste estatístico para detectar pequenas diferenças. De acordo com o valor de F, infere-se que existe uma probabilidade de quase 60% das diferenças observadas serem decorrência do acaso.

Tabela 8. Quadro de análise da variância do Experimento 2.
Variável número de calos embriogênicos, transformada segundo $\sqrt{(x+k)}$.

F.V.	G.L.	Soma Quadr.	Quadr.Médio	Valor F	Pr > F
CULT	1	0.02	0.02	0.15	0.6967
MEIO	2	0.59	0.29	2.09	0.1347
2,4-D	1	0.00	0.00	0.01	0.9069
C*M	2	1.38	0.69	4.90	0.0116
C*2,4-D	1	0.81	0.81	5.74	0.0205
M*2,4-D	2	0.51	0.25	1.82	0.1723
C*M*2,4-D	2	0.18	0.09	0.66	0.5223
Erro	48	6.78	0.14		
Total	59	10.29			
C.V.	23.48	Média	1.60		

As fontes de variação cultivares, meio e doses de 2,4-D não apresentaram diferença estatisticamente significativa na análise da variável número de calos embriogênicos induzidos (Tabela 8).

Tabela 9. Número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos para os cultivares IAC-201 e IAC-165 no Experimento 2.

CULTIVAR	Obs	-----CALOS-----			-----CAEMB-----		
		Média ± DP	DMRT		Média ± DP	DMRT	
IAC-201	30	7.93	1.22	A	1.58	0.45	A
IAC-165	30	6.23	1.47	B	1.61	0.38	A

DMRT - Médias na coluna com a mesma letra não diferem significativamente para um valor de Alpha = 0,05.
DP - Desvio padrão.

Os resultados mostrados na Tabela 9 confirmam os obtidos no experimento preliminar, ou seja, o cultivar IAC-201 induziu um maior número de calos do que o IAC-165. Significativo foi o aumento do número de calos induzidos para o cultivar IAC-165. Atribui-se esta diferença encontrada entre os dois experimentos, à prática da seleção de sementes através de gravidade específica. O mesmo efeito não foi percebido para o cultivar IAC-201. Uma explicação para este fato poderia ser a qualidade da amostra de sementes enviada ao laboratório para os trabalhos. Uma vez que a tomada destas amostras não foi acompanhada, nada se pode garantir a respeito da sua uniformidade, além disto, pode-se esperar que alguns cultivares

apresentem a indução de calos independente da gravidade específica dos grãos ou menos sensível a esta. Com relação ao número de calos embriogênicos induzidos não foi observada diferença entre os cultivares, porém, da mesma forma que para a variável anterior, o cultivar IAC-165 apresentou uma média de 1.26 (valor não transformado) calos embriogênicos induzidos. Um aumento de mais de 100% com relação ao desempenho deste cultivar no experimento preliminar.

Tabela 10. Número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos para os diferentes meios básicos no Experimento 2, considerando os dois cultivares.

MEIO BASICO	Obs	-----CALOS-----			-----CAEMB-----		
		Média ± DP	DMRT		Média ± DP	DMRT	
N ₆	20	7.30	1.45	A	1.68	0.45	A
MS	20	6.95	1.82	A	1.65	0.43	A
B5	20	7.00	1.55	A	1.46	0.34	A

DMRT - Médias na coluna com a mesma letra não diferem significativamente para um valor de Alpha = 0,05.
DP - Desvio padrão.

Observa-se pelos dados estatísticos da Tabela 10 que não houve diferença significativa pelo teste de comparações de médias DMRT para a variação do meio básico para as duas variáveis observadas. As variações na fonte de nitrogênio e relação entre fontes não implicaram resposta diferenciada quanto a indução de calos. Este dado está em desacordo com GRIMES & HODGES (1990). Isto pode ser explicado pela similaridade genética entre os dois

cultivares escolhidos. Embora apresentem diferenças morfológicas significativas, tais como tipo de grão, o IAC-201 é derivado de um cruzamento entre o IAC-165 e o cultivar norte-americano Labelle.

Tabela 11. Número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos para as diferentes doses de 2,4-D no Experimento 2, considerando os dois cultivares.

Regulador de Cresc. 2,4-D mg/l	Obs	-----CALOS-----			----CAEMB-----		
		Média ± DP	DMRT		Média ± DP	DMRT	
2	30	6.43	1.56	B	1.60	0.39	A
4	30	7.73	1.36	A	1.59	0.44	A

DMRT - Médias na coluna com a mesma letra não diferem significativamente para um valor de $\alpha = 0,05$.
DP - Desvio padrão.

Com relação ao nível de 2,4-D, como pode ser observado na Tabela 11, uma maior concentração de 2,4-D induziu um maior número de calos, porém tal alteração não foi observada para a indução de calos embriogênicos.

Tabela 12. Número médio de calos embriogênicos induzidos e qualidade dos calos nas diferentes combinações de meio básico e dose de 2,4-D no Experimento 2.

CULTIVAR	MEIO BAS.	2,4-D mg/l	N	-----CAEMB-----		Qualidade ^a
				MÉDIA	± DP	
IAC-201	N ₆	2	5	1.74	0.45	3
IAC-201	N ₆	4	5	1.56	0.43	3
IAC-201	MS	2	5	1.91	0.38	2
IAC-201	MS	4	5	1.73	0.50	3
IAC-201	B5	2	5	1.44	0.35	1
IAC-201	B5	4	5	1.08	0.18	0
IAC-165	N ₆	2	5	1.42	0.44	1
IAC-165	N ₆	4	5	2.01	0.38	3
IAC-165	MS	2	5	1.37	0.36	1
IAC-165	MS	4	5	1.57	0.38	3
IAC-165	B5	2	5	1.72	0.20	3
IAC-165	B5	4	5	1.59	0.26	1

a: 0=péssimo < 1=ruim < 2=bom < 3=ótimo
 DP - Desvio padrão.

Embora a análise estatística da variável número de calos embriogênicos não tenha detectado diferenças estatisticamente significativas, a qualidade dos calos embriogênicos não sujeita a análise estatística, permitiu a seleção de três combinações meio básico-dose de 2,4-D, para cada uma dos dois cultivares.

Desta maneira, ficaram estabelecidos os meios para indução de calos dos dois cultivares selecionados. Para o IAC-201 selecionou-se o meio básico N₆ acrescido de 2 e 4 mg/l de 2,4-D e o meio MS com 4 mg/l de 2,4-D. Para o cultivar IAC-165 os meios selecionados foram o MS e o N₆ com 4 mg/l de 2,4-D, e o B5 com 2 mg/l de 2,4-D. Os fatores comuns entre os meios selecionados para os dois cultivares são a concentração de 4 mg/l de 2,4-D e os meios básicos N₆ e MS. Os calos produzidos pelo IAC-165 no meio B5 com 2 mg/l de 2,4-D foram de excelente qualidade, fato que está em desacordo com a insensibilidade deste cultivar a auxina 2,4-D detectada pelo Experimento 1 e pelos próprios resultados do Experimento 2. Uma explicação para estes resultados seria a alteração da razão (NO₃⁻ : NH₄⁺). Segundo GRIMES & HODGES (1990) esta razão influencia a sensibilidade a auxina e, segundo os resultados do Experimento 2, esta influência seria dependente do genótipo, uma vez que o cultivar IAC-201 apresentou os piores resultados com o meio B5.

4.4.2. Experimento 3. Avaliação do efeito da caseína hidrolisada e da L-prolina na indução de calos.

Com o intuito de avaliar o efeito de dois aditivos nos meios, montou-se um experimento combinando os três meios selecionados para cada uma dos cultivares, com duas concentrações de caseína hidrolisada e L-prolina.

CULTIVAR IAC-201

Os dados estatísticos referentes a análise da variância das duas variáveis para o cultivar IAC-201, encontram-se nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Quadro de análise da variância do Experimento 3.
Variável número de calos induzidos. Cultivar IAC-201.

F.V.	GL	Soma Quadr.	Quadr. Médio	Valor F	Pr > F
ADIT	4	11.64	2.91	1.63	0.1712
MEIO	2	10.34	5.17	2.90	0.0593
A*M	8	13.49	1.68	0.95	0.4824
Erro	107	190.76	1.78		
Total	121	225.68			
C.V. 15.86		Média 8.41			

Tabela 14. Quadro de análise da variância do Experimento 3.
Variável número de calos embriogênicos induzidos.
Cultivar IAC-201.

F.V.	GL	Soma Quadr.	Quadr. Médio	Valor F	Pr > F
ADIT	4	0.14	0.03	0.48	0.7503
MEIO	2	0.22	0.11	1.51	0.2264
A*M	8	0.53	0.06	0.88	0.5327
Erro	107	8.05	0.07		
Total	121	8.98			
C.V. 22.21		Média 1.23			

Observando-se os resultados da análise da variância do Experimento 3, nota-se que não houve significância estatística para as diferenças encontradas em aditivos e meios, para ambas variáveis.

Na Tabela 15 estão os resultados referentes ao número de calos e número de calos embriogênicos induzidos obtidos no Experimento 3, para o cultivar IAC-201.

Tabela 15. Efeito dos aditivos no número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos no Experimento 3, cultivar IAC-201.

ADITIVO	Obs	-----CALOS-----			-----CAEMB-----		
		Média ± DP	DMRT		Média ± DP	DMRT	
Controle	25	8.16 1.34	A B		1.29 0.30	A	
2,5 mM Pr	24	8.45 1.28	A B		1.24 0.28	A	
5,0 mM Pr	23	8.86 1.32	A		1.23 0.29	A	
0,5g/l CH	27	8.59 1.39	A B		1.21 0.23	A	
1,0g/l CH	23	8.00 1.41	B		1.18 0.25	A	

DMRT - Médias na coluna com a mesma letra não diferem significativamente para um valor de Alpha = 0,05.
DP - Desvio padrão.

De acordo com o teste de comparação de médias, nenhum tratamento diferiu significativamente do controle. Os aditivos 5mM de L-prolina e 1,0 g/l de caseína hidrolisada diferiram quanto ao número de calos induzidos. Com relação a calos embriogênicos, não foi observada diferença estatística pelo teste DMRT de comparação

de médias. Estes resultados eram esperados uma vez que pela análise da variância não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

Na Tabela 16 estão as médias referentes ao número de calos e número de calos embriogênicos induzidos obtidos no Experimento 3 para cada um dos meios, para o cultivar IAC-201.

Tabela 16. Efeito do meio no número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos no Experimento 3. Cultivar IAC-201.

MEIO	Obs	-----CALOS-----			-----CAEMB-----		
		Média ± DP	DMRT		Média ± DP	DMRT	
N ₆ 4mg/l 2,4-D	37	8.72 1.26	A		1.20 0.25	A	
MS 4mg/l 2,4-D	42	8.52 1.41	A B		1.19 0.25	A	
N ₆ 2mg/l 2,4-D	43	8.04 1.34	B		1.29 0.29	A	

DMRT - Médias na coluna com a mesma letra não diferem significativamente para um valor de Alpha = 0,05.
DP - Desvio padrão.

As médias apresentadas na Tabela 16 demonstram que o meio básico não apresentou diferença quanto a indução de calo (MS vs N₆), porém o efeito do regulador fez-se sentir quando diferenciam-se os meio N₆ com 2 e 4 mg/l de 2,4-D. Com relação a calos embriogênicos, não foi observada diferença estatística pelo teste DMRT de

comparação de médias, sendo o meio N₆ com 2 mg/l de 2,4-D o de maior média.

Tabela 17. Médias do número de calos embriogênicos induzidos para cada meio, combinado com cada um dos aditivos e avaliação da qualidade dos calos embriogênicos. Cultivar IAC-201.

ADITIVO	MEIO	Obs	-----CAEMB-----		Qualidade ^a
			Média	± DP	
Controle	N ₆ 4mg/l 2,4-D	7	1.28	0.28	1
Controle	MS 4mg/l 2,4-D	9	1.18	0.21	2
Controle	N ₆ 2mg/l 2,4-D	9	1.41	0.36	2
2,5 mM Pr	N ₆ 4mg/l 2,4-D	7	1.22	0.29	3
2,5 mM Pr	MS 4mg/l 2,4-D	9	1.17	0.27	0
2,5 mM Pr	N ₆ 2mg/l 2,4-D	8	1.33	0.30	1
5,0 mM Pr	N ₆ 4mg/l 2,4-D	7	1.17	0.22	2
5,0 mM Pr	MS 4mg/l 2,4-D	7	1.37	0.36	2
5,0 mM Pr	N ₆ 2mg/l 2,4-D	9	1.17	0.27	2
0,5g/l CH	N ₆ 4mg/l 2,4-D	9	1.13	0.20	2
0,5g/l CH	MS 4mg/l 2,4-D	9	1.18	0.21	3
0,5g/l CH	N ₆ 2mg/l 2,4-D	9	1.31	0.25	3
1,0g/l CH	N ₆ 4mg/l 2,4-D	7	1.22	0.29	1
1,0g/l CH	MS 4mg/l 2,4-D	8	1.10	0.19	1
1,0g/l CH	N ₆ 2mg/l 2,4-D	8	1.24	0.28	3

a: 0= péssimo < 1=ruim < 2=bom < 3=ótimo.
DP - Desvio padrão.

Através da avaliação da qualidade dos calos embriogênicos induzidos pelo cultivar IAC-201, foi possível diferenciar quatro

meios de melhor resposta. Os meios que proporcionaram um melhor desempenho são o N₆ com 2 mg/l de 2,4-D e combinados com 0,5 e 1,0 g/l de caseína hidrolisada, o N₆ com 4 mg/l de 2,4-D combinado com 2,5 mM de L-prolina e o MS com 4 mg/l de 2,4-D combinado com 0,5 g/l de caseína hidrolisada.

O cultivar IAC-201 mostrou melhores respostas com relação a qualidade dos calos, quando os meios continham caseína hidrolisada. L-prolina somente incrementou a qualidade quando foi adicionado 2,5 mM no meio N₆ com 4 mg/l de 2,4-D.

CULTIVAR IAC-165

As análises da variância das duas variáveis observadas no experimento realizado com o cultivar IAC-165 apresentam-se nas Tabelas 18 e 19.

Tabela 18. Quadro de análise da variância do Experimento 3.
Variável número de calos induzidos. Cultivar IAC-165.

F.V.	GL	Soma Quadr.	Quadr. Médio	Valor F	Pr > F
ADIT	4	36.30	9.07	4.27	0.0030
MEIO	2	11.83	5.91	2.79	0.0661
A*M	8	11.20	1.40	0.66	0.7260
Erro	108	229.44	2.12		
Total	122	291.41			
C.V.	25.00	Média	5.82		

Tabela 19. Quadro de análise da variância do Experimento 3.
Variável número de calos embriogênicos induzidos.
Cultivar IAC-165.

F.V.	GL	Soma Quadr.	Quadr. Médio	Valor F	Pr > F
ADIT	4	2.168	0.542	3.52	0.0097
MEIO	2	0.002	0.001	0.01	0.9912
A*M	8	2.768	0.346	2.25	0.0293
Erro	108	16.637	0.154		
Total	122	21.406			

C.V. 25.66 Média 1.52

O cultivar IAC-165 mostrou diferenças estatísticas significativas somente com relação a aditivos.

Na Tabela 20 encontram-se os dados referentes ao efeito dos aditivos no número médio de calos e no número de calos embriogênicos induzidos no Experimento 3.

Tabela 20. Efeito dos aditivos no número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos no Experimento 3. Cultivar IAC-165.

ADITIVO	Obs	-----CALOS-----			-----CAEMB-----		
		Média ± DP	DMRT		Média ± SD	DMRT	
Controle	25	5.96 1.24	A B		1.54 0.37	A B	
2,5 mM Pr	23	5.86 1.60	B		1.48 0.37	B	
5,0 mM Pr	25	5.76 1.89	A		1.76 0.51	A	
0,5g/l CH	25	5.12 1.20	B		1.44 0.32	B	
1,0g/l CH	25	5.44 1.26	B		1.39 0.41	B	

DMRT - Médias na coluna com a mesma letra não diferem significativamente para um valor de Alpha = 0,05.

DP - Desvio padrão.

Como indicado pela análise da variância, os aditivos induziram comportamentos diferenciados. Em geral, nenhum aditivo mostrou-se diferente do controle, porém a adição de 5 mM de L-prolina alterou positivamente a frequência de indução de calos quando comparada com os demais aditivos, sendo isto válido tanto para indução de calos quanto para indução de calos embriogênicos (Tabela 20).

Tabela 21. Efeito do meio no número médio de calos e número médio de calos embriogênicos induzidos no Experimento 3. Cultivar IAC-165.

MEIO	Obs	-----CALOS-----			-----CAEMB-----		
		Média ± DP	DMRT		Média ± DP	DMRT	
N ₆ 4mg/l 2,4-D	43	6.06 1.36	A		1.53 0.41	A	
MS 4mg/l 2,4-D	40	5.32 1.49	B		1.51 0.44	A	
N ₆ 2mg/l 2,4-D	40	6.07 1.68	A		1.53 0.39	A	

DMRT - Médias na coluna com a mesma letra não diferem significativamente para um valor de Alpha = 0,05.
DP - Desvio padrão.

Com relação a comparação de meios, observa-se que o meio N₆ diferencia-se do MS com 4 mg/l de 2,4-D quanto ao número de calos induzidos. Nenhuma diferença é apontada para a variável número de calos embriogênicos (Tabela 21).

Na Tabela 22 estão as médias de calos embriogênicos induzidos por cada um dos meios, combinados com os diferentes

aditivos. São listados também as notas de qualidade atribuídas para cada um dos meios.

Tabela 22. Médias de indução de calos embriogênicos por meio, combinado com cada um dos aditivos e avaliação da qualidade dos calos embriogênicos. Cultivar IAC-165.

ADITIVO	MEIO	Obs	-----CAEMB-----		Qualidade ^a
			Média	± DP	
Controle	N ₆ 4mg/l 2,4-D	8	1.67	0.48	2
Controle	MS 4mg/l 2,4-D	8	1.52	0.22	1
Controle	B5 2mg/l 2,4-D	9	1.44	0.37	2
2,5 mM Pr	N ₆ 4mg/l 2,4-D	8	1.50	0.33	1
2,5 mM Pr	MS 4mg/l 2,4-D	7	1.51	0.56	3
2,5 mM Pr	B5 2mg/l 2,4-D	8	1.44	0.22	1
5,0 mM Pr	N ₆ 4mg/l 2,4-D	9	1.44	0.37	2
5,0 mM Pr	MS 4mg/l 2,4-D	7	2.00	0.55	1
5,0 mM Pr	B5 2mg/l 2,4-D	9	1.88	0.48	3
0,5g/l CH	N ₆ 4mg/l 2,4-D	9	1.43	0.42	2
0,5g/l CH	MS 4mg/l 2,4-D	9	1.50	0.24	2
0,5g/l CH	B5 2mg/l 2,4-D	7	1.38	0.29	1
1,0g/l CH	N ₆ 4mg/l 2,4-D	9	1.59	0.49	3
1,0g/l CH	MS 4mg/l 2,4-D	9	1.13	0.20	0
1,0g/l CH	B5 2mg/l 2,4-D	7	1.47	0.37	1

a: 0= péssimo < 1=ruim < 2=bom < 3=ótimo.

DP - Desvio padrão.

De acordo com a avaliação da qualidade dos calos embriogênicos induzidos foi possível selecionar três meios combinados com aditivos. São eles: N₆ com 4 mg/l de 2,4-D combinado com 1,0 g/l de caseína hidrolisada, MS com 4 mg/l de 2,4-D combinado com 2,5 mM de L-prolina e B5 com 2 mg/l de 2,4-D combinado com 2,5 mM de L-prolina (Tabela 22).

Não é finalidade deste trabalho estender-se na questão do uso da análise estatística em experimentos envolvendo cultura de tecidos, porém os resultados coletados nos experimentos permitem que alguns aspectos sejam discutidos.

MIZE & CHUN (1988) apontam 3 razões para que não se obtenha diferença estatística significativa mesmo quando se tem o conhecimento de que os tratamentos implicam respostas diferenciadas: primeira, o modelo estatístico escolhido pode não ser adequado ao tipo de resposta, ou seja, podem existir fontes de variação (F.V.) que não se tenha conhecimento e portanto não estão controladas, nem isolados seus efeitos; segunda, pode haver excessiva variação nas respostas sendo que problemas amostrais e de controle de fatores podem estar envolvidos; terceira, os níveis do tratamento adotados podem ser restritos a ponto de não permitirem grandes diferenças nas respostas.

A utilidade da análise estatística, fornecendo maior confiabilidade aos resultados obtidos é indiscutível em qualquer

área da pesquisa, porém em cultura de tecidos pouco se tem utilizado desta ferramenta. Isto causa uma ausência de dados estatísticos para efeitos comparativos e não permite um maior estudo das fontes de variação envolvidas em tais experimentos. Acredita-se que somente o uso da estatística e a discussão de seus resultados conduzirá ao aperfeiçoamento dos modelos e ao completo conhecimento e controle das fontes de variação, permitindo então, a associação de dados estatísticos aos resultados observados em laboratório.

Nos Experimentos 2 e 3, para ambos cultivares, não foram constatadas diferenças quanto a variação do meio de indução de calos. No entanto, pelas observações realizadas nos calos induzidos, existem diferenças que, para trabalhos em cultura de tecidos, são significativas. A associação de uma medida de avaliação subjetiva e não sujeita a análise estatística, qualidade de calos embriogênicos, foi utilizada como forma de correção e critério de escolha. Uma explicação para a não detecção de diferenças estatísticas significativas no Experimento 2 quando foi variado o tipo de meio, seria o baixo número de repetições e o controle inadequado de fontes de variação. Estas fontes poderiam ser, por exemplo, a proporção meio:número de sementes, espaço livre dentro da placa de Petri e estado fisiológico da semente utilizada para inoculação. Fontes de variação não controladas podem acarretar variação excessiva diminuindo a sensibilidade da análise. No Experimento 3 seria esperado que o método de análise não detectasse

diferenças uma vez que os meios utilizados foram pré-selecionados em um mesmo sentido no experimento anterior. Estariam envolvidos problemas de magnitude dos tratamentos escolhidos, que não fornecem variação suficiente.

Quando avaliado o número de calos embriogênicos, este somente mostrou diferenças estatísticas no Experimento 3 para o cultivar IAC-165 no tratamento aditivos. Esta diferença conduziu a separação pelo teste de comparação de médias dos tratamentos 5 mM de L-prolina e 1,0 g/l de caseína hidrolisada. A inobservância de diferenças para esta variável nas demais análises pode ser explicada pelo pouco conhecimento dos fatores envolvidos na indução deste tipo de calo e o conseqüente descontrole dos mesmos.

A importância do conhecimento dos fatores que influenciam um determinado caráter se faz sentir no Experimento 2, onde o caráter número de calos induzidos demonstrou diferenças significativas para cultivar e dose de 2,4-D e o caráter número de calos embriogênicos não as demonstrou. Isto poderia ser interpretado como resultado de um melhor controle dos fatores envolvidos na indução de calos decorrente do maior conhecimento que se tem desta variável.

4.4.3. Experimento 4. Avaliação do número de calos com porção embriogênica e da produção, peso fresco, de calos selecionados para isolamento no cultivar IAC-201.

O número de calos com porções embriogênicas e o peso dos calos selecionados por placa para fazer o isolamento, são parâmetros para o planejamento do número de sementes a serem inoculadas para um dado número de isolamentos. Para obtenção destes dados estatísticos idealizou-se um experimento com o cultivar IAC-201, utilizando para indução os três meios selecionados no experimento anterior.

Nas Tabelas 23 e 24 estão os dados referentes a análise da variância do Experimento 4.

Tabela 23. Quadro de análise da variância do Experimento 4. Variável número de calos induzidos com porções embriogênicas.

F.V.	GL	Soma Quadr.	Quadr. Médio	Valor F	Pr > F
MEIO	2	9.72	4.86	3.44	0.0438
Erro	33	46.58	1.41		
Total	35	56.30			
C.V. 19.35	Média	6.13			

Tabela 24. Quadro de análise da variância do Experimento 4.
Variável peso fresco de calos selecionados para o isolamento.

F.V.	GL	Soma Quadr.	Quadr. Médio	Valor F	Pr > F
MEIO	2	653622.22	326811.11	9.09	0.0007
Erro	33	1186400.00	35951.51		
Total	35	1840022.22			
C.V.	21.84	Média	867.77		

As duas variáveis apresentaram diferenças significativas estatisticamente, ou seja, o meio afeta o número de calos com porções embriogênicas e o peso dos calos selecionados para o isolamento.

Nota-se que quando se fez a análise estatística de variáveis de mensuração mais precisa, p.ex. peso, obtém-se confirmação daquilo observado em laboratório. Os três meios, mesmo tendo sido selecionados com o mesmo objetivo, apresentaram diferenças que segundo esta última análise são significativas estatisticamente. Este resultado permite inferir que, talvez, a adoção da variável número de calos com porções embriogênicas seja mais adequada ao modelo estatístico adotado, do que a número de calos embriogênicos. Poderiam haver fatores desconhecidos que interfeririam na indução de calos totalmente embriogênicos mas que não interfeririam na indução de porções embriogênicas, e estes

fatores desconhecidos estariam, uma vez não isolados, aumentando a variação devida ao erro experimental.

Os resultados da Tabela 25 indicam que o meio N₆ suplementado com 4 mg/l de 2,4-D combinado com 2,5 mM de L-prolina produziu um maior peso fresco de calos por placa, porém, quando avaliado o número de calos produzidos, não se diferencia do meio N₆ com 2 mg/l de 2,4-D combinado com 1,0 g/l de caseína hidrolisada. O meio N₆ com 2 mg/l de 2,4-D combinado com 0,5 g/l de caseína hidrolisada apresentou o pior comportamento em ambas variáveis.

Tabela 25. Médias do número de calos com porções embriogênicas e do peso dos calos selecionados para o isolamento do Experimento 4.

MEIOS	Obs	----CALOS----		----PESO-----	
		Médias	DMRT	Médias	DMRT
N ₆ (2mg/l 2,4-D + 1,0g/l CH)	12	6.00	A B	713.33	B
N ₆ (4mg/l 2,4-D + 2,5 mM Pr)	12	6.83	A	1041.67	A
N ₆ (2mg/l 2,4-D + 0,5g/l CH)	12	5.58	B	848.33	B

DMRT - Médias na coluna com a mesma letra não diferem significativamente para um valor de Alpha = 0,05.

De uma maneira geral, os calos de origem escutelar foram facilmente induzidos a partir de embriões maduros. Raras vezes foram observados calos de outra origem (p.ex. de raízes). Em 10 dias já observava-se multiplicação de células do escutelo (Figura 4A). Normalmente os calos encontrados foram heterogêneos (Figura 4B). Calos embriogênicos de ótima qualidade foram induzidos a uma freqüência de até 25% no cultivar IAC-165 (meio B5 com 2 mg/l de 2,4-D e 5 mM de L-prolina), e de até 7,1% no IAC-201 (meio N₆ com 2 mg/l de 2,4-D e 0,5 mg/l de caseína hidrolisada). A freqüência para o cultivar IAC-165 foi compatível com o valor mínimo obtido por WU & ZAPATA (1992), 20%, e a obtida pelo IAC-201 foi abaixo. Isto explica-se, provavelmente, pelo fato desses autores terem utilizado um tecido mais jovem como explante, embriões imaturos. Os tecidos mais jovens são menos especializados e portanto têm uma maior facilidade de voltarem ao estado embriogênico. Além disso, os autores utilizaram meio solidificado com agarose e proporcionaram condições de troca gasosa no frasco usado na indução dos calos.

A presença de estruturas globulares (Figura 4C), semelhantes a embrióides, foi observada em calos embriogênicos, o que está de acordo com o observado por NAKAMURA & MAEDA (1989).

A freqüência de indução de calos embriogênicos a partir de embriões maduros é tida como baixa, o que explica a recomendação do subcultivo destes calos para aumentá-los em número sem a necessidade de inocular-se muito material. O subcultivo prolongado

de calos aumenta a probabilidade de ocorrerem variações genéticas indesejáveis, razão pela qual deve-se procurar sistemas eficientes de indução de calos embriogênicos primários. Os resultados obtidos demonstram que um trabalho criterioso de escolha de meios de indução pode levar a obtenção de calos embriogênicos primários derivados de sementes, em qualidade e número suficientes para o início de suspensões celulares ou isolamento direto de protoplastos.

4.5. Início e manutenção de suspensões celulares

Os cultivares adotados neste trabalho, principalmente o IAC-165, não apresentam genealogia totalmente conhecida, nem tampouco estão classificados em japônica ou índica. Segundo GLASZMANN (1987), os cultivares americanos são, provavelmente, japônicas tropicais, apresentando um grau de dificuldade para trabalhos "in vitro" intermediário aos de japônicas e índicas.

Nos trabalhos realizados não foi encontrada dificuldade para o estabelecimento de suspensões celulares para os dois cultivares selecionados. Calos de aspecto embriogênico, 2 a 3 gramas inoculados em 30 ml de meio R2 ou GM, foram suficientes para iniciar suspensões celulares.

Calos que se originam da periferia do calo inicial, friáveis, foram os mais adequados. Uma seleção rigorosa para calos embriogênicos mostrou-se altamente responsiva no rápido estabelecimento de suspensões ricas em células esféricas e de alto conteúdo citoplasmático.

A inoculação de calos primários inteiros, não raro, causou oxidação do meio e medidas de esboroamento dos mesmos foram necessárias a intervalos de 7 a 10 dias. Esta tarefa torna mais laboriosa a obtenção de suspensões e aumenta os riscos de

contaminação. A aparente facilidade em não selecionar os calos reflete-se em mais trabalho no futuro e baixa eficiência.

Suspensões celulares que apresentaram oxidação foram descartadas. Medidas de encurtamento do período de subcultivo não mostraram-se eficientes para amenizar os efeitos da oxidação.

Mesmo algumas suspensões oriundas de calos selecionados necessitaram de medidas de esboroamento dos agregados. O uso de peneiras metálicas ou de bastão de vidro mostrou-se eficiente para tal trabalho. Após o esboroamento, tornou-se necessário encurtar o período de subcultivo para rigorosamente 4 dias. Quando tal procedimento não era feito, em geral a oxidação, oriunda provavelmente da morte de um grande número de células, causava a perda do frasco.

Subcultivos de 5 a 7 dias mostraram-se eficientes no primeiro mês do estabelecimento das suspensões, raros foram os casos de oxidação, porém foram obtidas respostas melhores quando observado rigorosamente um prazo de 5 dias.

Para manutenção, prazos de subcultivo de até 14 dias não causaram danos aparentes nas suspensões, porém, para isolamento de protoplastos foi observado no mínimo 3 subcultivos de rigorosamente 7 dias, antes do isolamento.

Observações periódicas em microscópio invertido de amostras retiradas dos frascos foram imprescindíveis para avaliação do tipo de células e progresso obtido com a seleção.

Suspensões celulares estabelecidas mostraram-se amareladas e com tendência a formar grumos maiores. Estes grumos, quando da seleção, eram descartados. O tamanho do grumo selecionado foi limitado pela abertura da pipeta que foi utilizada na seleção. As pipetas normais encontradas em laboratório não são adequadas para esta tarefa, pipetas de abertura larga (3 mm) mostraram-se eficientes para a execução do trabalho.

Em geral suspensões celulares foram obtidas, prontas para o isolamento, em 4 meses. Quando os calos foram subcultivados (30 dias) e selecionados a cada subcultivo, por no mínimo 3 meses, as suspensões derivadas destes calos estavam aptas ao isolamento em até 30 dias. Considerando o trabalho de manipulação de suspensões e o risco de contaminação, o subcultivo dos calos por até 3 meses em meio semi-sólido, seguido de somente 1 mês de manipulação da suspensão celular, parece vantajoso quando comparado a 4 meses de manipulação em meio líquido. Nas suspensões derivadas de calos subcultivados e selecionados nenhum tipo de oxidação foi observado e medidas de esboroamento não foram necessárias.

4.6. Isolamento de protoplastos

4.6.1. Calos primários

Calos cuidadosamente selecionados (FIGURA 4D) sob estereoscópio foram capazes de liberar uma média de $6,3 \times 10^6$ prot./g calo (peso fresco) para o cultivar IAC-165 e $8,0 \times 10^6$ prot/g calo (peso fresco) para o cultivar IAC-201. Estes valores são médias dos 3 meios selecionados para indução de calos (Tabela 26). Os protoplastos obtidos eram pequenos (20 a 25 μm) e de citoplasma denso (Figura 5A).

Tabela 26. Número médio de protoplastos obtidos por cultivar e por meio de indução de calos.

Cultivar	Meio de indução	Nº prot./g calo (peso fresco) ^a
IAC-201	N ₆ (2mg/l 2,4-D + 1,0g/l CH)	$8,5 \times 10^6$
IAC-201	N ₆ (4mg/l 2,4-D + 2,5 mM Pr)	$7,2 \times 10^6$
IAC-201	N ₆ (2mg/l 2,4-D + 0,5g/l CH)	$8,4 \times 10^6$
IAC-165	MS(4mg/l 2,4-D + 2,5 mM Pr)	$6,3 \times 10^6$
IAC-165	N ₆ (4mg/l 2,4-D + 1,0g/l CH)	$5,7 \times 10^6$
IAC-165	B5(2mg/l 2,4-D + 5,0 mM Pr)	$6,9 \times 10^6$

a: os valores são médias de 3 isolamentos independentes.

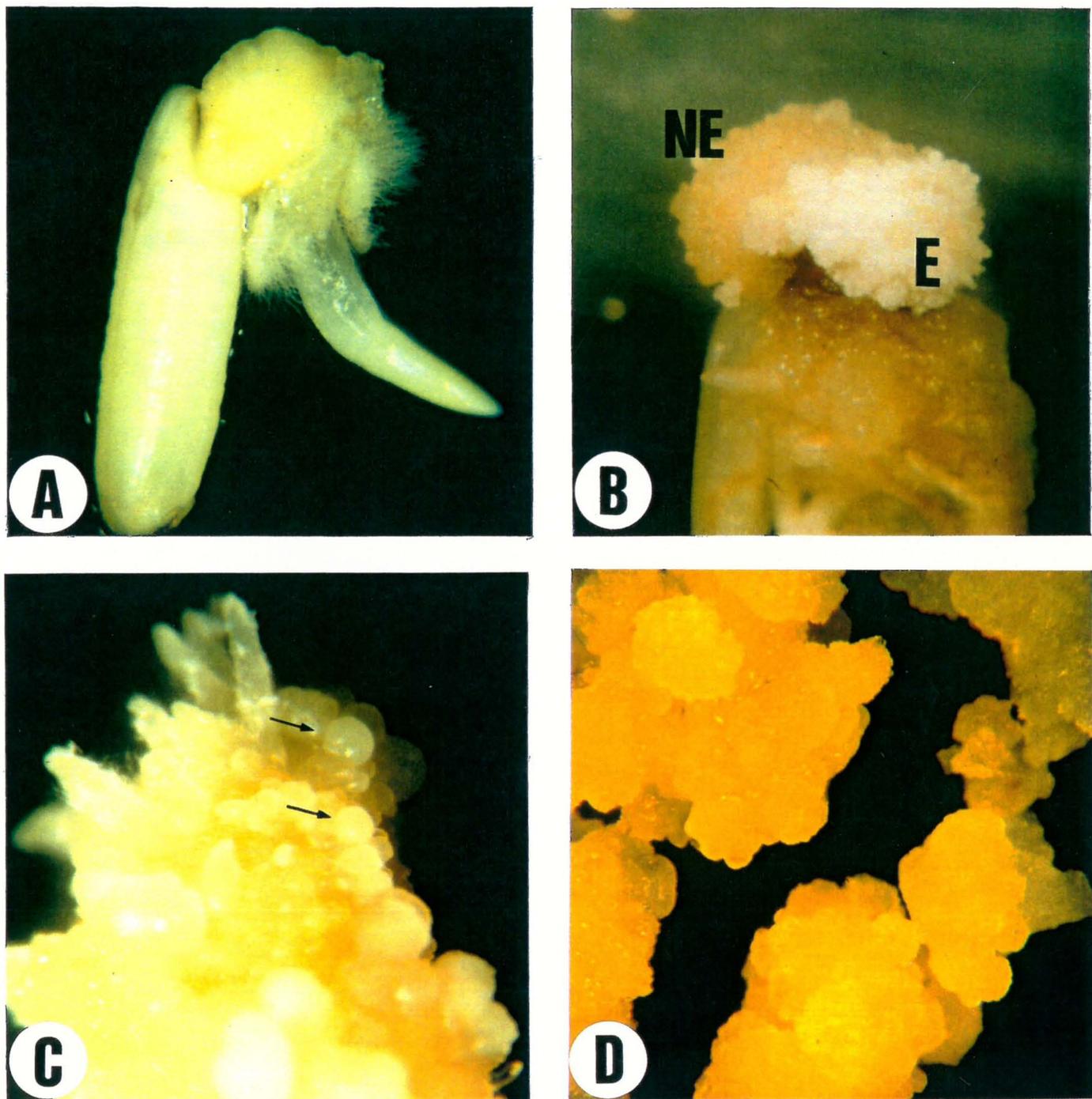


Figura 4. Indução de calos em arroz. A) Calo de origem escutelar induzido a partir de embrião maduro. B) Calo com porção embriogênica (E) e não embriogênica (NE). C) Estruturas semelhantes a embriões (setas). D) Calos selecionados para o isolamento de protoplastos.

Nenhuma diferença entre os meios de indução foi observada quanto a capacidade de liberar protoplastos. Acredita-se que pelo fato do processo de seleção ter sido rigoroso, existe uma maior probabilidade de uniformização dos resultados. O número de protoplastos liberados é superior àquele obtido por WU & ZAPATA (1992) e por Lee *et al.* (1989). Podem estar envolvidos diversos fatores: desde a simples metodologia de contagem até o tempo da digestão enzimática.

Esta é a primeira vez que se demonstra o isolamento de tal número de protoplastos derivados de calos primários em arroz induzidos a partir de embriões maduros (sementes). A utilização de sementes para a indução de calos elimina a etapa de crescimento das plantas para a obtenção dos embriões imaturos, facilita as medidas de assepsia e possibilita que os trabalhos sejam conduzidos independentemente das condições climáticas serem ou não adequadas ao crescimento das plantas.

4.6.2. Suspensões celulares

Amostras retiradas de frascos de suspensões celulares após 4 dias do último subcultivo, mostraram-se adequadas para isolar até 1×10^7 protoplastos por grama (peso fresco) de células.

A utilização de um meio de pré-tratamento, diferente do meio de manutenção da suspensão celular foi testada em linhagens celulares do cultivar IAC-165. O meio é denominado de pré-tratamento por ser utilizado somente no último subcultivo antes do tratamento das células com a solução enzimática. Na Tabela 27 estão os resultados do número de protoplastos obtidos em diferentes meios de pré-tratamento.

Tabela 27. Número médio de protoplastos por grama de suspensão celular (peso fresco) em diferentes meios de pré-tratamento.

Meio pré-trat.	Nº prot./g susp.cel.(peso fresco) ^a
R2 (controle)	$9,12 \times 10^6$
R2 + 5 mM Pr	$9,42 \times 10^6$
R2 + 10mM Pr	$9,42 \times 10^6$
AA	$14,66 \times 10^6$

a: Médias de pelo menos 2 isolamentos independentes.

A exceção do meio AA, o qual aumentou a produção de protoplastos em mais de 50%, os demais tiveram comportamento similar. Foi observado nos protoplastos liberados um maior número de fusões quando tratados com meio AA. O menor número de fusões foi encontrado no meio R2 com 10 mM de L-prolina. O tratamento com meio AA produziu protoplastos uniformes em termos de qualidade, ou seja, raramente observava-se protoplastos débeis ou com grandes vacúolos.

Linhagens celulares do cultivar IAC-201 mostraram-se mais produtivas quando do isolamento de protoplastos. Quando tratadas com meio AA, quatro dias antes do isolamento, chegaram a produzir 40×10^6 prot/g suspensão celular (peso fresco). Igualando-se em qualidade aos observados no cultivar IAC-165.

4.7. Cultivo de protoplastos

4.7.1. Calos

O sistema adotado para cultivo dos protoplastos mostrou-se eficiente para ambos os cultivares ensaiados e uma densidade de plaqueamento de 5×10^5 prot/ml produziu os melhores resultados.

A utilização de uma ou outra linhagem de células auxiliares ("nurse cells") não produziu resultados diferentes. Suspensões celulares de 5 a 7 dias do último subcultivo foram usadas; a este tempo, as células mostravam-se altamente embriogênicas e agregadas em grumos aptos a passarem por pipetas Pasteur ($\phi = 2\text{mm}$).

Nas primeiras 24 h de cultivo, os protoplastos mostravam-se com um pequeno aumento de volume e, aos 3 dias já percebia-se atividade citoplasmática (Figura 5B). Aos 4 dias muitos apresentavam mudança de forma e intensa atividade citoplasmática (Figura 5C). Células de conteúdo citoplasmático denso foram capazes de sustentar divisão (2 células, Figura 5D e 4 células, Figura 5E), formando colônias embriogênicas compactas aos 15 dias de cultivo (Figura 5F).

A observação de atividade citoplasmática e mudança de forma como a apresentada na Figura 5B, com núcleo centralizado e

fluxo citoplasmático (Figura 5B - seta), foi indicativo da capacidade dos protoplastos iniciarem e manterem divisões até a formação de colônias. Em protoplastos que não apresentaram citoplasma denso e tal atividade citoplasmática, não foi observada divisão celular.

Foram testados diferentes meios básicos, e os açúcares maltose e sacarose como agentes osmóticos no cultivo de protoplastos. Os resultados quanto ao tempo de vida dos protoplastos em meio de cultivo (observação visual) e a ocorrência de divisão estão apresentados na Tabela 28.

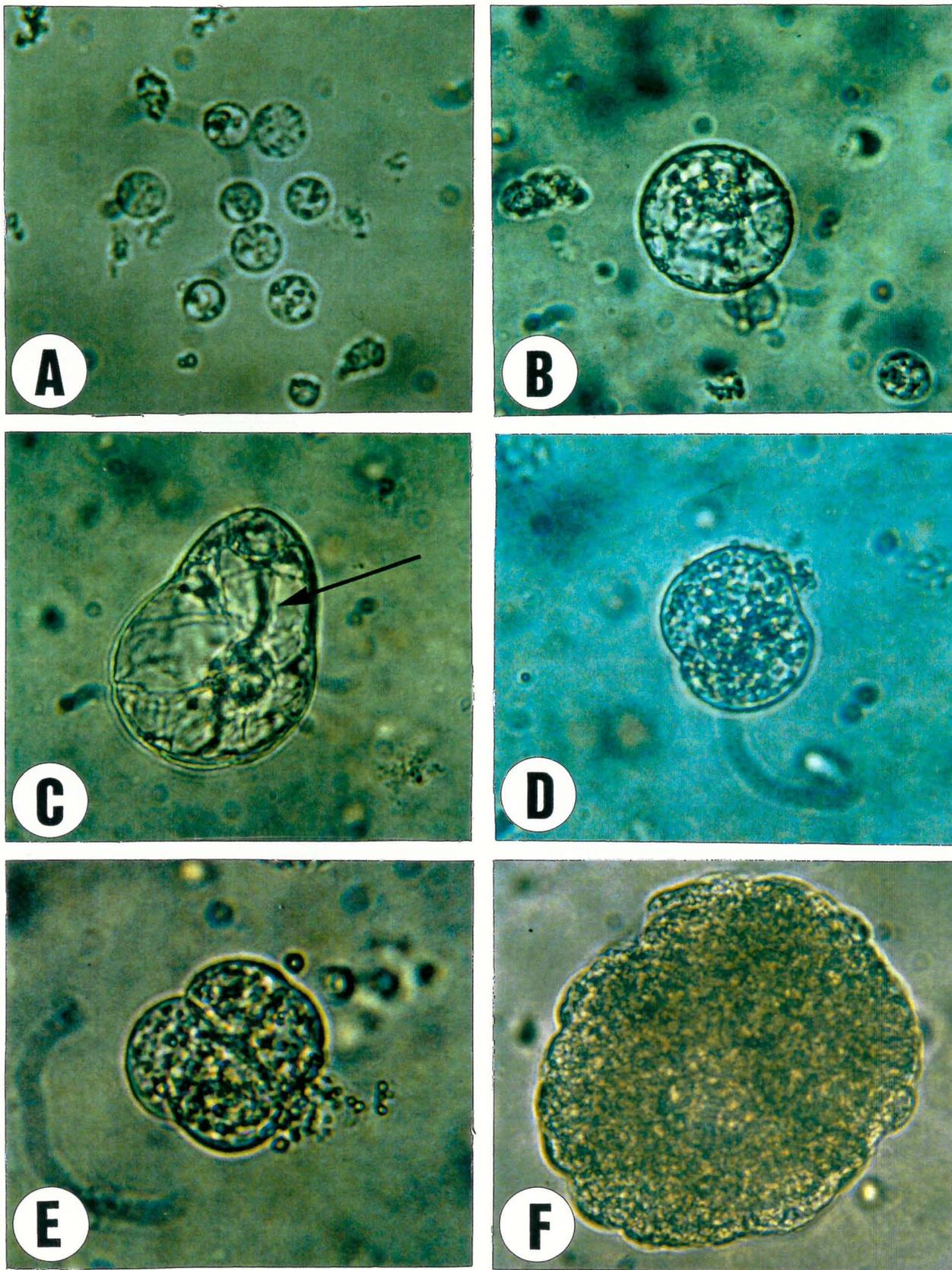


Figura 5. Formação de colônias embriogênicas a partir de protoplastos. A) Protoplastos recém-isolados. B) 3 dias após o isolamento. C) Célula com mudança de forma e atividade citoplasmática (seta). D) 1ª divisão. E) 2ª divisão. F) Colônia embriogênica.

Tabela 28. Tempo de vida em meio de cultivo e ocorrência de divisão celular de protoplastos derivados diretamente de calos em diferentes meios com diferentes agentes osmóticos.^a

MEIO (açúcar)	Cultivar	Tempo de vida (horas)	Ocorrência de divisão
GM Maltose	IAC-201	24	não ocorreu
	IAC-165	24	não ocorreu
GM Sacarose	IAC-201	00	não ocorreu
	IAC-165	00	não ocorreu
N ₆ Maltose	IAC-201	→	raramente
	IAC-165	→	raramente
N ₆ Sacarose	IAC-201	00	não ocorreu
	IAC-165	00	não ocorreu
R2 Maltose	IAC-201	→	ef.plaq. 0.01%
	IAC-165	→	ef.plaq. 0.01%
R2 Sacarose	IAC-201	24	não ocorreu
	IAC-165	24	não ocorreu
Kpr	IAC-201	00	não ocorreu
	IAC-165	00	não ocorreu

a: observações de pelo menos 3 isolamentos independentes.

Como pode ser observado na tabela 28, não ocorreram divisões em meios utilizando sacarose como "osmoticum". A observação de divisões celulares sendo dependentes da utilização de um determinado tipo de fonte de carbono está de acordo com os resultados encontrados por TORIYAMA & HINATA (1985), ABDULLAH *et*

al. (1986) e AMINO & TAZAWA (1988). Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de maltose como agente osmótico, isto está de acordo com o observado por ELLA & ZAPATA (1992) e GHOSH BISWAS & ZAPATA (1993). O meio que apresentou melhor resposta foi o R2, tanto em sobrevivência dos protoplastos, quanto em ocorrência de divisão. O meio Kpr, apesar da riqueza de componentes não apresentou o desempenho observado por WU & ZAPATA (1992).

Para experimentos posteriores foram adotadas variantes do meio R2, utilizando como "osmoticum" 0,4 M de maltose. O meio R2 é uma simplificação do meio B5, onde foram alteradas as proporções das fontes de nitrogênio e omitidas algumas vitaminas. Por este motivo, buscou-se adicionar ao meio original diferentes combinações de vitaminas. Testou-se o meio R2 com vitaminas de MS (KYOZUKA *et al.*, 1987) e R2 com 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina e 100 mg/l de inositol. Na tabela 29 estão os resultados referentes ao emprego destes novos meios.

A eficiência de plaqueamento obtida no meio R2 com inositol e o maior suplemento de vitaminas, mostrou-se claramente superior, tanto para IAC-201 quanto para o IAC-165. Em dois experimentos testou-se a adição de 5 mM de L-prolina ao meio R2. Observou-se que a resposta nestes meios com L-prolina nunca foi superior ao meio R2 com vitaminas de MS; portanto, muito aquém dos resultados obtidos com o melhor meio.

Tabela 29. Eficiência de plaqueamento de protoplastos derivados diretamente de calos em três variações do meio R2.

Meio	Cultivar	Efic. Plaqueamento (%) ^a
R2 (controle)	IAC-201	0,06
	IAC-165	0,04
R2 + vit MS	IAC-201	0,41
	IAC-165	0,40
R2 + 1mg/l Ac.Nicot.+ + 1mg/l Piridoxina + + 100mg/l Inositol	IAC-201	0,88
	IAC-165	0,60

a: Médias de no mínimo 3 isolamentos independentes.

Valores de eficiência de plaqueamento da ordem de 0,6 e 0,8% são compatíveis com os obtidos por WU & ZAPATA (1992). Estes valores podem ser demonstrados pelas Figuras 6A e 6B.

Micro-calos puderam ser observadas a olho nú em 15 a 20 dias. Estes micro-calos, quando colocados em meio de crescimento, produziram calos que aos 35 - 40 dias após o isolamento estavam aptos a serem inoculados em meio de regeneração (Figura 6C e 6D).

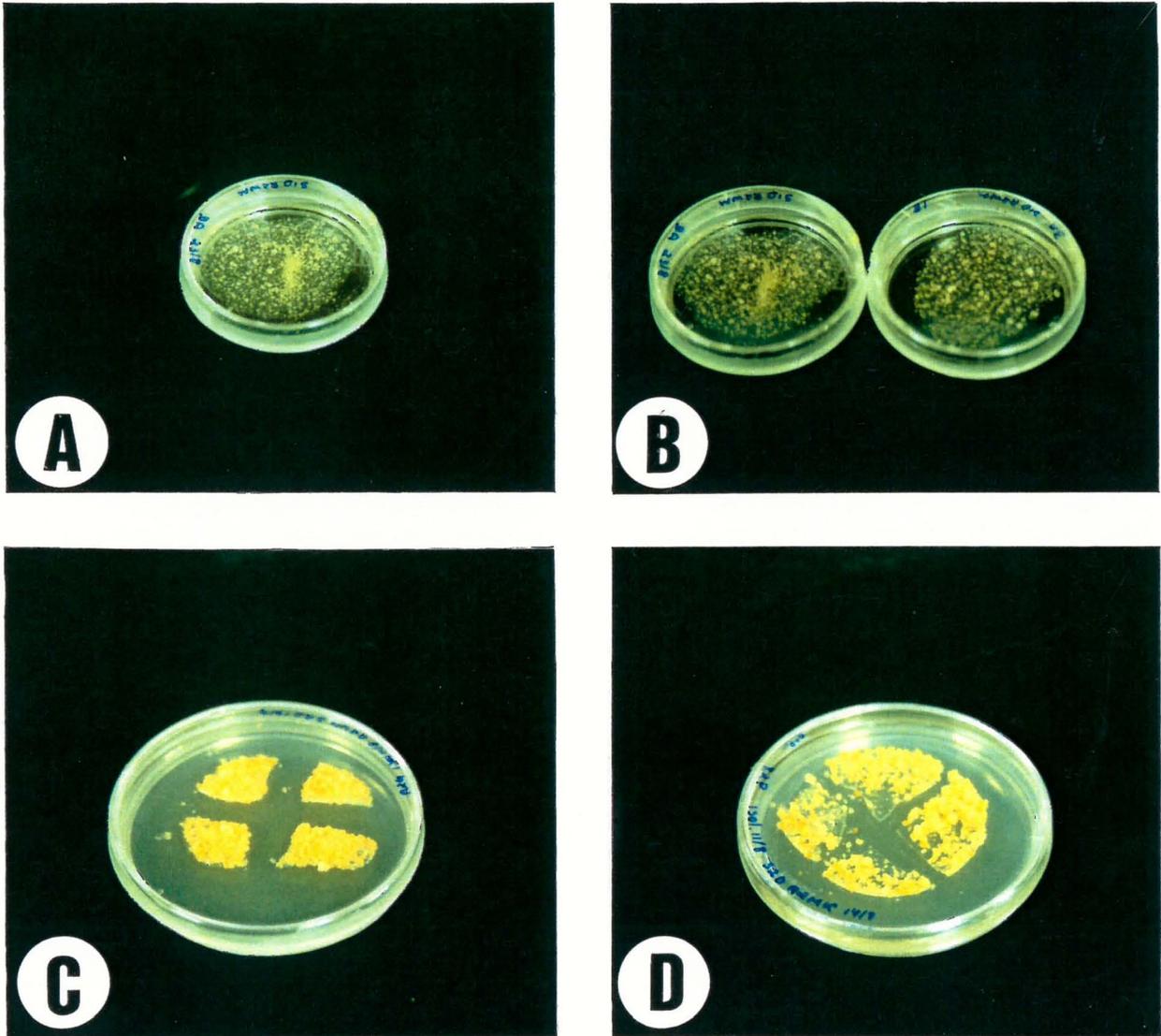


Figura 6. Cultivo de microcalos e calos derivados de protoplastos. A e B) Microcalos immobilizados em blocos de agarose (20 dias após o isol.). C e D) Calos multiplicando-se em meio semi-sólido (35 dias após o isol.).

4.7.2. Suspensões celulares

Embora se tenha testado os mesmos meios utilizados para cultivo de protoplastos derivados de calos, a eficiência de plaqueamento obtida em protoplastos derivados de suspensões celulares nunca esteve compatível com as já obtidas por outros autores. Os maiores valores obtidos foram no meio R2 com vitaminas de MS e não foram superiores a 0,05%, o que é baixo quando comparado com o obtido por KYOZUKA *et al.* (1987), 4,2% e por LI & MURAI (1990), 7,3%. Em um isolamento para avaliar a eficiência da manipulação dos protoplastos, utilizou-se a suspensão celular IR52 como doadora de protoplastos. Neste isolamento observou-se valores da ordem de 2 a 2,5% de eficiência de plaqueamento.

A obtenção de resultados positivos no sistema de isolamento de protoplastos diretamente de calos canalizou os trabalhos nesta direção, abandonando-se os isolamentos a partir de suspensões celulares, porém acredita-se, principalmente pelos resultados obtidos com a suspensão celular IR52, que o sistema necessita de pequenos ajustes para também possibilitar êxito através de suspensões celulares.

4.8. Regeneração de plantas a partir de calos derivados de protoplastos isolados diretamente de calos

Os calos inoculados em meio de regeneração mostraram pontos verdes e pequenas plântulas em duas semanas de exposição a luz (Figura 7A).

Existem somente dois trabalhos que relatam a regeneração de plantas a partir de calos primários (LEE *et al.*, 1989 e WU & ZAPATA, 1992). Nestes dois trabalhos foram utilizados como explante para a indução de calos embriões imaturos, portanto este é o primeiro trabalho que relata a regeneração de plantas a partir de calos primários derivados de embriões maduros (sementes).

O meio MS sem reguladores e com a metade dos sais, vitaminas e sacarose mostrou-se eficiente para o crescimento das plantas e desenvolvimento de raízes (Figura 7B e 7C). Aparentemente o meio semi-sólido desenvolveu um sistema radicular mais volumoso e facilitou o perfilhamento das pequenas plantas "in vitro", porém ambos meios produziram plantas que desenvolveram um sistema radicular e parte aérea vigorosas, quando colocadas em casa de vegetação em solução de Hoagland e Snyder diluída 5 vezes (Figura 7D).

Os resultados obtidos com relação a regeneração de plantas estão na Tabela 30. Não foi observada regeneração de plantas nos meios com ágar como agente gelificante.

Tabela 30. Número de calos inoculados, número de calos com plantas e número de plantas regeneradas a partir de calos primários em diferentes meios de regeneração, para cada um dos cultivares trabalhados.

Cultivar	Meio ^a	Nº calos inoculados	Nº calos com plantas	Nº de plantas regeneradas
IAC-201	MSB	57	7 (12,3%)	17
	MSC	51	3 (5,8%)	13
	MSD	45	1 (2,2%)	4
IAC-165	MSB	66	11 (16,6%)	27
	MSC	51	7 (13,7%)	27
	MSD	73	9 (12,3%)	14
	R2E	12	2 (16,6%)	2
	N ₆ F	27	6 (22,2%)	8
	MSG	60	13 (21,6%)	25
	MS $\frac{1}{2}$	12	2 (16,6%)	2
TOTAL				139

a: Semi-sólido com 0,6% de agarose Sigma tipo II.

As maiores taxas de regeneração foram 22,2% e 12,3%, para o cultivar IAC-165 e IAC-201 respectivamente. Os meios MSB e MSG, combinações de 3 reguladores (NAA, KIN e BAP), apresentaram os melhores resultados para IAC-201 e IAC-165 respectivamente. Doses elevadas do regulador cinetina, meios MSC e MSD, não produziram

bons resultados, principalmente no cultivar IAC-201. Aparentemente o efeito combinado de duas citocininas (KIN e BAP) favorece a regeneração de plantas.

A regeneração de plantas mostrou-se dependente do uso de um agente gelificante mais purificado. A inobservância de regeneração de plantas em meios semi-sólidos com 0,8% de ágar, e a observação de até 22% de regeneração em meios com agarose comprovam este fato.

A solução nutritiva de Hoagland e Snyder, diluída 5 vezes, mostrou bons resultados para o crescimento das plantas em casa de vegetação. Plantas com somente uma raiz puderam desenvolver-se normalmente e formar um sistema radicular adequado a transferência para vasos em 30 dias. A transferência de plantas para vasos não acarretou perdas.

O protocolo proposto por este trabalho permite a regeneração de plantas a partir de protoplastos derivados de calos primários de dois importantes cultivares de arroz brasileiros. Em no máximo 120 dias, obteve-se plantas de até 5 cm de comprimento, saudáveis e com capacidade de crescerem e serem postas em vasos na casa de vegetação.

O sistema aqui apresentado permitirá que estudos em transformação genética possam ser feitos, e que futuramente genes

de importância agronômica possam ser incorporados a dois cultivares de arroz que são atualmente plantados no Brasil. A metodologia desenvolvida poderá também ser estendida a outros cultivares o que amplia as possibilidades de trabalhos em transformação genética.

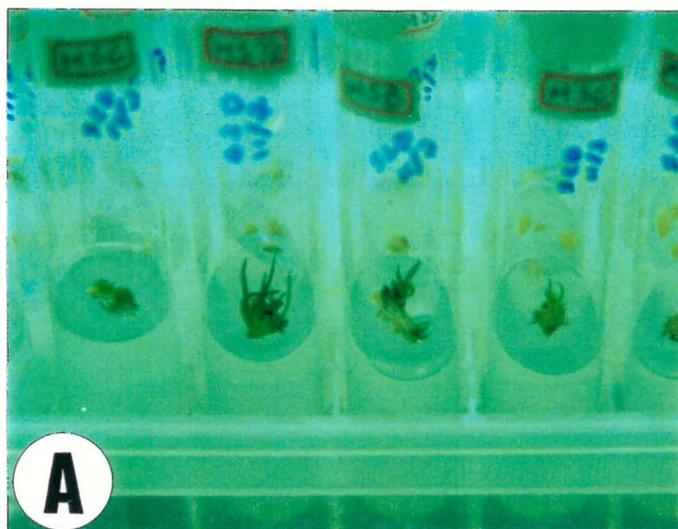


Figura 7. Regeneração e crescimento de plantas derivadas de protoplastos. A) Calos em meio de regeneração com pontos verdes e pequenas plântulas. B) Plântulas em meio líquido. C) Plântulas em meio semi-sólido. D) Plantas crescendo na casa de vegetação em solução nutritiva.

5. CONCLUSÕES

Os resultados e observações apresentados neste trabalho permitem, para os dois genótipos estudados, as seguintes conclusões:

É viável a utilização de embriões maduros (sementes) para a obtenção de calos primários embriogênicos em número e qualidade suficientes para o isolamento de protoplastos capazes de regenerarem plantas.

Seguindo-se o protocolo proposto, é possível em, no máximo 120 dias, regenerar plantas de protoplastos derivados de calos primários.

Este trabalho demonstra, pela primeira vez, a possibilidade de regenerar plantas a partir de protoplastos de cultivares de arroz brasileiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, R.; COCKING, E.C.; THOMPSON, J.A. Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. *Bio/Technology*, New York, 4:1087-90, 1986.
- ADKINS, S.W.; SHIRAISHI, T.; MCCOMB, J.A. Rice callus physiology - identification of volatile emissions and their effects on culture growth. *Physiologia Plantarum*, Kobenhavn, 78:526-31, 1990.
- ALDEMITA, R.R. & ZAPATA, F.J. Proline and high NH_4^+ concentration on the anther culture of rice. *Kimika*, Quezon City, 7:31-6, 1991.
- AMINO, S. & TAZAWA, M. Uptake and utilization in cultured rice cells. *Plant and Cell Physiology*, Tokyo, 29:483-7, 1988.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1961, Rio de Janeiro, 22:252. 1961.
- BABA, A.; HASEHAWA, S.; SYONO, K. Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *Plant and Cell Physiology*, Tokyo, 27:463-71, 1986.

- BOHLMANN, H. The role of thionins in plant protection. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, 13:1-16, 1994.
- BOISSOT, N.; VALDEZ, M.; GUIDERDONI, E. Plant regeneration from leaf and seed derived calli and suspension cultures of the african perennial wild rice *Oryza longistaminata*. **Plant Cell Reports**, New York, 9:447-50, 1990.
- CHU, C. The N₆ medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978. **Proceedings**. Peking, Academia Sinica, 1978. p.43-50.
- COCKING, E.C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. **Nature**, London, 187:962-3, 1960.
- COCKING, E.C. Concluding remarks and outlook. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R.; CIFFERRI, O. **Plant Cell Cultures: Results and Perspectives**. Oxford, Elsevier, 1980. p.419-25.
- COULIBALY, M.Y. & DEMARLY, Y. Regeneration of plantlets from protoplasts of rice, *Oryza sativa* L.. **Zeitschrift für Pflanzenzuchtung**, New York, 96:79-81, 1986.

DATTA, K.; POTRYKUS, I.; DATTA, S.K. Efficient fertile plant regeneration from protoplasts of the indica rice breeding line IR72 (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Reports**, New York, 11:229-33, 1992.

DATTA, S.K.; DATTA, K.; POTRYKUS, I. Fertile indica rice plants regenerated from protoplasts isolated from microspore derived cell suspensions. **Plant Cell Reports**, New York, 9:253-6, 1990.

ELLA, E.S. & ZAPATA, F.J. Effect of maltose and gelling agent on protoplast culture response in indica rice. **International Rice Research Newsletter**, Manila, 17:5-6, 1992.

EMONS, A.M.C.; SAMALLO-DROPPERS, A.; TOORN, C.van. The influence of sucrose, mannitol, L-proline, abscisic acid and gibberellic acid on the maturation of somatic embryos of *Zea mays* L. from suspensions cultures. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, 142:597-604, 1993.

FAO - QUATERLY BULLETIN OF STATISTICS - 1993, 6:22, 1993.

FUJIMURA, T.; SAKURAI, M.; AKAGI, H.; NEGISHI, T.; HIROSE, A. Regeneration of rice plants from protoplasts. **Plant Tissue Culture Letters**, Amsterdam, 2:74-5, 1985.

FREARSON, E.M.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. The isolation, culture and regeneration of petunia leaf protoplasts. **Developmental Biology**, New York, 33:130-7, 1973.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, 50:151-8, 1968.

GHOSH BISWAS, G.C. & ZAPATA, F.J. Callus formation and plant regeneration from protoplasts derived from suspension culture of rice (*Oryza sativa* L. cv. 'Taipei 177'). **Plant Breeding**, Berlin, 105:95-100, 1990.

GHOSH BISWAS, G.C. & ZAPATA, F.J. Morphogenesis in anther-derived cell suspension protoplast of indica rice (*Oryza sativa* L. cv. Tetep). **Journal of Genetic & Breeding**, Roma, 45:301-6, 1991.

GHOSH BISWAS, G.C. & ZAPATA, F.J. High-frequency plant regeneration from protoplasts of indica rice (*Oryza sativa* L.) using maltose. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, 141:470-5, 1993.

GHOSH BISWAS, G.C.; BURKHARDT, P.K.; WÜNN, J.; KLÖTI, A.; POTRYKUS, I. Fertile indica rice plants regenerated from protoplasts isolated from scutellar tissue of immature embryos. *Plant Cell Reports*, New York, 13:528-32, 1994.

GLASZMANN, J.C. Isozymes and classification of Asian rice varieties *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 74:21-30, 1987.

GRIMES, H.D. & HODGES, T.K. The inorganic $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, 136:362-7, 1990.

GUPTA, H.S. & PATTANAYAK, A. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). *Bio/technology*, New York, 11:90-4, 1993.

HEWITT, E.J. Sand and water culture methods used in study of plant nutrition. East Malling, Commonwealth Agriculture Bureaux, 1966. 547p.

KANDA, M.; KIKUCHI, S.; TAKAIWA, F.; OONO, K. Regeneration of variant plants from rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts derived from long term cultures. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, 63:127-36, 1988.

KAO, K.N. & MICHAYLUK, M.R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. **Planta**, Berlin, 126:105-11, 1975.

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, 135:184-90, 1989.

KYOZUKA, J.; HAYASHI, Y.; SHIMAMOTO, K. High planta regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. **Molecular & General Genetics**, Berlin, 206:408-13, 1987.

KYOZUKA, J.; OTOO, E.; SHIMAMOTO, K. Plant regeneration from protoplasts of indica rice: genotypic differences in culture response. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, 76:887-90, 1988.

- LAST, D.I. & BRETTELL, R.I.S. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. **Plant Cell Reports**, New York, 9:14-6, 1990.
- LEE, L.; SCHROLL, R.E.; GRIMES, H.D.; HODGES, T.K. Plant regeneration from indica rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts. **Planta**, Berlin, 178:325-33, 1989.
- LI, Z. & MURAI, N. Efficient plant regeneration from rice protoplasts in general medium. **Plant Cell Reports**, New York, 9:216-26, 1990.
- LI, Z.; XIE, Q.; RUSH, M.C.; MURAI, N. Fertile transgenic plants generated via protoplasts from the U.S. cultivar Labelle. **Crop Science**, Madison, 32:810-4, 1992.
- LINSMAIER, E.M. & SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, 8:100-27, 1965.
- MASUDA, K.; KUDO-SHIRATORI, A.; INOUE, M. Callus formation and plant regeneration from rice protoplasts purified by density gradient centrifugation. **Plant Science**, Amsterdam, 62:237-46, 1989.

- MIZE, C.W. & CHUN, Y.W. Analysing treatment means in plant tissue culture research. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 13:201-17, 1988.
- MENDOZA, A.B. & FUTSUHARA Y. Histological observations on plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Japanese Journal of Breeding*, Mishima, 42:33-41, 1992.
- MÜLLER, A.J. & GRAFE, R. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. *Molecular & General Genetics*, Berlin, 161:67-76, 1978.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologie Plantarum*, Kobenhavn, 15:473-97, 1962.
- NAKAMURA T. & MAEDA, E. A scanning electron microscope study on japonica type rice callus cultures, with emphasis on plantlet initiation. *Japanese Journal of Crop Science*, Tokyo, 58:395-403, 1989.
- OGURA, H.; KYOZUKA, J.; HAYASHI, Y.; KOBAYASHI, T.; SHIMAMOTO, K. Field performance and cytology of protoplast-derived rice (*Oryza sativa* L.); high yield and low degree of variation of four japonica cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 74:670-6, 1987.

OHIRA, K.; OJIMA, K.; FUJIWARA, A. Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple defined medium of rapid growth in suspension culture. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, **14**:1113-21, 1973.

OSAWA, K. & KOMAMINE, A. Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, **77**:205-11, 1989.

RENSBURG, L.van.; KRÜGER, G.H.J.; KRÜGER, H. Proline accumulation as drought-tolerance selection criterion: its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum* L.. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, **141**:188-94, 1993.

RIO GRANDE DO SUL (estado) Secretaria da Agricultura.
Melhoramentos da Rizicultura no Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Oficinas Gráficas da Imprensa Oficial, 1946. 208 p.

RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, **28**:425-49, 1990.

STATISTICS ANALYSIS SYSTEM/SAS INSTITUTE INC. **SAS USER'S GUIDE:**

STATISTICS. 5 ed. Cary, SAS Institute Inc., 1985. 956p.

SCHMITZ, U. & LÖRZ, H. Nutrient uptake in suspension cultures of gramineae. I. Development of an assay system. **Plant Science**, Amsterdam, **66**:87-94, 1990.

SHILLITO, R.D.; PASZKOWSKI, J.; POTRYKUS, I. Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. **Plant Cell Reports**, New York, **2**:244-7, 1983.

SHILLITO, R.D.; CARSWELL, G.K.; JOHNSON, C.M.; DIMAIO, J.J.; HARMS, C.T. Regeneration of fertile plants from protoplasts of elite inbred maize. **Bio/Technology**, New York, **7**:581-7, 1989.

SU, R.; RUDERT, M.L. HODGES, T.K. Fertile indica and japonica rice plants regenerated from protoplasts isolate from embryogenic haploid suspension cultures. **Plant Cell Reports**, New York, **12**:45-9, 1992.

SUN, B.; LI, X.; SUN, Y.; ZHAO, S.; CHEN, J. High frequency of protoplast division and regeneration in indica rice. **Rice Genetics Newsletter**, Tokyo, **6**:170-2, 1989.

STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics.** New York, McGraw-Hill Book Co., 1960. 481p.

THOMPSON, J.A.; ABDULLAH, R.; COCKING, E.C. Protoplast culture of rice (*Oryza sativa* L.) using media solidified with agarose. **Plant Science**, Amsterdam, **47**:123-34.

TORIYAMA, K. & HINATA, K. Cell suspension and protoplast culture of rice. **Plant Science**, Amsterdam, **41**:179-83, 1985.

TORIYAMA, K.; HINATA, K.; SASAKI, T. Haploid and diploid plant regeneration from protoplasts of anther callus in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, **73**:16-9, 1986.

TORRIZO, L.B. & ZAPATA, F.J. High efficiency plant regeneration from protoplasts of the indica cultivar IR58. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, **43**:1633-7, 1992.

WANG, D.; MILLER, P.D.; SÖNDAHL, M.R. Plant regeneration from protoplasts of indica type rice and CMS rice. **Plant Cell Reports**, New York, **8**:329-32, 1989.

WU, C. & ZAPATA, F.J. Plant regeneration from protoplasts isolated from primary callus of four japonica rice (*Oryza sativa* L.) varieties. **Plant Science**, Amsterdam, **86**:83-7, 1992.

YAMADA, Y.; YANG, Z.Q.; TANG, D.T. Plant regeneration from protoplast-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Reports**, New York, 5:85-8, 1986.

ZAPATA, F.J. & ELLA, E.S. Specific gravity of the grain - a factor to consider in rice tissue culture. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, 132:294-7, 1988.

ZIMNY, J. & LÖRZ, H. Plant regeneration and initiation of cell suspensions from root-tip derived callus of *Oryza sativa* L. (rice). **Plant Cell Reports**, New York, 5:89-92, 1986.

APÊNDICE

MEIOS DE INDUÇÃO DE CALOS

MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962)

	mg/l
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8,6
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,85
Na ₂ ·EDTA	37,25
Mio-inositol	100
Ácido nicotínico	0,5
Tiamina-HCl	0,1
Piridoxina-HCl	0,5
Glicina	2
Sacarose	30000
Ágar	8000

pH 5,8 ajustado com KOH ou HCl, antes de autoclavar

N₆ (CHU, 1978)

mg/l

(NH ₄) ₂ SO ₄	463
KNO ₃	2830
KH ₂ PO ₄	400
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185
CaCl ₂ ·2H ₂ O	166
KI	0,8
H ₃ BO ₃	1,6
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	1,5
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4,4
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,85
Na ₂ .EDTA	37,25
Ácido nicotínico	0,5
Tiamina-HCl	1,0
Piridoxina-HCl	0,5
Glicina	2
Sacarose	30000
Ágar	8000

pH 5,8 ajustado com KOH ou HCl, antes de autoclavar

B5 (GAMBORG, *et al.*, 1968)

	mg/l
KNO ₃	3000
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
MgSO ₄ .7H ₂ O	500
CaCl ₂ .2H ₂ O	150
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150
KI	0,75
H ₃ BO ₃	3,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄	0,025
ZnSO ₄ .4H ₂ O	2,0
MnSO ₄ .4H ₂ O	10,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Na ₂ .EDTA	37,25
Mio-inositol	100
Ácido nicotínico	1
Tiamina-HCl	10
Piridoxina-HCl	1
Sacarose	20000
Ágar	8000

pH 5,8 ajustado com KOH ou HCl, antes de autoclavar

MEIOS UTILIZADOS NAS SUSPENSÕES CELULARES

R2 (OHIRA, et al., 1973)

	mg/l
KNO ₃	4050
(NH ₄) ₂ SO ₄	330
MgSO ₄ .7H ₂ O	250
CaCl ₂ .2H ₂ O	150
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	276
KI	0,8
H ₃ BO ₃	2,83
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,125
CuSO ₄	0,125
ZnSO ₄ .4H ₂ O	2,2
MnSO ₄	1,6
Fe	2,5
Tiamina-HCl	1
Sacarose	20000

pH 5,8 ajustado com KOH ou HCl, antes de autoclavar

GM (LI & MURAI, 1990)

	mg/l
KNO ₃	3000
NH ₄ H ₂ PO ₄	400
MgSO ₄ .7H ₂ O	185
CaCl ₂ .2H ₂ O	166
KI	0,8
H ₃ BO ₃	1,6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ .4H ₂ O	1,5
MnSO ₄ .4H ₂ O	4,4
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Na ₂ .EDTA	37,25
Ácido nicotínico	0,5
Tiamina-HCl	1,0
Piridoxina-HCl	0,5
Glicina	2
Sacarose	30000

pH 5,8 ajustado com KOH ou HCl, antes de autoclavar

AA (MÜLLER & GRAFE, 1978)

	mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	246
CaCl ₂ .2H ₂ O	150
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	553
KCl	2940
KI	0,75
H ₃ BO ₃	3,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄	0,025
ZnSO ₄ .4H ₂ O	2,0
MnSO ₄ .4H ₂ O	10,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Na ₂ .EDTA	37,25
Mio-inositol	100
Ácido nicotínico	1
Tiamina-HCl	1
Piridoxina-HCl	1
Glicina	75
Glutamina	877
Ácido aspártico	266
Arginina	348
Sacarose	30000
2,4-D	2
Kin	0,2
GA3	0,1

pH 5,6 ajustado com KOH ou HCl, antes de filtro-esterilizar

LS (LINSMAIER & SKOOG, 1965) modificado para cultivo da linhagem IR 52

	mg/l
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Na ₂ .EDTA	37,25
Mio-inositol	100
Tiamina-HCl	1,0
Caseína hidrolisada	500

Sacarose 30000

pH 5,8 ajustado com KOH ou HCl, antes de autoclavar

MEIOS PARA CULTIVO DE PROTOPLASTOS

R2 (OHIRA, *et al.*, 1973)

	mg/l
KNO ₃	4050
(NH ₄) ₂ SO ₄	330
MgSO ₄ .7H ₂ O	250
CaCl ₂ .2H ₂ O	150
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	276
KI	0,8
H ₃ BO ₃	2,83
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,125
CuSO ₄	0,125
ZnSO ₄ .4H ₂ O	2,2
MnSO ₄	1,6
Fe	2,5
Mio-inositol	100
Ácido nicotínico	1
Tiamina-HCl	2
Piridoxina-HCl	1
Maltose	144000
2,4-D	1
pH 5,6 ajustado com KOH ou HCl, antes de filtro-esterilizar	
Agarose Sigma tipo II	600 (Autoclavada separadamente)

Kpr (KAO & MICHAYLUK, 1975, modificado segundo WU & ZAPATA, 1992)

	mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	600
NH ₄ NO ₃	600
KNO ₃	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	300
KH ₂ PO ₄	170
KCl	
KI	0,75
H ₃ BO ₃	3
MnSO ₄ .4H ₂ O	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2
NaMoO ₄	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Na ₂ .EDTA	37,25
Ac. p-aminobenzóico	0,01
Biotina	0,005
Riboflavina	0,1
Ac. fólico	0,2
Vit. A	0,005
Vit. D ₃	0,005
Vit. B ₁₂	0,01
D-sucrose	250
D-frutose	125
D-ribose	125
D-xilose	125
D-manose	125
L-ramose	125
D-celobiose	125
D-sorbitol	125
D-manitol	125
Maltose	100000
Arginina	50
Água de coco	10 ml/l
2,4-D	0,5
NAA	1
pH 5,6 ajustado com KOH ou HCl, antes de filtro-esterilizar	
Agarose Sigma tipo II	600 (Autoclavada separadamente)

N₆ (CHU, 1978)

Meio básico N₆

	mg/l
Maltose	144000

2,4-D	1
-------	---

pH 5,6 ajustado com KOH ou HCl, antes de filtro-esterilizar

Agarose Sigma tipo II 600 (Autoclavada separadamente)

GM (LI & MURAI, 1990)

Meio básico GM

	mg/l
Maltose	144000

2,4-D	1
-------	---

pH 5,6 ajustado com KOH ou HCl, antes de filtro-esterilizar

Agarose Sigma tipo II 600 (Autoclavada separadamente)

SOLUÇÃO PARA LAVAR OS PROTOPLASTOS, CPW 13M

SAIS DE CPW (FREARSON *et al.* 1973)

	mg/l
KH_2PO_4	27,2
KNO_3	101
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1480
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246
KI	0,16
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
Manitol	130000
MES	100

pH 5,6 ajustado com KOH ou HCl, antes de autoclavar

SOLUÇÃO DE HOAGLAND & SNYDER (HEWITT, 1966)

	mg/l
KNO ₃	510
Ca(NO ₃) ₂	820
KH ₂ PO ₄	136
MgSO ₄ ·7H ₂ O	490
Tartarato férrico	1 ml da sol 0,05%
Micronutrientes	ppm
Mn	0,5
Mo	0,05
B	0,2
Zn	0,01
Cu	0,01

MEIOS DE REGENERAÇÃO

Meio básico	Notação	Reguladores (mg/l)		
		NAA	KIN	BAP
MS	B	1	1	1
MS	C	1	4	
MS	D	1	8	
R2	E	1	5	
N ₆	F	0,05	2,5	
MS	G	1	2	2
MS	$\frac{1}{2}$ ^a	0,5	2	

a=MS à metade

DADOS ESTATÍSTICOS DAS AVALIAÇÕES DO EXPERIMENTO 01

CULTIVARES 1 = IAC-25
 2 = IAC-100
 3 = IAC-101
 4 = IAC-165
 5 = IAC-201
 6 = IAC-242
 7 = IAC-4440

MEIO 1 = MS + 1 mg/l 2,4-D
 2 = MS + 2 mg/l 2,4-D
 3 = MS + 3 mg/l 2,4-D
 4 = MS + 4 mg/l 2,4-D

VARIÁVEIS

CALOS = Número de calos induzidos
 EMB = Número de calos embriogênicos induzidos
 CAEMB = Variável EMB transformada

OBS	CULTIVAR	MEIO	REP	CALOS	EMB	CAEMB
1	1	1	1	1	1	1.41421
2	1	1	2	2	0	1.00000
3	1	1	3	0	0	1.00000
4	1	2	1	2	1	1.41421
5	1	2	2	4	1	1.41421
6	1	2	3	7	5	2.44949
7	1	3	1	4	0	1.00000
8	1	3	2	1	0	1.00000
9	1	3	3	5	2	1.73205
10	1	4	1	5	1	1.41421
11	1	4	2	5	2	1.73205
12	1	4	3	3	0	1.00000
13	2	1	1	0	0	1.00000
14	2	1	2	0	0	1.00000
15	2	1	3	0	0	1.00000
16	2	2	1	2	0	1.00000
17	2	2	2	4	1	1.41421
18	2	2	3	0	0	1.00000
19	2	3	1	6	1	1.41421
20	2	3	2	4	2	1.73205
21	2	3	3	4	2	1.73205
22	2	4	1	6	2	1.73205
23	2	4	2	6	3	2.00000
24	2	4	3	5	2	1.73205
25	3	1	1	1	1	1.41421
26	3	1	2	0	0	1.00000
27	3	1	3	0	0	1.00000
28	3	2	1	3	2	1.73205

29	3	2	2	3	2	1.73205
30	3	2	3	1	0	1.00000
31	3	3	1	2	2	1.73205
32	3	3	2	0	0	1.00000
33	3	3	3	2	1	1.41421
34	3	4	1	6	3	2.00000
35	3	4	2	4	3	2.00000
36	3	4	3	5	4	2.23607
37	4	1	1	0	0	1.00000
38	4	1	2	0	0	1.00000
39	4	1	3	0	0	1.00000
40	4	2	1	2	0	1.00000
41	4	2	2	1	1	1.41421
42	4	2	3	0	0	1.00000
43	4	3	1	0	0	1.00000
44	4	3	2	2	1	1.41421
45	4	3	3	1	0	1.00000
46	4	4	1	1	1	1.41421
47	4	4	2	1	0	1.00000
48	4	4	3	1	0	1.00000
49	5	1	1	9	2	1.73205
50	5	1	2	8	2	1.73205
51	5	1	3	7	0	1.00000
52	5	2	1	9	0	1.00000
53	5	2	2	10	2	1.73205
54	5	2	3	6	0	1.00000
55	5	3	1	10	0	1.00000
56	5	3	2	9	1	1.41421
57	5	3	3	10	1	1.41421
58	5	4	1	9	1	1.41421
59	5	4	2	9	1	1.41421
60	5	4	3	9	3	2.00000
61	6	1	1	0	0	1.00000
62	6	1	2	2	2	1.73205
63	6	1	3	1	1	1.41421
64	6	2	1	3	2	1.73205
65	6	2	2	2	2	1.73205
66	6	2	3	1	0	1.00000
67	6	3	1	1	1	1.41421
68	6	3	2	0	0	1.00000
69	6	3	3	1	0	1.00000
70	6	4	1	4	3	2.00000
71	6	4	2	3	1	1.41421
72	6	4	3	5	3	2.00000
73	7	1	1	6	1	1.41421
74	7	1	2	9	3	2.00000
75	7	1	3	5	2	1.73205
76	7	2	1	7	2	1.73205
77	7	2	2	7	1	1.41421
78	7	2	3	9	1	1.41421
79	7	3	1	7	2	1.73205
80	7	3	2	8	2	1.73205

81	7	3	3	9	3	2.00000
82	7	4	1	10	1	1.41421
83	7	4	2	10	2	1.73205
84	7	4	3	10	1	1.41421

DADOS ESTATÍSTICOS DAS AVALIAÇÕES DO EXPERIMENTO 02

CULTIVARES 1 = IAC-201
2 = IAC-165

MEIO 1 = N₆ HORMÔNIO 1 = 2 mg/l 2,4-D
2 = MS 2 = 4 mg/l 2,4-D
3 = B5

VARIÁVEIS

CALOS = Número de calos induzidos
EMB = Número de calos embriogênicos induzidos
CAEMB = Variável EMB transformada

OBS	CULTIVAR	MEIO	HORMONIO	REP	CALOS	EMB	CAEMB
1	1	1	1	1	8	1	1.41421
2	1	1	1	2	7	4	2.23607
3	1	1	1	3	8	4	2.23607
4	1	1	1	4	7	1	1.41421
5	1	1	1	5	7	1	1.41421
6	1	1	2	1	8	1	1.41421
7	1	1	2	2	8	3	2.00000
8	1	1	2	3	9	3	2.00000
9	1	1	2	4	7	1	1.41421
10	1	1	2	5	10	0	1.00000
11	1	2	1	1	9	5	2.44949
12	1	2	1	2	6	2	1.73205
13	1	2	1	3	8	3	2.00000
14	1	2	1	4	8	3	2.00000
15	1	2	1	5	9	1	1.41421
16	1	2	2	1	8	0	1.00000
17	1	2	2	2	10	4	2.23607
18	1	2	2	3	9	1	1.41421
19	1	2	2	4	7	3	2.00000
20	1	2	2	5	8	3	2.00000
21	1	3	1	1	7	1	1.41421
22	1	3	1	2	9	3	2.00000
23	1	3	1	3	6	1	1.41421
24	1	3	1	4	5	1	1.41421
25	1	3	1	5	7	0	1.00000
26	1	3	2	1	10	0	1.00000
27	1	3	2	2	8	0	1.00000
28	1	3	2	3	9	0	1.00000
29	1	3	2	4	9	0	1.00000
30	1	3	2	5	7	1	1.4141
31	2	1	1	1	6	0	1.00000

32	2	1	1	2	5	2	1.73205
33	2	1	1	3	7	3	2.00000
34	2	1	1	4	4	1	1.41421
35	2	1	1	5	5	0	1.00000
36	2	1	2	1	7	4	2.23607
37	2	1	2	2	9	1	1.41421
38	2	1	2	3	8	5	2.44949
39	2	1	2	4	8	3	2.00000
40	2	1	2	5	8	3	2.00000
41	2	2	1	1	7	2	1.73205
42	2	2	1	2	4	0	1.00000
43	2	2	1	3	3	0	1.00000
44	2	2	1	4	5	2	1.73205
45	2	2	1	5	5	1	1.41421
46	2	2	2	1	8	3	2.00000
47	2	2	2	2	6	2	1.73205
48	2	2	2	3	6	2	1.73205
49	2	2	2	4	6	0	1.00000
50	2	2	2	5	7	1	1.41421
51	2	3	1	1	6	1	1.41421
52	2	3	1	2	8	3	2.00000
53	2	3	1	3	5	2	1.73205
54	2	3	1	4	6	2	1.73205
55	2	3	1	5	6	2	1.73205
56	2	3	2	1	5	1	1.41421
57	2	3	2	2	6	2	1.73205
58	2	3	2	3	8	3	2.00000
59	2	3	2	4	8	1	1.41421
60	2	3	2	5	5	1	1.41421

DADOS ESTATÍSTICOS DAS AVALIAÇÕES DO EXPERIMENTO 03, CULTIVAR IAC-201

MEIO 1 = N₆ + 4 mg/l 2,4-D
 2 = MS + 4 mg/l 2,4-D
 3 = N₆ + 2 mg/l 2,4-D

ADITIVOS 1 = Controle sem aditivo
 2 = 2,5 mM de L-prolina
 3 = 5,0 mM de L-prolina
 4 = 0,5 mg/l de caseína hidrolisada
 5 = 1,0 mg/l de caseína hidrolisada

VARIÁVEIS

CALOS = Número de calos induzidos
 EMB = Número de calos embriogênicos induzidos
 CAEMB = Variável EMB transformada

Notação " . " = repetição perdida

OBS	MEIO	ADITIVO	REP	CALOS	EMB	CAEMB
1	1	1	1	7	1	1.41421
2	1	1	2	9	1	1.41421
3	1	1	3	9	1	1.41421
4	1	1	4	10	0	1.00000
5	1	1	5	10	0	1.00000
6	1	1	6	7	2	1.73205
7	1	1	7	7	0	1.00000
8	1	1	8	.	.	.
9	1	1	9	.	.	.
10	1	2	1	9	0	1.00000
11	1	2	2	7	1	1.41421
12	1	2	3	7	0	1.00000
13	1	2	4	10	1	1.41421
14	1	2	5	8	0	1.00000
15	1	2	6	9	2	1.73205
16	1	2	7	9	0	1.00000
17	1	2	8	.	.	.
18	1	2	9	.	.	.
19	1	3	1	10	0	1.00000
20	1	3	2	10	0	1.00000
21	1	3	3	10	0	1.00000
22	1	3	4	9	1	1.41421
23	1	3	5	8	0	1.00000
24	1	3	6	9	1	1.41421

25	1	3	7	8	1	1.41421
26	1	3	8	.	.	.
27	1	3	9	.	.	.
28	1	4	1	9	0	1.00000
29	1	4	2	10	0	1.00000
30	1	4	3	10	0	1.00000
31	1	4	4	10	1	1.41421
32	1	4	5	10	0	1.00000
33	1	4	6	8	1	1.41421
34	1	4	7	5	0	1.00000
35	1	4	8	8	1	1.41421
36	1	4	9	8	0	1.00000
37	1	5	1	9	1	1.41421
38	1	5	2	10	0	1.00000
39	1	5	3	10	0	1.00000
40	1	5	4	10	1	1.41421
41	1	5	5	9	2	1.73205
42	1	5	6	8	0	1.00000
43	1	5	7	7	0	1.00000
44	1	5	8	.	.	.
45	1	5	9	.	.	.
46	2	1	1	9	0	1.00000
47	2	1	2	8	1	1.41421
48	2	1	3	9	0	1.00000
49	2	1	4	8	1	1.41421
50	2	1	5	4	0	1.00000
51	2	1	6	10	1	1.41421
52	2	1	7	10	1	1.41421
53	2	1	8	7	0	1.00000
54	2	1	9	8	0	1.00000
55	2	2	1	7	1	1.41421
56	2	2	2	10	0	1.00000
57	2	2	3	7	1	1.41421
58	2	2	4	9	0	1.00000
59	2	2	5	8	0	1.00000
60	2	2	6	10	0	1.00000
61	2	2	7	9	0	1.00000
62	2	2	8	7	2	1.73205
63	2	2	9	9	0	1.00000
64	2	3	1	8	2	1.73205
65	2	3	2	10	0	1.00000
66	2	3	3	10	2	1.73205
67	2	3	4	10	0	1.00000
68	2	3	5	10	1	1.41421
69	2	3	6	9	0	1.00000
70	2	3	7	10	2	1.73205
71	2	3	8	.	.	.
72	2	3	9	.	.	.
73	2	4	1	10	1	1.41421
74	2	4	2	10	0	1.00000
75	2	4	3	8	0	1.00000
76	2	4	4	7	0	1.00000

77	2	4	5	10	1	1.41421
78	2	4	6	9	1	1.41421
79	2	4	7	9	1	1.41421
80	2	4	8	8	0	1.00000
81	2	4	9	10	0	1.00000
82	2	5	1	9	1	1.41421
83	2	5	2	6	0	1.00000
84	2	5	3	7	0	1.00000
85	2	5	4	6	0	1.00000
86	2	5	5	9	0	1.00000
87	2	5	6	8	0	1.00000
88	2	5	7	9	1	1.41421
89	2	5	8	7	0	1.00000
90	2	5	9	.	.	.
91	3	1	1	8	1	1.41421
92	3	1	2	8	0	1.00000
93	3	1	3	9	0	1.00000
94	3	1	4	8	2	1.73205
95	3	1	5	8	0	1.00000
96	3	1	6	7	2	1.73205
97	3	1	7	9	1	1.41421
98	3	1	8	7	1	1.41421
99	3	1	9	8	3	2.00000
100	3	2	1	7	0	1.00000
101	3	2	2	9	1	1.41421
102	3	2	3	10	0	1.00000
103	3	2	4	7	0	1.00000
104	3	2	5	10	2	1.73205
105	3	2	6	10	2	1.73205
106	3	2	7	9	1	1.41421
107	3	2	8	6	1	1.41421
108	3	2	9	.	.	.
109	3	3	1	9	0	1.00000
110	3	3	2	8	1	1.41421
111	3	3	3	10	0	1.00000
112	3	3	4	10	2	1.73205
113	3	3	5	9	0	1.00000
114	3	3	6	8	1	1.41421
115	3	3	7	7	0	1.00000
116	3	3	8	5	0	1.00000
117	3	3	9	7	0	1.00000
118	3	4	1	8	1	1.41421
119	3	4	2	7	1	1.41421
120	3	4	3	10	1	1.41421
121	3	4	4	8	0	1.00000
122	3	4	5	10	2	1.73205
123	3	4	6	9	1	1.41421
124	3	4	7	7	0	1.00000
125	3	4	8	6	0	1.00000
126	3	4	9	8	1	1.41421
127	3	5	1	9	0	1.00000
128	3	5	2	8	2	1.73205

129	3	5	3	7	1	1.41421
130	3	5	4	8	1	1.41421
131	3	5	5	5	1	1.41421
132	3	5	6	9	0	1.00000
133	3	5	7	6	0	1.00000
134	3	5	8	8	0	1.00000
135	3	5	9	.	.	.

DADOS ESTATÍSTICOS DAS AVALIAÇÕES DO EXPERIMENTO 03, CULTIVAR IAC-165

MEIO 1 = N₆ + 4 mg/l 2,4-D
 2 = MS + 4 mg/l 2,4-D
 3 = B5 + 2 mg/l 2,4-D

ADITIVOS 1 = Controle sem aditivo
 2 = 2,5 mM de L-prolina
 3 = 5,0 mM de L-prolina
 4 = 0,5 mg/l de caseína hidrolisada
 5 = 1,0 mg/l de caseína hidrolisada

VARIÁVEIS

CALOS = Número de calos induzidos
 EMB = Número de calos embriogênicos induzidos
 CAEMB = Variável EMB transformada

Notação " . " = repetição perdida

OBS	ADITIVO	MEIO	REP	CALOS	EMB	CAEMB
1	1	1	1	5	1	1.41421
2	1	1	2	7	0	1.00000
3	1	1	3	6	3	2.00000
4	1	1	4	8	2	1.73205
5	1	1	5	6	3	2.00000
6	1	1	6	6	3	2.00000
7	1	1	7	3	0	1.00000
8	1	1	8	6	4	2.23607
9	1	1	9	.	.	.
10	2	1	1	6	0	1.00000
11	2	1	2	6	1	1.41421
12	2	1	3	7	2	1.73205
13	2	1	4	8	2	1.73205
14	2	1	5	7	0	1.00000
15	2	1	6	6	2	1.73205
16	2	1	7	5	2	1.73205
17	2	1	8	5	2	1.73205
18	2	1	9	.	.	.
19	3	1	1	6	3	2.00000
20	3	1	2	5	0	1.00000
21	3	1	3	8	2	1.73205
22	3	1	4	5	0	1.00000
23	3	1	5	6	1	1.41421
24	3	1	6	10	2	1.73205
25	3	1	7	6	2	1.73205
26	3	1	8	6	1	1.41421

27	3	1	9	7	0	1.00000
28	4	1	1	6	2	1.73205
29	4	1	2	5	3	2.00000
30	4	1	3	5	0	1.00000
31	4	1	4	7	2	1.73205
32	4	1	5	4	2	1.73205
33	4	1	6	7	0	1.00000
34	4	1	7	6	2	1.73205
35	4	1	8	3	0	1.00000
36	4	1	9	7	0	1.00000
37	5	1	1	6	1	1.41421
38	5	1	2	6	2	1.73205
39	5	1	3	6	2	1.73205
40	5	1	4	4	0	1.00000
41	5	1	5	5	1	1.41421
42	5	1	6	6	0	1.00000
43	5	1	7	6	4	2.23607
44	5	1	8	9	5	2.44949
45	5	1	9	7	1	1.41421
46	1	2	1	4	1	1.41421
47	1	2	2	5	1	1.41421
48	1	2	3	5	1	1.41421
49	1	2	4	7	1	1.41421
50	1	2	5	7	2	1.73205
51	1	2	6	6	3	2.00000
52	1	2	7	5	1	1.41421
53	1	2	8	8	1	1.41421
54	1	2	9	.	.	.
55	2	2	1	4	1	1.41421
56	2	2	2	8	2	1.73205
57	2	2	3	7	6	2.64575
58	2	2	4	5	0	1.00000
59	2	2	5	5	1	1.41421
60	2	2	6	5	1	1.41421
61	2	2	7	3	0	1.00000
62	2	2	8	.	.	.
63	2	2	9	.	.	.
64	3	2	1	9	6	2.64575
65	3	2	2	6	4	2.23607
66	3	2	3	3	0	1.00000
67	3	2	4	5	2	1.73205
68	3	2	5	5	4	2.23607
69	3	2	6	8	5	2.44949
70	3	2	7	7	2	1.73205
71	3	2	8	.	.	.
72	3	2	9	.	.	.
73	4	2	1	5	1	1.41421
74	4	2	2	6	2	1.73205
75	4	2	3	5	2	1.73205
76	4	2	4	4	1	1.41421
77	4	2	5	6	1	1.41421
78	4	2	6	5	1	1.41421

79	4	2	7	6	2	1.73205
80	4	2	8	4	2	1.73205
81	4	2	9	3	0	1.00000
82	5	2	1	5	0	1.00000
83	5	2	2	5	0	1.00000
84	5	2	3	3	0	1.00000
85	5	2	4	6	1	1.41421
86	5	2	5	3	0	1.00000
87	5	2	6	5	0	1.00000
88	5	2	7	5	1	1.41421
89	5	2	8	4	0	1.00000
90	5	2	9	6	1	1.41421
91	1	3	1	7	1	1.41421
92	1	3	2	6	2	1.73205
93	1	3	3	7	2	1.73205
94	1	3	4	6	1	1.41421
95	1	3	5	6	0	1.00000
96	1	3	6	4	2	1.73205
97	1	3	7	7	3	2.00000
98	1	3	8	5	0	1.00000
99	1	3	9	7	0	1.00000
100	2	3	1	8	2	1.73205
101	2	3	2	5	1	1.41421
102	2	3	3	4	0	1.00000
103	2	3	4	8	1	1.41421
104	2	3	5	9	2	1.73205
105	2	3	6	5	1	1.41421
106	2	3	7	5	1	1.41421
107	2	3	8	4	1	1.41421
108	2	3	9	.	.	.
109	3	3	1	7	1	1.41421
110	3	3	2	3	1	1.41421
111	3	3	3	8	1	1.41421
112	3	3	4	9	7	2.82843
113	3	3	5	10	3	2.00000
114	3	3	6	7	4	2.23607
115	3	3	7	8	2	1.73205
116	3	3	8	6	2	1.73205
117	3	3	9	9	4	2.23607
118	4	3	1	6	2	1.73205
119	4	3	2	5	1	1.41421
120	4	3	3	6	2	1.73205
121	4	3	4	5	1	1.41421
122	4	3	5	5	1	1.41421
123	4	3	6	4	0	1.00000
124	4	3	7	3	0	1.00000
125	4	3	8	.	.	.
126	4	3	9	.	.	.
127	5	3	1	5	0	1.00000
128	5	3	2	5	1	1.41421
129	5	3	3	6	4	2.23607
130	5	3	4	5	1	1.41421

131	5	3	5	6	1	1.41421
132	5	3	6	5	1	1.41421
133	5	3	7	7	1	1.41421
134	5	3	8	.	.	.
135	5	3	9	.	.	.

DADOS ESTATÍSTICOS DAS AVALIAÇÕES DO EXPERIMENTO 04

MEIO 1 = N_6 + 2 mg/l 2,4-D + 1,0 g/l de caseína hidrolisada
 2 = N_6 + 4 mg/l 2,4-D + 2,5 mM de L-prolina
 3 = N_6 + 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l de caseína hidrolisada

VARIÁVEIS

CALOS = Número de calos com porções embriogênicas

PESO = Peso fresco das porções embriogênicas selecionadas

meio	rep	calos	peso (mg)
1	1	5	680
1	2	6	620
1	3	5	580
1	4	6	690
1	5	5	430
1	6	6	700
1	7	8	760
1	8	6	860
1	9	6	870
1	10	4	520
1	11	8	990
1	12	7	860
2	1	7	900
2	2	7	760
2	3	7	1220
2	4	9	1220
2	5	7	1000
2	6	6	900
2	7	8	1200
2	8	7	1130
2	9	5	1150
2	10	6	880
2	11	7	1180
2	12	6	960
3	1	4	810
3	2	4	760
3	3	6	520
3	4	7	820
3	5	5	860
3	6	4	920
3	7	7	1440
3	8	8	870
3	9	5	780
3	10	6	680
3	11	5	630
3	12	6	1090