

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) DE LINHAS ISOGÊNICAS DO GENÓTIPO MARINGÁ COM GENES DE PORTE BAIXO (Rht₁ e Rht₂)

PLANT REGENERATION OF ISOGENIC LINES OF THE MARINGÁ GENOTYPE OF WHEAT (*Triticum aestivum* L.) WITH SHORT HEIGHT GENES (Rht₁ and Rht₂)

Cristine Luise Handel¹ Luiz Carlos Federizzi² Fernanda Bered³
Cláudia Erna Lange⁴ Ana Lúcia Cunha Dornelles⁵

RESUMO

Existem variações entre genótipos de trigo quanto à regeneração de plantas *in vitro*. Em trabalho precursor com o genótipo Maringá obteve-se 100% de regeneração de plantas. Este trabalho visou investigar a capacidade de regeneração de plantas do Maringá e duas linhas isogênicas com um e dois genes de estatura reduzida (Rht₁ e Rht₂). Foram utilizados embriões imaturos de Maringá, das linhas isogênicas e das F₂'s dos cruzamentos entre estes genótipos, que foram colocados em meio de cultura MS modificado (MILACH et al., 1991) com sacarose, ágar e doses decrescentes de 2,4D conforme a etapa de cultivo (2mg/l; 0,5mg/l; 0,1mg/l e sem 2,4D). Também foi avaliada a possibilidade de supressão de um subcultivo, quando os calos não passariam pelo meio com 0,1mg/l de 2,4D. As análises estatísticas demonstraram que os genótipos diferiram quanto à regeneração de plantas, evidenciando a influência do gene Rht, que reduziu o número de plantas

regeneradas por calo. A retirada do meio com 0,1mg/l de 2,4D não alterou a regeneração, podendo-se eliminar esta etapa de cultivo. Os genótipos responderam da mesma forma nas diferentes seqüências de subcultivo, não havendo interação entre estes dois caracteres.

Palavras-chave: trigo, genes Rht, linhas isogênicas, embrião imaturo.

SUMMARY

Different genotypes show different responses for *in vitro* plant regeneration. In previous work with the Maringá genotype a result of 100% of *in vitro* plant regeneration was obtained. The purpose of this study was to investigate the capacity of plant regeneration of Maringá genotype and two of its isogenic lines with one and two short height genes (Rht₁ and Rht₂). Immature embryos from:

¹ Aluno de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

² Professor Titular, Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Caixa Postal 776, 90001-970, Porto Alegre, RS. Autor para correspondência.

³ Aluno de Doutorado em Genética e Biologia Molecular, Faculdade de Biologia, UFRGS.

⁴ Mestre, Pesquisador da FUNDACEP, Cruz Alta, RS.

⁵ Doutor em Fitotecnia pela Faculdade de Agronomia, UFRGS, Bolsista recém-doutor do CNPq.

(a) Maringá, (b) the isogenic lines and (c) the crosses between these genotypes were placed on MS medium (modified by MILACH et al., 1991) with saccharose, agar and decreasing doses of 2,4D (2mg/l; 0.5mg/l; 0.1mg/l and 0.0mg/l) according to the stage of culture. The possibility of suppressing one of the stages of culture, (which uses 0.1mg/l of 2,4D) was also evaluated. The statistic analysis demonstrated that the different genotypes gave different responses, therefore this indicates that the Rht genes had influence on plant regeneration rates. The suppression of the stage of culture which uses 0.1mg/l of 2,4D did not have any influence on regeneration, showing that this stage can be eliminated. Different genotypes had the same responses on the different culture medium sequences. The intercection between genotype x medium was not significant.

Key words: wheat, isogenic lines, Rht genes, imature embryos.

INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos tem grande potencial para auxiliar programas de melhoramento de cereais, mas isto só será concretizado se for possível regenerar plantas *in vitro* em grande escala. Em trigo, a regeneração *in vitro* tem sido obtida desde a década de 1970, mas nem todos os genótipos atingem a freqüência de regeneração desejada (LANGE, 1991), tendo sido relatadas variações de 0 a 100% de regeneração (SEARS & DECKARD, 1982). O mesmo comportamento foi observado em variedades brasileiras de trigo com a cultura de embriões imaturos, quando o genótipo Maringá apresentou 100% de regeneração de plantas utilizando-se um protocolo padrão (MILACH et al., 1991). O conhecimento das diferentes respostas em cultura *in vitro* tem importância estratégica na viabilização do melhoramento da regeneração de trigo (LANGE, 1991). Para a obtenção das plantas regeneradas *in vitro* através de um protocolo usual de regeneração de plantas de trigo são necessários quatro subcultivos distintos com doses decrescentes de 2,4D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) acrescentado ao meio de cultura, o que resulta em um período de 120 dias para a conclusão do processo.

Além dos genes Rht afetarem a estatura das plantas também causam uma insensibilidade ao ácido giberélico, que é fundamental para o desenvolvimento normal das plantas, por isso o teste de capacidade de regeneração de plantas *in vitro* de linhas que contenham estes genes pode mostrar se a sua presença afeta esta capacidade.

MATHIAS & ATKINSON (1988) desenvolveram trabalho com regeneração de plantas de três genótipos e suas linhas quase isogênicas para Rht 1, 2 e 3, e citaram que houve efeito significativo do gene de porte baixo, mas com dependência da variedade já que houve interação varie-

dade X gene de porte baixo. A regeneração de três linhagens com genes Rht da variedade Bersee foi inferior a da linhagem original, mas para variedade Huntsman ocorreu o oposto. Com a variedade April Bearded a regeneração da linha com Rht₂ foi a maior de todas, seguida pela Rht₃, pela linha original e por último pela linha com Rht₁.

A introdução de genes redutores da estatura de planta na maioria dos programas de melhoramento de trigo permitiu grandes avanços quanto ao rendimento de grãos, pela redução de perdas por acamamento e pelo melhor aproveitamento dos ambientes favoráveis (VOGEL et al., 1956; VOGEL et al., 1963; BRIGGLE & VOGEL, 1968; BOROJEVIC, 1968; PLARRE, 1975; GALE & YOUSSEFIAN, 1985). Por isto é de grande importância uma boa regeneração de plantas de material de baixa estatura, para que os programas de melhoramento possam usufruir dos benefícios da biotecnologia. Plantas com genes que lhes conferem estatura reduzida são também amplamente utilizadas no Brasil, em regiões de solo sem alumínio tóxico e de alta fertilidade natural.

Este trabalho visou investigar se duas linhas isogênicas ao genótipo Maringá, ou seja, com genótipo idêntico ao da cultivar mas com um e dois genes de estatura reduzida (Rht₁ e Rht₂) teriam capacidades de regeneração de plantas diferente do genótipo original. Além disto foi testado se a supressão de uma etapa de cultivo, que usa 0,1mg/l de 2,4D afetaria o número de plantas regeneradas por calo. Esta supressão representaria uma grande economia de recursos, mão de obra e tempo no processo de regeneração de plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os genótipos utilizados neste trabalho foram: Maringá, IPF550243 (linha isogênica com Rht₁), IPF550245 (linha isogênica com Rht₁ + Rht₂), Maringá x IPF550243 (embriões F2), Maringá x IPF550245 (embriões F2) e IPF550243 x IPF550245 (embriões F2). As linhas isogênicas foram obtidas junto ao CNPTrigo/EMBRAPA, obtidas do CIMMYT (México), sendo linhas amplamente conhecidas e utilizadas internacionalmente. A formação destas linhas foi via diversos retrocruzamentos para o pai Maringá.

Embriões imaturos de trigo dos genótipos utilizados foram resgatados quando mediam aproximadamente 2mm e colocados em meio de cultura de Murashige e Skoog modificado (MILACH et al., 1991) acrescido de 3% de sacarose, 0,8% de ágar e 2mg/l de 2,4D para indução de calos. Foram utilizados embriões F2 dos cruzamentos entre os pais para poder-se contar com a segregação dos caracteres regeneração de plantas e efeito dos genes Rht. Permaneceram neste meio, no escuro e à 25°C (+1) por 30 dias, quando foram transferidos para o mesmo meio com alteração da dose de 2,4D, que passou a ser de 0,5mg/l. Os calos

ficaram neste meio por mais 30 dias nas mesmas condições ambientais anteriores. Após este período os calos foram partidos em duas partes de forma aleatória, quando metade foi transferida para o meio com 0,1mg/l de 2,4D (segundo o protocolo normal) e a outra metade foi diretamente para o meio sem 2,4D (suprimindo-se a terceira etapa de cultivo). Esta fase (após o corte dos calos) passou a ser sob luz contínua (na mesma temperatura). Os calos que estavam em meio com 0,1mg/l de 2,4D, após 30 dias foram transferidos para o meio isento do hormônio. Assim que as plantas regeneradas apresentassem um crescimento adequado (6 a 8cm) eram retiradas dos vidros, separadas e contadas para avaliação do número de plantas por calo, sendo posteriormente transferidas para a fase de aclimação.

Foi realizada a análise de variância, com a transformação $\sqrt{x+1}$, considerando meio e genótipo como efeitos principais. Para comparar médias utilizou-se teste de Duncan a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da variância demonstrou que apenas os genótipos diferiram entre si, evidenciando que toda a variação existente foi devida aos genótipos, pois não houve diferença entre as seqüências de meios utilizados e a interação genótipo X meio não foi significativa, ou seja, todos os genótipos revelaram a mesma resposta frente a seqüência de meios. A regeneração de plantas por calo apresentou a seguinte ordem (Tabela 1): o Maringá regenerou mais plantas por calo que os genótipos com genes Rht_1 e Rht_1+Rht_2 (IPF550243 e IPF550245 respectivamente), e as progênies F2 que tinham este genótipo como genitor tiveram resultados intermediários aos pais, revelando a possível existência de efeito aditivo. O cruzamento entre os dois genótipos com Rht apresentou o menor número de plantas regeneradas, embora não tivesse diferido do pai com Rht_1 , indicando dominância no sentido de redução da capacidade de regeneração de plantas, confirmando os dados anteriores obtidos com estes genótipos (MILACH et al., 1991; MATHIAS & ATKINSON, 1988).

Os resultados obtidos com a variedade Maringá (Tabela 1) foram semelhantes aos obtidos com a variedade Bersee no trabalho de MATHIAS & ATKINSON (1988), demonstrando diferenças na resposta à regeneração de plantas *in vitro* pela introdução dos genes de porte baixo Rht_1 e Rht_1+Rht_2 .

Outra possibilidade seria que na formação das linhas isogênicas foram transferidos outros genes além dos de porte baixo, modificando a expressão da regeneração *in vitro* nestas linhas, como foi observado por FEDERIZZI et al. (1994) para outras características nestes mesmos genótipos derivados do Maringá.

Tabela 1. Média de plantas regeneradas por calo por genótipo.

Genótipo	Média de plantas/calos
Maringá	5.724a*
Maringá x IPF550245	4.506a b
Maringá x IPF550243	3.608 b c
IPF550245 (Rht_1+2)	3.333 c
IPF550243 (Rht_1)	2.657 c d
IPF550243 x IPF550245	2.062 d

* Médias não seguidas de mesma letra diferem significativamente a 5% pelo teste de Duncan

Neste trabalho não foi possível realizar teste para regeneração de plantas *in vitro* da linha portadora apenas do gene Rht_2 , mas seria interessante comparar seu desempenho com o observado pelas linhas portadoras dos genes Rht_1 e Rht_1+Rht_2 .

A supressão da etapa de cultivo que usa meio de cultura com 0,1mg/l de 2,4D não alterou o número de plantas regeneradas por calo, podendo-se eliminar esta etapa do protocolo original, o que resulta em economia de recursos e redução no tempo de regeneração usual, de 120 para 90 dias (Tabela 2). Em trabalhos anteriores (MILACH et al., 1991 e LANGE, 1991) nunca foi levantada a possibilidade desta alteração do protocolo de regeneração das plantas, que foram regeneradas pelo protocolo usual. Desde a obtenção dos resultados deste trabalho todas as plantas de trigo regeneradas no laboratório passam pelo novo protocolo desenvolvido, em um processo mais ágil e econômico.

Tabela 2. Média de plantas regeneradas por calo com e sem passagem pela etapa de subcultivo com 0,1mg/l de 2,4D.

Subcultivo	Média de plantas regeneradas por calo
com passagem por MS + 0,1mg/l de 2,4D	3.862a*
sem passagem por MS + 0,1mg/l de 2,4D	3.516a

* Médias não seguidas de mesma letra diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

CONCLUSÕES

Os genótipos portadores dos genes Rht_1 e Rht_1+Rht_2 apresentam menor número de plantas regeneradas por calo. A supressão de uma etapa de cultivo (com 0,1mg/l de 2,4D) não diminui o número de plantas regeneradas *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORJEVIC, S. Characteristics of some new dwarf and semi dwarf wheat lines. *Euphytica*, Wageningen, v. 17, n. 1, p. 143-151, 1968.
- BRIGGLE, L.W., VOGEL, O.A. Breeding short stature, disease resistant wheats in the United States. *Euphytica*, Wageningen, v. 17, n. 1, p. 107-130, 1968.
- FEDERIZZI, L.C., FANTINI, A.C., CARVALHO F.I.F. Efeito do acamamento artificial em genótipos de trigo de porte alto e baixo. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 465-469, 1994.
- GALE, M.D., YOUSSEFIAN, S. Dwarfing genes in wheat. In: RUSSEL, G.E. *Progress in plant breeding*. London: Butterworths, 1985. p. 1-35.
- LANGE, C.E. Genética da regeneração de planta *in vitro* de trigo (*Triticum aestivum* L.). Porto Alegre, RS. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1991.
- MATHIAS, R.J., ATKINSON, E. *In vitro* expression of genes affecting whole planta phenotype - The effect of Rht/Gai alleles on the callus culture response in wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, n. 75, p. 474-479, 1988.
- MILACH, S.C.K., FEDERIZZI, L.C., CARVALHO, F.I.F., et al. Regeneração de plantas no cultivo de calos de genótipos brasileiros de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v. 26, n. 11-12, p. 1947-1956, 1991.
- PLARRE, W. Cultivation of wheat and barley in the tropics and sub tropics. *Plant research and development*, Tübingen, n. 2, p. 67-69, 1975.
- SEARS, R.G., DECKARD, E.L. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. *Crop Science*, n. 22, p. 546-550, 1982.
- VOGEL, O.A., CRADDOCK Jr, J.C., MUIR, C.E. et al, semidwarf growth habit in winter wheat improvement for the pacific northwest. *Agronomy Journal*, Madison, v. 48, n. 2, p. 76-78, 1956.
- VOGEL, O.A., ALLAN, R.E., PETTERSON, C.J. Plant and performance characteristics of semidwarf winter wheats producing most efficiently in Eastern Washinton. *Agronomy Journal*, Madison, n. 55, p. 397-398, 1963.