ANDROGÊNESE EM ARROZ (*Oryza sativa* L.): INDUÇÃO DE CALOS E REGENERAÇÃO DE PLANTAS

SANDREMIR DE CARVALHO

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. AKIHIKO ANDO

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

1989

Carvalho, Sandremir

C331a Androgênese em arroz (*Oryza sativa* L.): indução de calos e regeneração de plantas. Piracicaba, ESALQ, 1989. 77p. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ

1. Arroz - Melhoramento. 2. Arroz - Cultura de Antera. 3. Arroz - Indução de Calos. 4. Arroz - Regeneração de Plantas. I. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

CDD 633.18

**ANDROGÊNESE EM ARROZ (*Oryza sativa* L.): INDUÇÃO DE CALOS
E REGENERAÇÃO DE PLANTAS**

SANDREMIR DE CARVALHO

Aprovada em: 17.03.1989

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. AKIHIKO ANDO

ESALQ/USP

Profª Drª CATALINA ROMERO LOPES

UNESP

Dr. LUIZ ERNESTO AZZINI

IAC

Prof. Dr. AKIHIKO ANDO

- Orientador -

Aos meus pais

João e Dorvalina,

OFEREÇO

A minha esposa **Vera** e aos
meus filhos **Ruiz** e **Carolina,**
pelo incentivo e amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Expressamos os nossos agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, de uma maneira especial, às seguintes pessoas e entidades:

- Ao Prof. Dr. Akihiko Ando, pela orientação, estímulo e amizade demonstrados.
- Aos Professores do Instituto de Genética da ESALQ, pelos ensinamentos.
- À Fundação Faculdade de Agronomia "Luiz Meneghel", pelo apoio e oportunidade concedidos.
- Aos Professores do Departamento de Ciências Biológicas e Tecnologia da FFALM, pelo apoio durante o curso.
- À CAPES e CNPq, pela ajuda financeira.
- Ao Sr. Serafim Meneghel, Diretor-Presidente de Açúcar e Alcool Bandeirantes S.A., pelo auxílio às viagens.
- À Seção de Radiogenética, Centro de Energia Nuclear na Agricultura.
- Aos funcionários da Seção de Radiogenética Benedita Inês Passignolo Rodrigues, Paulo Cassieri Neto, José Benedito Alves e Wlamir de Aguiar Godoy, pelo auxílio na condução dos trabalhos.
- À Professora Nina Maria Silva Risso, pela ajuda na elaboração do Summary.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Utilização de plantas haplóides	3
2.2. Obtenção de haplóides "in vivo"	4
2.3. Obtenção de haplóides "in vitro"	4
2.3.1. Cultura de pólenes isolados	4
2.3.2. Cultura de ovário	6
2.3.3. Protoplasto de células haplóides	6
2.3.4. Cultura de antera	7
2.3.4.1. Caminhos da androgênese	8
2.3.4.2. Condições de crescimento da planta doadora	10
2.3.4.3. Estádio do microsporo	12
2.3.4.4. Pré-tratamento das anteras	14
2.3.4.5. Meio de cultura para indução de calo ...	16
2.3.4.6. Reguladores de crescimento e tempe- ratura de incubação	18
2.3.4.7. Regeneração de plantas	21
2.3.4.8. Albinismo	22

	Página
2.3.4.9. Variação somaclonal	23
3. METODOLOGIA	27
3.1. Indução de calo	27
3.1.1. Estádio do micrósporo	27
3.1.2. Meio de cultura e reguladores de crescimento	28
3.1.3. Fatores químicos inorgânicos e orgânicos	28
3.1.4. Fatores físicos	29
3.2. Regeneração de plantas	30
3.2.1. Efeito dos componentes químicos	30
3.2.2. Idade do calo	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Estádio do micrósporo	32
4.2. Meio básico e reguladores de crescimento	34
4.3. Efeito de componentes orgânicos e inorgânicos no meio de cultura	38
4.3.1. Ferro	38
4.3.2. m-inositol	40
4.3.3. Sacarose	41
4.3.4. Aminoácidos	42
4.3.5. Vitaminas	45
4.3.6. Meios líquido e sólido e carvão ativado	47
4.4. Efeito dos fatores físicos	48
4.4.1. Pré-tratamento a frio	48

	Página
4.4.2. Temperatura e regime de luz durante a incubação	51
4.4.3. Raios-gamas	54
4.5. Regeneração de plantas	57
4.5.1. Efeito de hormônios, agar, carvão ativado e extrato de levedura	57
4.5.2. Idade do calo	61
5. CONCLUSÕES	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÊNDICE	76
- Apêndice 1 - Figuras	
Figura 1 - Calos produzidos no meio líquido.....	76
Figura 2 - Calos regenerando plantas albinas e plantas verdes.	76
- Apêndice 2 - Lista de Abreviaturas.....	77

**ANDROGÊNESE EM ARROZ (*Oryza sativa* L.): INDUÇÃO DE CALOS
E REGENERAÇÃO DE PLANTAS**

Autor: SANDREMIR DE CARVALHO

Orientador: PROF. DR. AKIHIKO ANDO

RESUMO

Com o objetivo de estudar uma metodologia para a cultura de antera de arroz de sequeiro, com variedades brasileiras Dourado Precoce e IAC-165, o presente trabalho foi realizado no Laboratório da Seção de Radiogenética do CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura), USP, Piracicaba, São Paulo.

As panículas foram coletadas quando as anteras apresentavam micrósporo no estágio uninucleado e pré-tratadas a 7°C por 7 dias. As anteras foram inoculadas no meio MS modificado e incubadas no escuro a 27°C.

Para as duas variedades estudadas, foram analisados os seguintes parâmetros: (1) frequência de calos produzidos e (2) capacidade de organogênese. Para o estudo da indução de calos, foram pesquisados os seguintes fatores: ferro, sacarose, vitaminas (tiamina, m-inositol e biotina), aminoácidos (glicina e metionina), reguladores de crescimento (2,4-D, NAA e BAP), agar e carvão (fatores químicos); temperatura e tempo de pré-tratamento a frio, temperatura de incubação e irradiação com raios gamas das panículas e das anteras junto com o meio de cultura (fatores físicos); estágio do micrósporo (fator fisiológico).

Para a regeneração de plantas foi utilizado o meio MS e os seguintes fatores foram avaliados: reguladores de crescimento (NAA e cinetina), extrato de levedura, agar, carvão ativado e idade do calo.

Os resultados obtidos permitem concluir que: (1) a frequência da indução de calos aumenta no meio líquido com 56,6 mg de ferro, 4% de sacarose, 4 mg/l de glicina para ambas as variedades e 0,8 mg/l de tiamina para Dourado Precoce e 0,4 mg/l para IAC-165; (2) o meio básico MS modificado foi superior ao meio N₆; (3) no meio MS modificado, as melhores combinações de 2,4-D e NAA foram 2 mg/l e 2 mg/l para Dourado Precoce e 1 mg/l e 3 mg/l, respectivamente, para IAC-165; (4) pré-tratamento a 10°C por 10 dias das panículas com micrôsporo no estágio uninucleado deu o melhor resultado na indução de calos; (5) incubação das anteras no escuro a 30°C aumentou a frequência na indução de calos; e (6) o efeito da irradiação com raios-gamas foi favorável quando anteras da variedade Dourado Precoce foram irradiadas junto com o meio de cultura.

Com relação a regeneração de plantas, os melhores resultados foram observados no meio R₆ e quando foram inoculados calos com 7 dias de idade.

**ANDROGENESIS IN RICE (*Oryza sativa* L.): INDUCTION OF CALLUS
AND PLANTS REGENERATION**

Author: SANDREMIR DE CARVALHO

Adviser: PROF. DR. AKIHIKO ANDO

SUMMARY

In order to study a methodology for anther culture of two Brazilian varieties of upland rice, Dourado Precoces and IAC-165, the present work was carried out in the Laboratory of Radiation Genetics Section of CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura), USP, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

The panicles were collected when anthers were at uninucleated stage of microspore and pre-treated at 70°C for 7 days. The anthers then were inoculated on the modified MS medium and incubated in the dark at 27°C.

For the two varieties studied, the following parameters were analyzed: (1) frequency of callus production and (2) organogenesis capacity. To study the induction of callus, the following factors were considered: iron, sucrose, vitamins, (thiamine, m-inositol and biotin), aminoacids (glycine and methionine), growth regulators (2,4-D, NAA and BAP), agar and activated charcoal (chemical factors); temperature and time of cold pre-treatment, incubation temperature and irradiation with gamma-rays of panicles and anthers together with medium of culture (physical factors); microspore stage (physiological factor).

For plant regeneration, the MS medium was used and the following factors were evaluated: growth regulators (NAA and kinetin), yeast extract, agar, activated charcoal and callus age.

According to the results obtained, we can conclude that:

- (1) frequency of callus induction increases on liquid medium with 56,6 mg/l of iron, 4% of sucrose, 4 mg/l of glycine for the both varieties and 0,8 mg/l of thiamine for Dourado Precoco and 0,4 mg/l for IAC-165;
- (2) the basic MS medium modified was superior to the N₆ medium;
- (3) as for the MS medium modified, better combinations of 2,4-D and NAA were 2 mg/l and 2 mg/l for Dourado Precoco and 1 mg/l and 3 mg/l, respectively, for IAC-165;
- (4) pre-treatment at 10°C for 10 days of panicles with microspore of uninucleate stage gave the best results in the induction of callus;
- (5) anther incubation in the dark at 30°C increased the frequency of callus induction; and
- (6) irradiation effect with gama-rays was favorable when anthers of the variety Dourado Precoco were irradiated together with the culture medium.

Regarding regeneration of plants, the best results were observed on the R₆ medium and when callus as with 7 days of age were inoculated.

1. INTRODUÇÃO

Desde o trabalho feito por BLAKESLEE et alii (1922), com *Datura stramonium*, relatando a ocorrência de plantas haplóides, tem aumentado o interesse no estudo para desenvolver técnicas para a produção de plantas com a metade dos seus cromossomos. Este tipo de planta pode ser obtido por aparecimento espontâneo ou por uso de tratamento experimental como demonstra a revisão feita por KIMBER & RILEY (1963). A obtenção de plantas haplóides a partir de grãos de pólen de *Datura innoxia* via cultura de antera por GUHA & MAHESHWARI (1964-1966), deu um grande impulso ao estudo nesta área, já que possibilita a obtenção de grande número de plantas "in vitro".

O interesse nas plantas haplóides é devido a sua grande aplicabilidade nos estudos de genética básica e aplicada, já que os genes se expressam livres do fenômeno da dominância, podendo os genes recessivos serem estudados mais facilmente, por outro lado, linhas homozigotas podem ser obtidas por duplicação do número de cromossomos, resultando em grande utilização no melhoramento de planta.

O uso desta técnica no melhoramento de plantas traz, como vantagem, o menor tempo necessário para obtenção de novas linhagens quando comparado com os outros métodos de melhoramento convencionais.

O primeiro trabalho com sucesso numa espécie importante na alimentação mundial, foi obtido em arroz, *Oryza sativa*, por Niizeki e Oono (1968), citado por YING (1983). Este trabalho despertou alto interesse nos pesquisadores chineses que usando esta técnica já produziram uma série de variedades que são cultivadas em vastas áreas.

O arroz, devido a sua utilidade na alimentação humana, constitui alimento básico de cerca de dois terços da população mundial. No Brasil, a cultura tem um caráter prioritário, sendo responsável por 12 a 25% das calorias e 8,4 a 16,9% das proteínas, consumidas pela população brasileira.

O objetivo deste trabalho é estudar uma metodologia para obtenção de plantas regeneradas a partir de cultura "in vitro" de anteras de arroz de sequeiro, que serão utilizadas posteriormente no melhoramento de arroz no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Utilização das plantas haplóides

Desde o trabalho de BLAKESLEE et alii (1922) reportando a obtenção da primeira planta haplóide em vegetais superiores, tem aumentado a discussão sobre a viabilidade do uso de plantas haplóides na genética básica ou aplicada. Muitas possibilidades teóricas tem sido levantadas como as apontadas por NITZSCHE & WENZEL (1977): (1) A partir de plantas haplóides, pode-se obter, em curto espaço de tempo, plantas diplóides homozigotas, chamadas de homodiplóides, ou simplesmente dihaplóides sem que seja necessário usar autofecundação; (2) O uso de plantas haplóides teria uma grande aplicabilidade no estudo de monossômicos, os quais seriam úteis na citogenética e melhoramento de plantas; (3) No caso de plantas ornamentais, os haplóides seriam usados diretamente na produção de variedades de flores pequenas, com maior durabilidade devido à sua esterilidade; (4) Haplóides androgênicos nos dão a possibilidade de incorporar núcleos em citoplasmas estranhos; (5) Sem o efeito da dominância, o haplóide seria utilizado com maior facilidade no estudo das mutações já que o genótipo é refletido no fenótipo; (6) A segregação nos haplóides é menos complexa e a população necessária para isolar determinada combinação é muito menor; (7) A homologia dos cromossomos em alopóiplóides pode ser conseguida com um único passo, que é a duplicação do número de cromossomos, abrindo uma boa possibilidade no melhoramento de plantas; (8) Haplóides podem ser usados na transferência de genes de poliplóides para espécies diplóides.

Apesar das boas possibilidades do uso de plantas haplóides nos vários setores das áreas científicas, o principal problema é a pequena quantidade dessas plantas obtidas através das várias técnicas, o que impossibilita o seu uso tanto na pesquisa básica como na aplicada,

com exceção dos casos onde a quantidade de material haplóide necessário é muito pequena.

2.2. Obtenção de haplóides "in vivo"

Segundo CHU (1982), os caminhos para a produção de plantas haplóides podem ser divididos em "in vivo" e "in vitro". Em "in vivo", os haplóides geralmente são obtidos a partir do ovário, portanto chamados de haplóides do óvulo, sendo derivados dos componentes do saco embrionário.

A produção de haplóides "in vivo" pode ser obtida por vários processos, como pela eliminação de cromossomos durante a primeira divisão celular depois da formação do zigoto, resultados conseguidos no gênero *Hordeum* (SYMKO, 1969; KASHA & KAO, 1970), *Nicotiana* (GUPTA & GUPTA, 1973) e *Gossypium* (BARROW & CHAUCHARI, 1974).

De acordo com NITZSCHE & WENZEL (1977), o uso de altas temperaturas e radiações ionizantes também induzem a formação de haplóides, sendo que radiações ionizantes apresentam melhor resultado do que temperaturas extremas.

Além dos fatores fisiológicos e físicos, existem também os fatores químicos que induzem a formação de haplóides tais como colchicina, fluorfenilalanina, cloranfenicol, formaldeído, entre outros (NITZSCHE & WENZEL, 1977). Além dos haplóides que podem ser induzidos experimentalmente, os haplóides espontâneos também podem ser obtidos como resultado de apomixia e partenogênese (BAJAJ, 1986).

2.3. Obtenção de haplóides "in vitro"

Em "in vitro", os processos para a obtenção de haplóides são conseguidos pela cultura de antera ou de pólen isolado ou do ovário (óvulo não fecundado).

Os principais processos para obtenção de haplóides "in vitro" são: culturas de pólen isolados, de ovários, de protoplastos e de anteras.

2.3.1. Cultura de pólen isolados

O uso de grãos de pólen isolados para a obtenção de plantas haplóides traz duas vantagens, segundo CHU(1982): (1) obtenção de grande

quantidade de plantas haplóides a partir de poucas anteras; e (2) suprimir a interferência do desenvolvimento de calos do tecido somático da antera. Já BAJAJ (1986) apresenta cinco vantagens no uso de grãos de pólen isolados: (1) eliminação dos efeitos da parede da antera, assim os fatores que controlam a androgênese podem ser melhor regulados; (2) a sequência da androgênese pode ser melhor estudada partindo de uma única célula; (3) o pólen é o material ideal para se trabalhar com transformação e mutação, facilitando o uso de agentes mutagênicos físicos e químicos; (4) o pólen pode ser transformado diretamente em embrião e isso facilita os estudos fisiológicos e bioquímicos da androgênese; e (5) altas produções de plantas por antera podem ser esperadas.

Apesar da potencialidade e das vantagens do uso de grãos de pólen isolados, os resultados ainda são muito inconstantes (MAHESHWARI et alii, 1982). Trabalho com grãos de pólen isolados foi primeiramente descrito em *Nicotiana tabacum* por SUNDERLAND & ROBERTS (1977). Em arroz, o uso da cultura de pólen isolado apresenta poucas divisões celulares (CHEN et alii, 1982 e CORNEJO-MARTINS & PRIMO-MILLO, 1981). A falha na produção das plantas a partir de pólenes isolados tem recebido grande atenção e refinamento na técnica, e tem conseguido aumentar a frequência de formação de calos. Quando as anteras são pré-tratadas em meio líquido para posterior isolamento dos pólenes, observa-se um aumento na frequência de formação de calos (CHU, 1982; MAHESHWARI et alii, 1982; OONO, 1981; HEBERLE-BORS, 1985; WEN-LIANG, 1981). A necessidade do pré-tratamento é apontado por CHU (1982) como uma função importante da parede da antera no início do desenvolvimento da androgênese, sendo que o extrato aquoso de anteras embriogênicas também ajuda a promover a embriogênese de pólen isolado.

SHARP et alii (1972) desenvolveram uma técnica, a qual aumenta a frequência de pólenes embriogênicos em tomate. A técnica consiste em colocar anteras intactas sobre o meio básico, em seguida papel de filtro sobre as anteras, com os grãos de pólen em suspensão.

De acordo com a revisão feita por HEBERLE-BORS (1985), comparando as culturas de antera e de pólen, dois fatores devem ser pesquisados na cultura de pólen: primeiro verificar qual dos caminhos da androgênese segue o grão de pólen, e segundo, quais os parâmetros de absorção

de componentes pelo grão de pólen. O desempenho quanto a estes dois fatores pode elucidar os efeitos dos tratamentos no grão de pólen.

2.3.2. Cultura de ovário

Para investigar fertilização *in vitro* e desenvolvimento do fruto, muita atenção tem sido dada para a cultura de ovário e, atualmente, tem despertado interesse no estudo do gametófito feminino em *Gymnospermas* e ovário não fecundado em *Angiospermas*. Estudos histológicos de mostraram que as plantas haplóides são produzidas por elementos do saco embrionário, sendo que as sinérgides produzem somente calos. Ovários com sacos embrionários jovens, ou seja, quando as anteras estão no estágio uninucleado tardio ou binucleado é que demonstram melhor indução de plantas haplóides (CHU, 1982).

CHANG et alii (1983) demonstraram que ovários não fecundados de arroz apresentam melhor desempenho quando são inoculados juntos todos os verticilos reprodutores, estames e pistilos sobre o receptáculo, e que concentrações de 2 ppm de MCPA (ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético), induzem uma alta formação de calos somáticos.

2.3.3. Protoplasto de células haplóides

O primeiro isolamento de protoplastos viáveis de arroz foi feito por DEKA & SEN (1976), com calos produzidos a partir de bainha de folha e caule, sem que nenhuma planta fosse regenerada. Protoplasto de calos de pólen também foi obtido sem conseguir regeneração de planta (Peking Institute of Botany, 1975, citado por YAMADA & LOH, 1986).

Segundo OONO (1981), o sucesso para a obtenção de protoplasto de mesófilo depende de: (1) Idade da planta; (2) Natureza da parte usada; e (3) Turgidez da célula.

O isolamento de protoplasto de mesófilo de plantas haplóides se obtém da mesma maneira como se obtém protoplasto em plantas diplóides. O isolamento de protoplasto de grãos de pólen e tétrades apresenta um grande interesse em vários aspectos. Um deles seria favorecer

Peking Institute of Botany. 1975. Isolation and culture of rice protoplasts. *Somatic Hybridization Research Group and Cytobiochemistry Research Group, Academia Sinica. Sci. Sinica* 18:779-789.

o estudo da ontogenia do pólen, principalmente o estudo da regeneração da parede da célula que poderia ser extrapolada para estudos de tecidos somáticos (BAJAJ, 1986).

A comparação entre a obtenção de protoplasto de pólen maduro e de pólen em estágio jovem demonstra que a principal dificuldade de se trabalhar com grãos de pólen maduros é a destruição da exina, que só é conseguida com a combinação enzimática e métodos mecânicos, mesmo assim com resultados limitados. Já, com o uso de grãos de pólen jovens, principalmente no estágio de tetrade, a obtenção de protoplasto fica bem mais simplificada e com melhores resultados, porque a exina não está formada (BAJAJ, 1986).

As aplicações de protoplasto de células haplóides apontadas por MAHESHWARI et alii (1982) são: (1) aumento na oportunidade para se obter variabilidade através de mutação, já que não existe o problema da dominância; (2) oportunidade de isolar mutantes resistentes a vários metabólitos inibidores, "stress" ambiental, herbicidas, doenças, etc; (3) seleção de mutantes auxotróficos, permitindo o estudo da regulação gênica da célula; e (4) obtenção de diplóides superiores a partir de fusão de protoplasto de mutantes não alélicos.

2.3.4. Cultura de antera

A cultura de antera é em essência a cultura de pólen, por isso grande atenção tem sido dada para a "totipotência" de células haplóides a partir de grãos de pólen, usando a técnica do cultivo de antera (HAN, 1981).

Os trabalhos com cultura de antera para a obtenção de plantas haplóides, tem despertado muito interesse nos laboratórios de vários países, tais como Inglaterra, França, Alemanha, China, Japão, Canadá e Estados Unidos. Muitos trabalhos têm sido publicados reportando a cultura de anteras em cerca de 171 espécies, incluindo alguns híbridos, distribuídos em cerca de 60 gêneros e 26 famílias de Angiospermas (MAHESHWARI et alii, 1982).

O primeiro sucesso da cultura de antera em cereais foi obtido com arroz (Niizeki e Oono, 1968 ; citado por YING 1983), e daí foi estendida para outros cereais de importância econômica, tais como trigo,

centeio, cevada, milho, e triticales (CLAPHAM, 1976).

Segundo NITSCH (1983), as chances de se obter plantas haplóides viáveis pela cultura de antera ou pólen dependem de: (1) viabilidade do pólen; (2) vigor que a planta apresenta no estágio homozigoto (as plantas alógamas são geralmente inferiores às plantas autógamas); e (3) a reação das plantas haplóides em relação aos agentes duplicadores dos cromossomos.

Muitas são as dificuldades que a cultura de tecidos em arroz apresenta, tais como: alta frequência de formação de calos, mas baixa produção de plantas regeneradas; perda de capacidade de regeneração com o tempo de cultura, o que dificulta os estudos de células mutantes; as respostas das variedades quanto trabalhadas "in vitro" não são iguais quanto a capacidade de formação de calos e regeneração de plantas (ZAPATA et alii, 1983). Mas a despeito destas dificuldades, o estudo de antera em arroz, tem sido muito pesquisado e vários trabalhos foram desenvolvidos, tentando estudar e resolver estas dificuldades, sendo que na China, várias variedades já foram desenvolvidas e estão sendo recomendadas para cultivo (YING, 1983).

Os principais pontos que envolvem a androgênese em arroz, segundo vários autores, são: (1) os caminhos da androgênese; (2) as condições em que a planta doadora das anteras foi desenvolvida; (3) o estágio ideal do microsporo para melhor desenvolvimento da androgênese; (4) estudo dos efeitos do tratamento com choques de temperatura para melhorar a eficiência do processo androgênico; (5) comparação de diferentes meios bem como de componentes do meio de cultura; (6) determinação das condições ótimas para a produção de calos e regeneração de plantas; (7) análise de possível variabilidade das plantas regeneradas pela cultura de antera; (8) estudo da herança genética quanto a capacidade das plantas produzirem calos e plantas verdes; e (9) avaliação das possibilidades da aplicação da cultura de antera no estudo da bioquímica e fisiologia dos vegetais superiores, bem como no estudo da genética básica e aplicada.

2.3.4.1. Caminhos da androgênese

De acordo com os trabalhos de CHING-SAN (1981), androgênese em cereais segue o caminho A, no qual a primeira mitose do pólen uninucleado é assimétrica, resultando em um núcleo grande com fraca coloração,

que é o núcleo vegetativo, e um núcleo pequeno que se cora fortemente, denominado de núcleo generativo. As características diferentes dos dois núcleos estão em que, no vegetativo a cromatina é difusa, e no generativo a cromatina é condensada. Já no caminho B, os dois núcleos formados na primeira divisão são iguais, quer dizer, uma divisão simétrica. A igualdade do núcleo não é só no tamanho, mas ambos são difíceis de corar com reagente de Schiff, o que é característico do núcleo vegetativo. Estudos semelhantes a estes foram descritos por CLAPHAM(1976) e DUNWELL (1978) que, além dos caminhos A e B, descreverem uma terceira possibilidade que é chamado de caminho ou rota C, no qual o embrião é originado das células vegetativas e generativas. RAGHAVAN (1986), além de descrever os caminhos da androgênese, discute com base na revisão de vários trabalhos a função dos núcleos ou células vegetativas ou generativas durante a divisão celular para a formação de calos na cultura de antera. Segundo este autor, para algumas espécies, os calos e embriões são formados a partir da célula vegetativa e em outras espécies a partir da célula generativa e, em alguns casos, já foram observados calos e embriões originados pelos dois processos descritos acima.

Em arroz, além dos caminhos A e B, um outro caminho descrito é o caminho E, no qual os pólenes embriogênicos são formados por grupos de células originadas das células vegetativa e generativa. Apesar de ser semelhante ao caminho C, este difere por não ocorrer fusão de núcleos e as plantas regeneradas serem haplóides, diferindo também do caminho D, pois neste caso os núcleos não são livres. Cada um é fechado dentro de um espaço formado pela parede celular (CHING-SAN, 1981).

HSIN-YING et alii(1981), observando grãos de pólen, 3, 7, 10, 14 e 17 dias após a inoculação, relataram que no 7º dia a taxa de grãos de pólen com dois núcleos iguais foi de 82,6%, enquanto que a frequência de grãos de pólen com dois núcleos desiguais no mesmo período foi de 1,5%, demonstrando a importância do caminho B na formação dos calos.

GENOVESI & MAGILL (1979) descobriram que, quando as anteras de arroz são pré-tratadas a frio, os grãos de pólen se dividem pela mitose, geralmente do tipo simétrica caracterizando o caminho B, e favorecendo nesta fase a embriogênese do micrósporo.

Estes estudos sobre os caminhos da androgênese são impor-

tantes pois permitem determinar com maior segurança, qual o melhor estágio do grão de pólen para a indução de calos, embriogênese e regeneração de plantas.

2.3.4.2. Condições de crescimento da planta doadora

É experiência geral que a idade e condição fisiológica da planta doadora têm considerável importância na eficiência da androgênese (KELLER & STRINGAM, 1978; BAJAJ, 1986). Geralmente, flores de plantas relativamente jovens e no início da estação de florescimento, produzem mais grãos de pólen embriogênicos do que flores do final do período de crescimento. O fumo é uma espécie que apresenta esta característica (KELLER & STRINGAM, 1978; CHU, 1982; BAJAJ, 1986). Ao contrário, grãos de pólen de flores velhas de *Datura* e de flores do ápice da panícula de trigo, produzem com maior frequência as plantas regeneradas (BAJAJ, 1986).

O fotoperíodo bem como a intensidade de luz são fatores que afetam a frequência da embriogênese (SUNDERLAND, 1981). Variação no fotoperíodo e alta intensidade de luz afetam a embriogênese em fumo, sendo que alta produção de embriões ocorre quando as plantas crescem em regime de dias curtos com alta intensidade de luz (KELLER & STRINGAM, 1978; CHU, 1982; HEBERLE-BORS, 1985). Segundo NITSCH (1981), o crescimento das plantas em regime de luz interna, como nas casas de vegetação, não consegue substituir a luz natural, sendo que muitas vezes a suplementação da luz natural seria aconselhável e que assim a taxa de crescimento é melhor do que se fosse utilizado somente luz artificial. Em trigo, o material que cresce no campo é mais forte, sadio e vigoroso, dando melhor resultado do que as plantas desenvolvidas em casa de vegetação pobremente iluminadas (BAJAJ, 1986). Variação de comprimento do dia é importante, já que em cevada as melhores produções de embriões são obtidas com plantas desenvolvidas no final do verão, e que as plantas desenvolvidas no campo apresentam melhores resultados do que as crescidas em casa de vegetação, enquanto em colza, altas frequências de produção de embriões são obtidas no final da primavera e no início do verão (KELLER & STRINGAM, 1978).

Outro fator importante na embriogênese do grão de pólen é a temperatura. Em *Brassica napus*, plantas desenvolvidas a 15°C durante

16 horas de luz e 10°C por 8 horas de escuro, 97,9% das anteras produziram calos. Em plantas desenvolvidas a 21°C durante 16 horas de luz, e 20°C durante 8 horas de escuro somente 26,7% das anteras produziram calos (KELLER & STRINGAM, 1978; BAJAJ, 1986). Colza produz grande quantidade de calos quando a temperatura é baixa, já para cevada e trigo, as frequências de calos são altas quando a temperatura é alta, como a que acontece no final do verão (CHU, 1982).

A nutrição da planta também apresenta influência na frequência de embriogênese na cultura de antera. NITSCH (1981) recomenda algum tipo de "stress" nutricional pouco antes do período de florescimento e dar nutrição ótima durante o período de desenvolvimento do grão de pólen. Em fumo, a embriogênese de micrósporos ocorre frequentemente em plantas que receberam sais adicionais (KELLER & STRINGAM, 1978).

Em arroz, apesar da importância das condições ambientais nas quais a planta doadora de pólen se desenvolve, poucos foram os trabalhos que pesquisaram este conjunto de efeitos sobre a androgênese. CHUNG et alii (1981), estudando as condições que afetam a androgênese a partir de cultura de antera em arroz, observaram que a temperatura e a luz natural exercem acentuado efeito sobre o estágio da microsporogênese. No final de julho e início de agosto, a média de temperatura do ar na China é de 18,5 a 20°C, e plantas cultivadas nestas temperaturas respondem melhor a androgênese, do que plantas cultivadas em casa de vegetação, com temperaturas controladas baixas de 16 a 18°C e altas de 26 a 28°C. Outro fator observado foi que a intensidade de luz também afeta a androgênese. Em todas as temperaturas, as plantas desenvolvidas sob regime de luz intensa ou suficiente, responderam melhor que as plantas crescidas sob regime de baixa intensidade luminosa. Eles também observaram o comportamento de 3 variedades cultivadas em campo e em casa de vegetação quanto à frequência de indução de calo, diferenciação de plantas verdes e albinas. Concluíram que as plantas cultivadas no campo, são superiores tanto na produção de calos, como na frequência de plantas verdes regeneradas.

O uso de substâncias químicas em determinados estágios de desenvolvimento das plantas, também pode aumentar a frequência de indução de calo. CHUNG et alii (1981) aplicaram CEPA (ácido 2-cloroetilfosfônico-

co) quando as panículas apresentavam anteras com micrósporos em vários estádios de desenvolvimento e observaram que os micrósporos não tratados no estágio uninucleado médio foram inferiores aos tratamentos com CEPA, mesmo quando o tratamento foi feito no período da emergência das flores (grãos de pólen maduro).

Segundo HEBERLE-BORS (1985), a frequência de pólen embriogênico em fumo, não aumenta pelos tratamentos físicos e químicos "in vitro", mas é pré-determinada antes da cultura, sendo influenciado pelas condições de crescimento da planta doadora. Assim sendo temperatura, iluminação, crescimento no campo ou em casa de vegetação e variações das estações, afetam a capacidade de formação de calos e regeneração de plantas. Não é surpresa que os resultados variem de laboratório para laboratório (BAJAJ, 1986), e que materiais homogêneos como a F_1 de duas linhas altamente homozigotas também apresentem resultados variáveis devido às condições de crescimento da planta doadora (WOO & HUANG, 1982).

2.3.4.3. Estádio do micrósporo

O estágio do micrósporo é crítico para o sucesso da cultura de antera ou cultura de pólen isolado. O estágio no qual o pólen muda sua evolução da gametogênese para a androgênese é mais ou menos fixo, ficando próximo da primeira mitose, apresentando variação de uma espécie para outra. Em cereais, o estágio ótimo fica antes da primeira mitose (NITSCH, 1983).

Uma classificação dos estádios do micrósporo é dada por CLAPHAM (1976), sendo assim divididos:

Estádio 1 - Tétrades ou micrósporos jovens: a fase G_1 do ciclo celular.

Estádio 2 - Micrósporo na fase mediana: exina bem desenvolvida, vacúolo presente e núcleo no estágio G_1 .

Estádio 3 - Micrósporo na fase final: vacúolo presente e núcleo na fase S ou G_2 .

Estádio 4 - Primeira mitose do grão de pólen.

Estádio 5 - Núcleo vegetativo e generativo presente, e núcleo generativo separado por uma parede.

Em arroz, a seguinte descrição dos estádios de desenvolvimento do micrósporo é dado por GENOVESI & MAGILL (1979):

- Estádio uninucleado inicial: poro germinativo visível, núcleo pequeno e condensado, e matriz citoplasmática densa, correspondem a fase G_1 do ciclo mitótico.
- Estádio uninucleado médio: a fase S do ciclo mitótico.
- Estádio uninucleado tardio: fase G_2 do ciclo mitótico e o núcleo mais visível que em G_1 , com áreas claras e escuras.
- Estádio binucleado inicial: possui características típicas do grão de pólen, apresentando dois núcleos, um grande e difuso, o núcleo vegetativo, e um núcleo pequeno e condensado, o generativo, os quais são separados por uma pequena membrana.
- Estádio binucleado tardio: caracterizado pelo depósito de amido e a observação dos núcleos fica dificultada.

O estágio uninucleado é o que apresenta melhor resposta para algumas espécies, principalmente as gramíneas, já para outras espécies como o fumo, o melhor estágio é o binucleado. Estádios de desenvolvimento tardios são melhores para a cultura de micrósporos isolados e o estágio uninucleado é o que apresenta o máximo de resposta na absorção de substâncias específicas tais como hormônios e vitaminas (DUNWELL, 1978; MAHESHWARI et alii, 1982).

Para o fumo, o estágio ideal para a androgênese seria a época da primeira mitose ao binucleado inicial. Fora deste estágio, os embriões são produzidos mas em baixas frequências, entretanto estádios tardios são necessários para a produção de embriões a partir de grãos de pólen isolados e para a separação de grãos de pólen embriogênicos dos normais. Isto indicaria que o grão de pólen normal e a parede da antera produzem substâncias inibidoras para o grão de pólen embriogênico e embriões jovens (HEBERLE-BORS, 1985). Segundo BAJAJ (1986), para o sucesso da cultura de pólen isolado é necessário um pré-cultivo das anteras, onde substâncias produzidas pelas anteras auxiliariam no início da embriogênese do grão de pólen.

Em arroz, os autores são unânimes em afirmar que o melhor estágio do micrósporo para a indução da androgênese é o uninucleado, principalmente o uninucleado médio e o tardio (GUHA-MUKHERJEE, 1973; MOK &

WOO, 1976; CHEN & LIN, 1976; HAN & SHUI, 1980; SHU-HUA, 1981; CHEN et alii, 1982; WONG et alii, 1983; KARIN et alii, 1985).

2.3.4.4. Pré-tratamento das anteras

O tratamento a frio das gemas florais, ou em alguns casos das anteras, pode aumentar as respostas das anteras quanto a sua capacidade de produzir calos ou plantas regeneradas. A temperatura ótima para o tratamento varia de espécie para espécie (CHU, 1982; MAHESHWARI et alii, 1982; HU & ZENG, 1986).

Os efeitos do pré-tratamento a frio apontados por CHU (1982), MAHESHWARI et alii (1982), BAJAJ (1986) e HU & ZENG (1986) são: (1) Aumento da frequência da primeira mitose anormal, ou seja, de ocorrência de dois núcleos iguais; (2) retardamento da senescência das anteras, obtendo-se assim um alto número de grãos de pólen embriogênicos viáveis.

Temperaturas baixas e altas podem ocasionar a dissolução dos microtúbulos, aumentando assim, a divisão simétrica do grão de pólen (BAJAJ, 1986). Já YING (1983) demonstrou que, durante o tratamento a frio, a vida da parede da célula foi prolongada e a degeneração do pólen diminuída, e que o pré-tratamento a frio não só iniciou a androgênese como permitiu também que o microsporo se dividisse várias vezes. KELLER & STRINGAM (1978) e BAJAJ (1986) apontam que o tratamento a frio combinado com centrifugação melhora a androgênese em grão de pólen isolado.

NITSCH (1983) observou, que anteras de *Datura* tratadas a 30°C por 48 horas tiveram uma frequência de pólen viáveis de 92%, contra 62% do material não tratado. Resultado semelhante também foi obtido com *Nicotiana*, sendo que o material não tratado, apresentou 45% de grãos de pólen viáveis depois de 5 dias em cultura, contra 68% das anteras tratadas por 48 horas a 50°C.

Na cultura de antera de arroz, a frequência de indução de plantas verdes é muito baixa, mas, quando as panículas foram pré-tratadas a 9-11°C por 14 dias, a frequência de plantas verdes regeneradas por anteras foi aumentada em 7,6% em relação às panículas não tratadas (YING, 1983).

Um dos principais efeitos do pré-tratamento a frio das anteras é o aumento da frequência de calos produzidos que se observa em arroz. Anteras tratadas a 10°C por 4 a 8 dias produzem cerca de 10% de calos contra os 2% obtidos das anteras não tratadas (CHUNG et alii, 1981). A taxa de calos produzidas pela variedade Norin 21, foi de 68% quando as panículas foram tratadas a 13°C durante 14 dias contra os 18% do material não tratado (GENOVESI & MAGILL, 1979). CHALEFF & STOLARZ (1981), estudando os fatores que afetam a formação de calos da variedade Minehikari, observaram uma frequência de 41% quando as panículas foram mantidas a 7°C por 4 dias, comparado com os 31% das anteras não tratadas. ZAPATA et alii (1983), relataram que, tratando as panículas por 8 dias a 8°C, a frequência de calos induzidos foi aumentada em 50% em relação ao controle. A eficiência do tratamento para a produção de calos, também foi alta quando as panículas foram tratadas por 14 dias a 8°C. Só que neste caso, a frequência de plantas albinas regeneradas também foi alta. CORNEJO-MARTIN & PRIMO-MILLO (1981), pré-tratando as anteras a 2-4°C por 48 horas e incubando em seguida em regime de 16 horas de luz por 8 horas de escuro ou só no escuro, observaram que a frequência dos calos produzidos sob o regime de luz foi de 0,95%, enquanto o controle sem tratamento produziu 1,07%. No escuro, as anteras tratadas produziram 2,02% de calos, enquanto que o controle produziu 1,6%.

CHUNG et alii (1981) propuseram uma outra metodologia para o pré-tratamento da cultura de antera que consiste em pré-tratar as anteras em meio líquido por 4 dias a 8°C e transferí-las para um meio sólido. Eles observaram que este tratamento aumentou duas vezes a frequência de calos em relação as anteras não-tratadas. ZAPATA et alii (1983) apresentaram resultados semelhantes, tratando as anteras em meio líquido por 8 dias a 8°C, e mantendo em seguida o material também em meio líquido.

Existe uma tendência geral de realizar pré-tratamento a frio das panículas ou das anteras inoculadas em meio líquido, numa faixa de temperatura que varia de 7 a 10°C por um tempo de 7 a 10 dias (HAN & SHUI, 1980; ZAPATA et alii, 1985; ZAPATA & TORRIZO, 1985; MERCY & ZAPATA, 1986^a).

2.3.4.5. Meio de cultura para indução de calos

A composição do meio de cultura é um dos muitos fatores importantes que afeta o sucesso da cultura da antera, determinando não só o sucesso mas também o modo de desenvolvimento da cultura (BAJAJ, 1986; HU & ZENG, 1986).

O estudo de componentes do meio de cultura para estudo de crescimento de células de arroz, demonstrou que os macronutrientes que afetam o crescimento são NO_3 e NH_4 , sendo o nitrato usado numa concentração oito vezes superior ao amônio. Fósforo e potássio também afetam, de acordo com a concentração, o crescimento da massa celular. Cobalto, iodo, piridoxina, ácido nicotínico e m-inositol não foram essenciais para o crescimento celular (OHIRA et alii, 1973). A omissão de ferro no meio de cultura causa acentuado decréscimo no crescimento de células de arroz. A quantidade necessária de manganês é bem menor do que a observada em outras plantas. Na deficiência de zinco, as células apresentam menos proteínas e acumulam alanina e amidas. Deficiência tanto de zinco como de ferro causam uma diminuição da atividade respiratória da célula (OHIRA et alii, 1975).

HAI-MAN (1981), estudando a evolução dos componentes do meio para cultura de antera em arroz, levanta em sua revisão os seguintes pontos: 1) O uso de NH_4 em baixos níveis é melhor para a cultura de antera de arroz, já que NH_4 afeta não só a frequência de indução de calos mas também a formação de parte aérea verde a partir de calo; 2) Fósforo é muito importante na diferenciação de parte aérea verde, sendo seu efeito maior que outros sais; 3) Ferro pode funcionar possivelmente como regulador de crescimento, como o 2,4-D, mas trabalhos neste sentido tem que ser investigados. O nível de ferro influencia a frequência de indução de calos; 4) Para o sulfato, trabalhos têm demonstrado que mudanças no nível de SO_4 , não influenciam a frequência de formação de calos, possivelmente porque o tecido do arroz tem boa capacidade de estocar sulfatos; e 5) O nível de Mg^{++} afeta significativamente a indução de calos, e claramente influencia a frequência de regeneração de plantas verdes, a partir de calos.

A cultura de antera em arroz, responde a muitos meios básicos diferentes, tais como: o de White (CHEN & LIN, 1976), Nitsche Nitsch

(WOO & TUNG; 1972), Linsmair e Skoog (NISHI & MITSUOKA, 1969; CHALEFF & STOLARZ, 1981), Blaydes (IYER & RAINA, 1972; GUHA-MUKHERJEE, 1973); Gamborg (B_5) (ZAPATA & TORRIZO, 1985; ZAPATA et alii, 1985; ZAPATA et alii, 1986^a; MERCY & ZAPATA, 1986^a; ZAPATA & TORRIZO, 1986); N_6 (SUN et alii 1979; GENOVESI & MAGILL, 1979; OONO, 1981) e MS (MOK & WOO, 1976; WU & KIANG, 1979; CORNEJO-MARTIN & PRIMO-MILLO, 1981; WANG, 1981; CHEN et alii, 1982; WONG et alii, 1983).

Segundo YING (1983), apesar do uso freqüente dos meios básicos (Miller, 1/2 MS; LS modificado, White modificado e N_6), o efeito dos componentes sobre a freqüência de indução de calos a partir de cultura de antera de arroz é menos claro do que o efeito do genótipo, estágio do microsporo e pré-tratamento a frio, já que vários trabalhos têm demonstrado que diferentes subespécies requerem diferentes componentes do meio de cultura.

O meio N_6 descrito por CHU et alii (1975), tem sido bastante usado na cultura de antera na China, para cultivo de antera das variedades japônica, as quais respondem melhor à baixa concentração de NH_4 (YING, 1983; KARIN et alii, 1985). Para a cultura de antera das variedades indica e F_1 dos híbridos indica/japônica, KARIN et alii (1985) e SHAHJAHAN et alii (1985) têm usado o meio H_5 e SK_8 . Isto porque, de acordo com YING (1983), quando são cultivados os híbridos F_1 de cruzamentos indica/japônica no meio N_6 , as plantas verdes regeneradas são geralmente do tipo japônica ou tipo intermediário, sugerindo que o meio de cultura usado pode servir para selecionar o tipo de planta regenerada desejado.

Meio à base de batata tem sido usado na concentração de 20% de extrato de batata, com a finalidade de substituir a maioria dos componentes orgânicos e inorgânicos do meio de cultura sintético. Segundo Chen et alii (1981), citado por HAN (1981) e YING (1983), o meio de batata tem apresentado melhores resultados na indução de calos e principalmente na regeneração de plantas verdes, mas, GURANATHAN & RANGASAMY

CHEN, Z.Q.; LI, S.; LU, D.; ZHENG, S. 1981. Green plants regenerated from isolated rice pollen grains *in vitro* and the induction factors [in chinese, English abstract]. *Acta Genet. Sin.* 8(2):158-163.

(1983) compararam a frequência de indução de calos de vários híbridos F_1 nos meios N_6 e de batata, e observaram que o meio N_6 foi melhor.

2.3.4.6. Reguladores de crescimento e temperatura de incubação

O uso de reguladores de crescimento é outro fator importante para o sucesso da cultura de antera de arroz, mas um assunto também bastante polêmico, já que a embriogênese direta é muito rara sem o uso de hormônios sintéticos ou naturais no meio de cultura e conseqüentemente eles são utilizados comumente.

De acordo com NITSCH (1981), a embriogênese é iniciada pelos reguladores de crescimento, sendo que a presença de hormônios, especialmente auxinas e citocininas no meio de cultura, aumenta a divisão celular. Para se obter plantas haplóides, via androgênese, é necessário adaptar a composição do meio de cultura ao açúcar ou aminoácidos junto com os reguladores de crescimento. CLAPHAM (1976), em sua revisão, mostra que, em cereais, altas concentrações de auxinas como o 2,4-D são necessárias, e que usualmente NAA, IAA e citocininas podem ajudar a indução de calos.

Em arroz, a temperatura de incubação geralmente fica na faixa de 25 a 28°C, e para algumas linhagens, temperaturas mais altas (30°C) são necessárias para alta frequência de indução de calos, mas isso é desfavorável para a regeneração de plantas.

Na cultura de antera em arroz, além da diversificação do uso de meio básico, o uso de reguladores de crescimento, bem como de outros componentes do meio de cultura, é bastante variado, considerando que os genótipos também variam muito de trabalho para trabalho.

WOO & TUNG (1972), cultivando anteras de híbridos entre indica e japonica, em meio Nitsch e Nitsch, suplementado com 1 mg/l de extrato de levedura, 100 ml de leite de côco e 4 mg/l de 2,4-D com a incubação a 30°C no escuro, obtiveram 66 calos.

JYER & RAINA (1972) cultivaram 15 diferentes genótipos de arroz no meio de Blaydes, suplementado com 1 mg/l de 2,4-D, 1,5 mg/l de cinetina e 1% de leite de côco com a incubação no escuro, e observaram que apenas 4 genótipos formaram calos numa frequência, de 2,9% a 5,5%.

GUHA-MUKHERJEE (1973) cultivaram anteras de 20 variedades de arroz no meio Blaydes suplementado com 15% de leite de côco, 1/g 1 de extrato de levedura, 2 mg/l de IAA; 2 mg/l de 2,4-D e 1 mg/l de cinetina com incubação a 25°C no escuro. Das variedades do grupo indica, 10 não responderam e, nas outras 8 variedades, a frequência de formação de calos variou de 0,2% a 26%. Das duas variedades do tipo japonica, uma formou calo e a outra não.

MOK & WOO (1976) inocularam híbridos F_1 entre as variedades dos tipos indica e japonica no meio modificado MS suplementado com 0,5 a 2,0 mg/l de IAA; 2,0 mg/l de 2,4-D e 2,0 mg/l de cinetina e 15% de leite de coco. A incubação foi feita no escuro a 28°C. Das 2500 anteras inoculadas, somente 122 ou 0,48% formaram calos.

CHEN & LIN (1976) inocularam 5 variedades do grupo japonica e 7 variedades indica no meio modificado White com 5 mg/l de NAA, 2,5 mg/l de cinetina e 15% de leite de coco com a incubação de 1000 lux. Para as variedades do grupo japonica, a frequência de indução de calos variou de 5,7% a 44,7%, e, para as indicas, três variedades não formaram calos e a maior frequência foi de 8,9%.

GENOVESI & MAGILL (1979) inocularam a variedade Norin 21 do grupo japonica no meio N_6 suplementado com 2 mg/l de NAA. A incubação foi feita inicialmente no escuro por 2 semanas a 25°C e depois transferida para regime de 16 horas de luz. Foi obtido um resultado que variava de 0,5 a 83,5% dependendo do estágio e do pré-tratamento utilizado.

WU & KIANG (1979), cultivando anteras de arroz selvagem *Oryza perennis* var. *formosana* no meio MS acrescido com 2 mg/l de IAA, 2 mg/l de cinetina, 2 mg/l de 2,4-D e 10% de leite de côco, incubadas a 25°C no escuro, relataram que 12 calos foram produzidos.

CORNEJO-MARTIN & PRIMO-MILLO (1981) cultivaram anteras de duas variedades e dois híbridos no meio MS suplementado com 0,2 a 2mg/l de 2,4-D ou 0,2 a 2mg/l de NAA. A incubação foi feita no escuro e também sob fotoperíodo de 16 horas de luz. A variedade Bahia respondeu melhor com 2 mg/l de 2,4-D, já a variedade Girona respondeu melhor com 2 mg/l de NAA. O híbrido Balilla x Sollana respondeu melhor à concentração de 0,2 mg/l de NAA. Quanto à incubação, as variedades e os híbridos responderam me-

lhor no escuro.

CHUNG et alii (1981), cultivando variedades e híbridos da subespécie japonesa nos meios básicos Miller ou N_6 adicionado com 2 mg/l de 2,4-D e CEPA nas concentrações de 0,2 e 4 mg/l, observaram que com 2 e 4 mg/l de CEPA a frequência de indução de calo foi maior que o controle.

WOO & HUANG (1982) cultivaram anteras de arroz selvagem *Oryza spontaneus* var. *taiwanica*, no meio MS suplementado com 0,5 mg/l de cinetina e seus híbridos F_1 e F_2 com arroz cultivado no meio MS acrescido de 2 mg/l de NAA. A frequência de indução de calo no arroz selvagem foi de 48% e, para os híbridos F_1 , as frequências variaram de 36 a 53% e para a geração F_2 , de 61 a 66%.

CHEN et alii (1982) cultivaram várias linhagens de arroz com marcadores genéticos no meio MS modificado com 2 mg/l de cinetina e 4 mg/l de NAA. De 4320 anteras inoculadas, 1563, ou seja, 36,2% produziram calos.

CHUNG (1982), usando o meio N_6 suplementado com 2 mg/l de 2,4-D, inoculou anteras de 8 híbridos F_1 e o resultado observado foi uma variação de formação de calo de 1,4% a 15,7%.

WONG et alii (1983) inocularam anteras obtidas de sementes da variedade Tainan 5, tratadas com EMS (etilmetanossulfonato), no meio MS suplementado com 4 mg/l de NAA e 2 mg/l de cinetina e as incubaram a 26°C. Nas sementes tratadas por 4 horas com EMS as anteras não formaram calos. No tratamento por 5 horas a frequência de formação de calos foi de 2,33%. Nas sementes tratadas por 8 horas as anteras não formaram calos, e o controle apresentou uma taxa de formação de calos de 14,27%.

GURUNATHAN & RANGASAMY (1983) inocularam anteras de vários híbridos no meio N_6 ou no extrato de batata suplementado com 2 mg/l de 2,4-D com a incubação no escuro a 24-26°C. As anteras responderam melhor no meio N_6 do que no extrato de batata; e as frequências de indução de calos nos dois meios variaram de 2 a 10%.

ZAPATA & TORRIZO (1985) inocularam anteras das variedades Giza 170 e Taipei 309 no meio de Gamborg (B_5) suplementado com 0,5 mg/l de IAA, 0,5 mg/l de BAP e 1 mg/l de 2,4-D. A incubação foi feita no escuro. Para a variedade Taipei 309, as frequências de indução de calos

variaram de 27,2% a 50% e para Giza 170 de 0 a 68,4%.

MERCY & ZAPATA (1986^b) inocularam anteras da variedade Taipei 309 no meio N₆, no meio de batata suplementado com 2 mg/l de 2,4-D e no meio E₁₀ (Gamborg modificado) suplementado com 1 mg/l de 2,4-D 0,5 mg/l de BAP e 0,5 mg/l de IAA. As frequências de indução de calos foram de 23 a 33%, 26 a 37% e 20 a 45% nos meios N₆, batata e E₁₀, respectivamente.

2.3.4.7. Regeneração de plantas

Em muitas espécies, por razões não conhecidas, a embriogênese direta é rara e as plantas têm que ser diferenciadas de calos. Para indução de calos, geralmente é necessário uma auxina, e para a regeneração de plantas, um simples meio básico é suficiente, ou o uso de citocininas junto com baixas concentrações de auxina. Geralmente, a regeneração de plantas passando por calos, resulta em muitas anomalias celulares, tais como, endomitose e aberrações cromossômicas. Em cereais uma grande proporção das plantas regeneradas são albinas que não têm valor prático na agricultura (MAHESHWARI et alii, 1982).

Apesar da complexidade dos resultados dos trabalhos, CHING (1982) apresenta alguns aspectos importantes na regeneração de plantas a partir de cultura de antera de arroz: (1) a idade do calo tem influência marcante na regeneração de plantas, pois mais de 50% dos calos podem produzir plantas quando são transferidos para o meio de regeneração com 10 a 15 dias de idade. Calos mais velhos com idade de 50 dias não regeneram plantas; (2) os meios básicos MS ou N₆ induzem melhor a regeneração de plantas do que o meio de Miller; (3) os meios suplementados com 0,2 mg/l de IAA e 1 mg/l de cinetina são usados normalmente para a regeneração de plantas. Calos de arroz no meio de regeneração sem hormônio, podem regenerar plantas na mesma frequência que no meio com hormônio e (4) alta ocorrência de regeneração da parte aérea necessita de altas concentrações de sacarose. Entretanto, a concentração de 5% é suficiente para a indução de calos e regeneração de plantas.

O desenvolvimento de plantas diretamente das anteras, sem passar pelo estágio de calo, foi estudado em arroz por Lin et alii (1980), citado por YING (1983). O estudo foi baseado no balanceamento de auxi-

LIN CONG-SONG, et al. 1980. Pollen planthets induced dirictly via anther culture in rice. (não publicado)

na e cinetina. Quando 2,4-D decresce para 0 a 0,1 mg/l, o micrôsporo desenvolveu e diferenciou diretamente em planta sem passar pelo estágio de calo.

ZAPATA et alii (1983), estudando a relação entre o meio de indução de calo e o meio de regeneração de plantas em arroz, observaram que a regeneração de plantas requer um meio mais complexo, e que 2,4-D no meio de indução de calo acelera a produção da parte aérea pelo aumento na síntese de citocinina.

MERCY & ZAPATA (1986^b), estudando a influência da concentração de sacarose no meio de regeneração de plantas, observaram que, em todos os três meios com altos níveis de sacarose, a frequência de regeneração de plantas foi alta.

SHAHJAHAN et alii (1985), analisando o efeito de condições de incubação sobre o meio de indução de calo, observaram que o meio H5 modificado e a incubação no escuro apresentaram boa formação de calo, regeneração de plantas e principalmente uma alta frequência de plantas verdes.

2.3.4.8. Albinismo

Planta albina é um fenômeno bastante comum em plantas regeneradas de cultura de pólen em gramíneas. A frequência de plantas albinas varia de 5 a 90%. Segundo CHING (1982), dois fatores estão relacionados com a frequência de plantas albinas. (1) O genótipo do cultivar; (2) A temperatura durante o período de incubação.

SUN et alii (1979) demonstraram que as plântulas regeneradas de pólen de arroz apresentam baixa capacidade de formar a fração I da proteína, causada por uma proteína nos cloroplastos antes da formação das células vegetativas e generativas, e que as plantas albinas apresentam os rRNAs 23s e 16s poucos ou ausentes, sugerindo que isto talvez seja devido a falta de reparo no DNA do plastídeo.

Estudos de estrutura submicroscópica de plantas verdes e albinas demonstraram que, em células de plantas verdes, são encontrados muitos cloroplastos e mitocôndrias e que as células da superfície da folha são planas ou semi-invaginadas, indicando menor conteúdo de água. Nas células de plantas albinas, a quantidade de cloroplastos e mitocôn-

drias é menor ou nula, e as células são ricas em água (CHIH-CHING,1981).

NIIZEKI (1983) cita alguns fatores sobre os mecanismos para a produção de plantas albinas: (1) distúrbio no metabolismo de proteína; (2) deficiência de metabolitos no meristema dos calos; e (3) efeito da temperatura de incubação.

ZAPATA et alii (1983) encontraram dois tipos de plantas albinas: as verdadeiras e as fisiológicas que dependendo do meio podem reverter ao verde normal, demonstrando portanto que as mudanças podem ser fisiológicas ou genéticas.

DINGGANG & JUNWEN (1983), trabalhando com anteras de arroz tetraplóide, demonstraram que a possibilidade das plantas albinas serem devido a mutação de genes nucleares é pouco provável, já que, na variedade Takahara, o total de plantas albinas foi de 84,0% para plantas regeneradas tetraplóides e 85,8% para plantas diplóides, e na variedade Nongken 13, foi de 67,9% para as tetraplóides e 97,8% para as diplóides, respectivamente.

2.3.4.9. Variação somaclonal

A variação em relação ao nível de ploidia nas plantas regeneradas na cultura de anteras, pode apresentar três tipos de mutações, do ponto de vista citológico: euploidia, aneuploidia e quimeras citológicas (Mc-COMB, 1981). Segundo este mesmo autor, os seguintes pontos devem ser considerados na poliploidização durante os estádios iniciais e tardios da cultura: (1) o estágio uninucleado não é haplóide devido a anormalidades durante a meiose; (2) a divisão inicial do núcleo vegetativo é precedida pela degeneração das organelas citoplasmáticas e a reorganização pode gerar deficiência dos fusos ou de mitocôndria, causando uma divisão incompleta ou endomitose, aparecendo núcleos diplóides; (3) fusão de núcleo em estádios iniciais da divisão nuclear; (4) ocorrência de endoreduplicação dos cromossomos na metáfase dos núcleos generativos; (5) células crescendo em forma de calos talvez demonstrem citocinese incompleta e aparentemente não sofrem uma severa limitação como a imposta a uma célula meristemática de um esporofítico; e (6) fusão de fusos e endoreduplicação estariam ligados a euploidia, e mitose multipolar, pontes e cromossomas retardatários estariam ligadas a aneuploidia.

No arroz também existe uma grande variação no número de cromossomos em plantas regeneradas, sendo que uma grande parte das plantas regeneradas são diplóides. OONO (1981) observou que cerca de 48,5% das plantas regeneradas foram diplóides, 40% haplóides e as restantes foram triplóides, tetraplóides e aneuplóides, e que longos períodos da cultura também aumentam a frequência de diplóides, sendo que calos com idade entre 30 a 50 dias regeneram plantas com maior fertilidade. Resultados semelhantes foram observados por CHEN & LIN (1976), onde mais de 50% das plantas regeneradas são diplóides. CHIH-CHING (1981) afirma que 90% das plantas diplóides regeneradas são homozigotas, indicando que as plantas são originadas de micrósporos com o número de cromossomos duplicados e não do tecido somático da antera. CHUNG (1982) observou que, em 50 plantas regeneradas de plantas de vários híbridos F_1 , 20 foram haplóides, 25 diplóides e 5 triplóides. NISHI & MITSUOKA (1969), comparando o nível de ploidia com caracteres morfológicos de plantas regeneradas na cultura de antera e ovário, observaram plantas com nível de ploidia n , $2n$, $3n$, $4n$ e $5n$, sendo que diferentes níveis de ploidia acarretam alterações na panícula, raiz e porte da planta. No cruzamento de *Oryza sativa* x *O. glaberrima*, WOO et alii (1983), analisando 97 plantas regeneradas, observaram que 34 plantas eram haplóides, 58 diplóides e 5 tetraplóides. CHEN & CHEN (1980), analisando o efeito da transferência de calos sobre o nível de ploidia da célula, observaram que, em 17 culturas durante 19 transferências, somente um calo tetraplóide e um hexaplóide não variaram no número de cromossomos e que 13 culturas apresentaram uma série geométrica (n , $2n$, $4n$ e $8n$), indicando que endomitose e endorredução foram responsáveis pelas alterações ocorridas.

Além das variações cromossômicas, as plantas de arroz regeneradas pela cultura de tecido ou célula, também apresentam alterações a nível de características morfológicas. ZONG-XIU et alii (1983), estudando a herança e variação de algumas características de 2.000 plantas regeneradas de células somáticas, observaram que somente 24,4% das linhas foram normais para todas as características analisadas.

CHEN et alii (1982), usando dois marcadores genéticos, estudaram a segregação desses, em plantas regeneradas pela cultura de antera de arroz e em plantas autofecundadas de F_1 . Eles observaram que tan-

to as plantas haplóides como as plantas diplóides, regeneradas pela cultura de antera, apresentaram uma segregação de 1:1, como era esperado pelo teste do χ^2 para os dois marcadores genéticos, e que a geração F_2 apresentou também uma segregação normal 3:1. Para o teste de independência tanto para as plantas haplóides como para os diplóides regeneradas, a segregação de 1:1:1:1 foi altamente significativa, demonstrando que os locus são ligados. Estes resultados são importantes para a cultura de antera em arroz, pois demonstram que as plantas regeneradas realmente foram obtidas de micrósporos de arroz e não do tecido somático da antera. Resultados semelhantes a estes foram descritos por HU & ZENG (1986), em trigo, para características da cor da semente, cor das glumas, arista e tipo de espiga.

Com relação a estabilidade de características, em gerações avançadas de plantas regeneradas de cultura de antera, ZHEN-HUA (1982) observou em cinco gerações que as características tais como data de florescimento, altura da planta, comprimento da panícula, comprimento da folha bandeira e peso de 1.000 sementes, se mantiveram estáveis sem apresentar variações significativas.

RANGASAMY et alii (1987), comparando plantas regeneradas de híbridos F_1 pela cultura de antera com seus progenitores, observaram que, a altura da planta, o número de perfilhos, o número de grãos por panícula e o peso de grãos por planta, não apresentaram coeficiente de variação maior que os progenitores, sendo a única exceção o comprimento da panícula das plantas regeneradas, que apresentou um coeficiente bem maior que o progenitor Co-37 mas equivalente ao outro, Co-40. Resultados semelhantes a estes são descritos por YING & LIANG-TSAI (1981), para as características: data de florescimento, altura de planta, número de panículas por planta e densidade da panícula.

Outro problema sério nas plantas regeneradas através da cultura de antera em arroz é a baixa fertilidade das panículas, que dificulta a continuidade dos trabalhos (MOK & WOO, 1976).

OONO (1981) aponta que as altas frequências de mutação espontânea nas plantas regeneradas de calo, possivelmente são devido: (1) aos processos de desdiferenciação e rediferenciação que podem ser geneticamente instáveis; (2) às auxinas ou outros componentes do meio que po-

dem atuar como mutagênicos; e (3) às condições não adequadas para a cultura de antera de arroz "in vitro".

3. METODOLOGIA

3.1. Indução de calo

A condução dos experimentos foi feita no Laboratório da Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), utilizando duas variedades de arroz de sequeiro IAC-165 e Dourado Precoce, de procedência do Centro Nacional de Pesquisa do Arroz e Feijão (CNPAP), EMBRAPA, Goiânia. As variedades foram plantadas em vasos de barro contendo uma mistura de terra, estêrco curtido e areia, com intervalo de 15 dias durante o verão e 30 dias durante o inverno, em casa de vegetação, sem controle de luz e temperatura. As variedades foram adubadas com a solução nutritiva de Hoagland & Arnon nº 2, 30 dias após a germinação e com intervalo de 15 dias.

As panículas foram coletadas antes da emergência das mesmas, obedecendo a característica morfológica, que são a distância da aurícula da penúltima folha até a aurícula da folha bandeira, e a determinação do estágio correto do micrósporo feito microscopicamente, fixando-se uma amostra das anteras da panícula em solução Carnoy (3 partes de álcool etílico: 1 parte de ácido acético glacial). A coloração foi feita com carmim acético a 1%. De acordo com estas observações, os micrósporos foram divididos em 3 estágios: téttrade, uninucleado e binucleado, para serem testados quanto à sua capacidade de formação de calos.

3.1.1. Estágio do micrósporo

Para o teste de estágio do grão de pólen, as panículas foram pré-tratadas em geladeira à temperatura de 7 a 10°C por 7 dias e as anteras foram inoculadas no meio modificado MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), contendo metade da concentração dos macro e micronutrientes com exceção do ferro que permaneceu na concentração normal, 50 mg/l de m-inositol, 4

mg/l de glicina, 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina, 0,2 mg/l de tiamina, 6 mg/l de 2,4-D, 2 mg/l de NAA e 40 g/l de sacarose, sendo o pH do meio ajustado para 5,8 e o meio esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos. Para inoculação de todos os experimentos, a assepsia da panícula foi feita com hipoclorito de sódio usando o produto comercial Q-BOA, na concentração de 20% v/v por 20 minutos e lavado por 3 vezes em água destilada e esterilizada. As placas de Petri, contendo 20 ml do meio de cultura e as anteras foram vedadas com parafilme e incubadas a 27°C no escuro por 30 dias para depois serem avaliadas.

3.1.2. Meio de cultura e reguladores de crescimento

Para a comparação dos meios N₆, (CHU et alii, 1975) e o meio modificado MS, (metade da concentração dos macro e micronutrientes, exceto a concentração de ferro), foram acrescentados para ambos os meios 50 mg/l de m-inositol, 4 mg/l de glicina, 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina, 0,2 mg/l de tiamina e 40 g/l de sacarose com o pH ajustado para 5,8. Para o meio N₆, foram testados os hormônios combinados de 2,4-D e NAA nas seguintes concentrações: 0, 1, 2, 3 e 4 mg/l e 0, 1, 2, 3, 4 e 6 mg/l respectivamente. Para o meio MS modificado, a concentração dos hormônios foram 0, 1, 2 e 4 mg/l de 2,4-D combinado com 1, 2, 3, 4 e 6 mg/l de NAA. Para análise do efeito de BAP foram usadas as concentrações de: 0, 0,5, 1, 2 e 4 mg/l. Os meios foram esterilizados em autoclave a 120°C por 15 minutos. Os micrôsporos foram inoculados no estádio uninucleado. As panículas foram pré-tratadas a 7-10°C em geladeira por 7 dias. A incubação foi feita no escuro a 27°C e avaliação do número de calos formados foi feita depois de 30 dias.

3.1.3. Fatores químicos: inorgânicos e orgânicos

No estudo de alguns componentes orgânicos e inorgânicos do meio de cultura, foi usado o meio MS modificado como já citado acima, acrescentado de 50 mg/l de m-inositol, 4 mg/l de glicina, 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina, 0,2 mg/l de tiamina, 40 g/l de sacarose, 6 mg/l de 2,4-D e 2 mg/l de NAA com o pH ajustado para 5,8. Este meio foi utilizado como padrão.

Para avaliação dos componentes específicos foram realizados os seguintes experimentos entre os quais somente um elemento foi altera-

do e os outros permaneceram constante:

1) Teste de ferro-EDTA: Foram utilizadas as seguintes concentrações: 37,3 mg/l de Na_2 -EDTA mais 27,8 mg/l de FeSO_4 ; 74,6 mg/l de Na_2 -EDTA mais 55,6 mg/l de FeSO_4 ; 129,2 mg/l de Na_2 -EDTA mais 111,2 mg/l de FeSO_4 ; 258,4 mg/l de Na_2 -EDTA mais 222,4 mg/l de FeSO_4 .

2) Teste de m-inositol: Foram utilizadas as concentrações de 0, 50, 100 e 200 mg/l.

3) Teste de sacarose: Foram usadas as concentrações de 5, 10, 40 e 80 g/l.

4) Teste de glicina e metionina: Foram usadas as concentrações de 0, 4, 8 e 16 mg/l.

5) Teste de tiamina: Foram usadas as concentrações de 0,2, 0,4, 0,8 e 1,6 mg/l.

6) Teste de biotina: Foram usadas as seguintes concentrações de 0, 0,5, 1, 2 e 4 mg/l.

7) Teste de comparação do meio sólido versus meio líquido e uso de carvão ativado: O meio usado é o MS modificado, acrescidos com os componentes citados acima.

a) Meio líquido: Somente os componentes citados acima foram utilizados.

b) Meio sólido: Além dos componentes do meio líquido, foi adicionado mais 8 g/l de agar.

c) Meio líquido mais 2 g/l de carvão ativado.

d) Meio sólido mais 2 g/l de carvão ativado.

Para todos os experimentos citados acima, os micrôsporos foram inoculados no estádio uninucleado e as panículas foram pré-tratadas na geladeira a 7-10°C por 7 dias. A incubação foi feita no escuro a 27°C e a contagem dos calos foi feita 30 dias após a inoculação.

3.1.4. Fatores físicos

Para verificação do efeito do pré-tratamento na formação de calos, foi utilizado o MS modificado acrescido de 50 mg/l de m-inositol, 4 mg/l de glicina, 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina, 0,2 mg/l de tiamina, 6 mg/l de 2,4-D, 2 mg/l de NAA e 40 g/l de sacarose com o pH ajustado para 5,8. As temperaturas usadas para pré-

tratamento foram 5, 10 e 15°C, todas por 5, 10 e 15 dias, utilizando uma câmara de temperaturas graduadas modelo TG-100-AD, marca NKS, Japão. O material inoculado estava no estágio uninucleado e a incubação foi feita no escuro a 27°C e a avaliação foi feita 30 dias após a inoculação. Como testemunha, foram inoculadas anteras sem pré-tratamento.

Também foi analisado o efeito da temperatura de incubação. Para este experimento, foi usado o meio citado no experimento acima. As anteras continham micrôsporos no estágio uninucleado e foram pré-tratadas a 7-10°C por 7 dias. As placas de Petri com o meio e as anteras foram incubadas nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C durante 30 dias, na estufa de temperaturas graduadas acima mencionada.

O efeito da luz sobre a formação de calos também foi avaliado. O meio e o estágio do grão de pólen foram os mesmos utilizados no estudo do pré-tratamento. Neste caso, o pré-tratamento foi feito a 7-10°C por 7 dias em geladeira e a testemunha foi a incubação no escuro a 27°C. O período de luz foi de 16 horas por 8 de escuro. A temperatura da sala de luz variou durante o período de experimentação de 18°C a 39°C com a luminosidade em torno de 3.000 lux. Após 30 dias da incubação, foi feita a contagem dos calos.

Para a avaliação do efeito dos raios-gama sobre a formação de calos, as panículas e as anteras mais o meio de cultura foram irradiadas nas doses de 0, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 Krad na taxa de 0,5 krad por minuto. O meio utilizado foi o MS modificado, o estágio dos micrôsporos foi o uninucleado, as panículas foram pré-tratadas a 7-10°C por 7 dias, a incubação foi feita no escuro a 27°C e a contagem dos calos 30 dias após a incubação.

3.2. Regeneração de plantas

3.2.1. Efeito dos componentes químicos

Para os testes de regeneração de plantas, foi utilizado o meio MS normal acrescido de 100 mg/l de m-inositol, 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina, 0,2 mg/l de tiamina e 50 g/l de sacarose com pH 5,8. Foram avaliadas as seguintes combinações de fatores:

Meio R₁: 1mg/l de NAA mais 1 mg/l de cinetina. (Neste teste do meio líquido, o suporte para os calos foi feito com algodão e papel de

filtro esterilizado);

Meio R₂: 1 mg/l de NAA mais 2 mg/l de cinetina. (Neste meio líquido, o suporte para os calos foi igual ao do meio anterior);

Meio R₃: 1 mg/l de NAA, 1 mg/l de cinetina, 8 g/l de agar e 10 g/l de extrato de levedura;

Meio R₄: sem hormônios, porém com 8 g/l de agar;

Meio R₅: 1 mg/l de NAA; 1 mg/l de cinetina, 10 g/l de extrato de levedura e 3 g/l de carvão ativado, 8 g/l de agar;

Meio R₆: 1 mg/l de NAA; 1 mg/l de cinetina, 8 g/l de agar e 3 g/l de carvão ativado;

Meio R₇: 1 mg/l de NAA; 1 mg/l de cinetina, 8 g/l de agar.

Para todos os testes acima mencionados, os calos inoculados apresentavam idade entre 15 a 18 dias após sua formação (visualização) e foram incubados em sala de luz com temperatura variando entre 22 a 39°C. A avaliação foi feita 20 dias após a inoculação. As plantas regeneradas com parte aérea e raiz foram transferidas para o meio MS normal citado acima, acrescidos de 8 g/l de agar e 3 g/l de carvão ativado.

3.2.2. Idade do calo

Outra avaliação feita, foi o efeito da idade do calo na regeneração de plantas. Para isso, os calos foram inoculados aos 7, 14 e mais de 21 dias após a visualização. O meio utilizado foi o MS normal, descrito para regeneração de plantas, acrescido de 1 mg/l de NAA, 1 mg/l de cinetina, 8 g/l de agar e 3 g/l de carvão ativado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estádio do micrósporo

O estágio do grão-de-pólen exerce um grande efeito na frequência de formação de calos como também afeta a regeneração de plantas. Existem vários trabalhos que discutem a importância do estágio do grão-de-pólen sobre a formação de calos. Alguns, tentam correlacionar as características morfológicas externas da planta, com o estágio de desenvolvimento dos micrósporos na antera. CHIH-CHING (1981) afirma que micrósporo com estádios uninucleados médio a binucleado médio podem produzir altas quantidades de calos, e que uma alta frequência de micrósporo com estágio uninucleado tardio pode ser encontrada quando as espiguetas apresentarem as seguintes características morfológicas: (1) O comprimento da lema é igual ao da espiguetta madura e amarelada; (2) os estames têm cerca de 33 a 50% do comprimento das glumas. Já MERCY & ZAPATA (1986^a), avaliando o comprimento da lígula da folha bandeira até a lígula da penúltima folha, com relação ao estágio do micrósporo e a frequência de indução de calos, observaram que alguns estádios de desenvolvimento foram comuns na mesma espiguetta. Foram observados as seguintes combinações: uninucleado inicial e médio ou uninucleado médio e tardio ou uninucleado tardio a binucleado inicial. Observaram ainda que a determinação do estágio do micrósporo através das características morfológicas externas podem apresentar uma determinada correlação, no entanto, pode também induzir a muitos erros.

No presente trabalho, a tentativa de caracterizar o estágio do micrósporo, com as características morfológicas da planta doadora, usando a medida do comprimento da lígula da folha bandeira até a lígula da penúltima folha, mostrou que os resultados observados não foram viáveis, uma vez que a mesma medida quando tomada em plantas cultivadas em épocas diferentes

ou em perfilhos de uma mesma planta, formados também em épocas diferentes podem apresentar micrósporos em estádios diferenciados, apesar de apresentar a mesma distância entre as lígulas. Portanto, para uma melhor uniformidade na frequência de indução de calos é necessário uma confirmação microscópica.

Com relação ao melhor estágio do micrósporo para a indução de calos, é consenso geral entre os pesquisadores que o estágio uninucleado é o melhor. Restando discutir se o estágio uninucleado médio ou tardio é o que induz maior frequência de calos (CHEN & LIN, 1976; GENOVESI & MAGILL, 1979; BAJAJ, 1986 e MERCY & ZAPATA, 1986^a). Os resultados observados no presente trabalho onde a frequência de calos no estágio uninucleado foi superior aos demais estádios, conforme os dados da Tabela 1, confirmam as opiniões dos pesquisadores citados acima. As duas variedades Dourado Precoce e IAC-165 apresentaram o mesmo estágio como superior, sendo que na variedade Dourado Precoce o estágio uninucleado superou dez vezes mais aos outros. Já na variedade IAC-165 apesar do uninucleado ter sido melhor, a diferença não foi tão alta, ficando cerca de quatro vezes acima do estágio inicial.

TABELA 1 - Efeito do estágio do micrósporo na frequência de indução de calo.

Estádio	Dourado Precoce			IAC-165		
	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
Meiose a Tétrade	150	12	8,00	154	26	16,88
Uninucleado	183	176	96,18	172	121	70,35
Binucleado	168	16	9,52	150	0	0

Anteras com micrósporos em desenvolvimento tardio como o estágio binucleado, quando inoculadas, tornavam-se marrons e liberam os grãos-de-pólen no meio de cultura, o que prejudicou o desenvolvimento normal na formação de calos. Resultados semelhantes foram observados por ZAPATA et alii (1983).

4.2. Meio básico e reguladores de crescimento

Como já foi descrito na revisão bibliográfica, o uso de meios básicos bem como dos reguladores de crescimento, variam muito de laboratório para laboratório, que associados com a variação a nível de genótipos dificultam bastante a análise para determinar qual o melhor meio básico para a cultura de antera de arroz. Contudo, em alguns pontos existe um consenso, o meio N_6 se adapta bem para variedades do grupo japonica onde os cultivares são sensíveis às concentrações elevadas de amônio.

Para as variedades brasileiras de arroz de sequeiro ainda não existe uma definição que indique em qual dos grupos elas possam ser enquadradas: japonica, indica ou javanica. Para a cultura de antera dessas variedades os meios escolhidos foram os seguintes: meio MS, clássico nos trabalhos de cultura de tecido e célula, e o meio N_6 recomendado para cultura de anteras de arroz do grupo japonico e outras espécies.

De acordo com ZAPATA et alii (1983), o meio básico MS sem modificação, apresenta uma quantidade total de nitrogênio de 60 mM, enquanto o meio N_6 apresenta somente 35 mM de nitrogênio total. No IRRI, o meio geralmente utilizado para a androgênese em arroz é o meio B_5 de Gamborg (1968), que tem 26,72 mM de nitrogênio. Com base nestes dados foi feita a alteração do meio MS, utilizando a metade dos macro e micronutrientes, com exceção da concentração de ferro. Neste caso, o meio MS modificado apresenta uma quantidade de nitrogênio próxima de 30 mM por litro, ocupando com relação à concentração de nitrogênio, a posição intermediária entre os meios B_5 e N_6 e conservando os micronutrientes do meio MS em concentrações menores, como é o caso do cloro, cobre, molibdênio e cobalto ausentes no meio N_6 .

Esta alteração foi eficiente, conforme Tabela 2 e 3. As variedades Dourado Precoce e IAC-165 responderam melhor ao meio MS modificado do que as do meio N_6 . Das 3102 anteras inoculadas no meio N_6 da variedade Dourado Precoce, somente 30 formaram calos, numa frequência de 0,97%. Para a variedade IAC-165 das 3148 anteras inoculadas no meio N_6 somente 38 calos foram observados dando uma frequência de 1,21%. No meio MS modificado, das 1968 anteras inoculadas da variedade Dourado

TABELA 2 - Efeito da concentração dos reguladores de crescimento 2,4-D e NAA na frequência de indução de calos nas variedades Dourado Precoces e IAC-165, quando inoculadas no meio básico N₆.

Concentração mg/l		Dourado Precoces			IAC-165		
2,4-D	NAA	Número Antera	Número Calo	Frequên- cia (%)	Número Antera	Número Calo	Frequên- cia (%)
0	0	156	0	0	144	0	0
0	1	156	0	0	156	0	0
0	2	156	0	0	156	0	0
0	3	162	0	0	156	0	0
1	0	156	1	0,64	156	0	0
1	1	162	0	0	162	0	0
1	2	132	0	0	162	0	0
1	3	150	0	0	150	0	0
2	0	186	0	0	180	0	0
2	1	150	4	2,67	162	3	1,85
2	2	156	1	0,64	186	4	2,15
2	3	162	7	4,32	162	0	0
3	0	144	9	6,25	138	8	5,80
3	1	150	0	0	126	2	1,59
3	2	132	4	3,03	156	5	3,20
3	3	156	0	0	138	6	4,35
4	1	168	3	1,79	160	1	0,62
4	2	156	0	0	168	3	1,79
4	4	162	0	0	168	0	0
4	6	150	1	0,67	162	6	3,70
Total		3102	30	0,97	3148	38	1,21

Precoces, 23,63% formaram calos, superando em mais de vinte e três vezes a resposta desta variedade no meio N₆. Com relação a resposta da variedade IAC-165 o resultado foi ainda mais espetacular, pois das 1892 anteras inoculadas no meio MS modificado, 1177 calos foram observados, dando uma frequência de 62,21%, cerca de cinquenta e uma vezes maior que a

TABELA 3 - Efeito da concentração dos reguladores de crescimento 2,4-D e NAA na frequência de indução de calos das variedades Dourado Precoce e IAC-165, quando inoculadas no meio MS modificado.

Concentração mg/ℓ		Dourado Precoce			IAC-165		
2,4-D	NAA	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
0	1	162	0	0	144	0	0
0	1	162	3	1,85	150	2	1,33
0	2	150	2	1,33	144	1	0,69
0	3	108	0	0	162	21	12,96
1	1	174	20	11,49	156	8	5,13
1	2	150	0	0	156	145	92,95
1	3	114	12	10,53	162	275	169,75
2	1	174	33	18,97	168	121	72,02
2	2	114	85	74,56	156	116	74,36
4	1	162	109	67,28	108	20	18,52
4	2	162	37	22,84	108	169	156,48
4	4	162	100	61,73	162	187	115,43
4	6	174	64	36,78	116	112	96,55
Total		1968	465	23,63	1892	1177	62,21

resposta desta variedade no meio N₆.

Estes resultados indicam que, provavelmente, para as duas variedades testadas necessitam de uma relação amônio/nitrato diferente das do grupo japônica, e que talvez algum micronutriente seja importante para estes cultivares estudados os quais não estavam presentes no meio N₆. Futuras investigações deverão ser realizadas a fim de esclarecer estas dúvidas.

É conhecido que em cultura de antera de arroz, a embriogênese direta é difícil, e que a passagem por estágio de calo é necessária. Por isso na fase de indução de calos é importante o uso de reguladores

de crescimento, principalmente das auxinas, as quais segundo JACOBSEN(1986), apresentam os seguintes efeitos: (1) Dominância apical; (2) alongação das células da raiz e parte aérea; (3) Eliminação do H^+ e mudança na permeabilidade do plasmolema; (4) Formação de etileno; (5) Formação de raízes adventícias; (6) Aumento na taxa de respiração; (7) Crescimento desorganizado do tecido em altas concentrações (efeito de herbicida); (8) Inibe a formação de embrião de células com suspensão; (9) Formação de frutos partenocárpicos em algumas espécies; e (10) Irregularidades mitóticas em tecido mantidos em cultura por longos períodos. Enquanto que o uso de citocininas aparentemente não é importante na indução de calos (BAJAJ 1986).

Conforme a Tabela 3, as variedades Dourado Precoce e IAC-165 respondem de maneira diferente às concentrações dos hormônios 2,4-D e NAA. Para a variedade Dourado Precoce, a maior indução de calo foi observada na concentração de 2 mg/l de 2,4-D mais 2 mg/l de NAA, enquanto que a variedade IAC-165 respondeu melhor à concentração de 1 mg/l de 2,4-D mais 3 mg/l NAA. Mas de maneira geral 2,4-D é um componente importante, pois nos meios em que ele foi omitido nas duas variedades testadas a frequência de indução ou foi muito baixa ou não foi formado calo, não importando qual dos meios foi utilizado.

TABELA 4 - Efeito da concentração do regulador de crescimento BAP na frequência da indução de calo.

Concentração mg/l	Dourado Precoce			IAC-165		
	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
0	198	294	148,48	204	284	139,22
0,5	198	12	6,06	198	10	5,05
1,0	174	6	3,45	180	27	15,00
2,0	174	18	10,34	192	17	8,85
4,0	174	31	17,82	192	9	4,69

O uso do regulador de crescimento BAP, tem sido comumente utilizado nos trabalhos do IRRI na concentração 0,5 mg/l (ZAPATA & TORRIZO, 1985; ZAPATA et alii, 1986^a; ZAPATA et alii 1986^b; MERCY & ZAPATA, 1986^a e ZAPATA & ABRIGO, 1986).

Com relação ao efeito do BAP para a indução de calo, conforme mostra a Tabela 4, o acréscimo deste regulador de crescimento no meio de cultura foi muito prejudicial para as variedades estudadas. Para as variedades Dourado Precoce e IAC-165, a frequência de indução de calos no meio sem BAP foi de 148,48 e 139,22% respectivamente. Nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg/l a frequência foi de 6,06, 3,45, 10,34 e 17,82% para a variedade Dourado Precoce e de 5,05, 15,00, 8,85 e 4,69% para a variedade IAC-165 respectivamente.

4.3. Efeito de componentes orgânicos e inorgânicos no meio de cultura

4.3.1. Ferro

O ferro é um dos componentes que exerce uma marcada influência sobre o desenvolvimento da cultura de tecidos e células de arroz. OHIRA et alii (1975), investigando a influência de micronutrientes na cultura de células em suspensão, observaram que a deficiência de ferro, diminui drasticamente o crescimento celular, apresentando efeito mais pronunciado entre os seis micronutrientes estudados. Um dos efeitos mais notados na deficiência de ferro é um aumento considerável no meio de cultura e nas células dos aminoácidos solúveis, tais como: ácido γ -aminobutírico, alanina e serina. Outro efeito da deficiência de ferro, é a diminuição considerável da taxa de respiração da célula.

HAI-MAN (1981), analisando a evolução dos meios de cultura na China, cita que o nível de ferro no meio, influencia a frequência de formação de calos na cultura de antera de arroz. As anteras respondem melhor à indução de calos em níveis mais altos que 0,2 e.m./l de ferro, sendo que a melhor concentração estaria entre 0,4 a 0,6 e.m./l.

O meio básico utilizado no presente trabalho foi o MS modificado, com a metade da concentração dos macro e micronutrientes do original. A concentração de ferro mínima utilizada foi de 27,8 mg/l, concentração igual ao recomendado pelo meio MS normal. Conforme a Tabela 5,

a variedade Dourado Precoce responde melhor a níveis mais altos de ferro no meio de cultura (55,6 e 111,2 mg/l), sendo que, na concentração duas vezes ao nível mínimo de ferro utilizado (55,6 mg/l), foi onde ocorreu a maior frequência de indução de calo observada. Essa frequência foi de 140,40%, mais de cinco vezes superior a frequência de 26,52% observada na concentração de 27,8 mg/l de ferro. A variedade Dourado Precoce também teve um comportamento superior ao padrão, na concentração de ferro quatro vezes maior (111,2 mg/l) que a mínima utilizada. Mas a frequência de 86,82% foi quase duas vezes menor quando comparado ao melhor resultado (140,40%). Já, para a variedade IAC-165, os melhores resultados foram obtidos nas concentrações de ferro mais baixas, 27,8 e 55,6 mg/l. Na concentração mais baixa a frequência de formação de calos, 37,32% foi quase duas vezes menor que a concentração de 55,5 mg/l (66,67%). A variedade IAC-165 foi bastante sensível às concentrações mais altas de ferro (111,2 e 222,4 mg/l), mostrando uma redução bastante acentuada na produção de calos, 3,99 e 2,90% respectivamente.

TABELA 5 - Efeito da concentração de FeSO_4 e Na_2EDTA na frequência de indução de calo.

Concentração mg/l		Dourado Precoce			IAC-165		
FeSO_4	Na_2EDTA	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
27,8	37,3	264	70	26,52	276	103	37,32
55,6	74,6	198	278	140,40	222	148	66,67
111,2	149,2	258	224	86,82	276	11	3,99
222,4	298,4	264	56	21,21	276	8	2,90

Estes resultados demonstram que as duas variedades brasileiras utilizadas apresentam uma tendência a exigir níveis de ferro um pouco mais altos, 55,6 mg/l do que aqueles recomendados nos meios mais utilizados para a cultura de antera de arroz, 27,8 mg/l. Nesta concentração mais adequada

ocorre um incremento acentuado na frequência de calos produzidos.

4.3.2. m-inositol

OHIRA et alii (1973), avaliando os efeitos de componentes orgânicos e inorgânicos, em meio líquido, para cultura de células em suspensão de arroz, demonstraram que algumas vitaminas, tais como piridoxina e ácido nicotínico, não são essenciais para a proliferação celular, e que m-inositol associado ou não às vitaminas também não foi importante para o desenvolvimento de células em cultura de arroz. MAHESHWARI et alii (1982) afirmaram que m-inositol, bem como alguns outros aminoácidos, aumentam a frequência de formação de embriões a partir de pólen. BAJAJ (1986) afirmou que, entre os fatores que aumentam a frequência de androgênese em *Datura* e *Nicotiana*, está a concentração de sacarose e m-inositol no meio de cultura. FLICK et alii (1986) citam que entre os componentes que auxiliam na organogênese "in vitro" está incluído o m-inositol.

Como o m-inositol é um dos compostos orgânicos, geralmente utilizado nos meios básicos para cultura de antera, foi avaliado, no presente trabalho, seu efeito sobre a frequência de indução de calos em cultura de antera de arroz. Os resultados, conforme Tabela 6, demonstram que a presença de m-inositol, no meio para a indução de calos tem um efeito

TABELA 6 - Efeito da concentração do m-inositol na frequência de indução de calo.

Concentração mg/ℓ	Dourado Precoce			IAC-165		
m-Inositol	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
0	144	344	238,89	168	439	261,31
50	132	277	209,85	186	280	150,54
100	138	238	172,46	192	232	120,83
200	162	239	147,53	180	131	72,78

deletério. No meio, sem este composto, obtiveram-se melhores resultados na formação de calos 238,60%, para a variedade Dourado Precoce e 261,31% para a IAC-165, e com o aumento das concentrações, a frequência de calos produzido foi menor. Nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/l a frequência de indução de calos para a variedade Dourado Precoce foi de 209,85, 172,46 e 147,63% para IAC-165 150,54, 120,83 e 72,78% respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por CHALEFF & STOLARZ (1981), no qual, o meio que continha 50 mg/l de m-inositol produziu menos calo que o meio sem m-inositol. Configura-se neste caso que o m-inositol é desfavorável para a indução de calos a partir de cultura de antera de arroz.

4.3.3. Sacarose

Entre os açúcares usados na cultura de tecido, a sacarose tem sido o melhor estudado, usado como fonte de carbono e apresentando uma possível função osmoreguladora. Como fonte de carbono, a sacarose tem sido empregada comumente nas concentrações de 2 a 3%. Todavia, altas concentrações são necessárias em alguns casos, especialmente em gramineas (MAHESHWARI et alii, 1982). A razão da necessidade destas concentrações altas não está bem clara. BINDING (1972), supõe que a sacarose, em altas concentrações, tem uma função na regulação osmótica.

De acordo com HAI-MAN (1981), na cultura de antera de arroz, as concentrações acima de 6% diminuem a frequência de indução de calos, e aparentemente ocorre um aumento na frequência de regeneração da parte aérea verde. As concentrações próximas a 4,5% seriam mais apropriadas. Já MERCY & ZAPATA (1986^b), observaram que a concentração de sacarose de 12% produziu mais calos que as concentrações de 2 a 6%, usadas nos diferentes meios básicos, para obtenção de calos originários de anteras de arroz.

A avaliação do efeito da concentração de sacarose na indução de calos nas duas variedades estudadas, conforme a Tabela 7, demonstra que a concentração ideal de sacarose fica próximo a 4%, e que, nas concentrações mais baixas (0,4 e 1%), a frequência de calos diminui muito. Na concentração mais alta (8%), apesar da diminuição drástica na quantidade de calos produzidos, o tamanho médio é bem

TABELA 7 - Efeito da concentração da sacarose na frequência de indução de calo.

Concentração mg/l	Dourado Precoce			IAC-165		
Sacarose	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
4.000	192	5	2,60	198	0	0
10.000	186	70	37,63	186	86	46,24
40.000	198	259	130,81	210	144	68,57
80.000	192	45	23,44	168	51	30,36

maior que os calos formados nas concentrações mais baixas e mais compactos. NITZSCHE & WENZEL (1977) afirmaram que a concentração de sacarose no meio, além de ter uma função na regulação da pressão osmótica e servir como fonte de carbono, em concentrações altas, inibe a formação de calos, resultados semelhantes aos que foram obtidos na Tabela 7. CHALLEFF & STOLARZ (1981) mostraram que, no meio R_4 , variando a concentração de agarose em 0,2 e 0,4%, a melhor concentração de sacarose foi de 4% para os dois meios, e que, no meio com menos agarose, ocorreu uma tendência no aumento da frequência de calos.

Com relação as duas variedades testadas no presente trabalho, Dourado Precoce respondeu melhor a concentração de sacarose de 4% produzindo uma quantidade de calos cerca de três vezes e meia, maior (130,8%) que a concentração de 1% (37,63%). Quanto a variedade IAC-165, apesar do melhor resultado encontrado na concentração de 4% de sacarose (68,57%) as diferenças não foram tão significativas quando comparado a frequência obtida na concentração de 1% de sacarose (46,23%) que foi o segundo melhor resultado. Também para IAC-165 as menores frequências foram observadas nas concentrações extremas utilizadas 0,4% e 8%.

4.3.4. Aminoácidos

Certos aditivos orgânicos ou extratos naturais podem ser benéficos para a cultura de antera. KELLER & STRINGAM (1978) e BAJAJ (1986)

citam em suas revisões que a suplementação do meio com glutamina, bem como serina, estimula a embriogênese em *Nicotiana*. O uso de fontes de aminoácidos brutos, auxiliam a proliferação de calos em cultura de anteras de cereais. Leite de côco, glutatíon, ácido nucleico hidrolizado e extrato de levedura, podem aumentar a frequência de calos na cultura de antera (CLAPHAM, 1976).

DUNWELL (1978) sugere que, certas espécies ou variedades, necessitam de um aminoácido particular para que seja melhor a indução da androgênese e o crescimento dos calos. Entretanto, vários trabalhos utilizando aminoácido nos meios de cultura mostraram-se contraditórios. Alguns aminoácidos podem apresentar um efeito sintomático, aumentando a frequência de produção de calo, como é o caso da glicina, quando adicionada ao meio para indução de calos originários de antera das variedades Dourado Precoces e IAC-165, onde a concentração de 4 mg/l, aumentou a quantidade de calos formados, em relação ao meio sem glicina (Tabela 8).

TABELA 8 - Efeito da concentração de glicina na frequência de indução de calo.

Concentração mg/l	Dourado Precoces			IAC-165		
Glicina	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
0	210	186	88,57	186	219	117,74
4	186	280	150,54	168	204	121,43
8	222	180	81,08	174	169	97,13
16	174	51	29,31	174	137	78,74

Efeitos depreciativos na formação de calos foram observados por CHALEFF & STORLARZ (1981), quando se acrescentou ao meio 1 g/l de caseína hidrolizada. YING (1983), citando trabalhos chineses de análise bioquímica de aminoácidos, em anteras, nos estágios uninucleado médio a tardio, observaram que, em arroz do grupo indica, a quantidade de alanina foi menor que a encontrada nas variedades do grupo japonica. Quando 2

a 4 mg/l de DL-alanina foram adicionados ao meio básico para a cultura de antera de arroz do grupo indica, a frequência de formação de calos aumentou duas vezes.

TABELA 9 - Efeito da concentração de metionina na frequência de indução de calo.

Concentração mg/l	Dourado Precoce			IAC-165		
Metionina	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
0	162	158	97,53	180	196	108,89
4	144	23	15,97	156	34	21,79
8	186	0	0	174	1	0,57
20	156	1	0,64	156	0	0

Na avaliação do efeito dos aminoácidos sobre a frequência de formação de calo em cultura de anteras de arroz, glicina e metionina demonstraram, conforme Tabelas 8 e 9, que os aminoácidos atuam de maneira diferente. Enquanto a glicina na concentração de 4 mg/l, apresenta a frequência de formação de calo de 150,54% o padrão (sem glicina) apresentou uma frequência de 88,57%. Contudo, concentrações mais elevadas (8 e 16 mg/l) de glicina apresentaram um efeito depreciativo na frequência de calos (81,08 e 29,31%) respectivamente.

A metionina mostrou ser um forte inibidor, já que em todas as concentrações, a frequência de indução de calos foi inferior ao meio de cultura, sem este aminoácido. Apesar da diminuição, na indução de calos, no meio com metionina, os mesmos foram maiores e mais compactos, quando comparados com aqueles formados no meio sem metionina. Pode-se deduzir que apesar de ser um forte inibidor no início da androgênese, atua no meio de cultura com um composto que o ajudará no crescimento do calo. Resultados semelhantes aos encontrados por Furuhashi e Yatazawa

citado por OONO (1981), onde calos de arroz tiveram sua taxa de crescimento diminuída, quando metionina foi excluída da mistura de aminoácidos do meio.

4.3.5. Vitaminas

O efeito de vitaminas sobre a indução de calos ou regeneração de plantas em arroz, tem sido pouco pesquisado, e na bibliografia consultada poucas informações foram obtidas. HAI-MAN (1981), na sua revisão, discute sobre a evolução dos meios de cultura para induzir androgênese em arroz. Cita que, quando as vitaminas B₁ (tiamina), B₆ (piridoxina) e F (ácido nicotínico) foram aumentadas cinco vezes em relação ao meio de Miller, a frequência de indução de calos foi aumentada. OHIRA et alii (1973), estudando o efeito das vitaminas tiamina, piridoxina e ácido nicotínico, sobre o crescimento de células de arroz em suspensão observaram que somente a tiamina tinha um efeito benéfico sobre o crescimento das células.

Os resultados das Tabelas 10 e 11 mostram o efeito da tiamina e biotina sobre a indução de calo nas variedades Dourado Precoce e IAC-165. Das duas vitaminas analisadas a tiamina foi a que apresentou um efeito significativo na indução de calo principalmente para a variedade IAC-165, onde concentração de 0,4 mg/l foi superior aos demais tratamentos, 0,2, 0,8 e 1,6 mg/l produzindo cerca de três vezes mais calos (407,81%) que os demais tratamentos (128,00, 172,92 e 163,64%) respectivamente. Para a variedade Dourado Precoce as concentrações de 0,4 e 0,8 mg/l apresentaram comportamento semelhante (102,27 e 109,72%) respectivamente. A produção de calo nestas concentrações foi mais de duas vezes superior às encontradas nas concentrações extremas 0,2 mg/l (45,83%) e 1,6 mg/l (45,46%).

Os resultados da Tabela 11, demonstram que, nas variedades Dourado Precoce e IAC-165, a frequência de indução de calos foi de 66,65 e 128,00% respectivamente, no meio sem biotina. Para as duas variedades, todos os demais tratamentos apresentaram uma frequência de calos inferiores ao controle (sem biotina). Estes dados indicam que o uso de biotina como fonte de vitamina exógena não auxilia na indução de calo em cultura de anteras de arroz.

TABELA 10 - Efeito da concentração de tiamina na frequência de indução de calo.

Concentração mg/l	Dourado Precoce			IAC-165		
Tiamina	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
0,2	144	66	45,83	150	192	128,00
0,4	132	135	102,27	192	783	407,81
0,8	144	158	109,72	192	332	172,92
1,6	132	60	45,46	198	324	163,64

TABELA 11 - Efeito da concentração de biotina na frequência de indução de calo.

Concentração mg/l	Dourado Precoce			IAC-165		
Biotina	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
0	144	96	66,67	150	192	128,00
0,5	132	32	24,24	174	117	67,24
1,0	144	84	58,33	162	175	108,02
2,0	144	61	42,36	156	117	75,00
4,0	168	84	50,00	138	76	55,07

4.3.6. Meios líquido e sólido e carvão ativado

O cultivo de anteras em meio líquido tem sido utilizado com sucesso em algumas espécies, com aumento significativo na frequência de indução de calos.

De acordo com ZAPATA et alii (1983), as principais vantagens do meio líquido em relação ao sólido são: (1) A competição entre os proembriões é aliviada; já que eles crescem individualizados no meio de cultura; (2) Os componentes deletérios produzidos pelos grãos de pólen mortos são dispersos no meio, diminuindo seu efeito sobre os outros grãos de pólen viáveis; (3) O meio líquido facilita a penetração dos nutrientes. Estas vantagens foram comprovadas, quando eles compararam a calogênese da variedade Taipei 309 em dois meios básicos diferentes. Observaram que no meio J19 sólido, a frequência de indução de calo foi 24,7% e no meio líquido 324,3%. Um resultado mais expressivo foi observado no meio E24 ficando a frequência 22,7% para a forma sólida e 678,5% para a líquida.

YING (1983), citando trabalhos desenvolvidos por pesquisadores chineses, comenta sobre a grande potencialidade do meio líquido na produção de calo, mas, foi observado que os proembriões produzidos no meio líquido regeneraram menos plantas do que aqueles obtidos no meio sólido.

Os resultados descritos acima com relação a indução, foram ratificados conforme demonstra os resultados na Tabela 12 onde a frequência de indução de calo no meio líquido foi de 122,08%, treze vezes superior ao do meio sólido, 9,45%, para a variedade Dourado Precoces e oito vezes superior na variedade IAC-165, 49,19% no meio líquido e 6,41% no sólido, mostrando assim todo o potencial dessa técnica na cultura de anteras de arroz. As vantagens do meio líquido podem ser observadas na figura 1.

O uso de carvão ativado tem apresentado várias aplicações no meio de cultura: estimula crescimento de fungos (BUTLER & BOLKAN, 1973), em fumo onde carvão aumentou a frequência de anteras androgênicas de 15 para 45% na variedade Havana, também estimula a androgênese em batata e centeio (BAJAJ 1986). Segundo MAHESHWARI et alii (1982), a vantagem do carvão no meio seria adsorção de inibidores, presente no agar, aque-

TABELA 12 - Efeito do carvão ativado em meio líquido e sólido na frequência de indução de calo.

Meio	Dourado Precoce			IAC-165		
	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
Meio líquido	240	293	122,08	246	121	49,19
Meio solidificado com 8 g/l de ágar	222	21	9,46	234	15	6,41
Meio líquido + 2 g/l de carvão	252	0	0	252	0	0
Meio solidificado com 8 g/l de ágar + 2 g/l de carvão	240	0	0	246	0	0

les produzidos pelas anteras ou produzidos pela degradação da sacarose. Mas também, pode apresentar desvantagem pois pode adsorver hormônios ou outras substâncias úteis do meio de cultura. Já para BAJAJ (1986), as principais vantagens do carvão estariam na regulação da disponibilidade de auxinas tanto endógenas como exógenas.

Como nenhuma das referências consultadas traz alguma citação sobre o efeito de carvão na cultura de antera de arroz, este experimento demonstra que para a indução de calo 2 g/l de carvão ativado foi altamente desfavorável, uma vez que inibiu completamente a formação de calo, (ver tabela 12) provavelmente devido a adsorção das auxinas ou ferro do meio de cultura, os quais, são importantes para a sua indução.

4.4. Efeito dos fatores físicos

4.4.1. Pré-tratamento a frio

O uso de choques a baixa temperatura tem sido usado normalmente na cultura de antera em arroz, pois está comprovado sua eficácia

cia no aumento da quantidade de calo produzido. ZAPATA et alii (1983) apontam os seguintes efeitos do pré-tratamento a frio sobre as anteras e desenvolvimento do micrósporo "in vitro": (1) aumenta a quantidade de pólen com dois núcleos idênticos; (2) alta percentagem de pólen viáveis pois diminui a senescência do tecido somático; (3) aumenta a indução de proembrião específico; (4) aumenta a sincronização da divisão celular dos micrósporos. Sendo o resultado geral do pré-tratamento, um aumento no número de micrósporo que pode produzir proembrião.

Na literatura, a temperatura e o tempo de pré-tratamento não são uniformes variando de 3 a 20°C por 2 a 20 dias. NITZSCHE & WENZEL (1977) citam que o melhor resultado observado na produção de calos foi o tratamento 10°C por 48 horas. GENOVESI & MAGILL (1979) observaram que a maior indução de calo foi obtida quando anteras com micrósporos uninucleados e no ciclo mitótico G_1 foram incubadas a 13°C por 10 dias. HAN & SHUI (1980) trabalham normalmente com temperaturas 8 a 10°C por 10 dias para a indução de calo. CHALEFF & STOLARZ (1981), tratando as anteras a 7°C durante vários dias observaram que no verão o melhor tratamento foi o de quatro dias e no inverno foi de sete dias. CHUNG et alii (1981) notaram que anteras tratadas a 8°C por 4 dias induziram mais calos que as anteras não tratadas. YING (1983) cita que anteras tratadas a temperaturas de 9 a 11°C por 20 dias produziram mais calos em relação a testemunha. ZAPATA et alii (1983), pré-tratando anteras a 8°C por período de tempo que varia de 0 a 18 dias, concluiu que a melhor resposta foi o tratamento por 8 dias.

Já na avaliação do efeito do pré-tratamento a frio sobre a indução de calos, foram escolhidas as temperaturas de 5, 10 e 15°C, pois estas estão na faixa das temperaturas mais utilizadas para o choque a frio na cultura de anteras de arroz. Conforme tabela 15, quando as panículas não foram pré-tratadas a frequência de indução de calos foi 5,33% para a variedade Dourado Precoces e 4,76% para IAC-165. Somente foram inferior a estes resultados os tratamentos 5°C por cinco dias, 10°C por cinco e quinze dias para variedade Dourado Precoces e 10°C por cinco e quinze dias para IAC-165. Todos os outros pré-tratamentos apresentaram resultados superiores a testemunha. As maiores frequências de calos produzidos na variedade Dourado Precoces foram observados nos seguintes

TABELA 13 - Efeito da temperatura e número de dias de pré-tratamento das panículas na frequência de indução de calos.

Temperatura (°C)	Nº de dias	Dourado Precoce			IAC-165		
		Número Antera	Número Calo	Frequên- cia (%)	Número Antera	Número Calo	Frequên- cia (%)
S/ trata- mento	0	150	8	5,33	168	8	4,76
5	5	246	12	4,88	210	27	12,86
5	10	180	104	57,78	150	17	11,33
5	15	156	175	112,18	186	86	46,24
10	5	198	0	0	192	0	0
10	10	180	208	115,56	222	136	61,26
10	15	154	1	0,65	168	0	0
15	5	186	14	7,53	144	9	6,25
15	10	204	72	35,29	186	68	36,56

tratamentos: 112,8% pré-tratando as panículas a 5°C durante quinze dias e 115,56% no tratamento a 10°C por dez dias. Para a variedade IAC-165 os melhores resultados também foram observados nos tratamentos que deram os melhores resultados para Dourado Precoce onde panículas tratadas a 5°C por quinze dias apresentaram uma frequência de indução de calos de 46,23% e a 10°C por dez dias de 61,26%. Estes resultados levam a concluir que não só a temperatura, como tempo de tratamento influencia na produção de calos. Este experimento mostra uma tendência das variedades responderem melhor a um tempo maior de pré-tratamento, como é observado nas temperaturas de 5°C e 15°C, onde, quanto maior for o tempo de tratamento maior a frequência de indução de calos. Esta tendência só não foi observada no tratamento a 10°C, pois as duas variedades só formaram calos no tempo de tratamento de dez dias.

4.4.2. Temperatura e regime de luz durante a incubação

A temperatura e regime de luz utilizados durante a incubação das anteras são dois fatores, que podem influenciar a indução de calos. Geralmente a temperatura utilizada para a cultura de antera de arroz fica em torno de 25 a 30°C, (MAHESHWARI et alii, 1982; RUSH et alii, 1982 e YAMADA & LOH (1986). Alguns trabalhos associam temperatura com regime de luz (CHEN & LIN 1976; SUN et alii 1979; CHALEFF e STOLARZ 1981); WOO & HUANG 1982 e WONG et alii 1983) outros trabalham com associação de temperatura e incubação no escuro (MOK & WOO, 1976; OONO 1981 e ZAPATA & ABRIGO 1986).

COLLINS (1977) cita que para algumas espécies como uva e *Datura*, o uso de luz aumenta a produção de calos e MAHESHWARI et alii (1982) discutem a qualidade da luz na indução de calos. Na cultura de antera em fumo, a luz azul tem sido mais eficiente que a vermelha ou branca.

TABELA 14 - Efeito do regime de luz e escuro na frequência de indução de calos.

Regime	Dourado Precoce			IAC-165		
	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
Escuro	246	121	49,19	240	293	122,08
16 horas de luz por 8 horas de escuro	270	26	9,63	264	165	62,50

Na Tabela 14, são encontrados os resultados da incubação de anteras no escuro, e em regime de dezesseis horas de luz por oito de escuro, com uma intensidade de cerca de 3.000 lux. Tanto para a variedade Dourado Precoce como para IAC-165, o tratamento no escuro foi superior ao tratamento no claro. A variedade Dourado Precoce responde melhor ao escuro produzindo cerca de cinco vezes mais calos (49,19%) que as

anteras incubadas no claro (9,63%) nas mesmas condições. Já para a variedade IAC-165 a diferença não foi tão significativa, 122,08% no escuro e 62,50% no claro. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por CORNEJO-MARTINS & PRIMO-MILLO (1981).

Este trabalho demonstra que a temperatura afeta a frequência de calos produzidos durante o período de incubação. A Tabela 15 mostra que quando as anteras são incubadas a 20°C, a frequência de indução é baixa, 2,73% para a variedade Dourado Precoce e nenhum calo foi produzido na variedade IAC-165. Mas quando as placas de petri foram transferidas de 20°C para 30°C*, após trinta dias de incubação, a quantidade de calos produzidos foi de 104,85% para Dourado Precoce e 49,30% para IAC-165. Demonstrando neste caso, que apesar da frequência de calos formados a 20°C ser muito baixa, os micrôsporos não perderam a viabilidade, pois quando as anteras foram transferidas a 30°C* produziram uma grande quantidade de calos.

TABELA 15 - Efeito da temperatura de incubação na frequência de indução de calos.

Temperatura (°C)	Dourado Precoce			IAC-165		
	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
20	330	9	2,73	288	0	0
25	288	310	107,64	300	224	74,67
30	300	356	118,67	102	79	77,45
35	264	81	30,68	288	5	1,74
30*	330	346	104,85	288	142	49,31

WANG (1981), afirma que, anteras incubadas a 30°C produzem mais calos que anteras incubadas a 25°C. Estes mesmos autores também citam que os calos produzidos a 30°C, produzem mais plantas alginas do que aqueles produzidos a 25°C. Os resultados da Tabela 15 confirmam

estes dados com relação a frequência de indução de calos, pois para as variedades Dourado Precoce e IAC-165, quando incubadas a 25°C a frequência de indução de calos foi respectivamente de 107,64 e 74,67%. E para a temperatura de 30°C a frequência foi 118,67% para Dourado Precoce e 77,45% para IAC-165. Para temperaturas de 35°C, os resultados foram bem inferiores às temperaturas de 25 e 30°C, produzindo nesta temperatura, uma frequência de 30,68% para a variedade Dourado Precoce e 1,74% para IAC-165.

Por isso uma estratégia é trabalhar com a incubação das anteras com temperaturas próximas a 28°C, obtendo assim uma frequência elevada de calos sem aumentar a frequência de plantas albinas.

Um fator a ser ressaltado, é que em temperaturas mais altas, 15 ou 20°C e com tempo de tratamento longo, quinze ou vinte dias, as panículas ficam amareladas e as anteras contaminadas por fungos que se desenvolvem em grandes quantidades no meio, quando as anteras são inoculadas.

Outro tratamento que também pode dar resultados satisfatório é um tratamento a altas temperaturas antes do tratamento a frio. ZAPATA & TORRIZO (1986) trataram as anteras a 35°C por cinco e quinze minutos antes do choque frio de 7°C por 10 dias e nos dois tratamentos ocorreram um aumento na frequência de calos produzidos quando comparado com a testemunha no tratamento a frio. Mostrando assim que novas formas de choque de temperatura poderiam ser utilizadas para melhorar a indução de calos.

Um trabalho interessante sobre o efeito da temperatura de incubação, na indução de calos a partir de anteras de trigo foi realizado por OUYANG et alii (1983), durante o período de 1979 a 1982; observaram que muitas variedades, com frequências de indução de calos baixa, podem ser melhoradas, colocando as anteras em temperaturas mais altas, acima de 30°C e depois transferindo-as para a temperatura normal de indução, 28°C. Estes resultados demonstram que estudos mais aprofundados sobre os efeitos da temperatura devem ser realizados para que se possa melhorar a técnica da cultura de antera em espécies cultivadas.

4.4.3. Raios gamas

Para aumentar a frequência de indução de calo, vários métodos têm sido utilizado, entre eles o uso de raios gama (GUN et alii, 1981).

O uso de material irradiado tem sido comumente usado com objetivo de obter mutações. A irradiação de anteras, com posterior regeneração de plantas é um processo interessante, pois, o mutante seria haplóide e expressaria facilmente, o seu fenótipo sem a interferência da dominância. Além da obtenção de mutantes através da irradiação, observa-se que doses baixas têm demonstrado um efeito benéfico sobre a indução de calos. ZHONG (1983) verificou que irradiando panículas com micrôsporos uninucleados em doses de raios-gama que variavam de 0,5 a 5,0 krad, a frequência de formação de calos se diferenciou do controle, e que em doses menores 1,0 Krad, a frequência de indução de calos, aumentou. Entretanto, se as doses forem acima de 3,0 Krad, a formação de calo será drasticamente diminuída. Resultados semelhantes a estes foram observados com relação aos mutagênicos químicos EMS (etil-metano-sulfonato); EI (etileno-imida) e MNNG (1 metil-3 nitro-1-nitrosoguanidina) onde, quantidades pequenas estimulam a indução de calos, no entanto, se houver aumento da concentração, a frequência de calos formados cai rapidamente (Hu et alii, 1980; citados por ZHONG, 1983).

As anteras das variedades Dourado Precoces e IAC-165, inoculadas no meio de cultura líquido, foram irradiadas nas doses 0, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 krad. Para a variedade Dourado Precoces, o material não irradiado (controle) apresentou uma frequência de indução de calos de 152,17%. E os materiais irradiados nas doses de 0,5, 2,0 e 4,0 krad apresentaram uma indução de calos superior ao controle 265,24, 210,95 e 187,96% respectivamente. Somente a dose de 1,0 krad foi menor que o controle 123,02%. Para variedade IAC-165 as doses 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 krad apresentaram uma indução de calos de 105,16, 43,75, 124,28 e 100,49% respectivamente, portanto, inferior ao controle onde a frequência de indução de calos foi de 137,34%. Os dados da Tabela 16 demonstram que para

HU, Z.; S.C. HUANG. e C.C. CHUANG. 1980. Studies on the causes of pollen derived albino plantlets in rice anther culture I. Influence of chemical mutagens on the formation of albino plantlets. *Acta Bot. Yunnanica*. 2:188-193.

a variedade Dourado Precoce a dose de 0,5 krad apresentou um efeito favorável, aumentou muito a indução de calos. A dose de 1,0 krad, tanto para a variedade Dourado Precoce como para a variedade IAC-165, foi prejudicial, pois nesta dose foram observadas as menores frequências.

TABELA 16 - Efeito da irradiação das anteras e meio de cultura com raios gamas na frequência de indução de calo.

Doses de radiação (Krad.)	Dourado Precoce			IAC-165		
	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
0	138	210	152,17	198	272	137,37
0,5	210	557	265,24	252	265	105,16
1,0	252	310	123,02	144	63	43,75
2,0	210	443	210,95	210	261	124,29
4,0	216	406	187,96	204	205	100,49

TABELA 17 - Efeito da irradiação das panículas com raios gama na frequência de indução de calos.

Doses de radiação (Krad.)	Dourado Precoce			IAC-165		
	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)	Número Antera	Número Calo	Frequência (%)
0	138	210	152,17	198	272	137,37
0,5	288	57	19,79	288	169	56,68
1,0	270	340	125,93	390	224	57,44
2,0	306	112	36,60	192	0	0
4,0	234	28	11,97	276	0	0

Quando somente as panículas foram irradiadas nas doses de 0, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 krad, antes da inoculação, a frequência de indução de calos das panículas irradiadas nas doses de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 krad foi de 19,79, 125,93, 36,60 e 11,97% para variedade Dourado Precoce e de 56,68, 57,44, 0,00 e 0,00% para a variedade IAC-165 respectivamente. (Tabela 17). Todos os tratamentos foram inferiores ao controle, panículas não irradiadas, que apresentaram a frequência de 152,17% para a variedade Dourado Precoce e 137,37% para a variedade IAC-165.

De acordo com as Tabelas 16 e 17, convém ressaltar o efeito da dose 1,0 Krad. Quando foram irradiados anteras junto com o meio de cultura, observaram-se as menores frequências de indução de calos. Mas quando somente, as panículas forem irradiadas a melhor resposta com exceção do controle, para as duas variedades foi a dose de 1,0 krad.

Estes resultados indicam que a inoculação das anteras junto com o meio de cultura, apresentam um melhor resultado do que somente a irradiação das panículas levando a supor que quando o meio é irradiado, algumas substâncias do meio são alteradas, e estas substâncias podem aumentar a indução de calos. Pesquisas neste sentido devem ser feitas para determinar quais as substâncias que são alteradas, quais os subprodutos produzidos e qual o efeito deles na indução de calos a partir de antera.

O efeito da irradiação na cultura de antera, não é observado somente na irradiação direta das anteras. ZAPATA et alii (1986^b) observaram que sementes de arroz irradiadas com 20 krad, podem apresentar uma maior indução de calos, quando a glucose é acrescentada ao meio. ZAPATA et alii (1986^a) observaram que sementes irradiadas nas doses 0, 15, 20 e 25 krad mostram diferentes respostas quanto a frequência de indução de calos e regeneração de plantas verdes. A frequência de indução de calos caiu até a dose de 20 krad, aumentando na dose de 25 krad. Com relação a frequência de regeneração de plantas albinas, a dose de 15 krad, mostrou a mesma frequência observada no controle, mas na dose de 20 krad, aumentou a frequência de plantas verdes regeneradas.

4.5. Regeneração de plantas

4.5.1. Efeito de hormônios, agar, carvão ativado e extrato de levedura

Vários fatores afetam a regeneração de plantas a partir de calos obtidos através da cultura de anteras de arroz. CHING (1982), estudando a regeneração de plantas observou que zinco, sacarose, amido solúvel, leite de côco e extrato de levedura influenciam a regeneração de plantas. Além desses fatores, a concentração de auxina e citocinina no meio de cultura também afeta de modo marcante a regeneração de plantas. De acordo com este mesmo autor, os principais fatores observados na regeneração de plantas são: (1) a idade do calo influencia marcadamente a regeneração, calos com até quinze dias de idade apresentam boa capacidade regenerativa, calos com cinquenta dias praticamente não regeneram plantas; (2) os meios MS e N₆ regeneram plantas melhor que o meio de Miller; (3) meio sem hormônio pode regenerar plantas quase na mesma frequência que meio com hormônio; (4) a frequência de regeneração de plantas aumenta com o aumento na concentração de sacarose, geralmente uma concentração de 5% é apropriado tanto para indução de calo como para a regeneração de plantas.

Para os experimentos de regeneração de plantas, os calos foram induzidos no meio MS modificado acrescido de 50 mg/l, de m-inositol, 4 mg/l de glicina, 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina, 0,2 mg/l de tiamina, 6 mg/l de 2,4-D, 2 mg/l de NAA 40 g/l de sacarose e o pH foi ajustado para 5,8. Foi utilizado calos com mais de 1mm, observando se eles flutuavam ou não no meio de cultura. Os calos que ficaram submersos foram descartados, pois dificilmente regeneravam plantas, talvez pela oxigenação deficiente, pois o meio para indução de calo não ficava sob agitação. Com relação a coloração foram utilizados calos amarelo claro, descartando calos com coloração mais escuras, pois estes apresentavam degeneração do tecido dificultando a regeneração.

De acordo com a Tabela 18, a concentração de hormônios, agar, extrato de levedura e carvão ativado influenciam a regeneração de plantas. O balanço auxina/citocinina foi mais eficiente quando se utilizou concentrações de 1 mg/l de NAA e 1 mg/l de cinetina, meio R₁. Porém,

TABELA 18 - comportamento das variedades Dourado Precoce e IAC-165 no meio MS com diferentes combinações de hormônios, agar, carvão e extrato de levedura, para a regeneração de plantas a partir de calos obtidos por cultura de antera de arroz.

MEIO	DOURADO PRECOCE				ICA-165			
	Nº calo	com raiz %	albinas %	verdes %	Nº calo	com raiz %	albinas %	verdes %
R ₁ ⁽¹⁾	128	18 (14,06)	12 (9,38)	1 (0,78)	96	12 (12,50)	8 (8,33)	0 (0,00)
R ₂ ⁽²⁾	104	3 (2,88)	4 (3,85)	0 (0,00)	89	2 (2,25)	2 (2,25)	0 (0,00)
R ₃ ⁽³⁾	116	22 (18,97)	13 (11,21)	0 (0,00)	124	16 (12,90)	15 (12,10)	2 (1,61)
R ₄ ⁽⁴⁾	132	17 (12,88)	14 (10,61)	0 (0,00)	127	11 (8,66)	17 (13,39)	1 (0,79)
R ₅ ⁽⁵⁾	146	30 (20,55)	27 (18,49)	0 (0,00)	128	9 (7,03)	19 (14,84)	0 (0,00)
R ₆ ⁽⁶⁾	136	9 (6,62)	42 (30,88)	0 (0,00)	106	7 (6,60)	37 (34,91)	1 (0,94)
R ₇ ⁽⁷⁾	153	25 (16,45)	32 (21,05)	1 (0,66)	164	32 (19,51)	42 (25,61)	0 (0,00)

(1) - NAA 1 mg/l e cinetina 1 mg/l.

(2) - NAA 1 mg/l e cinetina 2 mg/l.

(3) - NAA 1 mg/l e cinetina 1 mg/l, agar 8 g/l e extrato de levedura 10 g/l.

(4) - Agar 8 g/l.

(5) - NAA 1 mg/l, cinetina 1 mg/l, 8 g/l, extrato de levedura 10 g/l e carvão ativado 3 g/l.

(6) - NAA 1 mg/l, cinetina 1 mg/l, agar 8 g/l e carvão ativado 3 g/l.

(7) - NAA 1 mg/l, cinetina 1 mg/l, e agar 8 g/l.

quando a concentração de cinetina foi aumentada para 2 mg/l meio R_2 , tanto a frequência de calos que só produziram raízes como aqueles que regeneraram plantas inteiras, tiveram sua frequência bastante diminuída. Estes dados contrariam as observações de YAMADA (1982), e YAMADA & LOH (1986), onde eles citam que citocinina não parece ser um fator essencial para regeneração de plantas, sendo talvez sua principal função de acelerar a organogênese.

Comparando meio sólido (R_7) com meio líquido (R_1), onde a diferença entre os dois meios foi somente o acréscimo de 8 g/l de agar, a resposta do meio sólido foi muito superior ao meio líquido na capacidade de organogênese e posterior regeneração de plantas inteiras.

OONO (1981) cita em sua revisão sobre a técnica para cultura de antera em arroz que o uso de 3 g/l de extrato de levedura ou 2 g/l de caseína hidrolisada auxiliam na regeneração de plantas. No experimento para a regeneração de plantas, o meio com extrato de levedura, R_3 , não foi superior ao meio sem este composto, R_7 . O principal fator observado no meio com extrato de levedura é que os calos crescem bastante, mas, não apresentam uma frequência muito elevada de regeneração.

O uso de carvão ativado na cultura de antera, tem apresentado resultados satisfatórios para a indução de calo e regeneração direta de plantas em fumo (BAJAJ, 1986). Na cultura de antera de arroz, o uso de carvão foi altamente prejudicial no meio para a indução de calo, inibindo completamente a sua formação. Entretanto, para a regeneração, a presença de carvão, no meio aumenta a regeneração de plantas, conforme dados da Tabela 18, onde, pode-se comparar os meios com carvão R_5 e R_6 com seus similares sem carvão R_3 e R_7 . A importância do carvão no meio é apontado por MAHESHWARI et alii (1982) como um composto que pode adsorver substâncias inibidoras da embriogênese contida no meio de cultura ou que é produzida pelo próprio calo, ou por regular a distribuição dos hormônios no meio, tanto os exógenos como os endógenos.

Outro dado importante é que para a regeneração não é necessário o uso de hormônios no meio, como é o caso do meio R_4 , mas a sua eficiência é menor quando comparado com o meio com hormônios (R_7).

Um efeito bastante pronunciado nos testes de regeneração, conforme os dados das Tabelas 18 e 19 é a alta frequência de plantas al-

Precoce e IAC-165

Idade dias	DOURADO PRECOCE				IAC-165			
	Nº calo	com raiz %	albinas %	verdes %	Nº calo	com raiz %	albinas %	verdes %
7	86	6 (6,98)	29 (33,72)	0 (0,00)	116	18 (16,52)	36 (31,03)	0 (0,00)
14	102	12 (11,76)	32 (31,37)	1 (0,98)	118	10 (8,47)	29 (24,58)	2 (1,70)
21	122	6 (4,92)	6 (4,92)	0 (0,00)	148	4 (2,70)	12 (8,11)	0 (0,00)

binas observadas. Com relação às condições experimentais, dois fatores podem ser apontados como prováveis causas da alta frequência de plantas albinas observadas, primeiro a variação da temperatura da sala onde foi feita a incubação, onde a temperatura muitas vezes ultrapassava a 30°C. Temperaturas elevadas e apontadas por KELLER & STRINGAM (1978), e GUN et alii (1981), como sendo uma das causas do albinismo. E segundo a alta concentração de auxina utilizada no meio de indução de calo, principalmente o uso de 2,4-D como auxina, conforme hipótese de GUN et alii (1981).

KARIN et alii (1987), testando 4 meios de regeneração, com diferentes combinações de hormônios, observaram que a habilidade de produzir plantas verdes não estavam relacionados com o meio de cultura, utilizado, mas sim com o genótipo da variedade, que também pode ser uma das causas.

Na regeneração de plantas, o calo pode produzir só plantas verdes ou albinas, ou plantas verdes e albina no mesmo calo conforme mostra a Figura 2. Resultados semelhantes a estes foram observados por ZAPATA et alii (1983).

4.5.2. Idade do calo

A idade do calo influencia significativamente a frequência de regeneração de plantas. Calos com mais de quatorze dias após o início de visualização, têm a sua capacidade de organogênese diminuída apesar de nesta idade os calos serem maiores. Mas isto não implica em uma maior frequência de regeneração de plantas.

Os calos jovens desde que colocados em condições adequadas, apresentam uma maior capacidade de regeneração, quando comparadas com mais velho, com mais de quatorze dias. Conforme a Tabela 19, os calos com sete dias da variedade Dourado Precoces, apresentaram as seguintes respostas: 6,98% só produziram raiz, 33,72% formaram plantas albinas e nenhuma planta verde foi formada. Os calos com quatorze dias apresentaram um aumento na frequência de organogênese de raiz, 11,76% e uma pequena diminuição na frequência de formação de plantas albinas, e produziu uma planta verde (0,98%). Os calos com mais de 21 dias apresentaram a capacidade de organogênese de raiz e parte aérea bastante diminuída: 4,92% de calos só com raiz 4,92% de plantas albinas e nenhuma planta

verde. Para a variedade IAC-165 os resultados foram semelhantes aos obtidos para a variedade Dourado Precoce, devendo ser ressaltado que somente em calos com quatorze dias é que foram observados a formação de plantas verdes. Estes dados indicam que a idade do calo também pode influenciar na capacidade de regeneração de plantas verdes, pois só em calos com quatorze dias e que foram observados plantas verdes, mas como estas frequências foram muito baixas 0,98% para Dourado Precoce e 1,70% para IAC-165, não é possível uma conclusão mais definitiva.

5 - CONCLUSÃO

No presente trabalho foi determinada a metodologia para indução de calos e regeneração de plantas, para as variedades Dourado Precoce e IAC-165. Os resultados obtidos permitem tirar as seguintes conclusões:

- 1 - As duas variedades apresentam uma maior frequência de indução de calos no estágio uninucleado.
- 2 - Com relação à resposta das anteras à diferentes meios básicos, as duas variedades apresentaram maior frequência de indução de calos no meio MS modificado. A melhor resposta em relação aos hormônios 2,4-D e NAA foi nas concentrações de 2 mg/l de 2,4-D e 2 mg/l de NAA para a variedade Dourado Precoce e 1 mg/l de 2,4-D e 3 mg/l de NAA para IAC-165. Em todos os tratamentos em que foram utilizados BAP, a frequência de indução de calos foi menor que no meio sem BAP.
- 3 - As duas variedades apresentaram maiores produções de calos nas concentrações de 55,6 mg/l de Ferro, 4% de sacarose e no meio sem m-inositol.
- 4 - Com relação aos aminoácidos estudados, a glicina na concentração de 4 mg/l aumentou a frequência de indução de calos nas duas variedades. Já metionina quando acrescentada no meio de cultura causou uma diminuição na frequência dos calos formados.
- 5 - A variedade Dourado Precoce teve sua maior frequência de indução de calo na concentração de 0,8 mg/l de tiamina e IAC-165 na concentra-

ção de 0,4 mg/l. Com relação a biotina, as duas variedades apresentaram maior produção de calos no meio sem esta vitamina.

- 6 - As duas variedades apresentaram maior frequência de formação de calo no meio líquido. Carvão ativado quando adicionado no meio de cultura não permitiu a formação de calo.
- 7 - As maiores frequências de indução de calos foram obtidas quando as panículas foram pré-tratadas a 10°C por 10 dias e incubadas no escuro a 30°C.
- 8 - Anteras irradiadas junto com o meio de cultura apresentaram maiores frequências de indução de calos nas doses de 0,5; 2,0 e 4,0 krad quando comparado com o material não irradiado para a variedade Dourado Precoce. Para IAC-165, todos os tratamentos mostraram frequências inferiores ao controle. Quando a panícula foi irradiada, todos os tratamentos apresentaram uma diminuição na frequência de calos induzidos nas duas variedades.
- 9 - Com relação a regeneração de plantas, as maiores frequências foram obtidas no meio R₆.
- 10 - Calos com idade de 7 dias apresentaram maior capacidade de regenerar plantas, mas plantas verdes só foram obtidas em calos com idade de 14 dias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAJAJ, Y.P.S. In vitro Production of haploids. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.U.; YAMADA, Y. eds. **Handbook of Plant Cell Culture**. Orlando, Academic Press 1986, Vol. 1, cap. 6, p. 228-281.
- BARROW, J. & CHAUCHARI, H. Cotton haploids produced by semigamy from specific breeding. In: KASHA, K.J., ed. **Haploids in higher plants**. Guelph, Univers. Cuelph. 1974, p.274.
- BINDING, H. Selecktion in Kallus Kulturen mit hoploiden Zellen. **Z. pflanzenziichtg.** Berlim, 67:33-38, 1972.
- BLAKESLEE, A.; BELLING, J.; FARNHAM, M.E.; BERGNER, A.D. A haploid mutant in *Datura stramonium*. **Science**, New York, 55:646-647, 1922.
- BUTLER, E.E. & BOLKAN, H. A medium for heterokaryon formation in *Rhizoctonia solani*. Lancaster, **Phytopathology**. 63:542-543, 1973.
- CHALEFF, R.S. & STOLARZ, A. Factors influencing the frequency of callus formation among culture rice (*Oryza sativa*) anthers. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, 51:201-206, 1981.
- CHANG, Z.; HONG-YUAN, Y.; HUA, Y.; SHENG, C. Factors affecting callus formation in unpollinated ovary culture of rice. In: CELL AND TISSUE CULTURE TECHNIQUES FOR CEREAL CROP IMPROVEMENT, Beijing. 1981. **Proceedings**. Beijing. Science Press. 1983. p.81-94.
- CHEN, C.C. & CHEN, C.M. Changes in chromossome number in microspore cal-
lus of rice during successive subcultures. **Canadian Journal of Ge-
netics and Cytology**, Ontario, 22:607-614, 1980.

- CHEN, C.M.; CHEN, C.C.; LIN, M.H. Genetic analyzis of anther-derived plants of rice. **The Journal of Heredity**, Washington, 73:49-52, 1982.
- CHEN, C.C. & LIN, M.H. Induction of rice plantlets from anther culture. **Botanical Bulletin Academia Sinica**, Taipein, 17:18-24, 1976.
- CHIH-CHING, C. The medium and ito application to anther culture of ce-real crops. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978, **Proceedings**, Boston. Pitman Plublishing Inc., 1981. p. 43-50.
- CHING, C.C. Anther culture of rice and its significance in distant hybridization. In: RICE TISSUE CULTURE PLANNING CONFERENCE. Los Baños, 1980. **Proceedings**. Los Baños, International Rice Research Institute, 1982. p.47-54.
- CHING-SAN, S. Androgenesis of cereal crops. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978, **Proceedings**, Boston, Pitman Plublishing Inc., 1981. p.116-124.
- CHU, C.C. Haploids in plant improvement. In: VASIL, I. K., SCOWCROFT, W.R., FREY, K.J. ed. **Plant Improvement and Somatic Genetics**. Orlando, Academic Press, 1982, cap. 7. p.127-158.
- CHU, C.; WANG, C.; HSU, C.; YIN, K.; CHU, C, BI, F. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice throug comparative experiments on the nitrogen sources. **Science Sinica**, Beijing, 18: 659-668, 1975.
- CHUNG, G.S. Tissue culture work on rice in Korea. In: RICE TISSUE CULTURE PLANNING CONFERENCE. Los Baños. 1980. **Proceedings**. Los Baños, International Rice Research Institute, 1982. p.75-82.
- CHUNG, H.; SHI-CHOU, H.; CHING-PO, H.; HAN-CHIH, L.; CHENG-CHI, C.; LIN-PING, P. On the inductive conditions of rice pollen plantlets in anther culture. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978, **Proceedings**, Boston, Pitman Publishing Inc., 1981. p.87-96

- CLAPHAM, D.H. Haploid induction in cereal. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P.S. **Applied and Fundamental Aspects of Plant, Tissue and organ culture**. Berlin, Springer-Verlag, 1976. p. 279-298.
- COLLINS, G.B. Production and utilization of anther-derived haploids in crop plants. **Crop Science**, Madison, 17:583-586, 1977.
- CORNEJO-MARTINS, M.J. & PRIMO-MILLO, E. Anther and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, Wageningen, 30:541-546, 1981.
- DEKA, P.C. & SEN, S.K. Differentiation in calli originated from isolated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.) through plating technique. **Molecules & General Genetics**, Berlin, 145:239-243, 1976.
- DINNGANG, H. & JUNWEN, O. Anther culture of tetraploid rice a study on the origin of albino pollen plantlets **Kixue Tongbao**, Beijing, 9:1287, 1983.
- DUNWELL, J.M. Division and differentiation in culture pollen. In: THORPE, T.A. ed. **Frontiers of Plant Tissue Culture**. Alberta. The international Association for Plant Tissue Culture, 1978. p.103-112.
- FLICK, C.E.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Organogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. eds. **Handbook of Plant Cell Culture**. Academic Press 1986, vol. 1, cap. 2, p.13-81.
- GENOVESI, A.D. & MAGILL, C.W. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. **Crop Science**, Madison, 19:662-664, 1979.
- GUHA, S.; MAHESHWARI, S.C. **In vitro** production of embryos from anthers of *Datura*. **Nature**, Londres, 204:497, 1964.
- GUHA, S.; MAHESHWARI, S.C. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro. **Nature**, Londres, 212:97-98, 1966.

GUHA-MUKHERJEE, S. Genotypic differences in the in vitro formation of embryoids from rice pollen. **Jornal of Experimental Botany**, London, 78(21):139-144, 1973.

GUPTA; S.B. & GUPTA, P. Selective somatic elimination of *Nicotiana glutinosa* chromosomes in the F_1 hybrids of. *N. suaveolens* and *N. glutinosa*. **Genetics**, Baltimore, 73:605-612, 1973.

GUN, S.H.; NAM, L.S.; RYONG, L.G.; GUN, Y.S.; WAN, L.J. Studies of increasing the induction rate of callus tissue and pollen plants anther of *Oryza sativa* cultures in vitro. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978. **Proceedings**, Boston, Pitman Publishing Inc., 1981. p.97-106.

GURANATHAN, G.M. & RANGASAMY, S.R.S. Anther culture in rice. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, 8(4):10, 1983.

HAI-MAN, L. The advance of studies on medium for anther culture of rice in China. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978. **Proceedings**, Boston, Pitman Publishing Inc., 1981. p.57-64.

HAN, H. Advances in anther culture investigations in China. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978, **Proceedings**, Boston, Pitman Publishing Inc., 1981. p.3-10.

HAN, H. & SHUI, H. Some advances in anther culture thechnique of maize and rice. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA; R.J. O., ed. **Plant Cell Cultures: Results and Perspectives**. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 1980, p.87-88.

HEBERLE-BORS, E. In vitro haploid formation from pollen: a critical review. **Teoretical and applied genetics**, Berlin, 71:361-374, 1985.

HSIN-YING, C.; THE-MING, L.; YING-LI, W. A preliminary observation on histogenesis and organogenesis of the in vitro development from rice microspores in to plantlets. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978, **Proceedings**, Boston, Pitman Publishing Inc., 1981. p. 125-132.

- HU, H. & ZHENG, S.Z. Development new varieties via anther culture. In: EVANGS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. YAMADA, Y. eds. **Handbook of Plant Cell Culture**, Orlando Academic Press, 1986, Vol. 3. cap. 3, p.65-90.
- IYER, R.D. & RAINA, S.K. The early ontogeny of embryoids and callus from pollen and subsequent organogenesis in anther cultures of *Datura metel* and rice. **Planta**, Berlin, 104:146-156, 1972.
- JACOBSEN, H.J. Biochemical mechanisms of plant hormone activity. In : EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. eds. **Handbook of Plant Cell Culture**. Orlando, Academic Press, 1986. vol. cap. 21, p. 673-695.
- KARIN, N.H.; NAHAR, M.A.; SHAHJAHAN, A.K.M.; KANJER, D.G.; HAQUE, M. Z.; MIAH, S.A. Regeneration of anther-derived callus. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, 12(2):26, 1987.
- KARIN, N.H.; SHAHJAHAN, A.K.M.; MIAH, A.; MIAH; S.A. Response of rice anthers to callus induction and plant regeneration. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, 10(3):21-22, 1985.
- KASHA, K.J.& KAO, K.N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Nature**, Londres, 225:874-875, 1970.
- KELLER, W.A.& STRINGAM, G.R. Production and utilization of microspore-derived haploid plants. In: THORPE, T.A. ed. **Frontiers of Plant Tissue Culture**. Alberta, **The International Association for Plant Tissue Culture**, 1978. p.113-122.
- KIMBER, G. & RILEY, R. Haploid angiosperms. **The Botanical Review**, New York, 29:480-531, 1963.
- MAHESHWARI, S.C.; RASHID, A.; TYAGI, A. Haploids from pollen Grains - retrospect and prospect. **American Journal of Botany**, Columbus, 69 (5):865-849, 1982.

- McCOMB, J.A. Variation in ploidy levels of plants derived from anther culture. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978, **Proceedings**, Boston, Pitman Publishing Inc., 1981. p. 167-180.
- MERCY, S.T. & ZAPATA; F.J. Effect of pollen development stage on callus induction and its relation to auricle distance in two rice varieties. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, 11(4):23-24, 1986^a.
- MERCY, S.J. & ZAPATA, F.J. Effect of sucrose on callus induction and plant regeneration in Taipei 309. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, 11(4):25, 1986^b.
- MOK, T. & WOO, S.C. Identification of pollen plants regenerated from anthers of an intersubspecific rice hybrid. **Botanical Bulletin Academia Sinica Taipei**, 17:169-174, 1976.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plantarum**, Copenhagen, 15:473-497, 1962.
- NIIZEKI, H. Uses and application of anther and pollen culture in rice. In: CELL AND TISSUE CULTURE TECHNIQUES FOR CEREAL CROP IMPROVEMENT, Beijing, 1981. **Proceedings**. Beijing. Science Press, 1983. p.165-172.
- NISHI, T. & MITSUOKA, S. Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant. **Japanese Journal of Genetics**, Tokio, 44(6):341-346, 1969.
- NITSCH, C. The use of *in vitro* culture techniques for plant improvement. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978. **Proceedings**, Boston, Pitman Publishing Inc., 1981. p. 107-108.
- NITSCH, C. Progress in anther and pollen culture techniques. In: CELL AND TISSUE CULTURE TECHNIQUES FOR CEREAL CROP IMPROVEMENT, Beijing, 1981. **Proceedings**. Beijing, Science Press. 1983. p. 1-10.

- NITZSCHE, W. & WENZEL, G. *Oryza* spp. In: HANNOVER, W. H.; GÖTTINGEN, G. R., ed. **Haploids in plant breeding**. Berlin e Hamburgo, Felgentreff & Goebel, 1977. p. 43-46.
- OHIRA, K.; OJIMA, K.; FUJIWARA, A. Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple difined medium for rapid growth in suspension culture. **Plant Cell Physiol.**, Tokyo, 14:1113-1121, 1973.
- OHIRA, K.; OJIMA, K.; SAIGUSA, M.; FUJIWARA, A. Studies on the nutrition of rice cell culture II. Microelement requeriment and the effects of deficiency. **Plant & Cell Physiol.**, Tokyo, 16:73-81, 1975.
- OONO, K. In vitro methods applied to rice. In: THORPE, T.A. ed. **Plant Tissue Culture: Methods and Aplication in Agriculture**. Caleyary, Alberta, Academic Presse, 1981 p.274-298.
- OUYANG, J.W.; ZHOU, S.M.; JIA, S.E. The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. **Theoritical and Aplied Genetics**, Berlin, 66:101-109, 1983.
- RAGHAVAN, Y. Pollen developmental biology in culture anthers. In: Vasil, I.K. **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**. Orlando, Academic Press, 1986. cap. 14, 275-304.
- RANGASAMY, S.R.S.; RANGANATHAN, T.B.; GURANATHAN, G.M. Variability in quantitative traits of anther culture-derived progenies. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, 12(1):15-16, 1987.
- RUSH, M.C.; QI-QUAN, S. & GRILL, J.P. Protoplast, cell, and tissue culture in rice: prospects for the future. In: RICE TISSUE CULTURE PLANNING CONFERENCE. Los Baños, 1980. **Proceedings**. Los Baños, International Rice Research Institute. 1982. p. 31-40.
- SHAHJAHAN, A.K.M.; KARIN, N.H.; MIAH, S.A. Culture conditions and callus-forming ability of rice anthers. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, 10(3): 22, 1985.

- SHARP, W.R.; RASKIN, R.S.; SOMMER, H.E. The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato. **Planta**, Berlin, 104:357-361, 1972.
- SHU-HUA, M. Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978, **Proceedings**, Boston, Pitman Publishing Inc., 1981. p.23-34.
- SUNDERLAND, N. Strategies in the improvement of yields in anther culture. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978, **Proceedings**, Boston, Pitman Publishing Inc., 1981. p. 65-86.
- SUNDERLAND, N. & ROBERTS, M. New approach to pollen culture. **Nature**, New York, 270:236-238, 1977.
- SUN, C.S.; WU, S.C.; WANG, C.C.; CHU, C.C. The deficiency of soluble proteins and plastid ribosomal RNA in the albino pollen plantlets of rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, 55:193:197, 1979.
- SYMKO, S. Haploid barley from crosses of *Hordeum bulbosum* (2x) x *H. vulgare* (2x). **Canadian Journal of Genetic and Cytology**, 11:602-608, 1969.
- WANG, C. Studies on the albino pollen plantlets of rice. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978, **Proceedings**, Boston. Pitman Publishing Inc., 1981. p. 149-160.
- WEN-LIANG, L. Study on the induction of haploid plants derived from isolated pollen Grain of *Nicotiana tabacum* L. culture **in vitro**. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978, **Proceedings**, Boston, Pitman Publishing Inc., 1981. p.109-116.
- WONG, C.K., KO, S.W.; WOO, S.C. Regeneration of rice plantlets on NaCl-stressed medium by anther culture. **Botanical Bulletin Academia Sinica**, Taipei, 24:59-64, 1983.

- WOO, S.C. & HUANG, C.Y. Anther culture *Oryza sativa* L. x *Oryza spontaneous taiwania* hybrids. **Botanical Bulletin Academia Sinica**, Taipei, 23:39-44, 1982.
- WOO, S.C.; KO, S.W.; WONG, C.K. Anther culture of pollen plants derived from cross *Oryza sativa* L. x *O. Globerrima* Stud. **Botanical Bulletin Academia Sinica**, Taipei, 24:53-58, 1983.
- WOO, S.C. & TUNG, I.G. Induction of rice plants hybrid anthers of Indica and japonica cross. **Botanical Bulletin Academia Sinica**, Taipei, 13:67-69, 1972.
- WU, L. & KIANG, Y.T. Using an isozyme marker to detect pollen derived plants from anther culture of wild rice. **Botanical Bulletin Academia Sinica**, Taipei, 20:97-102, 1979.
- YAMADA, Y. The significance for rice improvement of studying regeneration in tissue culture. In: Rice TISSUE CULTURE PLANNING CONFERENCE, Los Baños. 1980. **Proceedings**. Los Baños, International Rice Research Institute, 1982. p. 41-46.
- YAMADA, Y. & LOH, W.H. Rice. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. eds. **Handbook of Plant Cell Culture**. Orlando, Academic Press. 1986, Vol. 3, cap. 6, p. 151-170.
- YING, C. Anther and pollen culture of rice in China. In: CELL AND TISSUE CULTURE TECHNIQUES FOR CEREAL CROP IMPROVEMENT, Beijing. 1981. **Proceedings**. Beijing. Science Press, 1983. p. 11-26.
- YING, C.; & LIANG-TSAI, L. Investigation and utilization of pollen-derived haploid plants in rice and wheat. In: PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978, **Proceedings**, Boston, Pitman Publishing Inc., 1981, 199-212.
- ZAPATA, F.J. & ABRIGO, E.M. Plant regeneration and screening from long-term NaCl-stressed rice callus. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, 10(3): 22, 1986.

- ZAPATA, F.J.; ALDEMITA, R.R.; TORRIZO, L.B.; NOVERO, A.V.; RAINA, S. K.; ROLA, R.R. Anther culture of Basmati 370 at IRRI. Agama ray-induced green plant regeneration. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, 11(4):22, 1986^a.
- ZAPATA, F.J.; ALDEMITA; R.R.; TORRIZO, L.B.; NOVERO, A.V.; RAINA, S. K.; ROLA, R.R. Anther culture of Basmati 370 at IRRI. Effect of glucose in anther culture of irradiated Basmati 370. **International Rice Research Newsletter**. Los Baños, 11(4): 22-23, 1986^b.
- ZAPATA, F.J.; KHUSH, G.S.; CRILL; J.P.; NEU, M.H.; ROMERO, R.O.; TORRIZO, L.B.; ALEJAR, M. Rice anther culture at IRRI. In: CELL AND TISSUE CULTURE TECHNIQUES FOR CEREAL CROP IMPROVEMENT, Beijing, 1981. **Proceedings**. Beijing. Science Press, 1983. p.27-46.
- ZAPATA, F.J. & TORRIZO, L.B. Effect of some media components and organic additives on callus induction in rice anther culture. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, 10(5):16, 1985.
- ZAPATA, F.J. & TORRIZO, L.B. Heat treatments to increase callus induction efficiency in anther culture of IR-42. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, 11(4):25-26, 1986.
- ZAPATA, F.J.; TORRIZO, L.B.; ALDEMITA, R.R. Effect of a conditioned medium on callus production and plant regeneration in rice anther culture. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, 10(5):14, 1985.
- ZHEN-HUA, Z. Application of anther culture techniques to rice breeding. In: RICE TISSUE CULTURE PLANNING CONFERENCE, Los Baños. 1980. **Proceedings**. Los Baños, International Rice Research, Institute, 1982. p.55-62.
- ZHONG, H. Stimulating pollen haploid culture mutation in *Oryza sativa* subs.Keng (japonica). CELL AND TISSUE CULTURE TECHNIQUES FOR CEREAL CROP IMPROVEMENT; Beijing. 1981. **Proceedings**. Beijing. Science

Press, 1983. p.291-302.

ZONG-XIU, S.; ZHANG, Z.C.; KANG-LE, Z.; FANG, Q.X.; PING.; F.Y. Somaclonal genetics of rice, *Oryza sativa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, 67:67-73, 1983.

FIGURA 1 - Grande quantidade de calos isolados produzidos no meio líquido.

FIGURA 2 - Tubo da esquerda: calo regenerando somente planta albina. Tubo da direita: calo regenerando planta albina e plantas verdes.

ABREVIATURAS

BAP = 6-benzilamino purina.

2,4-D = Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

NAA = Ácido naftalenoacético.

IAA = Ácido indol acético.

Na₂-EDTA = Ácido etilendiamintetracético dissódico