

**JOSÉ MAGNO QUEIROZ LUZ**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA *IN VITRO* EM ANTERAS DE PIMENTÃO  
(*Capsicum annuum* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

**Orientador**

**Prof. JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO**



**LAVRAS**

**MINAS GERAIS - BRASIL**

**1995**

**Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da  
Biblioteca Central da UFLA**

Luz, José Magno Queiroz

Embriogênese somática in vitro em anteras de pimentão  
(Capsicum annuum L.) / José Magno Queiroz Luz.--Lavras :  
UFLA, 1995.

115 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.  
Tese (Doutorado) - UFLA.  
Bibliografia.

1. Pimentão - Cultura de antera. 2. Embriogênese. 3. Cultivo in vitro. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.6433

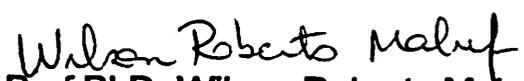
**JOSÉ MAGNO QUEIROZ LUZ**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA *IN VITRO* EM ANTERAS DE PIMENTÃO  
(*Capsicum annum* L.).**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

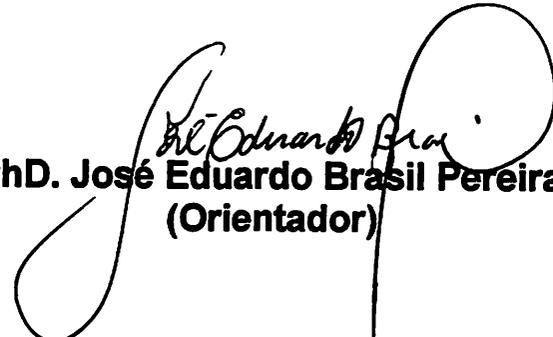
**APROVADA em 20 dezembro de 1995**

  
Prof Dr. Fernando Cesar Juliatti

  
Prof PhD. Wilson Roberto Maluf

  
Prof PhD. Márcio de Castro S. Filho

  
Profª Drª Lisete Chamma Davide

  
Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
(Orientador)

A meu pai, Francisco Pereira da Luz, que não está mais entre nós, um exemplo de vida a ser seguido;

A minha mãe, Raimunda Benta Luz (D<sup>a</sup> Mozinha), uma mãe exemplar;

A minha avó Raimunda (D<sup>a</sup> Beata), uma linda senhora com grande força de espírito;

A minha tia Graça, minha segunda mãe;

Aos meus irmãos Francisco Jr. e Costa Neto - Amigos do peito;

A minhas irmãs, Luíza, Neide, Vera e Lígia - Excelentes amigas;

Aos meus cunhados Jorge Hirano e Jorge Leandro, que são verdadeiros irmãos;

As minhas cunhadas Maria Helena e Marta - Meus irmãos têm bom gosto;

Aos meus sobrinhos, Bruno, Paulo Vitor, Jorge Leandro, João Vitor, Pedro Henrique, Rodrigo, Líria e Natasha - Crianças de futuro;

***DEDICO ESTE TRABALHO, COM CARINHO E GRATIDÃO***

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e ao amigo Jesus Cristo, por mais esta excelente etapa de minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade concedida.

Ao prof. Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (UFLA), pela grande orientação, amizade e companherismo.

Ao prof. Ph.D. Wilson Roberto Maluf (UFLA), pelos ensinamentos e amizade.

A prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lisete Chamma Davide (UFLA), pela indispensável colaboração.

Ao prof. Dr. Fernando César Juliatti (UFU, Uberlândia-MG), por mais esta participação e pela amizade de sempre.

Ao Prof. Ph.D. Márcio de Castro S. Filho (ESALQ, Piracicaba-SP), pela grande colaboração.

Ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela concessão de afastamento, indispensável para a conclusão desta tese.

Aos professores e amigos Tarciso Alves Costa e Luis Antônio da Silva (UFC) pelo auxílio durante o meu afastamento da UFC.

Ao amigo prof. Renato Innecco (UFC), pela amizade e apoio de sempre.

Aos amigos Evaldo S. Arantes e Vantuil A. Rodrigues, Polyana A. D. Ehlert e Estér Solange (Lab. Cultura de Tecidos-UFLA), pela indispensável ajuda.

Às amigas Renata Silva, Ana Hortência e prof<sup>a</sup> Iara Mesquita, e ao amigo Ivan Bedin (Lab. Citogenética-UFLA), pelo indispensável auxílio e amizade.

Ao amigo Francisco Vilela Resende pelo auxílio na confecção final desta tese.

Aos amigos Alcides, Toshio, André, Leonardo, Patrícia, Giovana, Carla, Beni e cida, pela convivência, apoio e amizade.

E aos colegas de Pós-Graduação.

**MUITO OBRIGADO.**

## BIOGRAFIA DO AUTOR

JOSÉ MAGNO QUEIROZ LUZ, filho de Francisco Pereira da Luz e Raimunda Benta Luz, nasceu em Mossoró, RN, em 06 de janeiro de 1967, deficiente físico com escoliose e ausência do membro superior esquerdo.

Residente em Uberlândia, MG, a partir de 1970. Em agosto de 1986, iniciou o curso de Agronomia pela Universidade Federal de Uberlândia - UFU, concluindo-o em agosto de 1991 (IIª turma).

Em outubro de 1991 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, na antiga Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, MG, atualmente Universidade Federal de Lavras - UFLA, concluindo em fevereiro de 1993. Em março do mesmo ano iniciou o curso de Doutorado na mesma área, concluindo em dezembro de 1995.

Em setembro de 1994 ingressou através de concurso público, na Universidade Federal do Ceará - UFC, Fortaleza, CE, onde é professor no Departamento de Fitotecnia, na área de Horticultura.

## SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	01
1.2 OBJETIVO GERAL.....	05
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	06
2 RELAÇÃO ENTRE OS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS MICRÓSPOROS E AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO BOTÃO FLORAL.....	07
RESUMO.....	07
2.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	08
2.2 OBJETIVO.....	11
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
2.5 CONCLUSÕES.....	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
3 INFLUÊNCIA DA IDADE E GENÓTIPO DA PLANTA DOADORA NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES ADVENTÍCIOS.....	20

RESUMO.....	20
3.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
3.1.1 Genótipo.....	21
3.1.2 Condições Fisiológicas das plantas doadoras.....	24
3.2 OBJETIVO.....	26
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.5 CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
4. AVALIAÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DAS CONDIÇÕES <i>IN VITRO</i> DO THIDIAZURON (TDZ).....	35
RESUMO.....	35
4.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	36
4.1.1 Considerações gerais.....	36
4.1.2 Thidiazuron (TDZ).....	41
4.2 OBJETIVOS.....	43
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.3.1 PROCEDIMENTOS GERAIS.....	44
4.3.2 AVALIAÇÃO DO TDZ E DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO À 35 <sup>o</sup> C... 4.3.3 INFLUÊNCIA DO TDZ E DO MEIO MS NA REGENERAÇÃO DE EMBRIÓIDES.....	45
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.4.1 AVALIAÇÃO DO TDZ E DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO À 35 <sup>o</sup> C... 4.4.2 INFLUÊNCIA DO TDZ E DO MEIO MS NA REGENERAÇÃO DE EMBRIÓIDES.....	46
4.5 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
5 INFLUÊNCIA DO NITRATO DE PRATA, CARVÃO ATIVADO, ÁCIDO SALICÍLICO E DO ETILENO NA INDUÇÃO DE EMBRIÓIDES EM ANTERAS DE PIMENTÃO.....	66
RESUMO.....	66
5.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	68

5.2 OBJETIVOS.....	75
5.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
5.3.1 EFEITO DO NITRATO DE PRATA E DO CARVÃO ATIVADO.....	77
5.3.2 INFLUÊNCIA DO ÁCIDO SALICÍLICO (AS) NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES.....	77
5.3.3 EFEITO DO ETILENO EM COMBINAÇÃO COM TDZ, AgNO <sub>3</sub> E ÁCIDO SALICÍLICO.....	78
5.3.4 VERIFICAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA DAS PLÂNTULAS.....	80
5.3.5 CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA EMBRIOGÊNESE NAS ANTERAS.....	80
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
5.4.1 EFEITO DO NITRATO DE PRATA E DO CARVÃO ATIVADO.....	82
5.4.2 INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO (AAS) NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES.....	87
5.4.3 EFEITO DO ETILENO EM COMBINAÇÃO COM TDZ, AgNO <sub>3</sub> E ÁCIDO SALICÍLICO.....	94
5.4.4 VERIFICAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA DAS PLÂNTULAS.....	104
5.4.5 CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA EMBRIOGÊNESE NAS ANTERAS.....	106
5.6 CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
01	Percentagem de micrósporos por estágio de desenvolvimento em cada classe de tamanho do botão floral.....	14
02	Composição dos meios C e R (Sibi, Dumas de Vaulx e Chambonnet, 1979).....	28
03	Percentagem de anteras com embrióides adventícios em diferentes idades das plantas doadoras em genótipos de pimentão.....	31
04	Número de embrióides por 100 anteras em diferentes idades das plantas doadoras em genótipos de pimentão.....	32
05	Resumo das análises de variância para porcentagens de anteras com embrióides e calos embriogênicos; e número de embrióides por 100 anteras, da combinação de TDZ com tempo de incubação à 35°C para diferentes genótipos.....	47
06	Porcentagens de anteras com embrióides e calos embriogênicos; e número de embrióides por 100 anteras, para tempo à 35°C. Dados dos genótipos e doses TDZ em conjunto.....	52
07	Resumo das análises de variância para porcentagens de anteras com embrióides e calos embriogênicos; e número de embrióides por 100 anteras, da combinação de TDZ com a concentração de sais do meio MS para os diferentes genótipos.....	53
08	Influência da concentração de sais do meio MS e do genótipo sobre o número de embrióides por 100 anteras inoculadas.....	58
09	Influência da combinação de TDZ com a concentração da sais do meio MS e do meio R nas porcentagens de anteras com embrióides e calos embriogênicos, e no número de embrióides por 100 anteras.....	59

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
10	Resumo das análises de variância para porcentagem de anteras com embriões e o número de embriões por 100 anteras, de diferentes genótipos inoculadas em meios contendo $\text{AgNO}_3$ e Carvão ativado.....	83
11	Porcentagem de anteras com embriões e número de embriões por 100 anteras, para os 5 genótipos em conjunto.....	84
12	Número de embriões por 100 anteras, inoculadas em meio C adicionado de 5 mg/L de $\text{AgNO}_3$ e transferidas para meio R com ou sem carvão ativado, para os diferentes genótipos estudados.....	87
13	Resumo das análises de variância para porcentagem de anteras com embriões, número de embriões por 100 anteras e porcentagem de anteras necrosadas, da combinação de concentrações do Ácido acetilsalicílico com os diferentes genótipos.....	89
14	Resumo das análises de variância para porcentagem de anteras com embriões, número de embriões por 100 anteras, da combinação de meios com TDZ, $\text{AgNO}_3$ e AAS, com tempos de exposição ao ethrel, para os diferentes genótipos.....	95
15	Porcentagem de anteras com embriões, em diferentes meios de indução combinados com tempo de permanência com Ethrel, considerando dados dos genótipos em conjunto.....	96
16	Frequência de plantas do genótipos cultivados em meio C adicionado de 5 mg/L de $\text{AgNO}_3$ , em diferentes tempos de permanência com Ethrel.....	102

## LISTA DE FIGURAS

Figura		página
01	Botões florais do híbrido F <sub>1</sub> PIX22C#31 x linhagem 004, dividido em 6 classes de diferentes tamanhos.....	12
02	Evolução do tamanho das anteras em função do comprimento e diâmetro do botão floral.....	15
03	Diferentes fases da microsporogênese.....	16
04	Efeito de concentrações de TDZ sobre o número de embrióides por 100 anteras, para os diferentes híbridos, independente do tempo a 35°C.....	48
05	Número de embrióides por 100 anteras e porcentagem de calos embriogênicos para os híbridos.....	49
06	Efeito de concentrações de TDZ sobre as porcentagens de anteras com embrióides e calos embriogênicos, considerando dados em conjunto dos genótipos e do tempo de incubação à 35°C.....	51
07	Embrióides nos estádios globular e torpedo, em anteras com 35 dias de inoculação em meio C + 4,5µM TDZ.....	52
08	Porcentagens de anteras com embrióides e de calos embriogênicos para os híbridos.....	54
09	Efeito de concentrações de TDZ sobre o número de embrióides por 100 anteras dos 5 híbridos avaliados, independente da concentração de sais do meio MS.....	56

Figura	Página	
10	Efeito de concentrações de TDZ sobre a porcentagem de anteras com embrióides em meio MS com 50% e 100% de sais, considerando dados dos genótipos em conjunto.....	57
11	Efeito de concentrações de TDZ sobre a porcentagem de calos embriogênicos, considerando dados em conjunto dos genótipos e da concentração de sais do meio MS.....	57
12	Efeito de concentrações de TDZ sobre o número de embrióides por 100 anteras em meio MS com 50% e 100% de sais, considerando dados dos genótipos em conjunto.....	58
13	Calos embriogênicos com 20 dias de subcultivo em meio R + 9,3 $\mu$ M de cinetina.....	60
14	Embrióides nos estádios globular e torpedo. Anteras inoculadas em meio C + 5 mg/L de AgNO <sub>3</sub> .....	85
15	Porcentagem de anteras com embrióides dos genótipos avaliados, considerando dados dos tratamentos em conjunto .....	86
16	Porcentagem de anteras com embrióides dos genótipos avaliados, considerando dados das concentrações de AAS em conjunto .....	90
17	Efeito de concentrações de AAS no número de embrióides por 100 anteras dos diferentes genótipos.....	91
18	Efeito de concentrações de AAS na porcentagem de anteras com embrióides, com dados dos genótipos em conjunto.....	92
19	Efeito da concentração do AAS na porcentagem de anteras necrosadas, considerando dados dos genótipos em conjunto.....	93
20	Anteras necrosadas em meio C acrescido de 355 $\mu$ M de AAS.....	93
21	Porcentagem de calos embriogênicos em função de diferentes meios de indução combinados com tempo de permanência com Ethrel, considerando dados dos genótipos em conjunto.....	98
22	Porcentagem de anteras necrosadas, em diferentes meios de indução combinados com tempo de permanência com Ethrel, considerando dados dos genótipos em conjunto.....	98

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
23	Número de embriões por 100 anteras, em diferentes meios de indução, considerando dados de tempo de permanência com Ethrel e genótipos em conjunto.....	100
24	Número de embriões por 100 anteras, em diferentes tempos de permanência com Ethrel, considerando dados de genótipos e meio de indução em conjunto.....	100
25	Estruturas de desenvolvimento dos embriões em plantas. Anteras inoculadas em meio de indução C + 5mg/L de AgNO <sub>3</sub> e tempo de 8 dias em ambiente com Ethrel. ....	103
26	Planta haplóide em estágio de desenvolvimento propício à aclimação.....	103
27	Planta haplóide em processo de aclimação com câmara úmida. ....	104
28	Células de ponta de raiz do F <sub>1</sub> (PIX22C#31 x 004). Planta haplóide (n = 12) e planta diplóide (n=24).....	105
29	Cortes histológicos de anteras em diferentes períodos de inoculação, 8 e 12 dias.....	108
30	Cortes histológicos de anteras em diferentes períodos de inoculação, 19, 27 e 32 dias.....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABA = ácido abscísico

AgNO<sub>3</sub> = Nitrato de Prata

ANA = ácido naftalenoacético

AIA = ácido indolacético

AIB = ácido indolbutírico

BA = benzyl adenina

BAP = 6-benzilaminopurina

B5 = Meio de Gamborg

2,4-D = ácido 2, 4 - diclorofenoxiacético

2ip = 6 dimetil alil amino purina

GA<sub>3</sub> = ácido giberélico

LS = Linsmayer & Skoog

MS = Murashige & Skoog

PAA = ácido fenilacético

TDZ = *N*-phenil-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-iluréia

## RESUMO

LUZ, José Magno Queiroz Luz. **Embriogênese somática *in vitro* em anteras de pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. Lavras: UFLA, 1995. 115p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).\*

Este trabalho teve como objetivo aplicar a técnica da cultura de anteras em diferentes genótipos de pimentão, verificando os vários fatores que influenciam na indução da embriogênese somática. Verificou-se, primeiramente, a relação entre o estágio de desenvolvimento dos micrósporos com algumas características morfológicas do botão floral nos genótipos Agrônômico 8, linhagem 004 e o híbrido F<sub>1</sub> (PIX22C#31 x linhagem 004), sendo que a análise citológica mostrou que o micrósporo não vacuolado, com núcleo central e diâmetro de aproximadamente de 24,5 µm (ideal para utilização em cultura de anteras), ocorreu em todos os genótipos cujos botões florais tinham pétalas de tamanho igual ou pouco maior que as sépalas e, anteras com traços de antocianina em sua extremidade. Com relação à influência do genótipo e da idade da planta doadora na androgênese, verificou-se a presença de embriões adventícios, sendo a linhagem 004 a mais responsiva, seguida do híbrido, mas não houve diferença significativa para o período entre a 6<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas pós-transplante.

---

\* Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto. Membros da Banca: Wilson Roberto Maluf, Fernando César Juliatti, Márcio de Castro S. Filho e Lisete Chamma Davide.

Foi avaliado o efeito do TDZ em combinação com o tempo de incubação à 35°C para vários genótipos, sendo os genótipos mais responsivos PIX22C#31 x linha 004, PIX21C04#4 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda, com respectivamente, 22,3, 17,9 e 15,4% de anteras com embrióides e 177,9, 121,6 e 133,5 embrióides por 100 anteras. Os embrióides apresentavam os estádios globular e torpedo. O TDZ à 4,5  $\mu\text{M}$  foi o que melhor induziu a embriogênese somática. Não houve interação entre as concentrações de TDZ e o tempo à 35°C, mas o período de 8 dias foi mais favorável. Em outro experimento, com os mesmos genótipos, avaliou-se a influência do TDZ e do meio MS na regeneração dos embrióides. O genótipo PIX22C#31 x linha 004 destacou-se tendo 36,6 % de anteras induzidas. O meio MS à 50% de sais e com 0,5  $\mu\text{M}$  de TDZ foi o mais favorável na indução de embrióides. Houve baixa regeneração de plântulas (1,0%), sendo em MS com 50% dos sais acrescido de 0,5  $\mu\text{M}$  de TDZ e MS completo com 4,5  $\mu\text{M}$  de TDZ.

Avaliou-se os efeitos do  $\text{AgNO}_3$  e do carvão ativado na indução e regeneração de embriões adventíceos. O  $\text{AgNO}_3$  à 5 mg/L no meio C, favoreceu a indução das anteras, com relação ao número de embrióides por 100 anteras. O carvão ativado no meio C prejudicou este parâmetro, e quando no meio R, não promoveu qualquer regeneração de plântulas, permanecendo os embrióides nos estádios globular e torpedo. Os genótipos mais responsivos foram PIX22C#31 x linha 004, PIX21C04#4 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda. O pior genótipo foi PIX21C15#45 x Ikeda. Com relação ao ácido acetilsalicílico (AAS), verificou-se maior indução de anteras e maior número de embrióides, principalmente à 88,9  $\mu\text{M}$ .

Finalmente verificou-se o efeito do Ethrel em combinação com TDZ, AgNO<sub>3</sub> e AAS, sendo as anteras inoculadas em meio C adicionado de 4,5 µM de TDZ ou meio C acrescido de 0,05 µM de 2,4-D, 0,05 µM de cinetina e 88,8 µM de AAS ou 5,0 mg/L de AgNO<sub>3</sub>. Após a inoculação as placas de Petri contendo as anteras, foram colocadas em um recipiente com Ethrel por diferentes períodos, sendo o tempo de 4 dias, o que mais induziu a embriogênese, principalmente nos meios com TDZ e AgNO<sub>3</sub>. O TDZ também promoveu maior indução de calos embriogênicos. As maiores taxas de necrose ocorreram no meio com AAS. Só ocorreu regeneração em plântulas no meio C adicionado de 5 mg/L de AgNO<sub>3</sub>, sendo o melhor tempo de exposição ao ethrel o de 8 dias. Os genótipos mais responsivos foram PIX22C#31 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda.

Verificou-se o número de cromossomos das plântulas através da análise de ponta de raízes, sendo que das plântulas analisadas houve a constatação de plântulas haplóides e diplóides. Considerando que a regeneração foi direta, sem passar por calos, supõe-se que as plântulas diplóides obtidas sejam provenientes dos micrósporos, portanto deve ter ocorrido uma diploidização *in vitro*. Foi feita uma verificação histológica da indução e desenvolvimento dos embrióides. Com 8 dias de inoculação a antera não apresentava setor embriogênico definido, no entanto aos 12 dias de inoculação verificou-se tais setores e a partir de 19 dias as anteras apresentaram a formação de elementos traqueais indicando a diferenciação celular para posterior formação de xilema. Não se percebeu mais a presença dos micrósporos o que pode levar a crer que as regiões em divisão foram originárias destes.

## SUMMARY

### ***IN VITRO* SOMATIC EMBRYOGENESIS IN THE ANTHOR CULTURE OF THE SWEET PEPPER (*Capsicum annuum* L)**

Anther culture technique was studied in different genotype of sweet pepper. The relationship was first found between the developmental stage of microspores with some floral bud morphological traits in the genotypes Agronômico 8, line 004 and the F<sub>1</sub> hybrid (PIX22C#31 x line 004), being that cytological analysis showed that the unvacuolated microspore, with a central nucleous and diameter of roughly 24,5 µm (suitable for utilization in anther culture) occurred in all the genotypes whose floral buds had of equal size or somewhat larger than the sepals and anthers with trace amounts of antocianin at their tip. Concerning the influence of the genotype and the age of the donor plant at androgenis, presence of adventitious embryos was verified, being the line 004 most responsive, followed by the hybrid but there was no significant difference among the weeks.

The influence of Thidiazuron (TDZ) was compared at a wide range of concentrations in combination with the incubation time at 35°C for the several F<sub>1</sub> genotypes. The most responsive genotypes were PIX22C#31 x line 004, PIX21C04#4 x

line 004, and PIX22C#21 x Ikeda, with respectively 22.3, 17.9 and 15.4% of anthers with embryoids and 177.9, 121.6 and 133.5 embryoids per 100 anthers. The embryoids bear both the globular and torpedo stage. Thidiazuron at 4.5  $\mu\text{M}$  was the most effective growth regulator source on somatic embryogenesis promotion. There was not any interaction between the concentrations of TDZ and time at 35°C, but the 8-day period was most favorable. Another experiment, with the same genotypes evaluated the influence of TDZ and MS medium upon the embryoid regeneration. Genotype PIX22C#31 x line 004 stood out having 36.6% of anthers induced. The MS medium at 50% of the salts and with 0.45  $\mu\text{M}$  of TDZ was the most favorable. There was low regeneration of plantlet, (1.0%), one half strength MS medium supplemented with 0.45  $\mu\text{M}$  TDZ, and MS with 4.5  $\mu\text{M}$  of TDZ.

The effects of  $\text{AgNO}_3$  and activated charcoal were evaluated for induction and regeneration of adventitious somatic embryos.  $\text{AgNO}_3$  at 5 mg/L on the C medium, showed the best induction of anthers relative to of the number of embryoids per 100 anthers. Activated charcoal on C medium was hazardous to this parameter and when inoculated on R medium, did not promoted any plantlet regeneration. The most responsive genotypes on this medium were PIX22C#31 x line 004, PIX21C04#4 x line 004, and PIX22C#21 x Ikeda and the poorest genotype was PIX21C15#45 x Ikeda. As regards acetylsalicylic acid (AAS), the highest anther induction and the greatest number of embryoids were found at 88.9  $\mu\text{M}$ .

The effect of Ethrel in combination of TDZ,  $\text{AgNO}_3$  and AAS were studied. TDZ and  $\text{AgNO}_3$  were the most effective for inducing somatic embryoid after 4 days with Ethrel. The greatest rates of necrosis took place on the medium with AAS. Regeneration

of plantlets occurred only on C medium supplemented with 5 mg/L of AgNO<sub>3</sub> after 8 days with Ethrel. The best responsible genotypes were PIX22C#31 x line 004 and PIX22C#21 x Ikeda.

Chromossome number of the seedlings was verified through the root tip analysis. There was a finding of the both haploid and diploid chromossome number. Taking into consideration that regeneration was direct, without going though callus phase, it is supposed that the diploid seedlings came from microspores, so an in vitro diploidization must have taken place. A histological assessment of induction and development of embryoids was performed. From 8 days of inoculation, the anther had not shown a definitive embryogenical sector, nonetheless at 12 days of inoculation, such sectors were found and from 19 days the anthers had shown the formation of tracheal elements pointing to cell differetiation to subsequent xylem formation it was noticed.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 INTRODUÇÃO GERAL

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) pertence a família Solanaceae, tendo sua origem na América Central e México. A nível mundial são 5 as espécies mais cultivadas de *Capsicum*, com  $2n=2x=24$  cromossomos. A espécie *C. annuum* L. é a mais cultivada estando hoje difundida em todo o mundo. É de clima tropical ou subtropical, e seu crescimento é afetado pelas condições climáticas, sendo que o frio retarda o crescimento e o calor em excesso causa abortamento e queda de flores. As flores são hermafroditas, com 5 anteras e 1 estigma, podendo algumas cultivares possuírem 6 anteras. É predominantemente autógama, mas pode ter uma taxa de alogamia até de 36%, principalmente em espécies de fruto pequeno, que possuem estilete maior e depende da população de abelhas, por isso, é considerada do grupo intermediário (Casali, Pádua e Braz, 1984).

Os frutos de pimentão são consumidos de forma imatura ou madura, e ainda podem ser industrializados para produção de alimentos e corantes. No Brasil, classifica-se entre uma das dez mais importantes hortaliças, sendo os estados de São Paulo e Rio de Janeiro os maiores produtores desta hortaliça.

Os programas de melhoramento desta cultura, visam resistência à doenças, maior espessura de polpa, frutos de cor verde escuro quando imaturos, precocidade e tendência cada vez maior da exploração da heterose.

Na obtenção de linhagens endogâmicas de plantas autofecundadas, pelo melhoramento convencional, visando a criação de novas cultivares ou para a produção de híbridos, é necessário, após o cruzamento intervarietal, tempo equivalente de 7 a 9 gerações para obtenção de uniformidade genotípica e fenotípica. Este tempo pode ser reduzido através da obtenção de haplóides em gerações segregantes; além de os haplóides serem livres dos problemas de dominância e recessividade, por possuir apenas um alelo em cada loco gênico, permitem a rápida produção de plantas homozigóticas através da duplicação do número de cromossomos numa única etapa, substituindo as gerações de autofecundação, no processo usual.

A maior eficiência de seleção é a outra vantagem do melhoramento com uso de haplóides, especialmente quando a variação de dominância é significativa. No melhoramento convencional, linhagens de gerações iniciais, mostram diferenças fenotípicas para as quais os efeitos aditivos e de dominância contribuem. Por outro lado, linhagens dihaplóides, têm apenas variância aditiva, e conseqüentemente, alta herdabilidade no sentido restrito. Portanto, menor quantidade de indivíduos serão necessários para a seleção dos recombinantes desejados.

Outra possibilidade de utilização das plantas haplóides é no estudo de herança, através de progênies homozigotas obtidas por androgênese, como no trabalho de Hendy, Pochard e Dalmaso (1985), no qual se estudou a herança genética para resistência à nematóides em pimentão.

A produção de haplóides pode ser obtida por diferentes técnicas como ginogênese, androgênese, tratamento químico, choque térmicos e irradiação com raios X ou luz ultravioleta., e ainda, por técnicas *in vitro* (cultura de pólen isolado, protoplastos, eliminação de cromossomos pela cultura de embriões jovens e paternogênese). No entanto, até o momento a melhor técnica *in vitro* para obtenção de haplóides é a cultura de anteras, pois nestas, os grãos de pólen estão em grande número, e podem desenvolver-se em haplóides por androgênese direta, dando origem a embriões, ou indireta, passando pela fase de calos (Moraes Fernandes, 1990).

Apesar de a obtenção de haplóides *in vitro* através da cultura de anteras ter sido registrada principalmente para espécies principalmente das famílias Solanaceae, Graminae e Cruciferae, recentes trabalhos mostram a possibilidade do uso desta técnica para outras famílias. Mas mesmo com o considerável sucesso da técnica da cultura de anteras, o principal problema continua sendo a baixa frequência de haplóides obtidos na maioria das espécies trabalhadas.

Outros fatores podem também causar problemas nessa metodologia: plantas podem-se originar de outros tecidos da antera, resultando plantas com vários níveis de ploidia e as chances de se isolar um haplóide numa mistura de níveis de ploidia, são pequenas, já que os haplóides são superados no crescimento pelos poliplóides, pois estes são mais vigorosos; pode haver alta incidência de plantas albinas, principalmente em cereais, exemplo disto ocorre em alguns genótipos de arroz, onde a frequência destas plantas pode ser baixa, até 20%, mas pode chegar a mais que 50%; pode ocorrer a formação de calos, originando-se espontaneamente ou induzidos por reguladores de crescimento. Técnicas inadequadas para a duplicação podem também constituir-se problema, e ainda, a mutação em plantas diplóides derivadas da cultura de

anteras é também um obstáculo ao sucesso da técnica. Por fim, a seleção que é feita *in vitro* nem sempre tem vantagem em condições de campo, devido a ausência da seleção natural.

É evidente que a cultura de anteras das espécies onde a técnica não foi bem sucedida são necessários estudos criteriosos dos fatores que possam influenciar a resposta das anteras cultivadas. Entre estes, os mais importantes são o genótipo do material a ser cultivado, o estágio ideal do explante, as condições de cultivo e idade das plantas doadoras, meio de cultura e condições físicas da cultura pré e pós inoculação (Moraes Fernandes, 1990).

Após obtidas as plantas haplóides a partir da cultura de anteras, o próximo passo é restabelecer a diploidia das mesmas, levando-as à homozigose. Há vários métodos para duplicar os cromossomos de plantas haplóides, mas o mais usado é o tratamento com colchicina. A colchicina é uma substância usada geralmente como solução aquosa ou dissolvida em álcool ou glicerina, podendo ainda ser aplicada como pasta de lanolina ou ágar. A concentração usada varia em função da espécie, mas de modo geral está entre 0,1 e 0,5%. Esta substância atua inibindo a formação das fibras do fuso de divisão. Esta metodologia, no entanto, apresenta algumas limitações de uso, como a mutagenicidade, perda de vigor em algumas espécies e ainda, surgimento de plantas com vários níveis de ploídia.

A endomitose é a duplicação dos cromossomos sem que haja a divisão do núcleo celular, o que é frequente em calos haplóides. Segundo Mantell, Matthews e McKee (1994) os núcleos idênticos, resultantes de uma primeira divisão do micrósporo fundiriam-se produzindo um embrião diplóide homozigoto. A diploidização *in vitro* pode ser explorada na obtenção de plantas diplóides homozigotas, o que é desejável do

ponto de vista prático, pois o emprego da colchicina tende a ser uma etapa longa e algumas vezes aleatória. A diploidização pode ser confirmada através da homogeneidade da descendência das plantas diplóides autofecundadas. Para manutenção das plantas haplóides, Vagera (1990) sugere para pimentão, sucessivas decapitações das plantas adultas, mas ao longo do tempo estas tendem a emitir brotações diplóides.

## **1.2 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como objetivo aplicar a técnica da cultura de anteras em diferentes genótipos de pimentão, verificando os vários fatores que influenciam a indução de embrióides e a regeneração de plântulas haplóides, tendo como finalidade posterior, a duplicação cromossômica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASALI, V.W.D.; PÁDUA, J.G.; BRAZ, L.T. Melhoramento de pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.10, n.113, p.19-22, maio 1984.
- HENDY, H.; POCHARD, E.; DALMASSO, A. Trnsmiission héréditaire de la résistance aux nématodes *Meloidogyne* Chitwood (*Tylenchida*) portée par 2 lignées de *Capsicum annuum* L.: étude de descendances homozygotes issues d'androgenése. **Agronomie**, Versalhes, v.5, n.2, p.93-100, 1985.
- MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: Uma introdução à engenharia genética em plantas**. Riberão Preto, SBG, 1994. 333p.
- MORAES FERNANDES, M.I.B. de. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA/CNPH, 1990. p.311-32.
- VAGER, J. Pepper (*Capsicum annuum* L.): in vitro induction of haploids. In: BAJAJ, Y. P. S (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Haploids in Crop Improvement I**. Berlin: Spring-Verlag, 1990. v.12, p.375-392.

## 2 RELAÇÃO ENTRE OS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS MICRÓSPOROS E AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO BOTÃO FLORAL

### RESUMO

Vários fatores influenciam a cultura de anteras, entre eles, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos. O presente estudo teve por objetivo verificar a relação entre o estágio de desenvolvimento dos micrósporos com algumas características morfológicas do botão floral do pimentão. Foram utilizados botões florais dos genótipos Agrônomico 8, Linhagem 004 e o híbrido F<sub>1</sub> (PIX22C#31 x Linhagem 004), os quais inicialmente foram separados em seis classes de diferentes tamanhos. Foi determinado o comprimento e o diâmetro do botão floral e o comprimento de suas anteras, além de se observar a presença de antocianina e a relação entre o tamanho das sépalas e pétalas. O estágio de desenvolvimento dos micrósporos foi analisado através da coloração dos mesmos com carmim acético. A análise citológica de cada classe mostrou que o micrósporo não vacuolado, com núcleo central e diâmetro de aproximadamente de 24,5 µm (ideal para utilização em cultura de anteras), ocorreu em todos os genótipos cujos botões florais tinham pétalas de tamanho igual ou pouco maior que as sépalas e, anteras com traços de antocianina em sua extremidade.

## 2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Um importante fator para o sucesso da cultura de anteras é conhecer para cada cultura o estágio ideal de desenvolvimento das anteras a serem cultivadas, de maneira que este estágio contenha os micrósporos em uma fase de desenvolvimento de melhor resposta androgenética, que geralmente são os micrósporos recém liberados da tétrade meiótica até no máximo, estágio binucleado, pois Grandó e Moraes Fernandes (1993) sugerem que o potencial embriogênico do grão de pólen pode ser determinado tanto no período da meiose como no período da pré-mitose do micrósporo, pois nestes dois momentos o micrósporo ainda teria metabolicamente características esporofíticas, o que permite a diferenciação do grão de pólen em embrião e posterior formação de uma planta.

Moraes Fernandes (1990) cita que segundo Mascarenhas (1971) e Vasil et al. (1979), os genes de RNA ribossômico e transportador do grão de pólen parecem ser desligados depois de 24 horas da primeira endomitose, e depois deste período não seria possível reverter o processo e a célula formaria normalmente o grão de pólen. As células que em cultivo *in vitro* ainda não tivessem alcançado o ponto crítico, poderiam então originar embriões. O autor cita ainda que segundo Mii (1976) é possível que algum produto da parede da antera dê início ao mecanismo de formação dos embriões. De acordo com Reynolds (1990), trabalhando com *Hyoscyamus niger*, a indução pode ser observada com 6 horas após a inoculação, através de pequenas mudanças estruturais no micrósporo, o qual caracterizado por um grande núcleo e nucléolo, e cromatina dispersa.

Segundo Mantell, Matthews e McKee (1994) são possíveis vários tipos de desenvolvimento do micrósporo *in vitro*, sendo que tanto o núcleo generativo quanto o vegetativo podem se dividir continuamente originando um embrióide haplóide, ou ainda, a primeira mitose produziria dois núcleos semelhantes e estes se dividiriam repetidamente resultando na formação de embrióides haplóides.

Em cereais, segundo Nitsch (1983), o estágio ótimo está antes da primeira endomitose do micrósporo. Em arroz, por exemplo, trabalhos mostraram que a resposta da antera cai bruscamente após a primeira endomitose, e ainda, que as anteras no estágio de tétrade não tiveram boa resposta, uma vez que o micrósporo uninucleado prematuro pode responder deficientemente e o micrósporo do meio ao final do estágio uninucleado são os mais adequados para a cultura de anteras (Chen, Chen e Lin, 1982; Karin et al., 1985 e Mercy e Zapata, 1986). Em milho Pretova et al. (1993) testando a regeneração de diferentes estádios do micrósporo e do pólen, verificaram que entre os estádios testados apenas os micrósporos uninucleados regeneraram plântulas. Moro (1987) recomenda para esta cultura utilizar o pendão na fase de cartucho, sendo que o estágio ideal ocorre quando o núcleo do micrósporo está no centro, o que geralmente corresponde ao estágio em que já se pode perceber a flecha, dentro do cartucho, apertando-os com os dedos. Trabalhos com trigo também mostraram que a coleta das espiguetas deve ocorrer quando a maioria dos micrósporos estão entre o meio e o final do estágio uninucleado (Zhou e Konzak, 1992; Zhou, Ball e Konzak, 1992). Já para aveia, Islam, Kintzios e Fischbeck. (1992) efetuaram a coleta dos pendões quando estes continham o micrósporo no meio do estágio uninucleado, mas para o amendoizeiro, o de melhor resposta foi o micrósporo no início do estágio uninucleado (Willcox et al., 1991).

Botões florais de batata (*Solanum tuberosum* L.) com tamanho entre 4 e 6 mm, são os que contêm os micrósporos uninucleados ou em estágio de tétrade (Tiainen, 1992; Calleberg e Johansson, 1993; Tiainen, 1993). Para couve de bruxelas, os botões foram coletados com tamanho de 4 a 5 mm, com relação dos comprimentos entre as pétalas e as anteras, desde 1:2 até 7:8 (Ockendon e McClenaghan, 1993). Em couve-flor houve interação entre o genótipo e o estágio do micrósporo, sendo que de acordo com o material, maior número de embriões foram obtidos de anteras que continham micrósporos no estágio uninucleado, o que correspondia a uma relação entre os comprimentos da pétala e antera entre 0,5 e 0,8. Quando o micrósporo estava no estágio de início da primeira divisão nuclear, o que provinha de botões com a relação pétala/antera de 1,1 a 1,3, outros genótipos responderam melhor (Yang, Chauvin e Herve, 1992).

Wolyn e Feng (1993) coletaram botões florais de aspargo que continham anteras com micrósporos no último estágio uninucleado, próximo a primeira mitose nuclear. O mesmo foi verificado por Sibi, Dumas de Vaulx e Chambonnet (1979), com relação ao pimentão (*Capsicum annuum* L.), sendo que os autores verificaram que estes micrósporos estão em anteras de botões com pétalas de comprimento igual ou pouco maior que as sépalas, e as anteras apresentam traços de antocianina em suas extremidades. Nervo et al. (1994), também cultivaram *in vitro* anteras de botões florais de pimentão que tinham as pétalas e sépalas com comprimentos aproximadamente iguais ou com pétalas levemente maiores. Já Dumas de Vaulx, Chambonnet e Pochard (1981) e Kristiansen e Andersen (1993) somente inocularam anteras de botões com pétalas e sépalas de tamanhos iguais, pois estas é que continham os micrósporos uninucleados.

## 2.2 OBJETIVO

Verificar a relação entre o estágio de desenvolvimento dos micrósporos com as características morfológicas do botão floral de diferentes genótipos de pimentão.

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Três genótipos de pimentão foram usados neste estudo; a cultivar comercial Agrônômico 8, a Linhagem 004 e o híbrido F<sub>1</sub> (PIX 22C#31 x Linhagem 004). A cultivar Agrônômico 08 foi desenvolvida pelo Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), resistente à estirpes do vírus Y; tendo frutos de formato cônico e casca espessa (tipo cascadura) de comprimento por volta de 11 cm. As linhagens foram desenvolvidas pelo prof. Dr. Wilson Roberto Maluf. A Linhagem 004 é uma linhagem endogâmica obtida a partir de autofecundações do híbrido F<sub>1</sub> Vidi (sementes Vilmorin, França); possui fruto de formato quadrado com 4 lóculos com comprimento de 10 a 13 cm e largura de 4 a 8 cm. A linhagem PIX 22C#31 é resistente a nematóides de galhas *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Peixoto, 1995), tendo como fonte de resistência a nematóides o acesso o PM687 e “background” Agrônômico 08.

Sementes dos três genótipos foram germinadas em bandejas de 128 células, com substrato comercial, e mantidas em casa de vegetação à temperatura mínima de 25°C, fotoperíodo de aproximadamente 12 horas e irrigação diária. Após 4 a 5 semanas foi feito o transplântio para vasos com capacidade para 8 litros de substrato previamente preparado. A partir da sexta semana após o transplântio os botões florais foram

coletados e fixados em álcool etílico e ácido acético, na proporção 3:1, durante 24 horas e posteriormente foram armazenados em álcool a 70% à 4°C.

Os botões florais foram separados em seis classes de tamanhos diferentes para posterior análise morfológica e citológica (Figura 1). Com auxílio de um paquímetro foram determinados o comprimento e o diâmetro do botão floral e o comprimento de suas anteras; além disto, observou-se a presença ou não de antocianina na extremidade da antera e a relação entre o tamanho das sépalas e pétalas.

A análise citológica foi feita por classe, a partir de três lâminas coradas com acetocarmim a 2%. Para a verificação dos estádios de desenvolvimento e medição do diâmetro dos micrósporos, utilizaram-se amostras de 200 e 20 micrósporos, respectivamente. Determinaram-se as percentagens de micrósporos nos diferentes estádios, e o diâmetro médio dos micrósporos. A medida dos diâmetros dos micrósporos foi feita com auxílio da ocular OSM 0,5 a uma magnitude de 400 X.

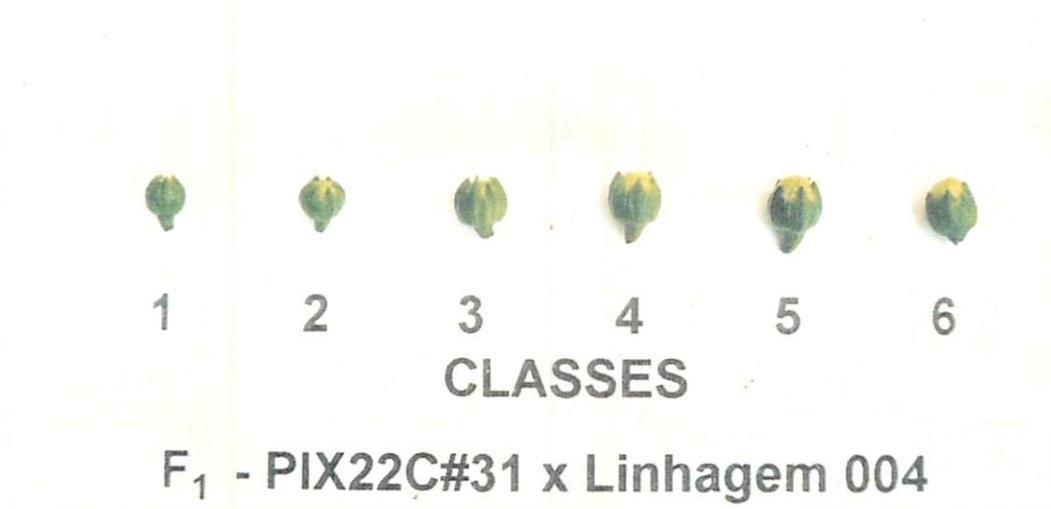


FIGURA 1 Botões florais do híbrido F<sub>1</sub> PIX22C#31 x linhagem 004, dividido em 6 classes de diferentes tamanhos

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise morfológica observou-se a evolução do tamanho das anteras em função do comprimento e diâmetro dos botões florais (Figura 2).

Na tabela 1 verifica-se para cada classe, os estádios de desenvolvimento dos micrósporos, sendo que para todos os genótipos, nos botões da classe 1, as pétalas ainda não eram visíveis e as anteras continham micrósporos ainda na tétrade meiótica ou, no máximo, micrósporos recém liberados da tétrade com diâmetro médio de 20  $\mu\text{m}$  (Figura 3a e 3b). A classe 2 apresentou micrósporos recém liberados, mas também ocorreram micrósporos vacuolados com núcleo não central, com diâmetro médio de 23  $\mu\text{m}$  (Figura 3c). Este mesmo estágio ocorreu na classe 3 de todos os genótipos e na classe 4 de Agrônomico 8 e linhagem 004, mas com diâmetro por volta de 24,5  $\mu\text{m}$ . A partir da classe 4 as anteras apresentaram traços de antocianina em sua extremidade.

O genótipo F1, na classe 4, e os demais genótipos na classe 5, apresentaram pétalas e sépalas com igual tamanho (Figura 2), contendo anteras com micrósporos não vacuolados, caracterizados por um núcleo central, ainda no estágio uninucleado ou no início do binucleado, logo após a primeira endomitose e com diâmetro médio de 24,5  $\mu\text{m}$  (Figura 3d). Na classe 5 o híbrido F<sub>1</sub> apresentou pétalas de comprimento um pouco maior que as sépalas e também contendo em suas anteras o micrósporo uninucleado. Estes resultados confirmam a correlação verificada por Sibi, Dumas de Vaultx e Chambonnet (1979).

Na classe 6 os botões apresentavam as pétalas maiores que sépalas, contendo em suas anteras os micrósporos com camada de exina, diâmetro de 25,9  $\mu\text{m}$  caracterizando um estágio mais avançado de desenvolvimento, certamente não mais no

estádio uninucleado (Figura 3e), conforme o verificado por Sibi, Dumas de Vaulx e Chambonnet (1979).

## 2.5 CONCLUSÕES

Os micrósporos em estágio de desenvolvimento uninucleado, adequado para obtenção de haplóides via cultura de anteras, ocorreram para todos os genótipos, em botões florais cujas pétalas e sépalas tinham comprimentos aproximadamente iguais. No híbrido F1 (PIX22C#31 x 004) estes micrósporos também ocorreram em botões com o comprimento de pétalas um pouco maior que o de sépalas.

TABELA 1. Percentagem de micrósporos por estágio de desenvolvimento em cada classe de tamanho do botão floral, considerando os dados dos genótipos em conjunto.

Estádios de desenvolvimento dos micrósporos	Classes de tamanho do botão floral					
	1	2	3	4	5	6
Tétrade	90					
Micrósporo recém liberado da tétrade	10	88				
Micrósporo vacuolado, núcleo não central		12	100	70		
Micrósporo não vacuolado, núcleo central *				30	100	
Micrósporo com camada de exina						100
Total (%)	100	100	100	100	100	100

\* Estádio adequado para utilização em cultura de anteras.

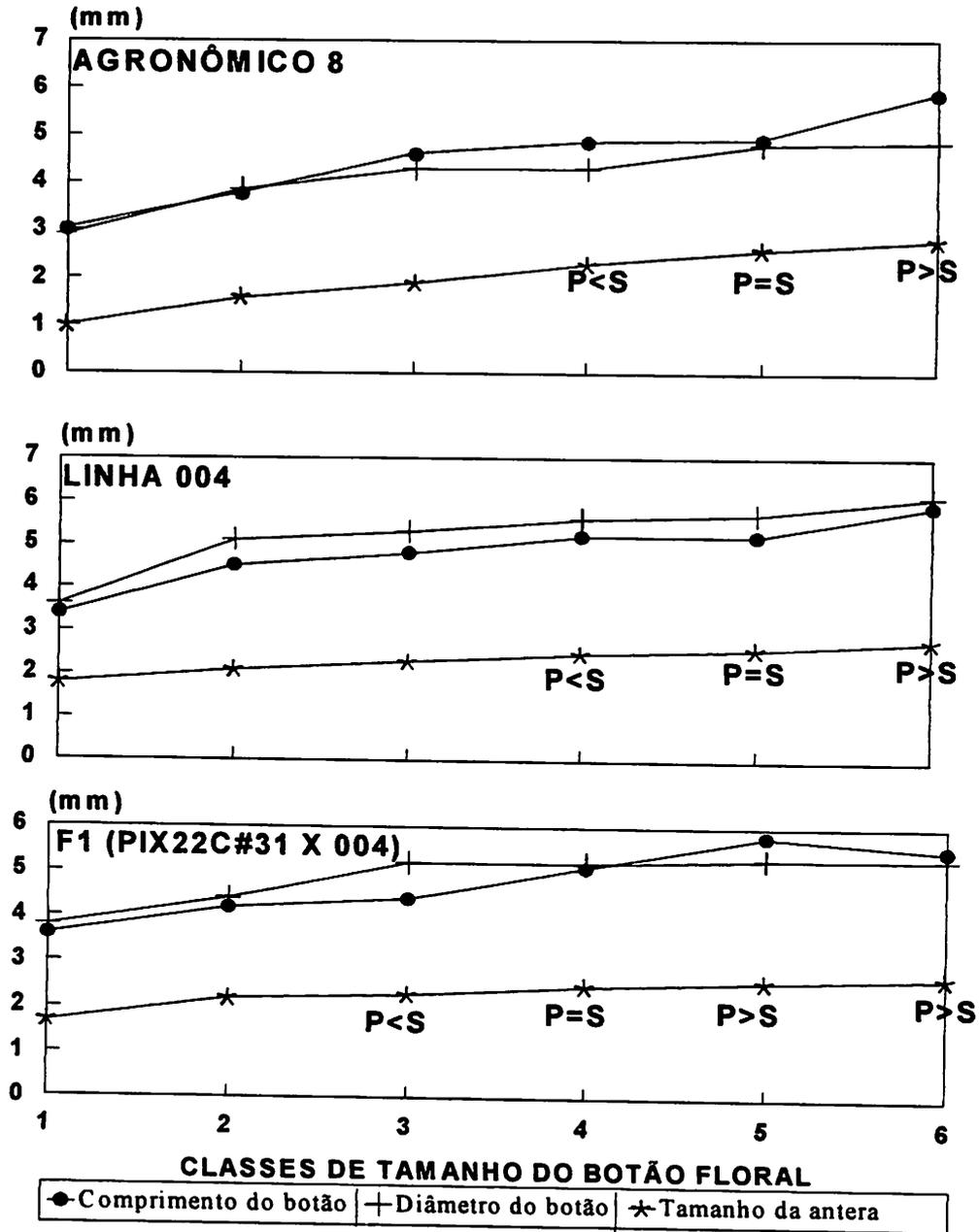


FIGURA 2. Evolução do tamanho das anteras em função do comprimento e diâmetro do botão floral (P = Pétalas, S = Sépalas).

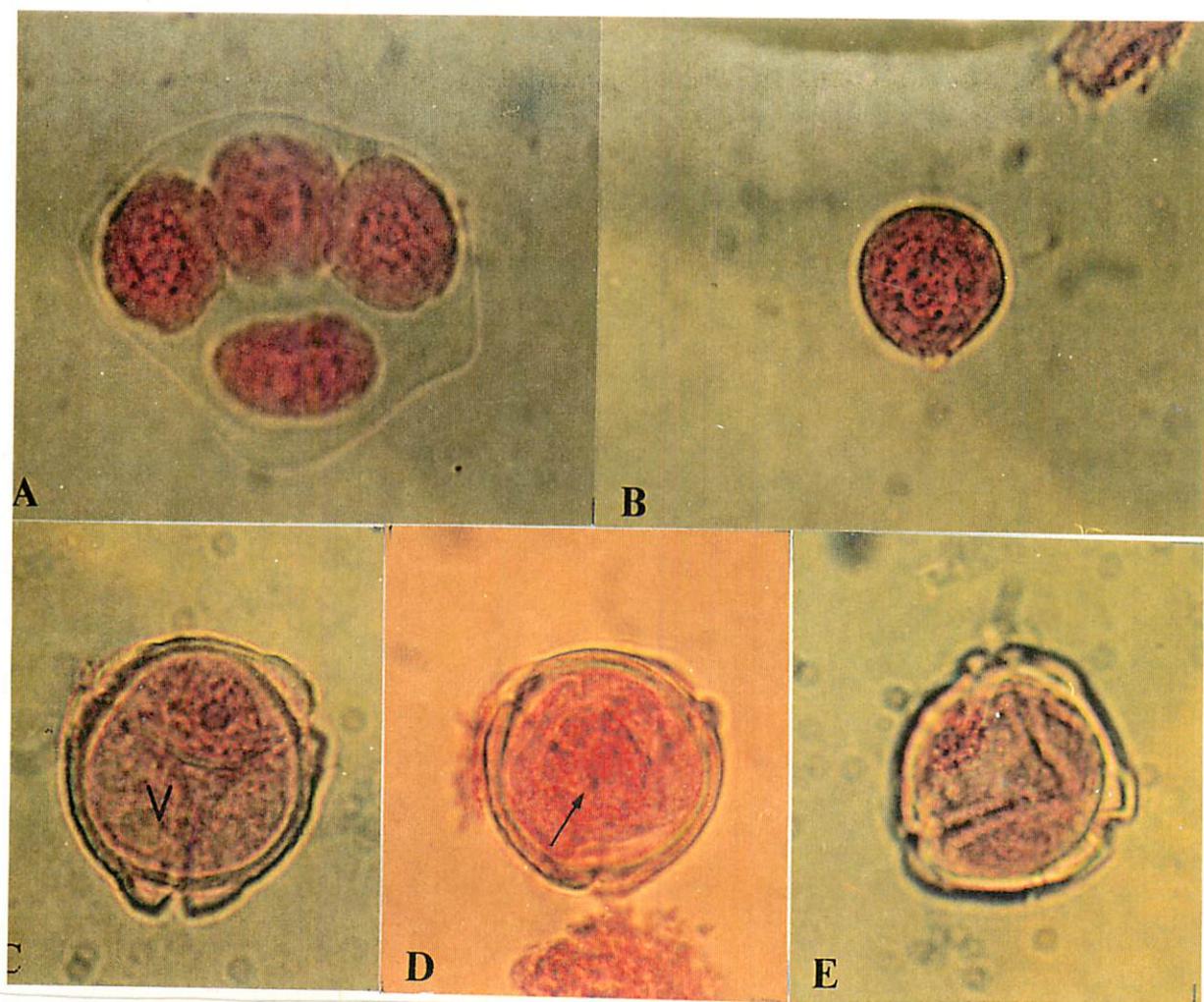


FIGURA 3. Diferentes fases da microsporogênese; A) tétrede meiótica, B) micrósporo recém liberado da tétrede, C) micrósporo vacuolado (V=região do vacúolo), D) micrósporo uninucleado, não vacuolado (seta=núcleo central). E) micrósporo com camada de exina. (A.T.1376 x).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALLEBERG, E.K.; JOHANSSON, L.B. The effect of starch and incubation temperature on anther culture of potato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.32, p.27-34, 1993.
- CHEN, C.M.; CHEN, C.C.; LIN, M.H. Genetic analysis of anther derived plants of rice. **The journal of heredity**, Washington, v.72, p.49-52, 1982.
- DUMAS DE VAULX,R.; CHAMBONNET,D.; POCHARD,E. Culture in vitro d'anthères de piment(*Capsicum annum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35°C. **Agronomie**, Versalhes, v.1,n.10,p.859-864,1981.
- GRANDO,M.F.; MORAES FERNANDES,M.I.B. Proposta de um modelo para explicar a embriogênese do grão de pólen in vitro.In:ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, Brasília,DF. 1993. **Anais...** Brasília: Redbio, 1993. v.1, res.69.
- ISLAM, M. R.; KINTZIOS, S.; FISCHBECK, G. Anther culture responsiveness of *Hordeum spontaneum* derived spring barley lines and a genetic analysis of plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.29, p.235-239, 1992.
- 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**, Manila, v.10, n.3, p.21-22, 1985.
- KRISTIANSEN,K.; ANDERSEN,S.B. Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annum* L.**Euphytica**,Wageningen,n.67,p.105-109,1993.
- MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: Uma introdução à engenharia genética em plantas**. Riberão Preto, SBG, 1994. 333p.
- 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**, Manila, v.11, n.4, p.23-24, Aug. 1986.
- MORAES FERNANDES,M.I.B. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras.In: TORRES,A.C.,CALDAS,L.S.**Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**.Brasília: Abctp/Embrapa/CNPH, 1990.p.311-332.

- MORO, J.R. Biotecnologia e melhoramentos genético de milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (eds). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas, FUNDAÇÃO CARGILL, 1987. v.2, p.343-372.
- NERVO, G.; CARANNANTE, G.; AZZIMONTI, M.T.; ROTINO, G.L. Use of anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlets production. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, Firenze. 1994. **Anais...** Firenze: IAPTC, 1994. v.8, p.92.
- NITSCH, C. Progress in anther and pollen culture technique. In: **Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement**, Beijing, 1981. **Proceedings...** Beijing: Beijing Science Press, 1983. p.1-10.
- OCKENDON, D.J.; McCLENAGHAN, R. Effect of silver nitrate and 2,4-D on anther culture of brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemnifera*). **Plant Cell tissue and Organ culture**, Dordrecht, v.32, p.41-46, 1993.
- PEIXOTO, J. R. **Melhoramento do pimentão (*Capsicum annuum* L.) visando resistência aos nematóides do gênero *Meloidogyne* spp.** Lavras: ESAL, 1995. 103p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia)
- PRETOVA, A.; RUIJTER, N.C.A. de; LAMMEREN, A.A.M. e SCHEL, J.H.N. Structural observations during androgenic microspore culture of the 4c1 genotype of *Zea mays* L. **Euphytica**, Wageningen, v.65, p.61-69, 1993.
- REYNOLDS, T. L. Ultrastructure of Pollen Embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Haploids in Crop Improvement I**. Berlin: spring-Verlag, v.12, p.67-82, 1990.
- SIBI, M.; DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D. Obtention de plantes haploides par androgenèse *in vitro* chez le Piment (*Capsicum annuum* L.). **Annales de l'Amélioration des Plantes**, Paris, v.29, n.5, p.583-606, 1979.
- TIAINEN, T. The influence of culture conditions on anther culture response of commercial varieties of *Solanum tuberosum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p.211-219, 1992.
- TIAINEN, T. The influence of hormones on anther culture response of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Science**, Limerick, v.88, p.83-90, 1993.
- WILLCOX, M. C.; REED, S. M.; BURNS, J. A.; WYNNE, J. C. Effect of microspore stage and media on anther culture of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.24, p.25-28, 1991.
- WOLYN, D.J.; FENG, X. Genotype temperature, and sampling date affect embryogenesis in asparagus anther culture. **Hort Science**, Alexandria, v.28, n.3, p.316-317, 1993.

- YANG, O.; CHAUVIN, J. E.; HERVE, Y. A study of factors affecting anther culture of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.28. p.229-296, 1992.
- ZHOU, H.; BALL, S.T.; KONZAK, C.F. Functional properties of ficoll and their influence on anther culture responses of wheat. **Plant Cell, tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p.77-83, 1992.
- ZHOU, H.; KONZAK, C.F. Genetic control of green plant regeneration from anther culture of wheat. **Genome**, Ottawa, v.35, p.957-961, 1992.

### **3 INFLUÊNCIA DA IDADE E GENÓTIPO DA PLANTA DOADORA NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES ADVENTÍCIOS.**

#### **RESUMO**

Avaliou-se a influência da idade da planta doadora de pimentão na androgênese de anteras da cv. Agrônômico 8, da Linhagem 004 e do híbrido F<sub>1</sub> (PIX22C#31 x 004). As plantas doadoras foram cultivadas em casa de vegetação. Os botões florais foram coletados quando sépalas e pétalas tinham tamanhos iguais, correspondendo a anteras com micrósporos uninucleados. Foram desinfestados com álcool 70% por 20 segundos e hipoclorito de Na (2%) por 10 minutos. As anteras foram retiradas e inoculadas em placas de Petri contendo o meio C (Sibi, Duma de Vault e Chambonnet, 1979), suplementado com, em  $\mu\text{M}$ , 0,05 de cinetina + 0,05 de 2,4-D. Logo após as placas foram colocadas a 35°C no escuro, por 8 dias, e após este período, a 26°C com 16 h de luz, até o 12º dia após a inoculação. Ao final dos 12 dias, as anteras foram transferidas para o meio R (Sibi, Duma de Vault e Chambonnet, 1979), suplementado com 0,5  $\mu\text{M}$  de cinetina. As inoculações ocorreram semanalmente a partir da 6ª até a 12ª semana pós-transplante das plantas doadoras. A partir dos 30 dias após a inoculação verificou-se a presença de embriões adventícios, sendo a linhagem 004 a mais responsiva, seguida do híbrido F<sub>1</sub>. Não houve diferença significativa para as semanas.

### 3.1 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1.1 Genótipo

A resposta das anteras cultivadas *in vitro* é bastante dependente do genótipo da planta doadora, sendo a ação dos genótipos verificada quando os haplóides são formados em diferentes frequências. Não somente gênero e espécie, mas também as características parentais das sementes e do pólen devem ser consideradas na obtenção de haplóides.

Em arroz (*Oryza sativa* L.), por exemplo, em geral, sabe-se que as variedades de arroz japonico respondem melhor do que os índicos e os híbridos F1 possuem um melhor comportamento do que seus pais endogâmicos (Zapata, 1985 e Narasimman e Rangasamy, 1993).

Em milho (*Zea mays* L.), além de outros fatores a capacidade de resposta do genótipo utilizado parece ser decisiva para a regeneração *in vitro*, sendo um dos principais alvos de estudo (Brettel, Thomas e Wernicke, 1981 e Moro, 1987). Segundo King e Shimamoto (1984) o avanço considerável que a cultura de anteras em milho apresentou nos últimos anos só foi possível graças a seleção de genótipos mais responsivos.

Em várias outras espécies também verificou-se o efeito do genótipo na resposta para regeneração como em couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) na qual Yang, Chauvin e Herve (1992) verificaram entre outros fatores, forte efeito do genótipo. Em variedades comerciais, em um grupo de tetraplóides e também em dihaplóides de batata (*Solanum tuberosum* L.), ocorreu variação na resposta androgenética (Tiainen, 1992; Calleberg e Johansson, 1993). Trabalhando com aspargo (*Asparagus officinalis* L.) Wolyn e Feng (1993) verificaram interação do genótipo com a temperatura de

incubação e data de semeadura. Já para couve de Bruxelas (*Brassica oleracea* Var. *gemnifera*) a interação se deu com o meio de cultura acrescido de diferentes concentrações de nitrato de prata e 2,4-D (Ockendon e McClenaghan, 1993).

No gênero *Capsicum* o primeiro sucesso em obtenção de plantas haplóides foi obtido por George e Narayanaswamy (1973), os quais trabalharam com *C. annuum* L. var. *grossum*. Sibi, Dumas de Vaulx e Chambonnet (1979) cultivaram *in vitro* anteras de pimentão, sendo duas linhagens e seus híbridos recíprocos. As linhagens eram de alta taxa de haploidização por partenogênese e provavelmente por isto, houve pouca diferença entre as duas combinações quanto à resposta androgenética.

No trabalho de Dumas De Vaulx, Chambonnet e Sibi (1981), os autores testaram o efeito do tratamento das anteras com elevada temperatura, não houve diferença entre estas mesmas linhagens e seu híbrido. O mesmo autor e colaboradores em outro trabalho verificaram diferença significativa entre vários híbridos testados, no que diz respeito à porcentagem do surgimento de plantas  $2n$ , principalmente em anteras inoculadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 8 dias (Dumas De Vaulx, Chambonnet e Pochard., 1981). Por outro lado, híbridos comerciais de pimentão quando testados sobre os efeitos da temperatura, fotoperíodo e idade da planta doadora, não interagiram significativamente com estes tratamentos, mas houve diferentes respostas de acordo com os genótipos (Kristiansen e Andersen, 1993). Esta última consideração também foi observada por Nervo et al. (1994) trabalhando com 12 híbridos experimentais.

Outro aspecto interessante é o fato de que diplóides originados de parentais com alta capacidade androgenética, muitas vezes possuem também boa resposta à produção de plantas haplóides o que indica que genes podem afetar esta capacidade. Portanto, uma das estratégias do melhoramento genético pode ser, segundo Moraes

Fernandes (1990), o desenvolvimento de materiais mais responsivos, como resultados da recombinação de genes específicos relacionados ao controle desse caráter.

Em trigo (*Triticum aestivum* L.) os resultados do cruzamento entre uma cultivar com alta capacidade em regenerar plantas a partir da cultura de anteras, e outra com baixa e ainda, o retrocruzamento do F1 com estas cultivares, indicaram que a capacidade androgenética está ligada à genes nucleares com efeito aditivo, mostrando então um potencial para seleção *in vitro* de parentais para aumentar a resposta à cultura de anteras (Zhou e Konzak, 1992). Resultados semelhantes ocorreram em cevada em que a capacidade de responder à cultura de anteras foi herdada e comportou-se como dominante em F1, de um cruzamento entre uma linha altamente responsiva e outra de baixa resposta na regeneração de plantas (Islam, Kintzios e Fischbeck, 1992).

Em milho os mapas moleculares obtido por RFLP's, de uma população F<sub>2</sub> foram comparados com o de plantas dihaplóides provenientes da cultura de anteras. As duas populações foram obtidas do cruzamento de uma linha altamente responsiva à técnica e outra de baixa resposta. A comparação mostrou 97% de similaridade entre o mapa da população F<sub>2</sub> e o da população de dihaplóides, o que mostra possibilidade do uso de linhas de dihaplóides no melhoramento e mapeamento desta cultura (Bentolila et al., 1992).

Estudos esclarecem que uma das razões do insucesso na cultura de anteras se deve ao fato de que muitos pesquisadores se restringem a apenas uma cultivar, sendo recomendada a utilização de várias cultivares, quando não se dispõe de suficiente informação para a espécie trabalhada, em consequência, maximiza-se a eficiência do processo, podendo-se escolher então os materiais mais responsivos.

### 3.1.2 Condições Fisiológicas das plantas doadoras

A capacidade androgenética de uma planta é influenciada pelo estado fisiológico desta durante o seu cultivo e no momento da retirada de suas anteras. As variações ambientais também exercem uma grande influência, possivelmente afetando o estado endógeno da planta doadora. Geralmente, flores de plantas mais jovens e no início da estação de florescimento, produzem mais grãos de pólen embriogênicos do que flores mais velhas e no final do ciclo da planta (Bajaj, 1983). Os fatores ambientais que mais influenciam são a intensidade luminosa, o fotoperíodo, a temperatura, a nutrição e o CO<sub>2</sub>, sendo que estes fatores interagem entre si, afetando a planta doadora de modo complexo (Moraes Fernandes, 1990).

Estudando as condições ambientais que afetam a resposta da cultura de anteras em arroz, Chung et al. (1981) verificaram que a temperatura e a luz natural exercem acentuado efeito sobre o estágio da microsporogênese. Plantas cultivadas sob temperatura do ar de 18,5 a 20°C tiveram melhor resposta androgenética do que a cultivada entre 16 e 18°C ou 26 a 28°C. Independentemente da temperatura, as plantas cultivadas em regime de luz intensa ou suficiente, responderam melhor do que as crescidas sob regime de baixa intensidade luminosa. Em trabalhos com trigo, as plantas doadoras foram também cultivadas em alta intensidade luminosa, em casa de vegetação, com 16 hs de luz e temperatura diurna e noturna variando de 15 a 20°C, respectivamente (Zhou, Ball e Konzak, 1992 e Zhou e Konzak, 1992). Já para aveia, as plantas foram cultivadas em temperaturas de 10 a 12 e 6 a 8°C, nos períodos diurno e noturno, respectivamente (Islam, Kintzios e Fischbeck, 1992; Bjornstad, Skinnes e Thoresen, 1993). Moro (1987) não faz nenhuma recomendação específica quanto às

condições de luz e temperatura para plantas de milho doadoras de anteras, mas recomenda cultivá-las sem qualquer aplicação de defensivos durante o desenvolvimento da cultura, pois estes, tendem a prejudicar os resultados.

Em batata, Tiainen (1992) verificou influências da época de coleta dos botões, o que pode ter sido causado pela variação de temperatura e fotoperíodo ao longo de 11 meses de coleta mensal dos botões; a porcentagem de produção de embriões foi de 19 a 20% durante o outono e caiu para 1 a 3% no inverno. Em couve-flor também houve influência razoável, sendo que maio e junho foram os meses com os melhores resultados; no inverno e começo da primavera a formação de embriões foi moderado e das plantas cultivadas no verão houve baixa formação (Yang, Chauvin e Herve, 1992). Wolyn e Feng (1993) trabalhando com aspargo, verificaram que para alguns genótipos houve interação entre a data de coleta dos botões e a temperatura de incubação, mas este último fator parece ser mais importante.

Com relação ao pimentão, segundo Kristiansen e Andersen (1993), houve formação de embriões a partir de anteras de plantas cultivadas numa faixa de 18 a 27°C, sendo a máxima resposta a 26°C mas, no entanto, na faixa de 20 a 24°C, normalmente predominante em casas de vegetação, houve boa resposta à formação de embriões. Já o fotoperíodo testado na faixa de 11 a 19 hs de luz, não influenciou. A idade da planta doadora teve influência, sendo a formação de embriões, inversamente proporcional à idade da planta, com melhores respostas entre 6 a 11 semanas após o transplante do pimentão.

### 3.2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivos verificar o comportamento de diferentes genótipos de pimentão e a influência da idade da planta doadora no cultivo *in vitro* de anteras desta espécie.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

No presente experimento foram utilizados: a cultivar comercial Agrônômico 8, a Linhagem 004 e o híbrido F<sub>1</sub> (PIX 22C#31 x Linhagem 004). Sementes dos três genótipos foram germinadas em bandejas de 128 células, com substrato comercial, e mantidas em casa de vegetação à temperatura mínima de 25°C, fotoperíodo de aproximadamente 12 horas e irrigação diária. Após 4 a 5 semanas foi feito o transplante para vasos com capacidade para 6 litros de substrato previamente preparado. Esta data foi considerada como início do experimento, sendo as plantas mantidas em casa de vegetação.

Os botões florais foram coletados quando o tamanho das pétalas era aproximadamente igual ao das sépalas. Foram desinfestados com álcool 70% por 20 segundos e hipoclorito de Na (2%) por 10 minutos. Em câmara de fluxo laminar foram lavados 3 vezes com água destilada e autoclavada à 120°C e 1 atmosfera de pressão por 20 minutos. Sob luz de um microscópio estereoscópio em aumento de 40 vezes, as anteras foram extraídas dos botões que foram cortados com uma incisão em um dos seus lados. Posteriormente removeram-se os estames com auxílio de pinças finas e bisturi, previamente autoclavados. Reuniram-se os estames numa placa de petri esterilizada e destes foram retirados os filamentos, tomando-se o cuidado de não ferir as anteras. As anteras danificadas foram descartadas.

Logo em seguida as anteras foram inoculadas em placas de Petri de poliestireno, 90 cm de diâmetro, contendo 25 ml de meio previamente esterilizado em autoclave, sendo anteras de 4 botões por placa, perfazendo um total de 20 a 24 anteras por placa. Utilizou-se o meio C, de Sibi, Dumas de Vaulx e Chambonnet (1979) (Tabela 2), suplementado, em  $\mu\text{M}$ , 0,05 de cinetina + 0,05 de 2,4-D e com pH ajustado para 5,9. Logo após as placas foram seladas com filme plástico e colocadas em estufa incubadora tipo BOD, marca FANEM à 35°C, no escuro por 8 dias, e após este período foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e aproximadamente 1500 lux de luminosidade, até o 12º dia após a inoculação. Ao final dos 12 dias, as anteras foram transferidas para placas de Petri contendo 25 ml de meio R (Sibi, Dumas de Vaulx e Chambonnet, 1979) (Tabela 2) suplementado com 0,5  $\mu\text{M}$  de cinetina.

As inoculações ocorreram semanalmente a partir da 6ª até a 12ª semana pós-transplante das plantas doadoras. A partir da 13ª semana as plantas apresentavam senescência e poucos botões florais.

A partir dos 30 dias após a inoculação, avaliou-se a percentagem de anteras com presença de embriões adventícios e o número de embriões por 100 anteras. Esta avaliação foi feita com auxílio de um microscópio estereoscópio a uma magnitude de 80 vezes.

TABELA 2 Composição dos meios C e R (Sibi, Dumas de Vaulx e Chambonnet, 1979).

	Meio C	Meio R
<b>Macronutrientes (mg/L):</b>		
KNO <sub>3</sub>	2150	2150
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1238	1238
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	412	412
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	313	313
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	142	142
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	50	50
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	38	38
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	34	34
KCl	7	7
<b>Micronutrientes (mg/L):</b>		
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	22,130	20,130
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	3,625	3,225
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,150	1,550
KI	0,695	0,330
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,188	0,138
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,016	0,011
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,016	0,011
<b>Vitaminas e aminoácidos(mg/L)</b>		
mio-inositol	50,300	50,300
piridoxina (HCl)	5,500	5,500
ácido nicotínico	0,700	0,700
tiamina (HCl)	0,600	0,600
pantotenato de Cálcio	0,500	0,500
vitamina B12	0,030	—
biotina	0,005	0,005
glicina	0,100	0,100
<b>Quelatos de Fe(mg/L)</b>		
Na <sub>2</sub> E.D.T.A.	18,65	18,65
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	13,90	13,90
<b>Outros componentes(g/L)</b>		
sacarose	30	30
agar	8	8
pH	5,9	5,9

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 3 observa-se a percentagem de anteras com embriões adventíneos nos três genótipos e nas diferentes semanas de idade das plantas doadoras. Houve diferença para os genótipos, sendo a linha 004 a mais responsiva, com 40.1%, seguida do híbrido F<sub>1</sub> e da cultivar Agrônômico 8 com 31.7 e 11.8%, respectivamente. Mas mesmo este último valor foi superior ao encontrado por Sibi, Dumas de Vaulx e Chambonnet (1979), que alcançaram no máximo 8.4% de anteras com embriões. Para o número de embriões por 100 anteras (Tabela 4), também ocorreu diferença entre genótipos, tendo a linha 004, o híbrido e o Agrônômico 8, 159,1, 96,7 e 26,3 embriões por 100 anteras, sendo também estes valores de maneira geral, superiores ao trabalho citado e ao encontrado por Kristiansen e Andersen (1993); no entanto, Nervo et al. (1993) encontraram até 552 embriões por 100 anteras no genótipo PM687 x Yolo Wonder, sendo inclusive usado como testemunha por ser um genótipo altamente responsivo.

As diferentes respostas entre genótipos de pimentão também ocorreram nos trabalhos de Dumas De Vaulx, Chambonnet e Pochard (1981) que verificaram diferença significativa entre vários híbridos testados, no que diz respeito a percentagem do surgimento de plantas 2n; Kristiansen e Andersen, (1993) e Nervo et al. (1993) que trabalharam com 12 híbridos experimentais.

O efeito do genótipo também é comum em outras espécies como *Brassica oleracea* var. *botrytis* e *Solanum tuberosum* L (Yang, Chauvin e Herve, 1992; Tiainen, 1992; Calleberg e Johansson, 1993). Outro exemplo ocorreu em milho, onde segundo

King e Shimamoto (1984) o avanço na cultura de anteras desta cultura só foi possível graças à seleção de genótipos mais responsivos.

Considerando dados dos genótipos em conjunto, não houve diferença da idade da planta doadora, seja para a percentagem de anteras com embrióides, seja para o número de embrióides por 100 anteras, o que concorda com o observado no trabalho de Kristiansen e Andersen (1993) no qual a idade da planta doadora teve influência, sendo a formação de embriões, inversamente proporcional a idade da planta, com melhores respostas entre 6 a 11 semanas após o transplântio do pimentão. De maneira geral plantas mais jovens e no início da estação de florescimento, produzem mais grãos de pólen embriogênicos do que flores mais velhas e no final do ciclo da planta (Bajaj, 1983).

No entanto, dentro de cada genótipo houve diferença de acordo com a semana de inoculação, principalmente para o Agrônômico 8, no qual as duas primeiras semanas foram as de menores percentagens de anteras com embrióides (Tabela 3). Para o número de embrióides por 100 anteras também ocorreram diferenças entre as semanas, de maneira diferenciada para cada genótipo (Tabela 4), caracterizando novamente o efeito do genótipo para as variáveis avaliadas.

Verificou-se a presença de embrióides na forma globular, após a transferência para o meio R, mas apesar das boas taxas de indução e os consideráveis números de embrióides encontrados, não foi observado o amadurecimento desses embrióides em regeneração em plântulas, em nenhum dos genótipos.

TABELA 3. Percentagem de anteras com embriões adventícios em diferentes idades das plantas doadoras em genótipos de pimentão.

IDADE PL. DOADORA (SEMANAS)	GENÓTIPOS									TOTAL		
	AG08			LINHA004			HIBRIDO					
	A	A/E	%	A	A/E	%	A	A/E	%	A	A/E	%
6	140	6	4,3	102	42	41,6	96	27	28,1	338	75	22,2a
7	90	8	8,9	93	38	40,9	85	26	30,6	268	72	26,9a
8	110	20	18,2	118	45	38,1	86	22	25,6	314	87	27,7a
9	112	14	12,5	104	40	38,5	115	42	36,5	331	96	29,0a
10	117	18	15,4	117	49	41,2	126	40	31,7	360	107	29,7a
11	101	12	11,9	124	50	40,3	93	31	33,3	318	93	29,2a
12	83	11	13,3	80	32	39,8	118	40	33,9	281	83	29,5a
TOTAL	753	89	11,8	738	296	40,1	719	228	31,7	2210	613	27,7
Intervalo de Confiança	(10,7-15,9)			(36,6-43,6)			(28,3-35,1)					

Proporções seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste 't' ( $p < 0,05$ )

A = Número de anteras inoculadas

E = Número de anteras com embriões

% = Percentagem de anteras com embriões

( ) = Intervalo de confiança da % (nível de 0,05).

### 3.5 CONCLUSÕES

A indução de embriões ocorreu diferentemente entre os genótipos, sendo a linha 004 a mais responsiva, seguida do híbrido; mas com relação a idade da planta doadora, considerando os dados dos genótipos em conjunto, não houve diferença para o período entre a 6<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana pós-transplante das plantas doadoras, mas ocorreram variações dentro de cada genótipo de acordo com a semana.

TABELA 4 Número de embriões por 100 anteras em diferentes idades das plantas doadoras em genótipos de pimentão.

IDADE PL. DOADORA (SEMANAS)	GENÓTIPOS									TOTAL		
	AG08			LINHA004			HIBRIDO					
	A	E	%	A	E	%	A	E	%	A	E	%
6	140	39	27,9	102	172	168,6	96	101	105,2	338	312	92,3a
7	90	21	23,3	93	150	161,3	85	81	95,3	268	252	94,0a
8	110	51	46,4	118	172	145,8	86	69	80,2	314	292	92,9a
9	112	38	33,9	104	166	159,6	115	110	95,7	331	314	94,9a
10	117	28	23,9	117	196	167,5	126	115	91,3	360	339	94,2a
11	101	29	28,7	124	185	149,2	93	91	92,8	318	305	95,9a
12	83	18	21,7	80	133	166,3	118	114	96,6	281	265	94,3a
TOTAL	753	224	29,7	738	1174	159,1	719	681	94,7	2210	2079	94,1
Intervalo de Confiança (26,4 - 33,0)			(132,7 - 185,5)			(93,1 - 96,3)						

Proporções seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste 't' ( $p < 0,05$ )

A = Número de anteras inoculadas

E = Número de embriões.

% = Percentagem de embriões

( ) = Intervalo de confiança da % (nível de 0,05).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAJAJ, Y.P.S. In vitro production of haploides. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds). **Handbook of plant cell culture; Techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1984. v.1, p.228-287.
- BENTOLILA, S.; HARDY, T.; GUITTON, C.; FREYSSINET, G. Comparative genetic analyses of F2 plants and anther culture derived plants of maize. **Genome**, Ottawa, v.35, p.575-582, 1992.
- BJORNSTAD, A.; SKINNES, H.; THORESEN, K. Comparisons between doubled haploid lines produced by anther culture, the *Hordeum bulbosum* - method and lines produced by single seed descent in barley crosses. **Euphytica**, Dordrecht, v.66, p.135-144, 1993.

- BRETTELL, R.I.S.; THOMAS, E.; WERNICKE, W. Production of haploid maize plants by anther culture. **Maydica**, Bergamo, v.26, p.101-111, 1981.
- CALLEBERG, E.K.; JOHANSSON, L.B. The effect of starch and incubation temperature on anther culture of potato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.32, p.27-34, 1993.
- CHUNG, H.; SHI-CHOU, H; CHING-PO, K; HAN-CHIN, L.; CHENG-CHI, C. e LIN-PING, P. On the inductive conditions of rice pollen plantlets in anther culture. In: **Plant Tissue Culture**. Peking, 1978. **Proceedings...** Boston, Pitmans Publishing Inc. 1981. p.87-96.
- DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D. e SIBI, M. Stimulation of "in vitro" androgenesis in Pepper (*Capsicum annuum* L.) by elevated temperature treatments. C.R.N.S.F. - C.N.R.A. **Meeting**, Orsay, Juillet 1981, Dr. Earle (Ed.), (Souspresse).
- DUMAS DE VAULX, R., CHAMBONNET, D., POCHARD, E. Culture in vitro d'anthers de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35°C. **Agronomie**, Versalhes, v.1, n.10, p.859-864, 1981.
- GEORGE, L.; NARAYANASWAMY, S.; Haploid *Capsicum* through Experimental Androgenesis. **Protoplasma**, New York, v. 78, p.467-470, 1973.
- ISLAM, M. R.; KINTZIOS, S.; FISCHBECK, G. Anther culture responsiveness of *Hordeum spontaneum* derived spring barley lines and a genetic analysis of plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.29, p.235-239, 1992.
- KING, P.; SHIMAMOTO, K. Cereais-Maize. In: EVANS, D. A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds.). **Hand-book of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Maacmillan, 1984. v.2, p.70-91.
- KRISTIANSEN, K.; ANDERSEN, S. B. Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. **Euphytica**, Wageningen, n.67, p.105-109, 1993.
- MORAES FERNANDES, M.I.B. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Abctp/Embrapa/CNPH, 1990. p.311-332.
- MORO, J.R. Biotecnologia e melhoramentos genético de milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (eds). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas, FUNDAÇÃO CARGILL, 1987. v.2, p.343-72.

- NARASIMMAN, R.; RANGASAMY, S.R. Comparison of fertility between the F1, F2 and anther derived lines in the crosses of indica japonica and japonica/indica in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, Dordrecht, v.66, p.19-25, 1993.
- NERVO, G.; CARANNANTE, G.; AZZIMONTI, M.T.; ROTINO, G.L. Use of anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlets production. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 1994. Firenze. **Anais...** Firenze: Iapct, 1994. v.8, p.92.
- OCKENDON, D.J.; McCLENAGHAN, R. Effect of silver nitrate and 2,4-D on anther culture of brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemnifera*). **Plant Cell tissue and Organ culture**, Dordrecht, v.32, p.41-46, 1993.
- SIBI, M.; DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D. Obtention de plantes haploides par androgenèse *in vitro* chez le Piment (*Capsicum annuum* L.). **Annales de l'Amélioration des Plantes**, Paris, v.29,n.5,p.583-606,1979.
- TIAINEN, T. The influence of culture conditions on anther culture response of commercial varieties of *Solanum tuberosum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p.211-219, 1992.
- WOLYN, D.J.; FENG, X. Genotype temperature, and sampling date affect embryogenesis in asparagus anther culture. **Hort Science**, Alexandria, v.28, n.3, p.316-317, 1993.
- YANG, O.; CHAUVIN, J. E.; HERVE, Y. A study of factors affecting anther culture of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.28, p.229-296, 1992.
- ZAPATA, F.J. **Biotechnology in International Agricultural Research**. Manila: International Rice Research Institute, 1985. p.85-95.
- ZHOU, H.; BALL, S.T.; KONZAK, C.F. Functional properties of ficoll and their influence on anther culture responses of wheat. **Plant Cell, tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p.77-83, 1992.
- ZHOU, H.; KONZAK, C.F. Genetic control of green plant regeneration from anther culture of wheat. **Genome**, Ottawa, v.35, p.957-961, 1992.

## **4 AVALIAÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DO THIDIAZURON (TDZ) NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES ADVENTÍCEOS**

### **RESUMO**

Avaliou-se o efeito do TDZ em combinação com o tempo de incubação à 35°C, na indução de embriões adventíceos em anteras de pimentão, genótipos F<sub>1</sub> (PIX21C12#35 x Agrônômico 08, PIX21C04#4 x linha 004, PIX22C#31 x linha 004, PIX21C15#45 x Ikeda e PIX22C#21 x Ikeda). Os botões foram coletados quando sépalas e pétalas tinham tamanhos aproximadamente iguais, correspondendo a anteras com micrósporos uninucleados. As anteras foram plaqueadas em meio básico C (Sibi, Duma de Vaulx e Chambonnet, 1979) suplementado com TDZ nas concentrações 0,005, 0,05, 0,45 e 4,5 µM e colocadas no escuro à 35°C por 2 ou 8 dias e após este período permaneceram em ambiente com 26°C e 16 horas de luz até o 12º dia pós-inoculação. Posteriormente foram transferidas para o meio R (Sibi, Duma de Vaulx e Chambonnet, 1979) adicionado de 0,5 µM de cinetina. Após 30 dias, os genótipos mais responsivos foram PIX22C#31 x linha 004, PIX21C04#4 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda com, respectivamente, 22,3, 17,9 e 15,4% de anteras com embrióides e 177,9, 121,6 e 133,5 embrióides por 100 anteras. Os embrióides apresentavam os estádios globular e torpedo. O TDZ à 4,5 µM foi o que melhor induziu a embriogênese somática, mas com uma maior percentagem de calos (6,7%). Não houve interação entre as concentrações de TDZ e o tempo a 35°C, mas o período de 8 dias foi mais favorável.

Num outro experimento, com os mesmos genótipos, avaliou-se a influência do TDZ e do meio MS na regeneração dos embriões. As anteras foram inoculadas em meio C, conforme o experimento anterior e após o 12º dia pós-inoculação, transferiu-se para meio MS (50 e 100% de sais) x TDZ (0,05, 0,45 e 4,5  $\mu$ M). O genótipo PIX22C#31 x linha 004 destacou-se tendo 36,6 % de anteras induzidas, sendo que os demais genótipos também tiveram maior indução que o primeiro experimento, mas mantiveram-se aproximadamente com o mesmo número de embriões por 100 anteras. O meio MS à 50% de sais e com 0,1 mg/L de TDZ foi o mais favorável para estas características, bem como para a formação de calos, sendo 15,8%. Houve baixa regeneração de plantas (1,1%), sendo em MS com 50% dos sais acrescido de 0,45  $\mu$ M de TDZ e MS completo com 4,5  $\mu$ M de TDZ.

## **4.1 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **4.1.1 Considerações gerais**

A composição do meio é de grande importância para o sucesso da cultura de anteras, não existindo contudo, uma recomendação generalizada. Na maioria das espécies a androgênese se verifica em meio que contém sais minerais, sacarose, vitaminas, reguladores de crescimento e ágar (Moraes Fernandes, 1990). A consistência do meio, normalmente é sólida, mas os meios líquidos estão sendo cada vez mais usados, pois tem vantagens no aumento do rendimento pela maior obtenção de embriões e calos (Pierik, 1987).

A sacarose, segundo Bajaj (1983), é a melhor fonte de carboidratos, além de ser osmorreguladora. A concentração inicial de cultivo normalmente é mais alta que a

usual (6 a 10%), principalmente quando em cultura de anteras de cereais. Ching (1982), afirmou que em arroz, para alta ocorrência de regeneração da parte aérea, são necessárias altas concentrações de sacarose, entretanto, a concentração de 5% é suficiente para a indução de calos e regeneração de plantas. Já em cevada, segundo Scott e Lyne (1994), tanto a sacarose como a glicose e frutose, foram prejudiciais na embriogênese dos micrósporos, por mecanismo desconhecido, sendo que a maltose conferiu o desenvolvimento dos embriões e calos. No pimentão, Nervo et al. (1994), verificaram que a glicose estimulou a androgênese tanto na concentração de 30 g/L, quanto a 100 g/L, mas a sacarose nesta última concentração causou acentuado decréscimo na formação de plantas. Em milho, Barloy e Beckert (1993) obtiveram maior quantidade e melhor qualidade de embriões regenerados, quando transferiram as anteras, após 3 semanas de inoculação em meio com baixa concentração de sacarose e sem hormônios, para meio rico em sacarose, contendo 25 g/L, e ainda 1 mg/L de cinetina.

Com relação às condições ótimas de incubação, principalmente temperatura e iluminação, dependem da espécie e mesmo do genótipo. Geralmente as temperaturas ideais variam entre 20 e 28°C, sendo que a pré-incubação em baixas temperaturas é relatada como benéfica para muitas espécies, como por exemplo para o arroz, o qual em geral é pré-incubado a 8°C (Martinez et al., 1989). Quanto ao efeito da luz, segundo Moraes Fernandes (1990), os resultados são muito dependentes da espécie. De maneira geral, a maioria se desenvolve melhor quando em cultivo sob luz contínua, exceto para os cereais, em que ao escuro tem-se obtido melhores respostas.

Na cultura de anteras de arroz, vários meios são utilizados, mas o meio N<sub>6</sub> (Karin et al., 1985) tem sido bastante utilizado na China para as variedades japônicas e

para as variedades índicas e híbridos entre índica e japônica tem se usado o meio H<sub>5</sub> e SK<sub>8</sub> ( Shahjahan, Karin e Miah 1985). No Brasil, Carvalho (1989) verificou para o arroz sequeiro que a frequência de indução de calos aumentou em meio básico MS modificado, o qual no estado líquido, foi superior que ao N<sub>6</sub>. Silva et al. (1993) usou o meio N<sub>6</sub> acrescido de auxinas, para indução de calos em grupos de arroz sequeiro e irrigado, sendo os calos obtidos, repicados para o meio MS modificado, visando a regeneração que foi mais favorável para o grupo de cultivo de irrigado.

Em milho, Moro (1987) recomenda o uso do meio Yu-Pei, mas afirma que várias modificações desse meio, assim como outros meios podem ser usados. O mesmo autor recomenda ainda a incubação das anteras no escuro por uma semana a 14°C e depois em luz contínua a 28°C. Outra aplicação é o cultivo em duas semanas no escuro a 25°C, seguido de luz contínua a mesma temperatura. Após 6 a 8 semanas, dependendo do genótipo empregado, observa-se a formação de embriões ou de calos, que após duas semanas do surgimento devem ser transferidos para meio de regeneração.

Bjornstad, Skinnnes e Thoresen (1993) inocularam anteras de aveia em meio MS com 6% de maltose e cultivaram a 25°C, sendo a primeira semana com luz difusa, tendo bons resultados na obtenção de haplóides. Trabalhando com trigo Zhou, Ball e Konzak (1992) inocularam anteras em meio líquido, suplementado com 2,4-D e 20 g/L de sacarose, em condições de escuro e com temperatura entre 26 a 28°C, objetivando a produção de calos. A este meio foi adicionado um aditivo denominado Ficol, com o objetivo de aumentar a viscosidade do meio para que os calos não submergissem, mas verificaram que este produto em meio com alta concentração de sacarose (90 g/L) é

deletério para a produção de plantas verdes de trigo a partir da cultura de anteras, além de afetar a osmolaridade do meio. Posteriormente os calos foram transferidos para meio sólido para regeneração, acrescido de 30 g/L de sacarose e sem reguladores de crescimento.

Em aspargo, as anteras foram inoculadas em meio MS sólido acrescido de caseína hidrolizada, glutamina, ANA e BA, e ainda, 5% de sacarose e foram colocadas em diferentes temperaturas, sendo que 35°C foi a melhor para formação de calos embriogênicos (Wolyn e Feng, 1993). Para couve-flor a incubação inicial em alta temperatura, por 24 horas e sem luz, também foi favorável, mas a adição de BAP no meio foi prejudicial à embriogênese (Yang, Chauvin e Herve, 1992). O mesmo foi feito para couve de Bruxelas, mas por um período de 16 horas. Neste mesmo trabalho a presença de 2,4-D, isoladamente no meio de cultura, foi benéfica, e ainda foi testada a substituição do ágar por agarose purificada, o que não deu bom resultado (Ockendon e McClenaghan, 1993).

Em trabalhos com batata, os autores verificaram que as melhores respostas ocorreram em anteras inoculadas em meio de cultura gelatinizado com amido de batata (3%), e acondicionadas à 20°C. Com relação a reguladores de crescimento, BAP a 0,013 mM e AIA a 0,02 mM, isoladamente, foram os melhores tratamentos, mas quando num mesmo meio, estes foram prejudiciais à formação de embrióides; foi possível observar ainda que 2,4-D, zeatina, GA<sub>3</sub> e ABA não tiveram efeito algum. Estes dos reguladores parecem não terem tido nenhum efeito adverso sobre os níveis de ploidia plantas regeneradas. A concentração de sacarose 60 g/L, em comparação com

qualquer outra fonte de energia, deu melhores resultados (Calleberg e Johansson, 1993; Tiainen, 1992; Tiainen, 1993).

Em pimentão, Vagera (1990) cita que os trabalhos iniciais usaram os meios MS modificado e LS, mas obtiveram apenas pequenas percentagens de embriões e plantas, sendo 3 a 5% e 0,1%, respectivamente, como no trabalho de George e Narayanaswamy (1973). Posteriormente, melhores resultados foram alcançados por Sibi, Dumas de Vaulx e Chambonnet (1979) e os meios destes autores são os mais usados para a cultura de anteras desta espécie, sendo que inicialmente estes inocularam anteras em meio denominado de meio C suplementado com 2 mg/L 2,4-D; 2 mg/L de cinetina; 0,03 mg/L de vitamina B<sub>12</sub>, 3,25% de Fe-EDTA 3% de sacarose, solidificado com 0,8% de ágar, com pH ajustado para 5,9. As anteras contidas neste meio foram cultivadas por 12 dias a 25°C com 12 horas/luz. Após este período as anteras foram transferidas para um meio denominado R, sem 2,4-D e vitamina B<sub>12</sub>, mas com 0,1 mg/L de cinetina.

Dumas De Vaulx, Chambonnet e Sibi (1981) trabalhando também com cultura de anteras de pimentão nos meios C e R, compararam as respostas das anteras inoculadas a 35°C por 2 ou 8 dias, em diferentes doses de 2,4-D e cinetina; verificaram que tratamentos por 2 dias foi um pouco melhor que 8 dias a 35°C, quando em alta dose (9,1µM) de 2,4-D e cinetina. Com baixas concentrações destes reguladores de crescimento, no período de 8 dias a 35°C, sempre obteve-se uma melhor resposta, sendo a maior taxa (13,3%) de plantas obtidas com uma concentração de 0,05 µM de 2,4-D, sem cinetina. Os autores afirmam que a alta temperatura no início do cultivo das anteras permite que se use menor quantidade de reguladores de crescimento tendo

aumento na qualidade embriogênica e ganhos na produção de plantas. Em outro trabalho, Dumas De Vault, Chambonnet e Pochard (1981), verificaram que as anteras de pimentão inoculadas no meio C, suplementado com 0,05  $\mu\text{M}$  de cinetina e 0,05  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, colocadas a 35°C no escuro, nos oito primeiros dias de inoculação, deram melhores respostas que no trabalho anterior, e ainda, embriões transferidos para o meio R com 9,3  $\mu\text{M}$  de cinetina tiveram alta frequência de regeneração de plantas. Esta última verificação foi seguida por Nervo et al. (1994), com o meio C modificado e/ou adicionado de outros componentes, e verificaram que a melhor indução de plantas ocorre quando o ágar foi o agente solidificante, quando comparado ao gelrite e agarose.

#### 4.1.2 Thidiazuron (TDZ)

O TDZ, segundo Mok et al. (1982) é regulador de crescimento, derivado de uréia, sendo de composição química *N*-phenil-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-iluréia, com estrutura não contendo anel purínico, ao contrário do que acontece nas citocininas. Inicialmente este composto foi registrado como desfolhante de algodão e mais recentemente foi reportado como tendo ação citocinínica, e por isto, tem sido cada vez mais usado na indução *in vitro* de calos, brotos e embriões adventícios, bem como na proliferação de brotos axilares, principalmente em espécies florestais, mas já existem inúmeros trabalhos em ornamentais, frutíferas, hortaliças, plantas medicinais e grandes culturas (Visser et al., 1992 e Lu, 1993).

O mecanismo de ação do TDZ não é perfeitamente conhecido, no entanto existem hipóteses. É possível que o TDZ promova diretamente o crescimento através de uma ação biológica similar a uma citocinina; promoveria a conversão de ribonucleotídeos das citocininas em ribonucleosídeos biologicamente mais ativos,

caracterizando um papel de indução e ainda inibiria a degradação das citocininas, promovendo um acúmulo destas. Esta última é baseada no fato da alta regeneração de brotos dependentes de citocinina, bem como, a regulação dos níveis endógenos (Capelle et al., 1983; Mok e Mok, 1985 e Thomas e Katterman, 1986). Mok e Mok (1985) citam que o TDZ pode levar à produção de etileno e o fechamento dos estômatos o que é característico de ação citocinínica.

De acordo com Visser et al. (1992) e baseado nos resultados de Lu (1993), o TDZ pode ter uma ação auxínica e/ou estar envolvido no metabolismo das auxinas, pois este último autor verificou excelentes respostas na embriogênese somática em hipocótilos de geranium, quando o TDZ substituiu uma combinação adequada de auxina e citocinina.

Segundo Lu (1993), o número de brotos obtidos em meio contendo TDZ, é no mínimo igual, ou geralmente bem maior que o número em meio com qualquer citocinina, considerando ainda que são necessárias apenas baixas concentrações de TDZ (0,01 à 0,4  $\mu\text{M}$ ) para que isto ocorra. Isto foi constatado por Zhou et al. (1994), trabalhando com ovários de *Cayratia japonica*, onde verificaram que as melhores induções calos embriogênicos ocorreram nas combinações de 2,3 e 4,6  $\mu\text{M}$  de 2,4-D com 0,009  $\mu\text{M}$  de TDZ. Quando os calos eram subcultivados para meio contendo TDZ ou TDZ combinado com ANA, tiveram um incremento de 25% de embriões cotiledonares, em relação ao meio sem TDZ.

Estes resultados revelam que citocinina e auxina são necessárias na indução e que a atividade citocinínica do TDZ é mais acentuada que a cinetina, pois foram exigidos apenas 4% de TDZ, em relação à concentração de cinetina. O mesmo foi constatado por Innecco (1993) na indução de brotações e calos em cotilédones de

constatado por Innecco (1993) na indução de brotações e calos em cotilédones de pimentão, sendo que 0,68  $\mu\text{M}$  de TDZ teve o mesmo efeito que 17,8  $\mu\text{M}$  de BAP. Uma possível explicação da maior atividade do TDZ em relação às outras citocininas, é que o este não seria tão degradado pelas citocininas oxidases, e conseqüentemente tomaria-se mais estável e biologicamente mais ativo (Mok et al., 1987).

Mas, segundo Lu (1993), em alguns casos pode ocorrer o contrário, como em pêssego, no qual o TDZ produziu excesso de calos e poucas brotações, quando comparado com BAP. Este autor relata ainda que em certas espécies há desvantagens associadas ao uso do TDZ como: hiperhidratação das brotações regeneradas, formação anormal das folhas, brotações curtas e compactas e dificuldades de alongamento e enraizamento das brotações obtidas. O autor sugere que a hiperhidratação pode ser reduzida ou superada não se vedando as placas de Petri no estágio de iniciação dos brotos, colocando tampas com perfurações na fase de alongação dos brotos, ou usando altas concentrações de ágar; e ainda sugere que a qualidade dos brotos pode ser melhorada empregando o TDZ combinado com uma citocinina purínica. Além disso Lu (1993) cita que a maioria dos brotos provenientes de meios com TDZ, são curtos a médios, mas podem ser alongados em meio contendo AIB e 2iP.

## 4.2 OBJETIVOS

Os experimentos a seguir tiveram como objetivos verificar o efeito do TDZ combinado com períodos de incubação a 35°C, na indução de embrióides em anteras de diferentes genótipos de pimentão e ainda, verificar o efeito do TDZ em diferentes concentrações de sais do meio MS, na maturação dos embrióides.

## 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.3.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

Os genótipos utilizados foram os híbridos F<sub>1</sub> (PIX21C12#35 x Agrônômico 8, PIX21C04#04 x 004, PIX22C#31 x linha 004, PIX21C15#45 x Ikeda e PIX22C#21 x Ikeda). As linhagens são materiais desenvolvidos pelo prof. Dr. Wilson Roberto Maluf, sendo PIX21C12#35, PIX21C04#04 e PIX21C15#45 resistentes à nematóides das galhas *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Peixoto, 1995), tendo como fonte de resistência o acesso PM 217 e “background” as cultivares Margareth e Magda. As linhagens PIX22C#31 e PIX22C#21 tem as mesmas características mas com fonte de resistência o PM 687 e “background” a cultivar Agrônômico 08. A cultivar Ikeda é tradicionalmente plantada tendo plantas de bom vigor com altura de 70 a 80 cm, uniformidade e boa produtividade. Os frutos são de formato cônico com coloração verde escura brilhante e comprimento de 10 a 12 cm.

As plantas doadoras dos botões foram obtidas e mantidas em casa de vegetação com condições controladas. Os botões florais foram coletados quando o tamanho das pétalas era aproximadamente igual ao das sépalas, correspondendo à anteras contendo micrósporos uninucleados. Os botões florais foram desinfestados com álcool 70% por 20 s. e hipoclorito de Na (2%) por 10 minutos e em fluxo laminar foram lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada. As anteras foram retiradas sob luz de um microscópio estereoscópio em aumento de 40 vezes. Foram extraídas através de uma incisão em um dos lados dos botões, removendo-se posteriormente os estames com auxílio de pinças finas e bisturi, previamente autoclavados. Reuniram-se os estames numa placa de petri esterilizada e destes foram retirados os filamentos,

tomando-se o cuidado de não ferir as anteras. As anteras danificadas foram descartadas.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com 4 repetições por tratamento, constituindo cada placa uma parcela, composta de anteras provenientes de 4 botões, totalizando 20 a 24 anteras por placa. Cada semana em que ocorreu as inoculações, foi um bloco. As inoculações das anteras ocorreram a partir da 6ª semana pós-transplante. A partir dos 30 dias pós-inoculação, com o auxílio de um microscópio estereoscópio em aumento de 80 vezes, avaliou-se a percentagem de anteras com embriões, de calos embriogênicos e o número de embriões por 100 anteras. Os dados foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade através dos testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente.

Os embriões obtidos globular e torpedo, foram retirados das anteras com auxílio de bisturi de ponta fina, em câmara de fluxo laminar e sob luz de um microscópio estereoscópio, aumento de 40 vezes. Logo em seguida foram transferidos para placa de Petri contendo meio R adicionado de 9,3  $\mu\text{M}$  de cinetina, visando a maturação dos mesmos e posterior regeneração em plântulas. O mesmo foi efetuado para os calos embriogênicos.

#### **4.3.2 AVALIAÇÃO DO TDZ E DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO À 35°C.**

As anteras foram inoculadas em placas de Petri, contendo 25 ml do meio C, com pH ajustado para 5.9 e previamente autoclavado, suplementado com TDZ nas concentrações 0,005, 0,05, 0,45 e 4,5  $\mu\text{M}$  e colocadas no escuro à 35°C por 2 ou 8 dias, numa combinação fatorial. Após este período permaneceram em sala de crescimento

com  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e 16 horas de luz até o 12<sup>o</sup> dia pós-inoculação. Posteriormente foram transferidas para o meio R adicionado de  $0,5 \mu\text{M}$  de cinetina.

### **4.3.3 INFLUÊNCIA DO TDZ E DO MEIO MS NA REGENERAÇÃO DE EMBRIÓIDES**

As anteras foram inoculadas em placas de Petri, contendo 25 ml do meio C, com pH 5.9 e previamente autoclavado, suplementado com TDZ na concentração de  $4,5 \mu\text{M}$  e colocadas no escuro à  $35^{\circ}\text{C}$  por 8 dias. Após este período permaneceram em sala de crescimento com  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e 16 horas de luz até o 12<sup>o</sup> dia pós-inoculação, completando a fase de indução.

Logo em seguida, iniciou-se a fase de maturação, sendo as anteras transferidas para o meio MS completo ou com metade de sua composição de sais, combinado em esquema fatorial com TDZ nas concentrações de 0,05, 0,45 e  $4,5 \mu\text{M}$ . Estes meios também tiveram o pH ajustado para 5.9 e posteriormente foram autoclavados.

## **4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.4.1 AVALIAÇÃO DO TDZ E DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO À $35^{\circ}\text{C}$ .**

As porcentagens de anteras com embrióides e de calos embriogênicos, e o número de embrióides por 100 anteras, foram influenciadas significativamente pelas doses de TDZ, pelo período de incubação à  $35^{\circ}\text{C}$  e ainda pelos genótipos (Tabela 5). No entanto só houve interação entre TDZ e genótipo para o número de embrióides por 100 anteras (Figura 4). Houve um aumento significativo na indução de embriões somáticos a medida em que se aumentou a concentração do TDZ, indo de 85,6 na

concentração de 0.005  $\mu\text{M}$  para 159,7 com 1,0 mg/L, considerando os genótipos em conjunto. Comparando com o número de embriões do experimento anterior em que a indução se deu com 2,4-D e cinetina (94,0%), no presente estudo verifica-se então um papel importante do TDZ na indução de embriões em anteras de pimentão.

TABELA 5. Resumo das análises de variância para porcentagens de anteras com embriões (%AE) e calos embriogênicos (%Calos), e número de embriões por 100 anteras (EMB/100A), da combinação de TDZ com tempo de incubação à 35°C para diferentes genótipos.

F. V.	G. L.	Quadrados Médios		
		%AE	%Calos <sup>(1)</sup>	EMB/100A <sup>(2)</sup>
TDZ	3	742,1843**	431,4072**	84,3532**
Tempo	1	219,0229*	602,3641**	11,4971**
Genótipo	4	681,5076**	264,2296**	89,2154**
TDZ x Tempo	3	14,2120	5,7501	0,5074
TDZ x Genótipo	12	15,0818	42,8991	4,8992**
Tempo x Genótipo	4	12,4888	14,1018	1,1155
TDZ x Tempo x Genótipo	12	11,4792	15,0312	0,2432
Blocos	3	38,2759	15,1070	1,5819
C. V. (%)		36,5	46,6	9,2

(1) - Dados transformados para Arco Seno Raíz (X/100)

(2) - Dados transformados para Raíz (X);

\* - Significativo ao nível de 5% pelo teste F;

\*\* - Significativo ao nível de 1% pelo teste F.

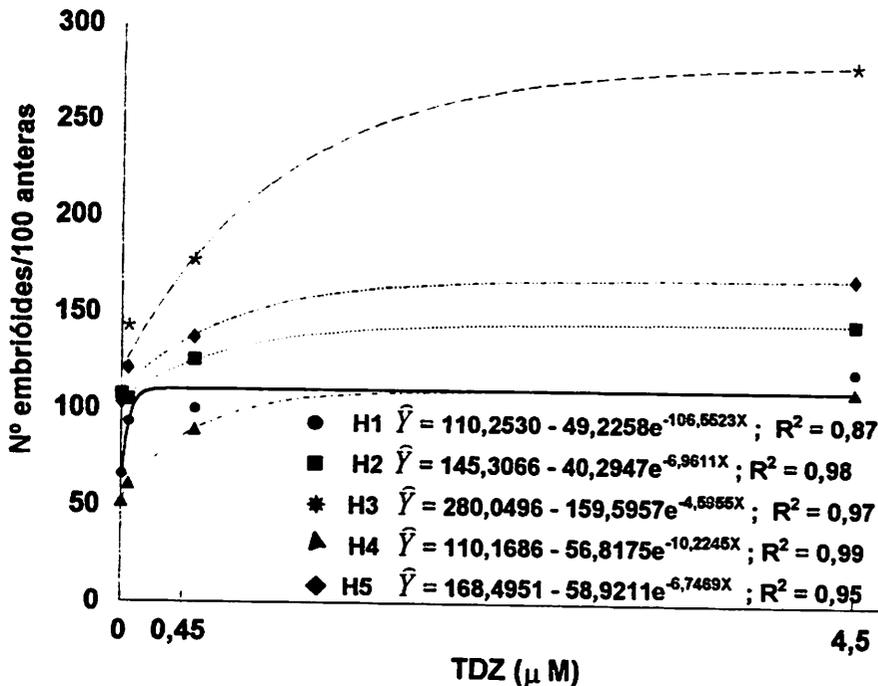


FIGURA 4. Efeito de concentrações de TDZ sobre o número de embriões por 100 anteras, para os híbridos PIX21C12#35 x Agrônômico 8,(H01); PIX21C04#04 x 004 (H02); PIX22C#31 x linha 004 (H03); PIX21C15#45 x Ikeda (H04) e PIX22C#21 x Ikeda (H05), com dados do tempo à 35°C em conjunto.

Trabalhos têm comprovado a alta eficiência do TDZ na indução embriogênica e na regeneração de brotações adventícias, quando comparado com citocininas e auxinas (Visser et al., 1992; Lu, 1993; Zhou et al., 1994 e Innecco, 1994), inclusive o 2,4-D, o qual a literatura demonstra, ser a auxina mais efetiva na indução de embriões somáticos. Alguns autores demonstram também a influência do etileno nesta indução. Mok e Mok (1985) citam que o TDZ pode levar a produção de etileno, o que leva a inferir sobre um efeito indireto deste regulador na indução da embriogênese somática em anteras de pimentão.

Os genótipos responderam com diferentes intensidades com respostas para os híbridos. Esta diferença é comum em trabalhos com cultura de anteras de várias espécies, inclusive para o pimentão, como nos trabalhos de Dumas de Vaultx, Chambonnet e Pochard (1981), Kristiansen e Andersen (1993) e Nervo et al. (1994). O efeito dos genótipos foi melhor explicitado na figura 5, não só para o número de embriões por 100 anteras, bem como para porcentagem de calos embriogênicos.

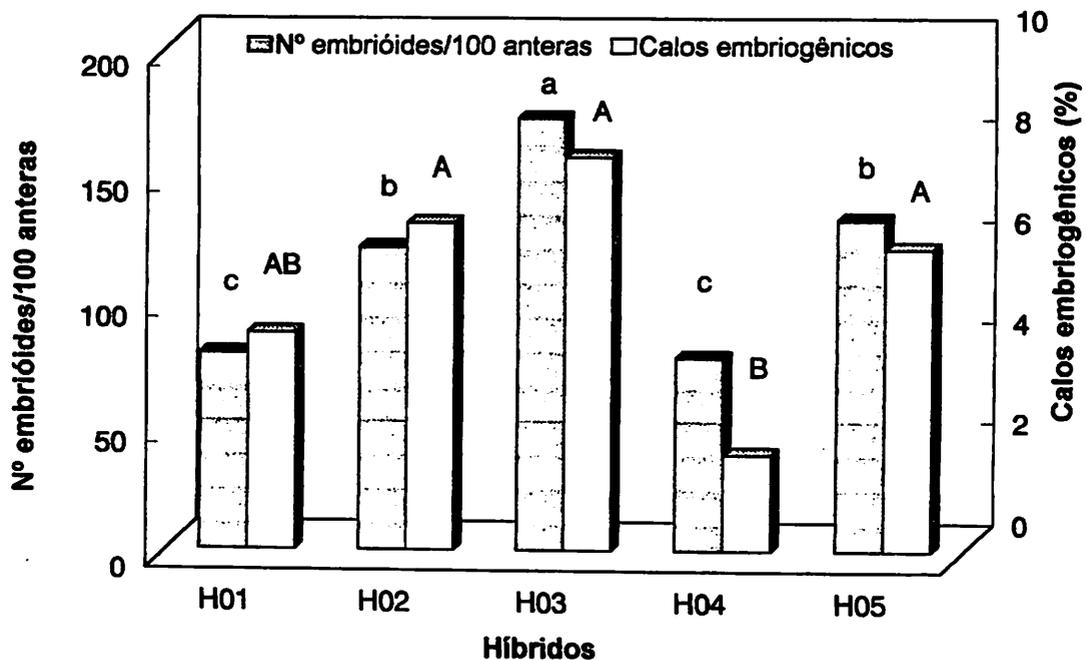


FIGURA 5. Número de embriões por 100 anteras e porcentagem de calos embriogênicos para os híbridos PIX21C12#35 x Agrônômico 8 (H01); PIX21C04#04 x 004 (H02); PIX22C#31 x linha 004 (H03); PIX21C15#45 x Ikeda (H04) e PIX22C#21 x Ikeda (H05), independente da concentração de TDZ e do tempo à 35°C.

Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de TuKey (5%).

Com relação à porcentagem de anteras com embrióides (Figura 6), também ocorreu um incremento conforme aumentou-se os níveis de TDZ, até 0.45  $\mu\text{M}$  e depois ocorreu uma tendência à estabilização, como mostra a equação de regressão assintótica (Equação de Mitscherlich). O mesmo verificou-se para a porcentagem de calos, o que concorda com Lu (1993), que afirma que às vezes o TDZ leva ao excesso de calos quando comparado com uma citocinina, por exemplo BAP.

O período de 8 dias de incubação foi mais favorável a todas as características avaliadas (Tabela 6), o que concorda com o observado por Dumas de Vaultx, Chambonnet e Pochard (1981); contudo, em outro trabalho Dumas de Vaultx, Chambonnet e Sibi (1981) verificaram interação entre concentrações de 2,4-D e os períodos de 2 e 8 dias a 35°C, sendo que tratamentos por 2 dias foi um pouco superior ao de 8 dias a 35°C, quando em alta dose, 9,1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 9,3  $\mu\text{M}$  de cinetina. Com baixas concentrações de 2,4-D e cinetina, no período de 8 dias a 35°C sempre obteve-se uma melhor resposta. Os autores afirmam que a alta temperatura no início do cultivo das anteras, permite que se use menor quantidade de reguladores de crescimento tendo aumento na qualidade embriogênica e ganhos na produção de plantas. Pode-se atribuir a este fato um aumento na ação metabólica dos reguladores de crescimento quando em altas temperaturas. A temperatura de 35°C também foi favorável para a cultura de anteras de aspargo (Wolyn e Feng, 1993), assim como 30°C foi para anteras de arroz (Silva et al., 1993) e também para couve-de-Bruxelas, onde segundo Biddington e Robinson (1991), o tratamento à 35°C é essencial para a embriogênese, sendo a sua influência sobre outros fatores ou na ação dos compostos adicionados, ou ainda afetando diretamente na biossíntese de etileno.

Não houve qualquer regeneração de plântulas, permanecendo os embriões nos estádios globular ou no máximo torpeda (Figura 7), mesmo quando estes foram transferidos para o meio R adicionado de 2 mg/L de cinetina, contrariando o verificado por Dumas de Vault, Chambonnet e Pochard (1981).

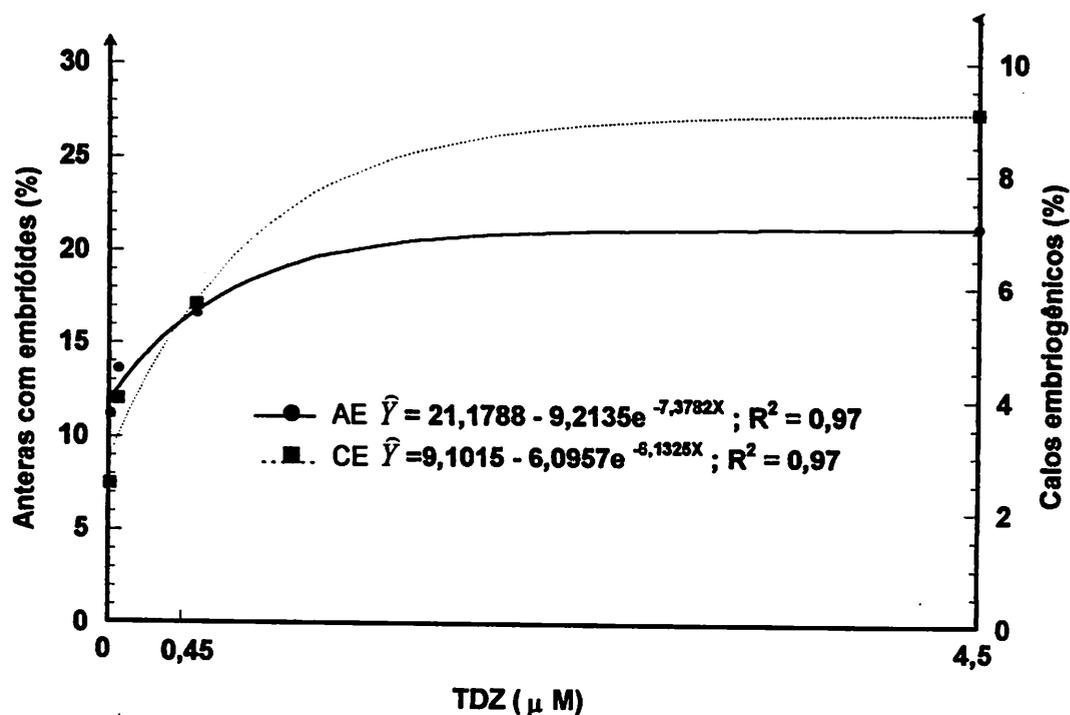


FIGURA 6. Efeito de concentrações de TDZ sobre as porcentagens de anteras com embriões e calos embriogênicos, considerando dados em conjunto dos genótipos e do tempo de incubação a 35°C.

TABELA 6. Porcentagens de anteras com embriões (%AE) e calos embriogênicos (%Calos), e número de embriões por 100 anteras (EMB/100A), para tempo à 35°C. Dados dos genótipos e dozes TDZ em conjunto.

Tempo à 35°C	%AE	%Calos <sup>(1)</sup>	EMB/100A <sup>(2)</sup>
2 dias	14,5	4,6	110,8
8 dias	16,8a	7,9a	122,3a

(1) - Dados transformados para Arco Seno Raíz (X/100)

(2) - Dados transformados para Raíz (X);

Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste F (5%).

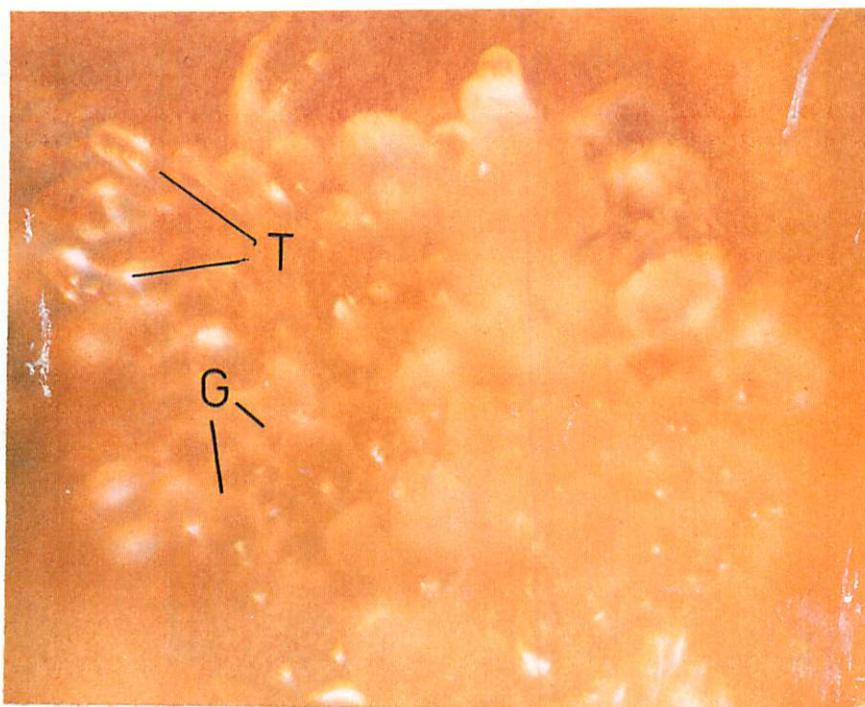


FIGURA 7. Embriões nos estádios globular (G) e torpedão (T), em anteras com 35 dias de inoculação, em meio C + 4,5 µM de TDZ.

#### 4.4.2 INFLUÊNCIA DO TDZ E DO MEIO MS NA REGENERAÇÃO DE EMBRIÕES

As porcentagens de anteras com embriões e de calos embriogênicos, e o número de embriões por 100 anteras, apresentaram diferenças significativas, entre os tratamentos inclusive em suas interações (Tabela 7).

TABELA 7. Resumo das análises de variância para porcentagens de anteras com embriões (%AE) e calos embriogênicos (%Calos), e número de embriões por 100 anteras (EMB/100A), da combinação de TDZ com a concentração de sais do meio MS para os diferentes genótipos.

F. V.	G. L.	Quadrados Médios		
		%AE	%Calos <sup>(1)</sup>	EMB/100A <sup>(2)</sup>
MS (Concentração sais)	1	4200,8349**	388,0748**	173,3705**
TDZ	2	2527,9611**	114,2509#	65,0516**
Genótipo	4	1297,9022**	337,0903**	68,1631**
MS x TDZ	2	618,8167**	9,2798	74,9138**
MS x Genótipo	4	19,0199	6,4004	7,8857**
TDZ x Genótipo	8	109,2044	16,2191	20,2787**
MS x TDZ x Genótipo	8	22,9134	2,1486	10,9905**
Blocos	3	95,8474	396,2348**	14,4345**
C. V. (%)		41,3	32,0	7,9

(1) - Dados transformados para Arco Seno Raíz (X/100)

(2) - Dados transformados para Raíz (X);

# - Significativo ao nível de 9% pelo teste F;

\*\* - Significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Para as porcentagens de anteras com embriões e de calos embriogênicos, verificou-se efeito de genótipo (Figura 8), com comportamento semelhante ao experimento anterior, mas com maiores respostas. Isto pode ser devido à transferência das anteras para meio MS contendo TDZ. Resultados semelhantes foram verificados por Zhou, Guo e Luo. (1994), com ovários de *Cayratia japonica*: as melhores induções de calos embriogênicos ocorreram em meio com TDZ, e quando os calos foram

subcultivados em meio também contendo TDZ ocorreu um incremento de 25% de embriões cotiledonares. No presente experimento, de maneira geral, os embriões permaneceram nos primeiros estádios de desenvolvimento, globular e torpedo, sem ocorrer a maturação dos embriões (Figura 7). Os calos continham embriões nos mesmos estádios.

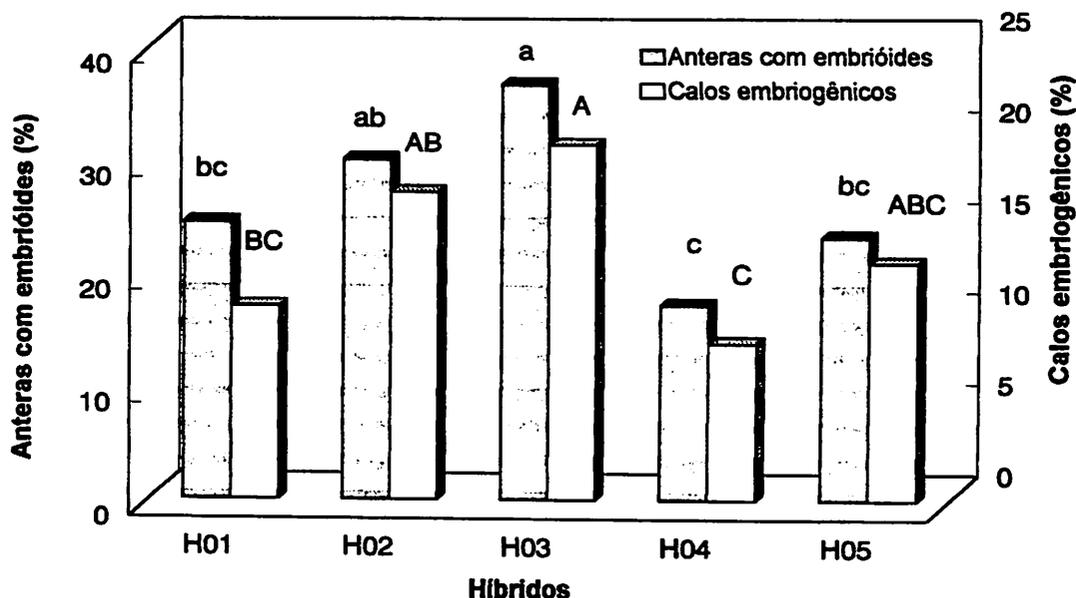


FIGURA 8. Porcentagens de anteras com embriões e de calos embriogênicos para os híbridos PIX21C12#35 x Agrônômico 8, (H01); PIX21C04#04 x 004 (H02); PIX22C#31 x linha 004 (H03); PIX21C15#45 x Ikeda (H04) e PIX22C#21 x Ikeda (H05), independente da concentração de TDZ e do meio MS. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de TuKey (5%).

Ocorreram apenas duas regenerações diretas em plantas no genótipo PIX22C#31 x linha 004, sendo uma no meio MS com 50% dos sais acrescido de 0,1 mg/L de TDZ e outra no meio MS completo com 4,5  $\mu$ M de TDZ. Estas regenerações

equivalem à taxas muito baixas (1,1%), semelhante ao alcançado por George e Narayanaswamy (1973). As plantas obtidas não alcançaram o pleno desenvolvimento *in vitro*, morrendo aproximadamente aos 52 dias após a inoculação das anteras.

O número de embriões somáticos por 100 anteras, também foi influenciado pelo genótipo, tendo aumentado no intervalo entre as concentrações de 0,05 e 0,45  $\mu\text{M}$  de TDZ, com queda para a concentração de 4,5  $\mu\text{M}$ . Isto aconteceu para todos os híbridos, sendo os mais responsivos PIX22C#31 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda, com 207,7 e 235,6 embriões por 100 anteras (Figura 9).

Verificou-se que a indução das anteras foi maior conforme o aumento dos níveis de TDZ no meio MS, principalmente com metade de sua concentração de sais (Figura 10). Provavelmente o TDZ contido no meio MS, visando a regeneração, continuou a estimular a indução de embriões.

Já a transferência das anteras para o meio de cultura MS com concentrações crescentes de TDZ, mostrou um aumento na indução de calos embriogênicos até a concentração de 0,45  $\mu\text{M}$  e a partir desta ocorreu queda (Figura 11). O mesmo ocorreu para o número de embriões por 100 anteras, na concentração de 50% de sais do meio MS, no entanto no meio MS completo, houve um pequeno aumento de 136,2 para 140,6 entre as concentrações de 0,45 e 4,5  $\mu\text{M}$  (Figura 12). A composição de 50% de sais do MS, foi mais favorável em todos os genótipos para o número de embriões por 100 anteras (Tabela 8).

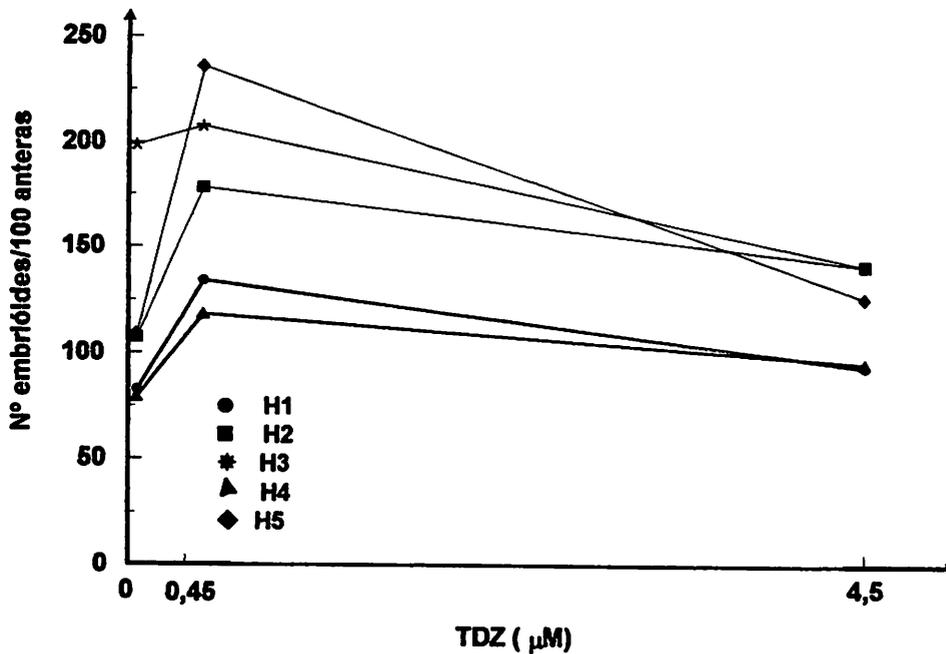


FIGURA 9. Efeito de concentrações de TDZ sobre o número de embriões por 100 anteras dos 5 híbridos avaliados, independente da concentração de sais do meio MS. PIX21C12#35 x Agrônômico 8,(H01); PIX21C04#04 x 004 (H02); PIX22C#31 x linha 004 (H03); PIX21C15#45 x Ikeda (H04) e PIX22C#21 x Ikeda (H05).

Na tabela 9, verifica-se que o meio MS combinado com o TDZ, de maneira geral, aumentou a percentagem de indução das anteras, quando comparado com anteras provenientes do mesmo meio de indução (meio C + 4,5 µM de TDZ por 8 dias à 35°C) e transferidas para o meio R adicionado de 0,5 µM de cinetina, do experimento anterior. O aumento médio foi de 23,2% (meio R adicionado de 0,5 µM de cinetina) para 26,2% (meio MS), tendo sido muito mais pronunciado no meio meio MS 50% de sais. (32.1%). Comportamento semelhante ocorreu para o número de embriões por 100 anteras.

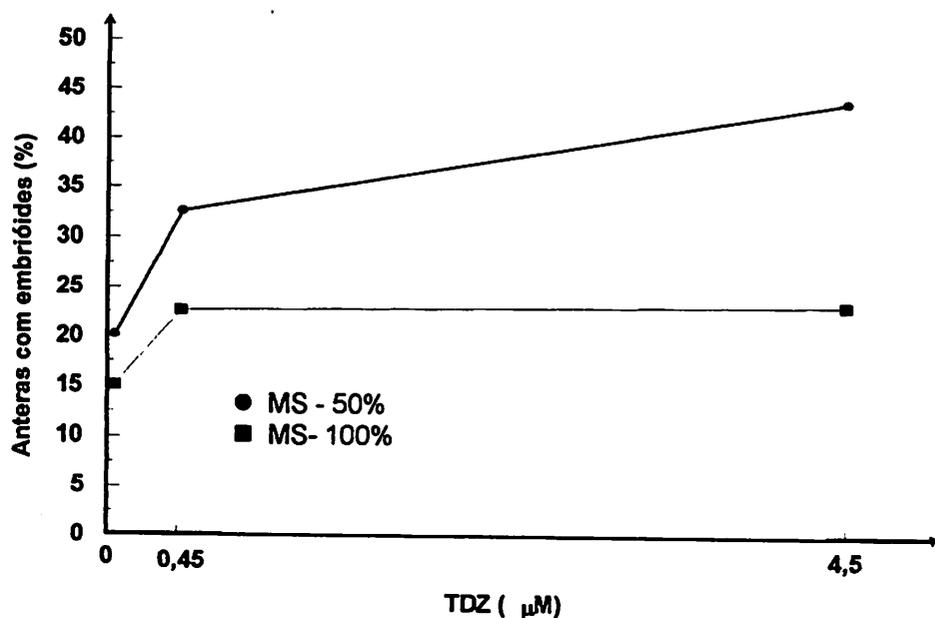


FIGURA 10. Efeito de concentrações de TDZ sobre a porcentagem de anteras com embriões em meio MS com 50% e 100% de sais, considerando dados dos genótipos em conjunto.

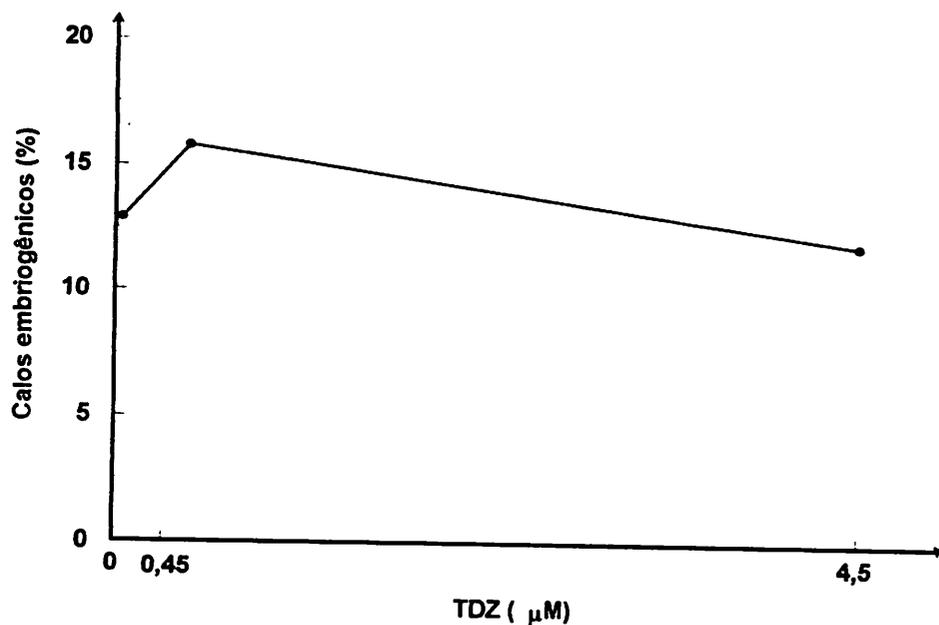


FIGURA 11. Efeito de concentrações de TDZ sobre a porcentagem de calos embriogênicos, considerando dados em conjunto dos genótipos e da concentração de sais do meio MS.

TABELA 8. Influência da concentração de sais do meio MS e do genótipo sobre o número de embriões por 100 anteras inoculadas.<sup>1</sup>

PIX21C12#35 x Agrônômico 8,(H01); PIX21C04#04 x 004 (H02); PIX22C#31 x linha 004 (H03); PIX21C15#45 x Ikeda (H04) e PIX22C#21 x Ikeda (H05).

Concentração sais do meio MS	GENÓTIPOS - HÍBRIDOS				
	H01	H02	H03	H04	H05
50% MS	131,7 b	197,6 a	198,9 a	114,9 b	208,5 a
100% MS	76,1 c	146,0 a	163,9 a	80,3 c	104,4 b

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

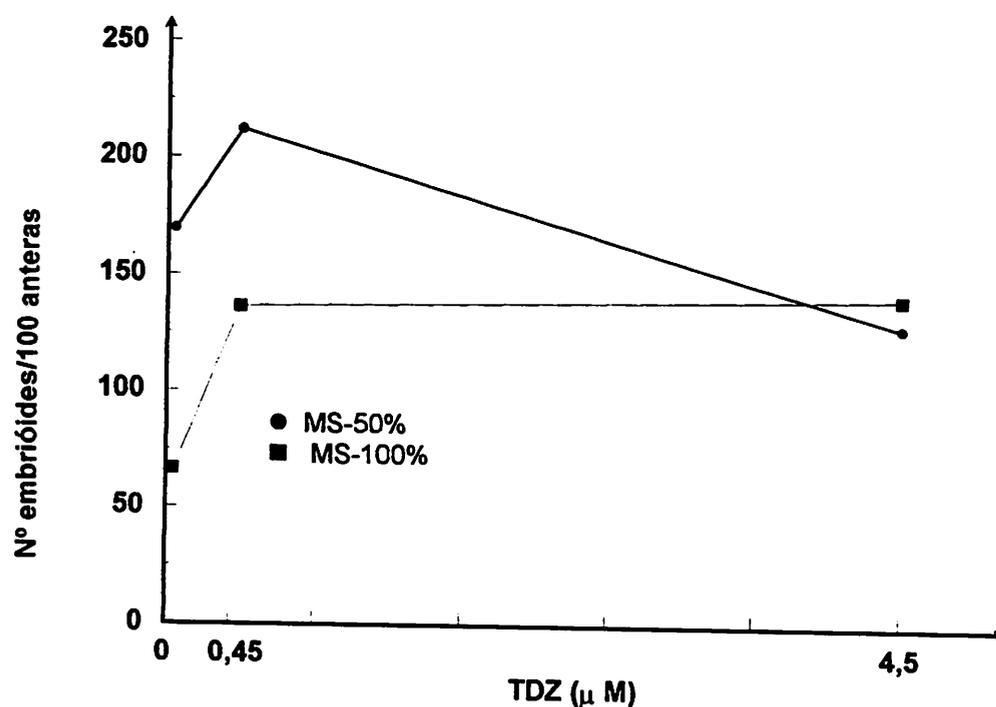


FIGURA 12. Efeito de concentrações de TDZ sobre o número de embriões por 100 anteras em meio MS com 50% e 100% de sais, considerando dados dos genótipos em conjunto.

TABELA 9. Influência da combinação de TDZ com a concentração de sais do meio MS e do meio R nas porcentagens de anteras com embrióides (%AE) e calos embriogênicos (%Calos), e número de embrióides por 100 anteras (EMB/100A).

Meios de regeneração	TDZ $\mu\text{M}$	% A E	EMB/100A	% Calos
MS - 50% Sais	0,05	20,2	169,4	16,4
	0,45	32,6	211,9	19,1
	4,54	43,6	128,0	11,6
MS - 100% Sais	0,05	15,1	66,4	10,9
	0,45	22,7	136,2	13,9
	4,54	23,1	140,6	9,4
Médias MS 50%		32,1	169,8	15,7
Médias MS 100%		20,3	114,4	11,4
Médias gerais do Meio MS		26,2	142,1	13,5
Meio R + 0,5 $\mu\text{M}$ de cinetina		23,2	169,1	13,1

Os calos embriogênicos não regeneraram, mas apenas se proliferaram quando transferidos para o meio R com 9,3  $\mu\text{M}$  de cinetina (Figura 13), e ao longo de 60 dias foram-se degenerando. Segundo Auboiron, Carron e Michaux-Ferrière (1990), a degenerescência pode estar relacionado com a liberação de etileno devido a intensa atividade mitótica e intensa respiração que com o processo de degeneração acentua-se mais ainda. Pode ter ocorrido também a exaustão do meio de cultura ou ainda, toxidez do meio devido a evaporação de água, concentrando o meio. Observou-se também que

em média 13,1% dos calos embriogênicos já estavam necrosados a partir de 30 dias pós-inoculação das anteras.

Até o momento, os trabalhos com cultura de anteras de pimentão não tinham relatado a emissão de calos embriogênicos com a utilização do TDZ, sendo que a androgênese ocorria diretamente, o que é mais desejável, pois de acordo com Grattapaglia e Machado (1990), a fase de calos pode favorecer o aparecimento de anormalidades genéticas.

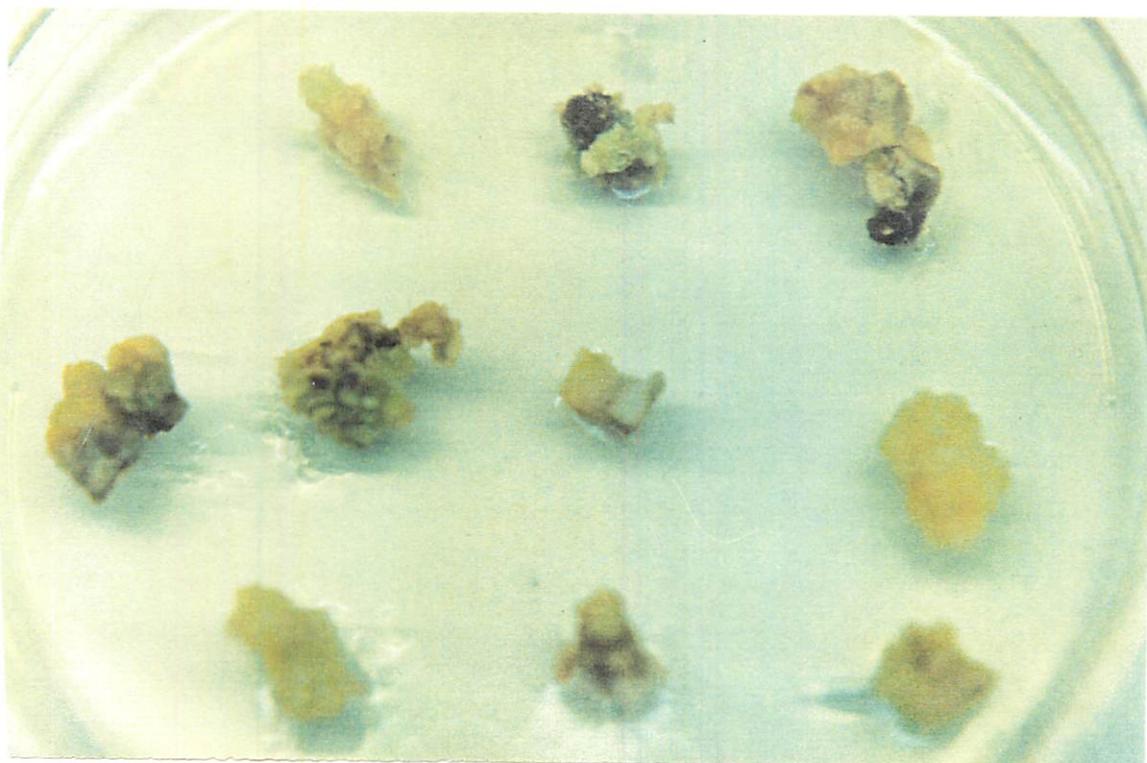


FIGURA 13. Calos embriogênicos com 20 dias de subcultivo em meio R + 9,3  $\mu$ M de cinetina.

## 4.5 CONCLUSÕES

A concentração de 4,5  $\mu\text{M}$  de TDZ, no tempo de 8 dias à 35°C, foi a que melhor induziu a formação e o número de embriões em anteras, sendo 23,2 e 169,1%, respectivamente, bem como a formação de calos embriogênicos (13,1%).

Não houve a maturação dos embriões no meio R, e conseqüentemente não houve a regeneração de plântulas.

O meio MS com TDZ proporcionou maior percentagem de anteras com embriões, mas foi pouco eficiente na maturação de embriões, ocorrendo apenas duas regenerações em plântulas do genótipo PIX22C#31 x 004, sendo uma no meio MS com 50% dos sais acrescido de 0,45  $\mu\text{M}$  de TDZ e outra no meio MS completo com 4,5  $\mu\text{M}$  de TDZ.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUBOIRON, E.; CARRON, M. P.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.21, p.31-37, 1990.
- BAJAJ, Y.P.S. In vitro production of haploids. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds). **Handbook of plant cell culture; Techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.228-287.
- BARLOY, D.; BECKERT, M. Improvement of regeneration ability of androgenetic embryos by early anther transfer in maize. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.33, p.45-50, 1993.

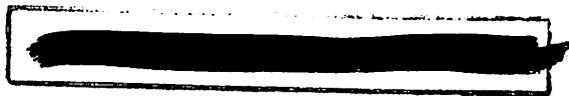
- BIDDINGTON, N. L.; ROBINSON, H. T. Ethylene production during anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var *gemmifera*) and its relationship with factors that affect embryo production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.25, p.169-177, 1991.
- BJORNSTAD, A.; SKINNES, H.; THORESEN, K. Comparisons between doubled haploid lines produced by anther culture, the *Hordeum bulbosum* - method and lines produced by single seed descent in barley crosses. **Euphytica**, Dordrecht, v.66, p.135-144, 1993. \* *copiar*
- CALLEBERG, E.K.; JOHANSSON, L.B. The effect of starch and incubation temperature on anther culture of potato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.32, p.27-34, 1993.
- CAPELLE, S.C.; MOK, D.W.S.; KIRCHNER, S.C.; MOK, M.C. Effects of Thidiazuron on Cytokinin Autonomy and the Metabolism of  $N^6$ -( $\Delta^2$ -Isopentenyl)[8- $^{14}$ C]Adenosine in Callus Tissues of *Phaseolus lunatus* L.<sup>1</sup> **Plant Physiology**, Maryland, v.73, p.796-802, 1983.
- CARVALHO, S. **Androgenese em arroz (*Oryza sativa* L.): indução de calos e regeneração de plantas**. Piracicaba: ESALQ-USP, 1989. 77p. (Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas).
- CHING, C.C. Anther culture of rice and its significance in distant hybridization. In: **Rice Tissue Culture Planning Conference**. Los Banos, 1980. Proceeding. Los Banos, int. Rice Res. Institute, 1982. p.47-54.
- DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D.; SIBI, M. Stimulation of *in vitro* androgenesis in Pepper (*Capsicum annuum* L.) by elevated temperature treatments. C.R.N.S.F. - C.N.R.A. **Meeting**, Orsay, Juillet 1980, Dr. Earle (Ed.), (Souspresse).
- DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D.; POCHARD, E. Culture *in vitro* d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents géotypes par des traitements à + 35°C. **Agronomie**, Versalhes, v.1, n.10, p.859-864, 1981.
- GEORGE, L.; NARAYANASWAMY, S.; Haploid *Capsicum* through Experimental Androgenesis. **Protoplasma**, New York, v. 78, p.467-470, 1973.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Abctp/Embrapa/CNPH, 1990. p.99-170.
- 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**, Manila, V.10, n.3, p.21-22, 1985.

- INNECCO, R. **Propagação vegetativa de pimentão (*Capsicum annuum* L.) através de métodos *in vitro* e estacas.** Lavras: UFLA, 1993. 105p. (Dissertação de Mestrado em Fitotecnia).
- KRISTIANSEN, K.; ANDERSEN, S. B. Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, Wageningen, n.67, p.105-109, 1993.
- LU, C., Y. The use of Thidiazuron in tissue culture. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, local, v.29, p.92-96, Apr. 1993.
- MARTINEZ, C.P.; PULVER, E.; NUNEZ, V.M. Uso del cultivo de tejidos en el mejoramiento del arroz. In: **Evaluacion cooperativa del germoplasma de arroz en América Latina.** Cali: CIAT, 1989. p.105-25.
- MORAES FERNANDES, M.I.B. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: Abctp/Embrapa/CNPH, 1990. p.311-332.
- MORO, J.R. Biotecnologia e melhoramentos genético de milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (eds). **Melhoramento e produção do milho.** Campinas, FUNDAÇÃO CARGILL, 1987. v.2, p.343-72.
- MOK, M. C.; MOK, D. W. S.; ARMSTRONG, D. J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMOTO, T. Cytokinin activity of *N*-phenyl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). *Phytochemistry*, Great Britain, v.21, n.7, p.1509-1511, 1982.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S. The metabolism of [<sup>14</sup>C]-thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.65, p.427-432, 1985.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and Biochemical Effects of Cytokinin-active Phenylurea Derivatives in Tissue Culture Systems. *HortScience*, Alexandria, v.22, n.6, p.1194-1197, 1987.
- NERVO, G.; CARANNANTE, G.; AZZIMONTI, M.T.; ROTINO, G.L. Use of anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlets production. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 1994. Firenze. *Anais...* Firenze: Iapctc, 1994. v.8, p.92.
- OCKENDON, D.J.; McCLENAGHAN, R. Effect of silver nitrate and 2,4-D on anther culture of brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemnifera*). *Plant Cell tissue and Organ culture*, Dordrecht, v.32, p.41-46, 1993.
- PEIXOTO, J. R. **Melhoramento do pimentão (*Capsicum annuum* L.) visando resistência aos nematóides do gênero *Meloidogyne* spp.** Lavras: ESAL, 1995. 103p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).

- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plant.** The Netherland M.N. Publishers, 1987. 344p.
- SCOTT, P.; LYNE, R.L. The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. **Plant Cell, Tissue and Organ culture**, Dordrecht, v.36, p.129-133, 1994.
- SHAHJAHAN, A.K.M.; KARIN, N.H.; MIAH, S.A. Culture conditions and callus-forming ability of rice anthers. **International Rice Research Newsletter**, Manila, v.10, n.3, p.22, 1985.
- SIBI, M.; DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D. Obtention de plantes haploides par androgenèse *in vitro* chez le Piment (*Capsicum annuum* L.). **Annales de l'Amélioration des Plantes**, Paris, v.29, n.5, p.583-606, 1979.
- SILVA, A.T.; FREIRE, A.B.; FREIRE, M.S.; MENDANHA, A.B.L. Interação de auxinas x genótipos - híbridos F1 de arroz (*Oryza sativa* L.). Renegeração de plântulas verdes e albinas. In: Congresso da Pós-Graduação na ESAL, **Anais...** Lavras, ESAL, 1993. p.105-106.
- THOMAS, J. C.; KATTERMAN, F. R. Cytokinin Activity Induced by Thidiazuron. **Plant Physiology**, Maryland, v.81, p.681-683, 1986.
- TIAINEN, T. The influence of culture conditions on anther culture response of commercial varieties of *Solanum tuberosum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p.211-219, 1992.
- TIAINEN, T. The influence of hormones on anther culture response of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Science**, Berkeley, v.88, p.83-90, 1993.
- VAGERA, J. Pepper (*Capsicum* spp.): In vitro Induction of Haploids. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. v.2, p.374-392.
- VISSER, C.; QURESHI, J. A.; RAVINDER, G.; SAXENA, P. K. Morphoregulatory role of thidiazuron. **Plant Physiology**, Maryland, v.99, p.1704-1707, 1992.
- WOLYN, D.J.; FENG, X. Genotype temperature, and sampling date affect embryogenesis in asparagus anther culture. **Hort Science**, Alexandria, v.28, n.3, p.316-317, 1993.
- YANG, O.; CHAUVIN, J. E.; HERVE, Y. A study of factors affecting anther culture of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.28. p.229-296, 1992.

ZHOU, H.; BALL, S.T.; KONZAK, C.F. Functional properties of ficoll and their influence on anther culture responses of wheat. **Plant Cell, tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p.77-83, 1992.

ZHOU, J.; MA, H.; GUO, F.; LUO, X. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica* . **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.36, p.73-79, 1994.



## **5 INFLUÊNCIA DO NITRATO DE PRATA, CARVÃO ATIVADO, ÁCIDO SALICÍLICO E DO ETILENO NA INDUÇÃO DE EMBRIÓIDES EM ANTERAS DE PIMENTÃO**

### **RESUMO**

Avaliou-se os efeitos do  $\text{AgNO}_3$  e do carvão ativado na indução e regeneração de embriões adventícios em anteras de pimentão, genótipos  $F_1$  (PIX21C12#35 x Agronômico 08), (PIX21C04#4 x Linha 004), (PIX22C#31 x Linha 004), (PIX21C15#45 x Ikeda) e (PIX22C#21 x Ikeda). As anteras foram inoculadas em meio C (Sibi, Duma de Vaulx e Chambonnet, 1979), suplementado com, em  $\mu\text{M}$ , 0,05 de cinetina + 0,05 de 2,4-D e adicionado ou não de 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$  ou 0,05% de carvão ativado. Logo após as placas foram colocadas em câmara de crescimento com temperatura de 35° C, no escuro por 8 dias, e após este período, em sala de crescimento à 26° C com 16 h de luz, até o 12° dia após a inoculação. Ao final dos 12 dias, as anteras foram transferidas para o meio R (Sibi, Duma de Vaulx e Chambonnet, 1979), suplementado com 0,5 mg/L de cinetina e adicionado ou não de carvão ativado. O  $\text{AgNO}_3$  à 5 mg/L no meio C, favoreceu a indução das anteras, com relação ao número de embriões por 100 anteras. O carvão ativado no meio C prejudicou a indução de embriões e quando no meio R, não promoveu qualquer regeneração de plântulas, permanecendo os embriões nos estádios globular e torpedo. Os genótipos mais responsivos foram

PIX22C#31 x linha 004, PIX21C04#4 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda. O pior genótipo foi PIX21C15#45 x Ikeda.

Num outro experimento avaliou-se o efeito do ácido acetilsalicílico (AAS), sendo as anteras inoculadas no mesmo meio C, como no experimento anterior, adicionado de AAS nas concentrações de 0,0, 44,4, 88,8, 177,6 e 355,2  $\mu\text{M}$ . Após a inoculação as placas foram colocadas nas condições do experimento anterior. O AAS promoveu maior indução de anteras e maior número de embriões, principalmente à 88,8  $\mu\text{M}$ . Os genótipos de melhores respostas foram PIX22C#31 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda. Concentrações mais altas de AAS promoveram maiores porcentagens de anteras necrosadas e não houve regeneração em plântulas.

Por fim verificou-se o efeito do Ethephon em combinação de TDZ,  $\text{AgNO}_3$  e AAS, sendo as anteras inoculadas em meio C adicionado de 4,5  $\mu\text{M}$  de TDZ ou meio C acrescido de 0,05  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 0,05  $\mu\text{M}$  de cinetina e 88,8  $\mu\text{M}$  de AAS ou 5,0 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ . Após a inoculação foram colocadas em recipiente com ETHREL<sup>®</sup> por diferentes períodos, sendo 0, 2, 4, 6 ou 8 dias a 35°C por 8 dias no escuro. O tempo de 4 dias foi o mais favorável à indução e as maiores induções de anteras ocorreram nos meios com TDZ e  $\text{AgNO}_3$ . O TDZ também promoveu maior indução de calos embriogênicos. As maiores taxas de necrose ocorreram no meio com AAS. Só ocorreu regeneração em plântulas no meio C adicionado de 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ , sendo o melhor tempo de 8 dias. Os genótipos mais responsivos foram PIX22C#31 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda.

Verificou-se ainda, o número de cromossomos das plântulas através da análise de ponta de raízes, sendo que das plântulas analisadas houve a constatação de plântulas haplóides e diplóides. Foi feita uma verificação histológica da indução e

desenvolvimento dos embriões. Com 8 dias de inoculação a antera não apresentava setor embriogênico definido, no entanto aos 12 dias de inoculação verificou-se tais setores e a partir de 19 dias as anteras apresentaram a formação de elementos traqueais indicando a diferenciação celular para posterior formação de xilema.

## 5.1 REFERENCIAL TEÓRICO

O etileno é um gás simples com 2 átomos de carbono, ligados entre si por uma dupla ligação ( $C_2H_4$ ). As primeiras evidências deste gás como regulador de crescimento se deram na Alemanha, devido ao vazamento de gás de iluminação, o qual promovia a abscisão de folhas. A partir de 1960, com o advento da cromatografia gasosa e a fabricação do ETHREL<sup>®</sup> (Ethepon = ácido 2-cloro etilfosfônico - 240g/L), as pesquisas com este gás avançaram. O Ethepon é estável em solução aquosa com pH abaixo de 4, do contrário, este ácido é quebrado liberando etileno. O pH do citoplasma das células geralmente é maior que 4, o que viabiliza a aplicação do ETHREL<sup>®</sup> como fonte de etileno (Wilde, 1971).

Em via de regra o etileno é produzido em todas as células das plantas superiores, sendo que altas taxas ocorrem em regiões meristemáticas de raízes, caules, folhas, flores e frutos. Menores taxas são observadas nas regiões internodais e altas taxas ocorrem em gemas dormentes. Durante a expansão das folhas e flores ocorre diminuição do etileno nestes órgãos. Na abscisão de folhas e flores aumenta a concentração deste gás, indicando novamente o seu envolvimento na regulação da queda destes órgãos. Também aumenta no desenvolvimento do fruto. O transporte do

etileno ocorre por difusão pelos espaços intercelulares, tanto em tecidos novos como mortos.

O precursor chave do etileno nas plantas superiores é a L-metionina, que se converte a S-adenosilmetionina (SAM). A molécula do SAM é quebrada em 2 metades, pela ação da ACC sintase, sendo uma parte reciclada, regenerando a L-metionina e a outra parte convertida a Ácido 1-aminociclopropanocarboxílico (ACC), e este em condições aérobicas forma o etileno,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4$  e Ácido fórmico, sendo então a síntese de etileno limitada pelo suprimento do ACC (Chitarra e Chitarra, 1990 e Yu, Adams e Yang, 1979).

Já foi demonstrado que a produção e ação do etileno é dependente de  $\text{O}_2$ , já que este tem de estar ligado ou reagindo em local próximo, na mesma célula (Chitarra e Chitarra, 1990). Mas outros fatores influenciam, sendo que em temperaturas altas ( $\pm 30^\circ\text{C}$ ), de maneira geral, ocorre aumento na taxa de etileno. O  $\text{CO}_2$  tem um efeito relativo em relação a produção de etileno, dependendo da espécie, mas de maneira geral funciona como um inibidor, pois compete pelo mesmo sítio de ligação por ser um análogo estrutural. A ação inibitória pode ser também por "feedback", uma vez que o  $\text{C}_2\text{H}_4$  é rapidamente oxidado à  $\text{CO}_2$  nos tecidos.

A luz inibe a produção de etileno, já qualquer tipo de injúria, leva ao aumento. Com relação aos reguladores de crescimento, as auxinas promovem a produção de  $\text{C}_2\text{H}_4$  antes mesmo de seus efeitos aparecerem; baixas taxas de etileno diminuem a ação das auxinas e altas taxas tornam a auxina sem efeito. Esta relação pode ocorrer em função do  $\text{CO}_2$ , que sendo um inibidor do etileno, reverteria a auxina e esta conseqüentemente não produziria este gás. As giberelinas diminuem a produção e as citocininas aumentam, mas com menor efeito quando comparado com as auxinas. O

Thidiazuron, segundo Mok e Mok (1985), pode levar à produção de etileno e o fechamento dos estômatos o que é característico de ação citocinínica.

Os efeitos fisiológicos do etileno nas plantas são bastante importantes e de aplicação comercial, no que diz respeito ao uso do ethephon na promoção ou inibição do florescimento, ou na reverção do sexo; na indução, amadurecimento e abscisão de frutos; na quebra de dormência de gemas e sementes; na produção de latex em seringueira e ainda, no aumento de resistência à doenças e distúrbios fisiológicos de armazenamento em baixas temperaturas (Wilde, 1971).

Com o contínuo aumento dos estudos com o cultivo *in vitro* de vegetais, recentemente uma das linhas que está sendo explorada é a composição e a influência de gases nos recipientes de cultivo, bem como a adição de componentes ao meio de cultura que influenciam na formação e ação destes gases, que por sua vez irão afetar diretamente a resposta do explante, principalmente no que diz respeito à embriogênese.

Segundo Auboiron, Carron e Michaux-Ferrière (1990), trabalhos mostram que os gases produzidos pelos tecidos podem ter diferentes influências conforme a espécie, sendo que por exemplo em *Daucus carota* L. e *Phoenix dactylifera* L. , CO<sub>2</sub>, etileno, acetaldeído e etanol produzidos durante a formação de calos, foram prejudiciais ao processo de embriogênese, no entanto a acumulação de etileno e CO<sub>2</sub> promoveram a morfogênese em cotilédones de *Pinus radiata* D. Don.

Estes mesmos autores trabalhando com seringueira verificaram que considerável liberação de etileno e CO<sub>2</sub> ocorre durante o desenvolvimento do calos devido a intensa atividade mitótica o que correlaciona-se com intensa respiração, principalmente nos primeiros 20 dias de cultivo; a partir de 30 dias os calos entram em degeneração, o que é acompanhado por mais liberação de etileno. Constataram ainda,

que o cultivo não lacrando os frascos, permitindo então a liberação dos gases formados, foi mais favorável à indução de embriões somáticos, mas causou estresse no material devido a desidratação do meio; o melhor resultado ocorreu com a adição ao meio do AOA (ácido aminooxiacético), inibidor da síntese de etileno, mas o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), inibidor da ação do etileno, pois age diretamente no sítios receptores deste gás, foi o mais efetivo na obtenção de embriões somáticos em seringueira.

Nissen (1994) verificou o estímulo do  $\text{C}_2\text{H}_4$  na embriogênese em suspensão de células de cenoura, bem como o efeito de moduladores da biossíntese e ação do etileno e constatou que baixas concentrações de ACC ( $10\mu\text{M}$ ), do etileno ( $0,1\mu\text{l l}^{-1}$ ) e do ethephon ( $10^{-7}$  M) estimulam a embriogênese, mas altas concentrações são prejudiciais. As causas da inibição ou estímulo do ACC ainda não foram determinadas. Constatou também que o  $\text{AgNO}_3$  em baixas concentrações inibiu a embriogênese e ainda elevou a produção de etileno, já o AOA e o AVG (aminoetoxivinilglicina), comumente usados como inibidores da ACC sintase, também influenciaram negativamente na produção de embriões, mas levaram à diminuição do etileno, no entanto o autor afirma que não há ligação entre estes efeitos. Em baixíssimas concentrações ( $10^{-8}$  a  $10^{-10}$  M) de AVG ocorreu estímulo na produção de embriões, mas não há relação com seu efeito na produção de etileno. O ácido salicílico (AS) e  $\text{CoCl}_2$ , inibidores da ACC-oxidase, inibiram a embriogênese mas o autor afirma que este fato também não está ligado ao efeito inibidor na produção de etileno, e ainda, o AS em baixas concentrações, mais estimula do que inibe a produção de etileno.

Segundo Leslie e Romani (1986) o AS, bem como o AAS (ácido acetilsalicílico), têm demonstrado ter uma influência no florescimento, na formação de brotos, iniciação de raízes adventícias e na própria reprodução de várias espécies. Mais

recentemente, estudos buscam compreender o papel destes ácidos na biossíntese de etileno. Os autores acima verificaram que AS e AAS adicionados ao meio MS junto com ACC,  $\text{CuCl}_2$  ou AIA, levaram a um decréscimo na produção de etileno em suspensão de células de pêra, tendo ambos uma mesma curva de inibição, nas concentrações de  $10^{-6}$  a  $10^{-4}\text{M}$ . A inibição observada neste estudo ocorreu em função do bloqueio da enzima formadora de etileno, independente do estimulador presente (ACC,  $\text{CuCl}_2$  ou AIA). Segundo os autores, esta ação do AS parece ser devido a presença de um derivado acetoxi neste ácido e com relação ao AAS, este quebra-se rapidamente em AS, quando em solução aquosa.

Segundo Herman (1991), tanto o AS quanto o AAS em forma de aspirina, estimularam a embriogênese em suspensão de células de cenoura, numa faixa de concentração de 10 à  $100\mu\text{M}$ , e não causaram qualquer prejuízo no crescimento e sobrevivência das células, bem como não afetaram o pH do meio. Os autores citam que houve uma direta relação entre a concentração de aspirina ou AS no meio de cultura e o estímulo da embriogênese com a inibição do etileno.

Trabalhando com calos de arroz, Adkins et al. (1993), constataram que o etileno restringiu o crescimento dos calos, principalmente quando em alta temperatura ( $35^\circ\text{C}$ ) e na presença de luz. AVG ( $5\text{ mmol m}^{-3}$ ) e  $\text{AgNO}_3$  ( $50\text{ mmol m}^{-3}$ ) na presença de luz e a  $25^\circ\text{C}$ , promoveram o crescimento dos calos, mas o ACC ( $200\text{ mmol m}^{-3}$ ) levou a um decréscimo de 40%. Em condições de escuro, o AVG e  $\text{AgNO}_3$  foram menos efetivos e a produção de etileno também caiu. Baseado nestes dados o autor afirma que o melhor controle do etileno produzido e o aumento do oxigênio disponível pode ser um caminho para incrementar a produção de calos em arroz e até mesmo de outros cereais.

Com relação a influência do etileno em cultura de anteras, trabalhos mostraram o efeito do ETHREL<sup>®</sup> sobre as plantas doadoras, como Argarwal e Bhojwani (1993), que constataram que o produto pulverizado na concentração de 4 ml/L, promoveu 18% de androgênese contra 3,5% das plantas controle. A pulverização iniciou-se quando as primeiras flores apareceram e se deu por 3 dias, e não afetou o florescimento das plantas. Outra linha de trabalho trata do efeito do etileno e dos seus antagonistas adicionados ao meio de cultura, bem como a relação destes com outros componentes do meio, principalmente auxinas.

Evans e Batty (1994) citam que as auxinas (2,4-D, IAA, PAA) são essenciais na indução de calos, mas geralmente tem efeito negativo na embriogênese, daí serem utilizadas em baixas concentrações ou omitidas na fase de regeneração dos calos. A este fato está ligada a maior biossíntese de etileno quando na presença de auxinas e por isto tem-se o uso de antagonistas da produção do etileno na embriogênese. No entanto, afirmam que tanto compostos que inibem como os que estimulam a produção deste gás podem levar ao mesmo efeito no cultivo *in vitro*, dependendo do genótipo, sendo que genótipos que produzem muito etileno respondem aos inibidores e vice-versa. Os autores verificaram que o ACC e o Tiosulfato de prata (TSP) tiveram efeitos similares no aumento da indução de calos em anteras de *Hordeum vulgare*, mas o TSP em 1 mg/L, foi o único que promoveu a regeneração de plantas.

Em outro trabalho relacionando o etileno com uma auxina, Ockendon e McClenaghan (1993) também verificaram no cultivo "in vitro" de anteras de couve-de-bruxelas, que o mais importante foi a interação entre o genótipo e a composição do meio, mas para a maioria dos genótipos as piores respostas ocorreram com a dose

maior de 2,4-D (1,36  $\mu$ M) junto com 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ . Em função da alta interação do meio com o genótipo, os autores recomendam o uso de pelo menos dois meios, um com a presença e outro sem  $\text{AgNO}_3$ , bem como sugerem outras alterações do meio.

Em pimentão, Nervo et al. (1994) verificaram que a presença de 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ , no meio de indução C (Sibi, Dumas de Vaultx e Chambonnet, 1979) teve efeito favorável na androgênese, provavelmente devido ao fato do  $\text{AgNO}_3$  bloquear a ação inibitória do etileno endógeno dos embriões, permitindo o maior desenvolvimento dos mesmos. Por outro lado, a presença de carvão ativado (0,05%) levou a uma menor indução, mas promoveu maior conversão de embriões em plantas. Respectivamente, isto se deve, provavelmente ao fato do carvão tornar os reguladores de crescimento menos disponíveis no meio C, mas por outro lado absorve prováveis inibidores do desenvolvimento dos embriões no meio de regeneração. Vagera (1990), recomenda a presença de 1% de carvão ativado em meio N, para a indução de anteras de pimentão. Herman (1991) cita que solução aquosa de carvão ativado aplicada em anteras de *Anemone canadensis* L. promoveu a embriogênese, porém a análise por espectrofotometria não mostrou que substâncias estavam presentes na solução.

Trabalhando com anteras de couve-de-Bruxelas, Biddington e Robinson (1991) constataram em cultivares pouco responsivas à cultura de anteras, que logo nos primeiras 6 horas após a inoculação ocorre uma grande produção de etileno, o que sugere que o etileno produzido nesta fase possa ser o inibidor da embriogênese. Com o aumento da temperatura de 25°C para 35°C por 24 h ocorreu uma queda significativa da quantidade de etileno e um aumento no número de embriões, mesmo nas cultivares mais responsivas. Mas à 38°C o etileno caiu mais ainda, o que deve estar ligado à inibição enzimática na conversão do ACC em etileno. O número de embriões também

caiu nesta temperatura. Estes autores verificaram ainda que o ACC e o ethephon, mesmo a 35°C por 24 h, diminuíram a embriogênese nestas cultivares e o AVG e AgNO<sub>3</sub> a promoveram, mas estes últimos a 25°C não promoveram qualquer embriogênese; eles concluem que o tratamento a 35°C é essencial para a embriogênese, sendo a sua influência sobre outros fatores ou na ação dos compostos adicionados, ou ainda afetando diretamente a biossíntese de etileno.

O sulfato de cobre e a colchicina são outras substâncias que têm efeito em cultura de anteras. Segundo Ghaemi, Sarrafi e Alibert (1994), o sulfato de cobre a 10 mg/L incrementou a frequência de embriões em anteras de 3 entre 4 genótipos de trigo tetraplóide estudados, o mesmo ocorrendo com a adição de 2,5 e 5,0 mg/L de AgNO<sub>3</sub>. Já a colchicina acarretou o contrário, provavelmente devido a um efeito tóxico, mas para o genótipo que afetou positivamente, os autores citam que a colchicina pode ter incrementado as divisões simétricas dos micrósporos e ainda diminuído o número de plantas albinas.

Devido as interações das várias substâncias acima citadas, com a produção ou inibição do etileno, tem-se que para várias espécies estudadas em técnicas de cultura de tecidos, os resultados devem ser interpretados com cuidado e torna-se cada vez mais importante elucidar o real papel do etileno no controle da embriogênese.

## 5.2 OBJETIVOS

O primeiro experimento teve como objetivo verificar o efeito do AgNO<sub>3</sub> e do carvão ativado na indução e regeneração de embriões em anteras de diferentes genótipos de pimentão. Um segundo verificou o efeito de diferentes concentrações do Ácido acetilsalicílico (AAS) na indução de embriões em anteras de diferentes genótipos de

pimentão. Um terceiro experimento teve como objetivo avaliar a influência do etileno combinado com Thidiazuron, Nitrato de prata e Ácido salicílico, na indução e regeneração de embriões em anteras de diferentes genótipos de pimentão, e por último Verificar o nível das plântulas obtidas e acompanhar histologicamente a indução e desenvolvimento dos embriões.

### 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os genótipos utilizados foram os híbridos F<sub>1</sub> (PIX21C12#35 x Agrônômico 8), (PIX21C04#04 x Linha 004), (PIX22C#31 x Linha 004), (PIX21C15#45 x Ikeda) e (PIX22C#21 x Ikeda), os mesmos estudados nos experimentos anteriores com TDZ.

As plantas doadoras dos botões foram obtidas e mantidas em casa de vegetação com condições controladas. Os botões florais foram coletados quando o tamanho das pétalas era aproximadamente igual ao das sépalas, correspondendo à anteras contendo micrósporos uninucleados. Foram desinfestados com álcool 70% por 20 s. e hipoclorito de Na (2%) por 10 minutos e em fluxo laminar foram lavados 3 vezes em água destilada e autoclavada. As anteras foram retiradas sob luz de um microscópio estereoscópio em aumento de 40 vezes. Foram extraídas através de uma incisão em um dos lados dos botões e posteriormente removeu-se os estames com auxílio de pinças finas e bisturi, previamente autoclavados. Reuniu-se os estames numa placa de petri esterilizada e destes foram retirados os filamentos, tomando-se o cuidado de não ferir as anteras. As anteras danificadas foram descartadas.

Logo após a inoculação as placas foram colocadas na BOD com temperatura de 35° C, no escuro por 8 dias, e após este período em sala de crescimento à 26° C com 16 h de luz, até o 12° dia após a inoculação.

### **5.3.1 EFEITO DO NITRATO DE PRATA E DO CARVÃO ATIVADO**

As anteras foram inoculadas em placas de Petri contendo 25 ml do meio C com pH ajustado em 5,9 suplementado com, em  $\mu\text{M}$ , 0,05 de cinetina + 0,05 de 2,4-D e adicionado ou não de 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ , ou ainda o meio C com os mesmos reguladores, adicionado ou não de 0.05% de carvão ativado. Ao final dos 12 dias, as anteras dos três meios anteriores foram transferidas para o meio R suplementado com 0,1 mg/L de cinetina e adicionado ou não de carvão ativado, perfazendo assim um total de 6 tratamentos para cada genótipo. O delineamento utilizado foi o de DBC com 4 repetições, sendo cada placa de Petri uma parcela contendo anteras de 4 botões, totalizando de 20 a 24 anteras por placa.

A partir dos 30 dias após a inoculação, avaliou-se a percentagem de anteras com embrióides e o número de embrióides por 100 anteras. Os embrióides foram retirados das anteras e transferidos para placa de Petri contendo meio R acrescido de 9,3  $\mu\text{M}$  de cinetina, visando a maturação dos mesmos e posterior regeneração em plantas. Os dados foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade através dos testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente.

### **5.3.2 INFLUÊNCIA DO ÁCIDO SALICÍLICO (AS) NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES**

As anteras foram plaqueadas em 25 ml do meio C (pH=5,9), suplementado com, em  $\mu\text{M}$ , 0,05 de cinetina + 0,05 de 2,4-D e adicionado de AAS nas concentrações de 0,0, 44,4, 88,8, 177,6 e 355,2  $\mu\text{M}$ . O AAS foi obtido através de solução de aspirina, contendo 325 mg de AAS em 200 ml. Ao final de 12 dias as anteras foram transferidas para o meio R suplementado com 0,5  $\mu\text{M}$  de cinetina. O delineamento utilizado foi o de

DBC com 4 repetições, sendo cada placa de Petri uma parcela contendo anteras de 4 botões, totalizando de 20 a 24 anteras por placa.

Após 30 dias, avaliou-se a percentagem de anteras com embriões, o número de embriões por 100 anteras e a percentagem de anteras necrosadas. Os dados foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade, conforme o experimento anterior.

Os embriões foram retirados das anteras e transferidos para placa de Petri contendo meio R adicionado de  $9,3 \mu\text{M}$  de cinetina, visando a maturação dos mesmos e posterior regeneração em plantas.

### **5.3.3 EFEITO DO ETILENO EM COMBINAÇÃO COM TDZ, $\text{AgNO}_3$ E ÁCIDO SALICÍLICO**

As anteras foram inoculadas em placas de Petri em 25 ml do meio C, suplementado com  $4,5 \mu\text{M}$  de TDZ ou acrescido de, em  $\mu\text{M}$ , 0,05 de cinetina + 0,05 de 2,4-D e adicionado ou  $88,8 \mu\text{M}$  de AAS ou  $5,0 \text{ mg/L}$  de  $\text{AgNO}_3$ .

Após a inoculação as placas foram somente tampadas e não lacradas, e colocadas em um recipiente com volume de 2 litros e capacidade para 12 placas empilhadas. Neste mesmo recipiente foi colocado um becker contendo 10 ml de ETHREL<sup>®</sup>, com pH ajustado em 4. Logo após o recipiente foi hermeticamente fechado e colocado em BOD à  $35^\circ\text{C}$ , no escuro por diferentes períodos, sendo 0, 2, 4, 6 ou 8 dias, totalizando 15 tratamentos para cada genótipo. Após estes períodos as placas foram retiradas do recipiente, vedadas com filme plástico e recolocadas na BOD até 8 dias. Logo após foram colocadas em sala de crescimento com temperatura de  $26^\circ\text{C}$  com 16 h

de luz, onde permaneceram até o 12<sup>o</sup> dia após a inoculação. Ao final dos 12 dias, as anteras foram transferidas para o meio R suplementado com 0,5  $\mu$ M de cinetina.

O delineamento utilizado foi um split-plot com parcelas divididas no tempo de permanência com o ETHREL<sup>®</sup>, com 4 repetições, sendo cada placa de Petri uma parcela contendo anteras de 4 botões, totalizando de 20 a 24 anteras por placa. Escolheu-se este delineamento por facilitar a instalação do experimento, pois evitou-se muito manuseio das placas, bem como a abertura em demasiado da BOD, o que poderia ser prejudicial, já que o material permaneceu no escuro.

Após 30 dias, avaliou-se a percentagem de anteras com embriões, o número de embriões por 100 anteras, a percentagem de calos embriogênicos e de anteras necrosadas e o número de plantas regeneradas. Os embriões foram retirados das anteras e transferidos para placa de Petri contendo meio R adicionado de 9,3  $\mu$ M de cinetina.

As plântulas obtidas nas placas foram transferidas para tubos de ensaio (150 x 25mm) contendo 20 ml de meio R sem a presença de regulador de crescimento. As primeiras plântulas obtidas tiveram suas pontas de raízes retiradas ainda *in vitro*, sendo as plântulas reinoculadas em meio R. Das demais, as pontas de raízes foram retiradas quando no transplante na aclimação. As pontas de raízes foram utilizadas para contagem cromossômica.

Após alcançarem *in vitro*, tamanho pouco maior que 3 cm as plantas regeneradas foram aclimatadas. Numa primeira etapa, as plântulas permaneceram *in vitro* e foram colocadas em casa de vegetação com temperatura média de 27°C e sob sombrite 50%. Após 5 dias nestas condições as plantas foram retiradas dos tubos e as

raízes lavadas para retirada do meio de cultura. Logo após foram transplantadas individualmente para copos plásticos (200 ml) contendo substrato esterilizado. Cada copo foi coberto com saco plástico formando uma câmara úmida e posteriormente foram colocados sob sombrite 50%, nas mesmas condições anteriores. Assim permaneceram por 7 dias. Após este período as plântulas foram transferidas para local com sombrite a 25% de bloqueio de luz., e após uma semana os sacos foram retirados. As plantas periodicamente eram irrigadas com solução nutritiva até o transplante definitivo em vasos com solo e adubo químico.

#### **5.3.4 VERIFICAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA DAS PLÂNTULAS**

Para a contagem do número de cromossomos foi empregada a técnica de esmagamento de raízes de acordo com Guerra (1983). As pontas de raízes foram tratadas com Hidroxiquinoleína a 0,029M, fixadas em álcool etílico: ácido acético (3:1) por 4 a 24 horas e armazenadas em álcool 70% até o uso. Após três banhos de 10 minutos, as raízes foram hidrolizadas em HCl 1N por 10 minutos e coradas com Feulgen. O esmagamento das raízes foi feito em ácido acético 45% e a lamínula foi retirada em gelo seco. A montagem das lâminas foi feita em Entellan.

#### **5.3.5 CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA EMBRIOGÊNESE NAS ANTERAS.**

Para a verificação da indução e desenvolvimento dos embriões, foram feitos cortes histológicos em diferentes etapas do cultivo das anteras. Estas, inicialmente foram inoculadas em meio C adicionado de 0,05  $\mu$ M de cinetina, 0,05  $\mu$ M de 2,4-D e 5 mg/L de  $AgNO_3$ , e logo em seguida foram colocadas em BOD à 35°C, em

ausência de luz e com a presença de ETHREL<sup>®</sup>, até o 8º dia pós-inoculação. Nesta data foi retirada uma amostra para análise anatômica. As demais anteras foram para sala de crescimento com temperatura de 26°C e fotoperíodo de 16 horas de luz, onde permaneceram até o 12º dia, quando foi retirada uma segunda amostra. Logo após, as anteras restantes foram transferidas para o meio R acrescido de 0,1 mg/L de cinetina e mantidas na sala de crescimento. A partir desta data foram retiradas mais 3 amostras, sendo aos 19, 27 e 32 dias após a inoculação, totalizando 5 períodos ao longo do desenvolvimento dos embriões.

Para o preparo das lâminas, inicialmente as anteras foram fixadas em solução de Glutaraldeído e Paraformaldeído (1:1) por 4 horas em geladeira. Em seguida o material foi desidratado em bateria alcoólica crescente, de 10, 30, 50, 70, 80, 90 e 100°, com 30 minutos para cada concentração. Posteriormente procedeu-se a diafanização em xilol, em soluções compostas de álcool e xilol nas proporções de 3:1, 1:1 e 1:3, respectivamente, com 30 minutos para cada combinação. Posteriormente foi feita a impregnação com parafina, através da substituição do xilol por xilol saturado com parafina, por 4 vezes em estufa à 58°C, com intervalo de 3 horas. A cada troca, metade da solução era descartada e completada com parafina pura fundida, seguindo-se de duas substituições com parafina pura por 3 horas.

Após o emblocamento foram realizados cortes em micrótomo rotativo a uma espessura de 8 µm. Os cortes foram colocados em lâminas previamente untadas com adesivo de Hauptz. O material foi colocado em estufa a 30°C por 24 horas. A desparafinização foi feita através de duas imersões em xilol puro por 10 e 5 minutos

cada vez, seguida de imersão em álcool 100% por 5 minutos. A coloração foi feita com Safra-Blau alcoólico (Safranina e Azul de Astra, 7:3), por 30 minutos.

A montagem final das lâminas foi feita em resina sintética Entellan (Merck). As observações foram efetuadas em microscópio de campo claro, Karl Zeiss Jena.

## **5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.4.1 EFEITO DO NITRATO DE PRATA E DO CARVÃO ATIVADO**

A porcentagem de anteras com embrióides e o número de embrióides por 100 anteras foram influenciados significativamente pelos tratamentos e pelos genótipos; no entanto só houve interação genótipos x tratamentos para o número de embrióides por 100 anteras.(Tabela 10).

Analisando os dados dos genótipos em conjunto (Tabela 11), verifica-se para a porcentagem de anteras com embrióides, que os tratamentos com  $\text{AgNO}_3$  no meio C, não foram significativamente superiores, pelo teste de Tukey (5%), aos tratamentos sem este componente. Entretanto os meios contendo carvão desde o início da inoculação das anteras, foram inferiores aos tratamentos com  $\text{AgNO}_3$ . Com relação ao número de embrióides por 100 anteras, o  $\text{AgNO}_3$  no meio C foi significativamente superior aos demais tratamentos, independente da presença ou não de carvão ativado no meio R. Já a adição do carvão no meio C diminuiu significativamente para o número de embrióides por 100 anteras.

TABELA 10. Resumo das análises de variância para porcentagem de anteras com embriões e o número de embriões por 100 anteras, de diferentes genótipos inoculadas em meios contendo  $\text{AgNO}_3$  e Carvão ativado.

F.V.	G.L.	Quadrados Médios	
		Porcentagem de anteras	
		com embriões <sup>(1)</sup>	Número de embriões por 100 anteras <sup>(2)</sup>
Bloco	3	2,9921	0,5036
Tratamentos	5	258,2949**	73,3710**
Genótipo	4	187,4515**	83,3301**
Tratamentos x Genótipo	20	9,8795	9,9283**
Resíduo	87	49,6762	1,5357
C. V.		33,982	12,646

(1) Dados transformados para Arc Sen Raíz ( $X/100$ );

(2) Dados transformados para Raíz de X;

\*\* - Significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Estes resultados confirmam a maior indução de embriogênese somática em meio que contenha  $\text{AgNO}_3$ , provavelmente devido ao bloqueio que o  $\text{AgNO}_3$  exerce sobre a ação inibitória do etileno endógeno dos embriões, o que concorda com Biddington e Robinson (1991) e Nervo et al. (1994). Por outro lado o carvão teve ação prejudicial em função provavelmente da absorção dos reguladores de crescimento, mas não teve qualquer benefício na regeneração de plantas, já que independente da presença ou não deste componente no meio R, os embriões permaneceram nos

estádios globular e torpedo (Figura 14), ao contrário do que foi verificado por Nervo et al. (1994) onde o carvão ativado (0,05%) levou a uma menor indução de embriões, mas promoveu maior conversão destes em plantas por absorver prováveis inibidores do desenvolvimento dos embriões no meio R.

TABELA 11 Porcentagem de anteras com embriões(%A/E) e número de embriões por 100 anteras(NE/100A), para os 5 genótipos em conjunto <sup>1</sup>.

TRATAMENTO	%A/E	NE/100A
Meio C+AgNO <sub>3</sub> ==>Meio R	19,0a	151,5a
Meio C+AgNO <sub>3</sub> ==>Meio R+Carvão	17,0a	144,6a
Meio C=====>Meio R	11,7ab	86,6 b
Meio C=====>Meio R+Carvão	11,5ab	83,2 bc
Meio C+Carvão==>Meio R	8,9 b	6,4 cd
Meio C+Carvão==>Meio R+Carvão	8,7 b	62,2 d

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



FIGURA 14. Embriões nos estádios globular (G) e torpedo (T). Anteras inoculadas em meio C + 0,05  $\mu$ M de cinetina + 0,05  $\mu$ M de 2,4-D + 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ .

A transferência dos embriões para o meio R + 9,3  $\mu$ M de cinetina também não teve qualquer influência na regeneração de plântulas, permanecendo os embriões de todos os genótipos, nos mesmos estádios quando na transferência, até a completa necrose dos mesmos, que ocorreu ao longo de 60 dias após. Talvez isto se deva ao fato do meio de regeneração não ser adequado para o processo de maturação destes genótipos. Estes resultados contrariam Dumas De Vault, Chambonnet e Pochard (1981), que verificaram que embriões transferidos para o meio R com 9,3  $\mu$ M de cinetina tiveram alta frequência de regeneração de plantas..

Com relação aos genótipos verifica-se na figura 15 que ocorreram diferenças significativas para a porcentagem de anteras com embriões, sendo o genótipo mais responsivo o PIX22C#31 x linha 004, isto considerando dados de todos os tratamentos em conjunto.

Para o número de embriões por 100 anteras obteve-se interação dos tratamentos com os genótipos, sendo que a presença de  $\text{AgNO}_3$  no meio C, independente do carvão ativado estar presente no meio R, promoveu diferentes respostas de acordo com o genótipo; sendo o  $F_1$  (PIX22C#31 x Linha 004) foi significativamente superior que os demais, seguido de PIX21C04#4 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda. O pior genótipo foi PIX21C15#45 x Ikeda (Tabela 12). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Ockendon e McClenaghan (1993) que verificaram no cultivo *in vitro* de anteras de couve-de-bruxelas, que o mais importante foi a interação entre o genótipo e a composição do meio, e em função disto recomendam o uso de pelo menos dois meios, um com a presença e outro sem  $\text{AgNO}_3$ , bem como sugerem outras alterações do meio.

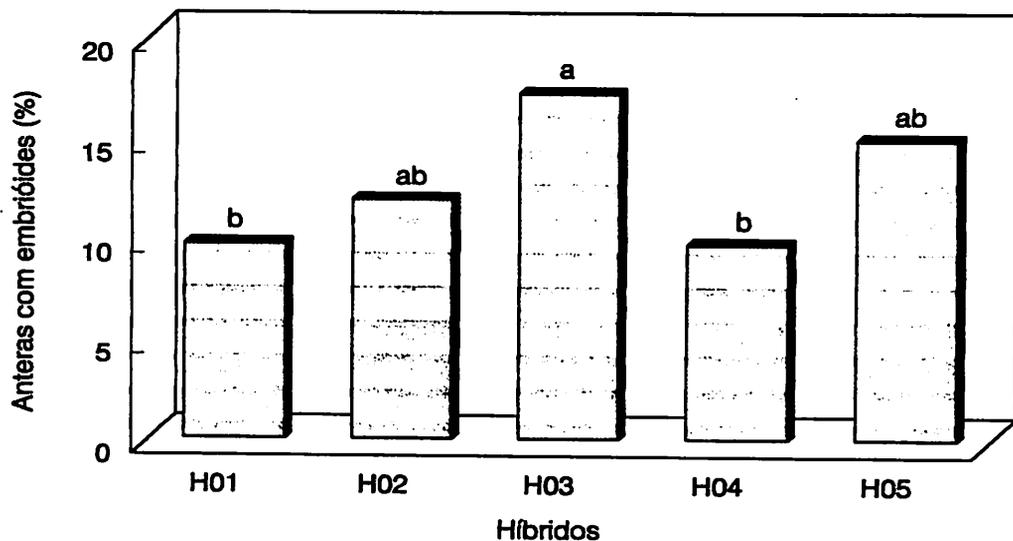


FIGURA 15. Porcentagem de anteras com embriões dos genótipos avaliados, considerando dados dos tratamentos em conjunto. PIX21C12#35 x Agrônômico 8, (H01); PIX21C04#04 x 004 (H02); PIX22C#31 x linha 004 (H03); PIX21C15#45 x Ikeda (H04) e PIX22C#21 x Ikeda (H05). Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (5%).

TABELA 12. Número de embriões por 100 anteras, inoculadas em meio C adicionado de 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$  e transferidas para meio R com ou sem carvão ativado, para os diferentes genótipos estudados <sup>1</sup>.

Genótipo	Meio C+ $\text{AgNO}_3$ =>Meio R	Meio C+ $\text{AgNO}_3$ => Meio R+Carvão
PIX22C#31 x linha 004	306,3 a	302,8 a
PIX21C04#4 x linha 004	223,2 b	190,5 b
PIX22C#21 x Ikeda	115,9 c	118,0 c
PIX21C12#35 x AG. 08	103,1 cd	94,1 cd
PIX21C15#45 x Ikeda	66,9 d	69,9 d

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para os tratamentos sem a presença de  $\text{AgNO}_3$  no meio C, independente da presença de carvão no meio R, não houve diferença significativa entre os genótipos. Os valores encontrados para número de embriões por 100 anteras nos genótipos mais responsivos, estão numa mesma faixa que o verificado por Nervo et al. (1994), para três genótipos também considerados mais responsivos.

#### 5.4.2 INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO (AAS) NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES

A porcentagem de anteras com embriões, o número de embriões por 100 anteras e a porcentagem de anteras necrosadas, foram influenciados significativamente pelas doses de AAS, bem como houve diferença significativa entre os genótipos para as

duas primeiras características, e só houve interação entre genótipos com os níveis de AAS para o número de embriões por 100 anteras. O alto valor observado do C.V. (74,3%) para porcentagem de anteras necrosadas, pode ser devido ao fato de que existiam placas com nenhuma ou poucas anteras necrosadas, enquanto outra possuía alta porcentagem, caracterizando uma grande variação em parcelas de um mesmo tratamento (Tabela 13).

Para a porcentagem de anteras com embriões, verificou-se respostas distintas entre os genótipos, considerando os dados de doses de AAS em conjunto, com destaque para os materiais PIX22C#31 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda, com 20,4 e 19,9%, respectivamente (Figura 16).

No que diz respeito ao número de embriões por 100 anteras, também ocorreram diferentes respostas para genótipos de acordo com os níveis de AAS, sendo os mais responsivos PIX22C#31 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda (Figura 17). O mesmo verificou-se para os demais materiais. O F<sub>1</sub> (PIX21C15#45 x Ikeda) foi o de piores respostas, independente dos níveis de AAS. Os genótipos PIX21C12#35 x Agrônomo 8 e PIX22C#21 x Ikeda, tiveram comportamento intermediário, e as suas melhores respostas deram-se com 88,8 µM de AAS.

TABELA 13. Resumo das análises de variância para porcentagem de anteras com embriões (%AE), número de embriões por 100 anteras (EMB/100A) e porcentagem de anteras necrosadas (AN), da combinação de concentrações do Ácido acetilsalicílico com os diferentes genótipos.

F. V.	G. L.	Quadrados Médios		
		%AE	EMB/100A <sup>(1)</sup>	%AN
AAS	4	220,4725**	20,7057**	2.651,2905**
Genótipo	4	293,6635**	41,5789**	377,4273
AAS x Genótipo	16	47,2304	2,8495*	59,1893
Blocos	3	48,3524	6,8739**	250,8419
C. V. (%)		44,4	12,2	74,3

(1) - Dados transformados para Raiz (X);

\* - Significativo ao nível de 5% pelo teste F;

\*\* - Significativo ao nível de 1% pelo teste F.

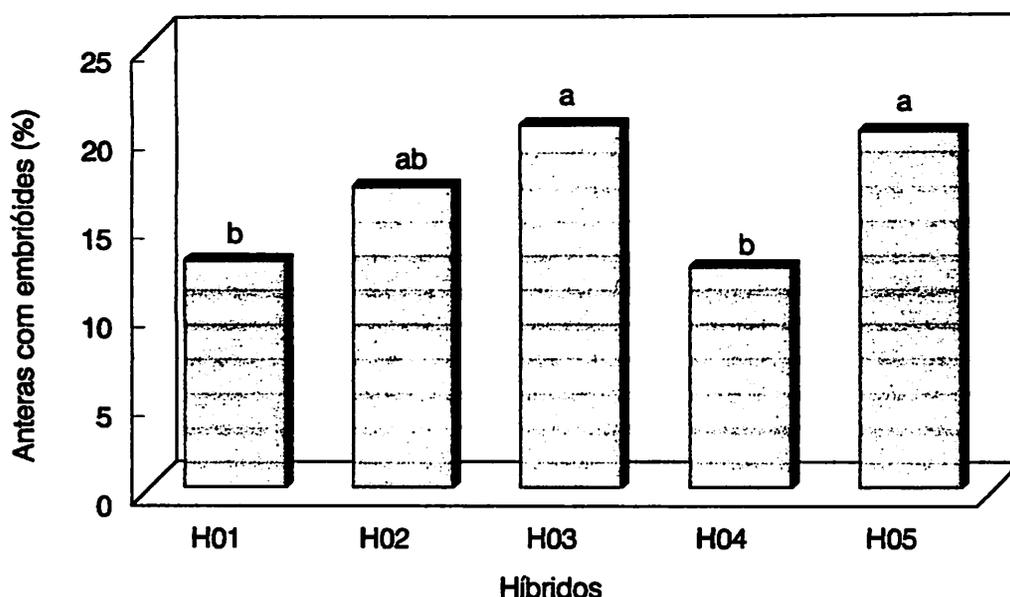


FIGURA 16. Porcentagem de anteras com embriões dos genótipos avaliados, considerando dados das concentrações de AAS em conjunto . PIX21C12#35 x Agrônômico 8,(H01); PIX21C04#04 x 004 (H02); PIX22C#31 x linha 004 (H03); PIX21C15#45 x Ikeda (H04) e PIX22C#21 x Ikeda (H05). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para porcentagem de anteras com embriões, considerando dados dos genótipos em conjunto (Figura 18), verificou-se o aumento deste parâmetro com comportamento semelhante ao número de embriões por 100 anteras, sendo então a melhor resposta na concentração de 88,9  $\mu\text{M}$  de AAS. Resultado semelhante é citado por Herman (1991) em que tanto o AS quanto o AAS em forma de aspirina, estimularam a embriogênese em suspensão de células de cenoura, numa faixa de concentração de 10 à 100  $\mu\text{M}$ , e não causaram qualquer prejuízo no crescimento e sobrevivência das células, bem como não afetaram o pH do meio. Os autores citam que houve uma direta

relação entre a concentração de aspirina ou AS no meio de cultura e o estímulo da embriogênese com a inibição do etileno

O mesmo foi observado por Leslie e Romani (1986) sendo que AS e AAS adicionados ao meio MS junto com ACC,  $\text{CuCl}_2$  ou AIA, levaram a um decréscimo na produção de etileno em suspensão de células de pêra; segundo os autores, esta ação do AS parece ser devido a presença de um derivado acetoxi deste ácido.

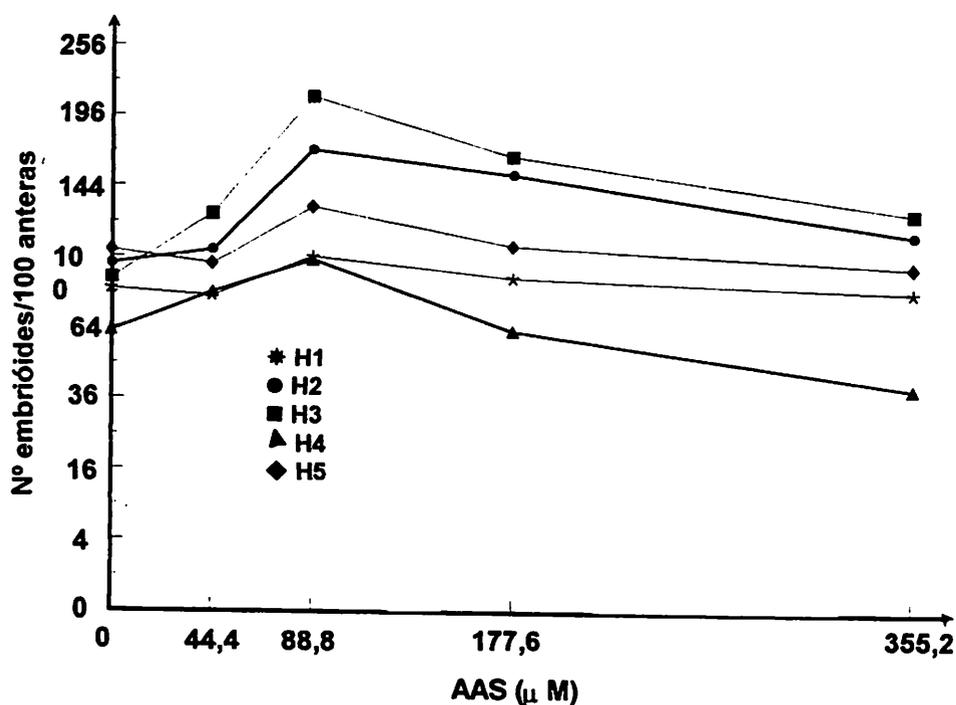


FIGURA 17. Efeito de concentrações de AAS no número de embriões por 100 anteras dos diferentes genótipos. PIX21C12#35 x Agrônômico 8,(H01); PIX21C04#04 x 004 (H02); PIX22C#31 x linha 004 (H03); PIX21C15#45 x Ikeda (H04) e PIX22C#21 x Ikeda (H05).

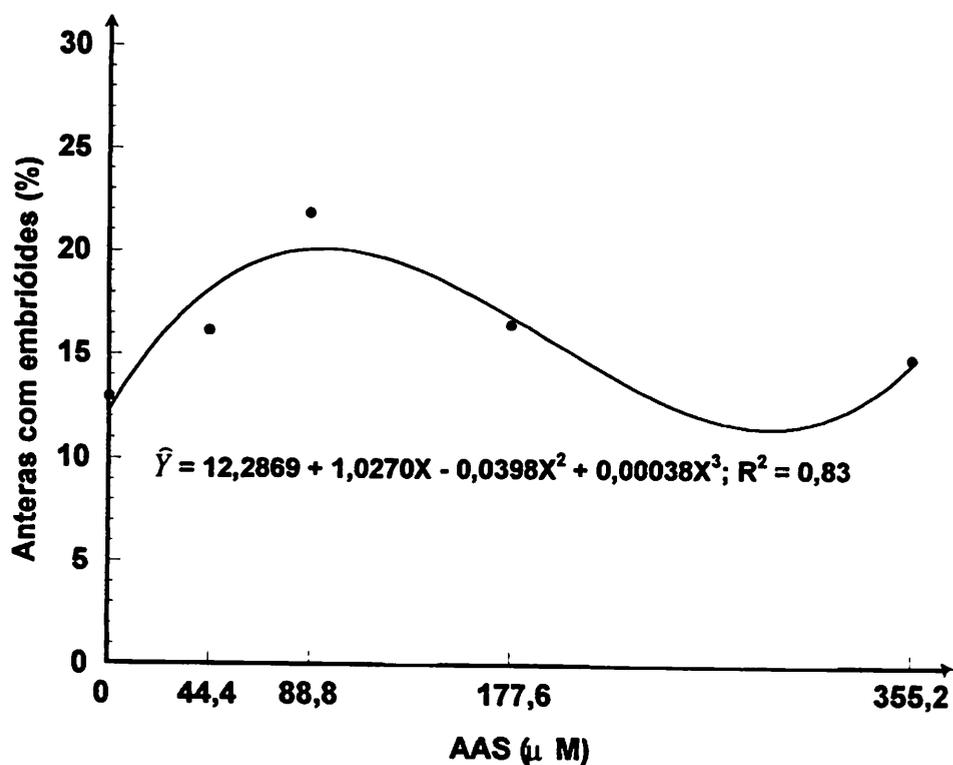


FIGURA 18. Efeito de concentrações de AAS na porcentagem de anteras com embriões, com dados dos genótipos em conjunto. .

Para o presente experimento à medida em que se aumentou o nível de AAS verificou-se um crescente aumento na porcentagem de anteras necrosadas (Figura 19). Em alguns tratamentos a necrose se deu em praticamente toda a placa (Figura 20). Isto pode ter ocorrido em função de um possível efeito tóxico do AAS.

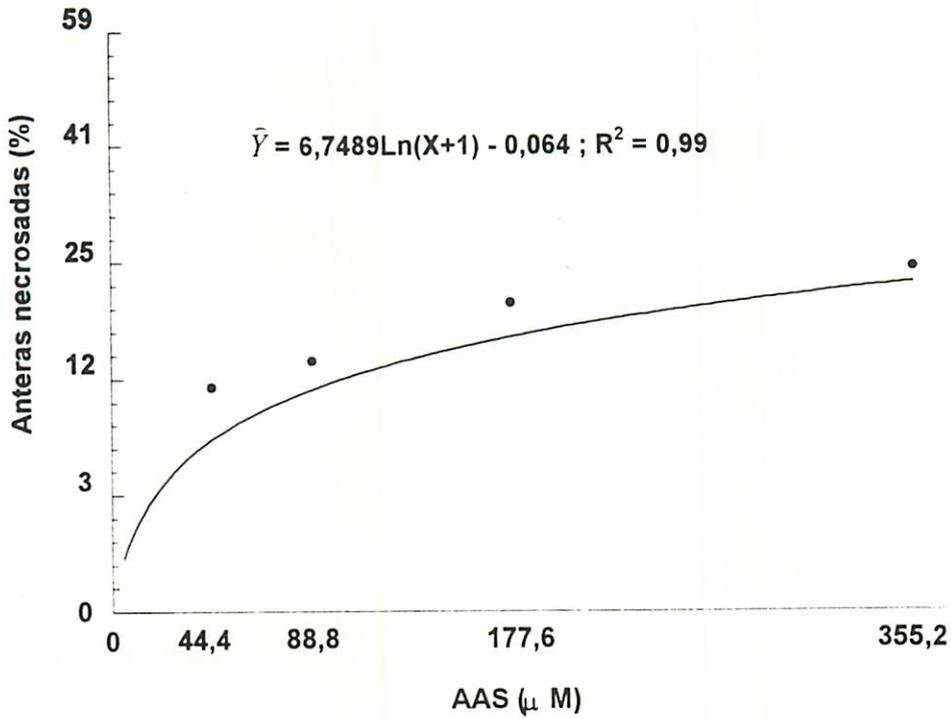


FIGURA 19. Efeito da concentração do AAS na porcentagem de anteras necrosadas, considerando dados dos genótipos em conjunto.

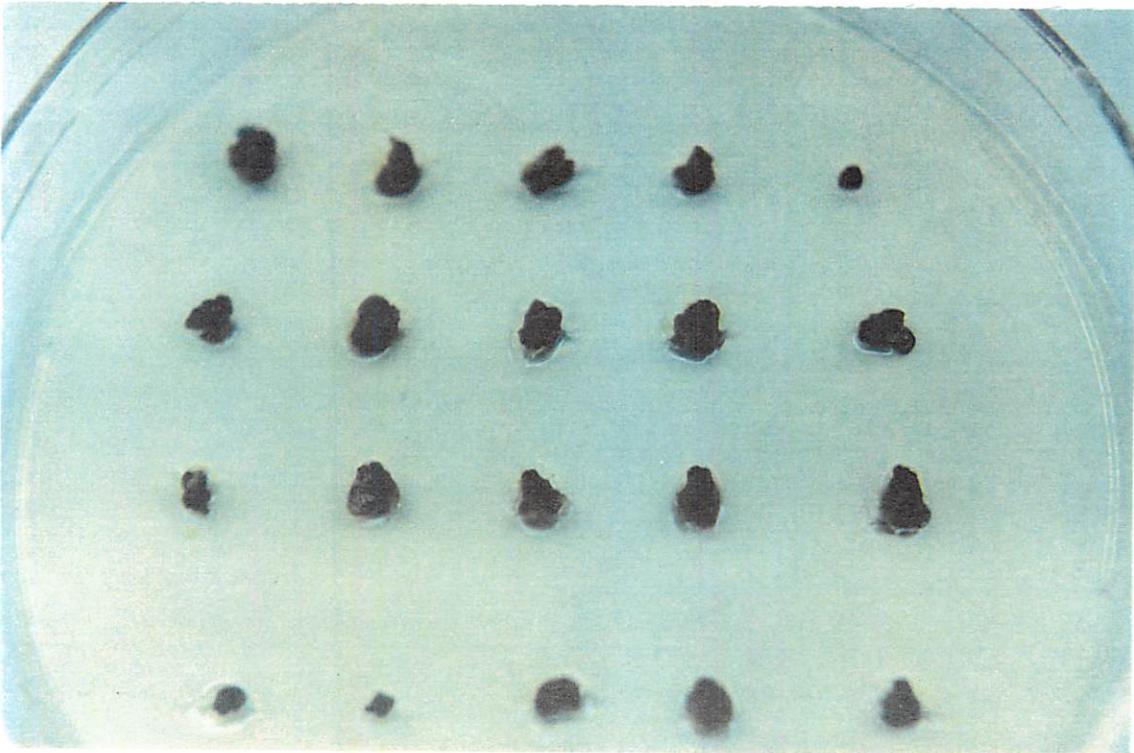


FIGURA 20. Anteras necrosadas em meio C acrescido de 355,2  $\mu\text{M}$  de AAS.

Os embriões obtidos estavam nos estádios globular e torpedo e mesmo quando transferidos para o meio R + 9,3  $\mu$ M de cinetina, não se desenvolveram, permanecendo nos mesmos estádios até a completa necrose que ocorreu ao longo de 60 dias após. Novamente, como no experimento anterior, pode-se inferir que este meio não foi adequado à maturação dos embriões. Estes resultados contrariam Dumas De Vault, Chambonnet e Pochard (1981), que verificaram para outros genótipos, que embriões transferidos para o meio R com 9,3  $\mu$ M de cinetina tiveram alta frequência de regeneração de plantas.

#### **5.4.3 EFEITO DO ETILENO EM COMBINAÇÃO COM TDZ, AgNO<sub>3</sub> E ÁCIDO SALICÍLICO**

A porcentagem de anteras com embriões e o número de embriões por 100 anteras foram influenciados significativamente pelos tratamentos com diferentes componentes (TDZ, AgNO<sub>3</sub> e AAS) e pelo tempo de permanência das anteras nestes meios junto com ETHREL<sup>®</sup>, mas só houve interação entre o tempo e o meio para a primeira característica (Tabela 14). Ao contrário dos demais experimentos, não ocorreu efeito significativo dos genótipos para estas características avaliadas, o que pode estar relacionado com a exposição dos meios ao ETHREL<sup>®</sup>, que aproximou as respostas dos diferentes genótipos. Em alguns experimentos com cultura de anteras de pimentão também não ocorreram diferenças entre genótipos, como nos trabalhos de Sibi, Dumas de Vault, Chambonnet (1979) e Dumas de Vault, Chambonnet e Sibi (1981), sendo que nestes casos a provável explicação para a não diferença entre genótipos, foi que todos estes eram altamente responsivos.

TABELA 14. Resumo das análises de variância para porcentagem de anteras com embriões (%AE), número de embriões por 100 anteras (EMB/100A), da combinação de meios com TDZ, AgNO<sub>3</sub> e AAS, com tempos de exposição ao ETHREL<sup>®</sup>, para os diferentes genótipos.

F. V.	G. L.	Quadrados Médios	
		%AE <sup>(1)</sup>	EMB/100A <sup>(2)</sup>
Meio de cultura	2	2.169,1632**	111,3476*
Genótipo	4	145,3919	4,7122
Meio de cultura x Genótipo	8	121,6891	3,4768
Resíduo (a)	45	194,0321	29,0053
Tempo/Etrel	4	940,4264**	470,4888**
Meio de cultura x Tempo/Etrel	8	295,3642*	8,8267
Genótipo x Tempo/Etrel	16	35,6333	1,5281
Meio x Gen. x Tempo/Etrel	32	39,4324	1,5807
Resíduo (b)	180	122,7023	17,3803
C.V. (a) (%)		22,9	19,7
C.V. (b) (%)		40,8	34,2

(1) - Dados transformados Arco seno da raiz (X/100)

(2) - Dados transformados para Raiz (X+0,5);

\* - Significativo ao nível de 5% pelo teste F;

\*\* - Significativo ao nível de 1% pelo teste F.

Com relação à porcentagem de anteras com embriões, na interação entre a composição do meio de cultura com o tempo em exposição ao ETHREL<sup>®</sup> (Tabela 15), verifica-se que de maneira geral o tempo de 4 dias foi o mais favorável para o meio contendo AAS, enquanto para os meios com TDZ ou AgNO<sub>3</sub>, o melhor tempo foi o de 2

dias. As maiores induções de anteras ocorreram nos meios com TDZ e  $\text{AgNO}_3$ . O AAS apresentou as menores percentagens de anteras com embriões.

O fato dos períodos de 2 e 4 dias terem sido genericamente os melhores, de certa forma concorda com o verificado por Nissen (1994), em suspensão de células de cenoura, onde altas concentrações do ethephon foram prejudiciais à embriogênese, pois considerando que no presente experimento, o recipiente estava ermeticamente fechado, quanto maior o tempo das anteras com o ETHREL<sup>®</sup>, maior é a tendência de aumentar a concentração de etileno no ambiente que continha as anteras.

TABELA 15. Porcentagem de anteras com embriões, em diferentes meios de indução combinados com tempo de permanência com ETHREL<sup>®</sup>, considerando dados dos genótipos em conjunto.<sup>1</sup>

Meios de indução	Tempo em exposição ao ETHREL <sup>®</sup> (dias)				
	0	2	4	6	8
	TDZ	23,0 Ab	38,8 Aa	30,3 Aab	22,0 Ab
$\text{AgNO}_3$	14,6 ABb	33,7 Aa	25,4 Aab	15,0 ABb	24,6 Ab
AAS	11,9 Bb	10,9 Bb	23,9 Aa	16,9 Bb	17,6 Ab

1 - As médias seguidas de mesma letra (Maiúsculas para meios e minúsculas para o tempo com ETHREL<sup>®</sup>) não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

O TDZ também promoveu novamente, como nos experimentos anteriores, uma maior indução de calos. A indução de calos foi crescente à medida em que se

aumentou a exposição das anteras em ETHREL<sup>®</sup>, indo de 13,1 a 25,1%, em 0 e 8 dias, respectivamente (Figura 21). Esta última verificação pode estar relacionada com o aumento da atividade citocinínica do TDZ pela presença do etileno, já que segundo Mok e Mok (1985), este pode levar a produção de etileno o que é característico das citocíninas, e assim o etileno estaria funcionando como um estimulador da divisão, formando os calos. Outro fato que reforça esta consideração é que também houve um aumento na porcentagem de anteras necrosadas no meio com TDZ, conforme o aumento no período de exposição ao ETHREL<sup>®</sup> (Figura 22) e consequente acúmulo de etileno, pois conforme Auboiron, Carron e Michaux Ferriere (1990) durante o desenvolvimento do calos já ocorre liberação de etileno devido à respiração e a atividade mitótica, levando a degeneração que libera mais etileno, que somado ao etileno liberado no recipiente pelo ETHREL<sup>®</sup>, teria aumentado a taxa de necrose das anteras.

As maiores taxas de necrose ocorreram no meio com AAS e também foram crescentes com o incremento do período em ETHREL<sup>®</sup>, principalmente com 6 e 8 dias (Figura 22).

FIGURA 22. Porcentagem de anteras necrosadas, em diferentes meios de indução combinados com tempo de permanência com ETHREL<sup>®</sup>, considerando dados dos genótipos em conjunto.

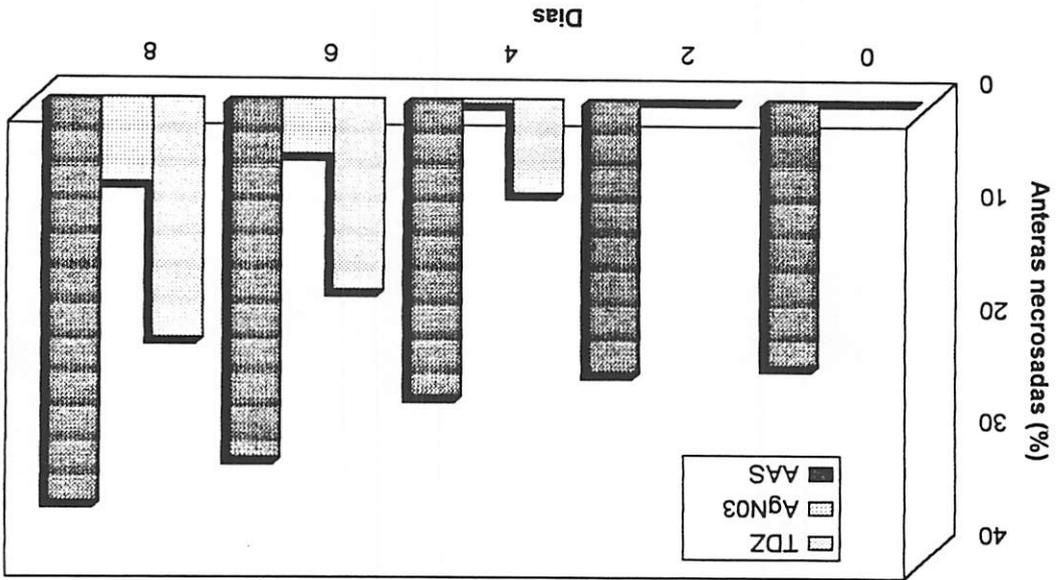
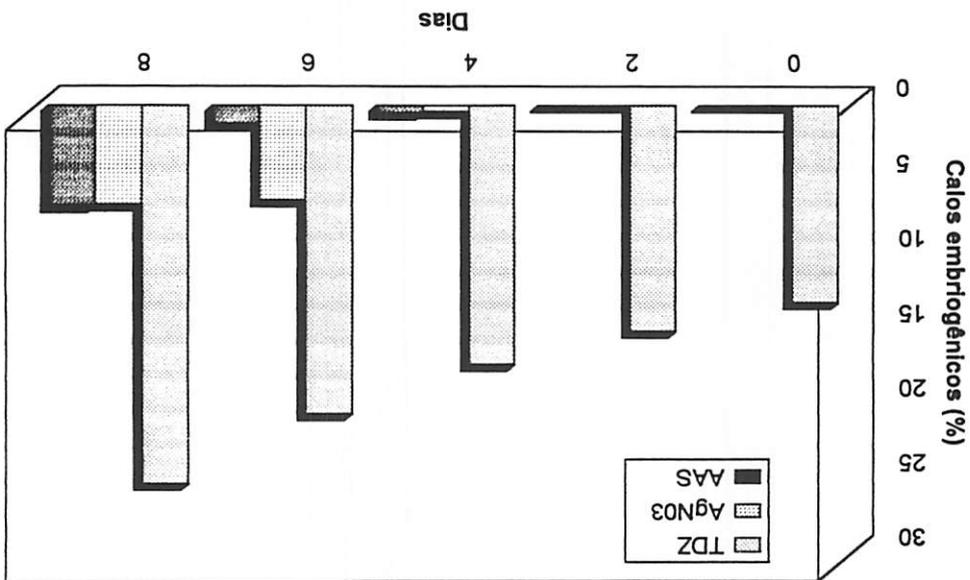


FIGURA 21. Porcentagem de calos embriogênicos em função de diferentes meios de indução combinados com tempo de permanência com ETHREL<sup>®</sup>, considerando dados dos genótipos em conjunto.



Considerando que a necrose no meio com AAS, também seja em função do etileno, estes resultados de certa forma reforçam o constatado por Herman (1991) em que tanto o AS quanto o AAS em forma de aspirina, estimularam a embriogênese em suspensão de células de cenoura numa faixa de 10 a 100  $\mu\text{M}$ , o que inclui a concentração usada no tratamento em questão (88,9  $\mu\text{M}$ ). Verificaram que não houve qualquer prejuízo no crescimento e sobrevivência das células, e ainda, houve uma direta relação entre a concentração de AS e AAS e o estímulo à embriogênese com a inibição do etileno. Portanto pode-se inferir que o AAS na concentração de 88,9  $\mu\text{M}$ , não foi suficiente para inibir o efeito do etileno, aumentando a necrose a medida em que este era mais presente no ambiente devido ao aumento do tempo de exposição ao ethephon.

Com relação ao número de embriões por 100 anteras, verificou-se que o TDZ também se destacou (Figura 23), mas não diferindo significativamente do meio acrescido de  $\text{AgNO}_3$ , tendo respectivamente 170,7 e 155,5 embriões, considerando os genótipos e os tempos de exposição ao ETHREL<sup>®</sup> em conjunto. Estes valores são próximos aos encontrados por Nervo et al. (1994) em anteras do genótipo PM 687 x Yolo Wonder, também inoculadas em meio C adicionado de  $\text{AgNO}_3$ . Este genótipo é considerado altamente responsivo, tendo sido usado como controle neste trabalho citado.

Considerando dados em conjunto dos meios e genótipos, o tempo de 4 dias foi significativamente mais favorável para o número de embriões por 100 anteras, tendo em média 271,8 embriões (Figura 24)

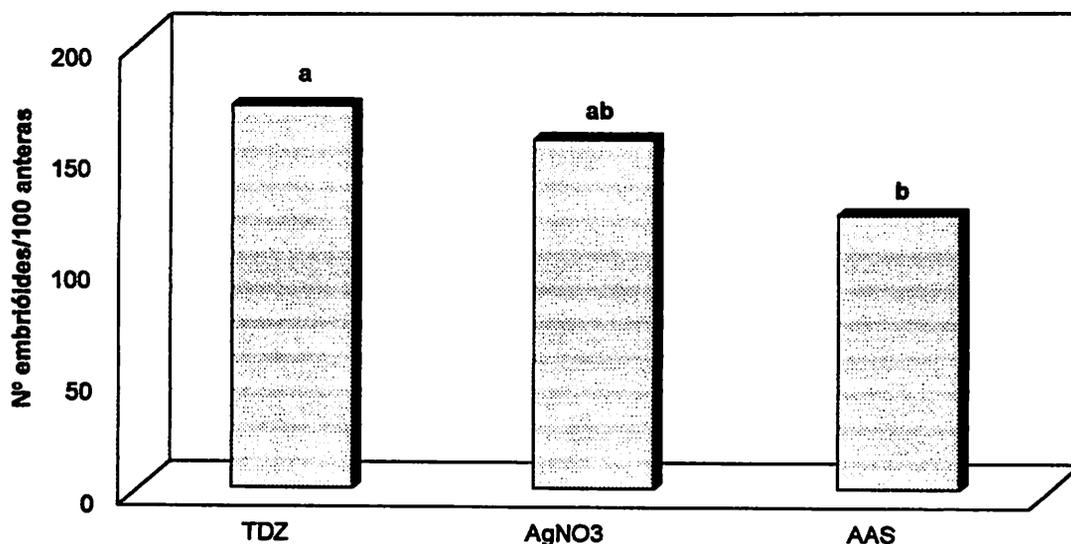


FIGURA 23. Número de embriões por 100 anteras, em diferentes meios de indução, considerando dados de tempo de permanência com ETHREL<sup>®</sup> e genótipos em conjunto. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

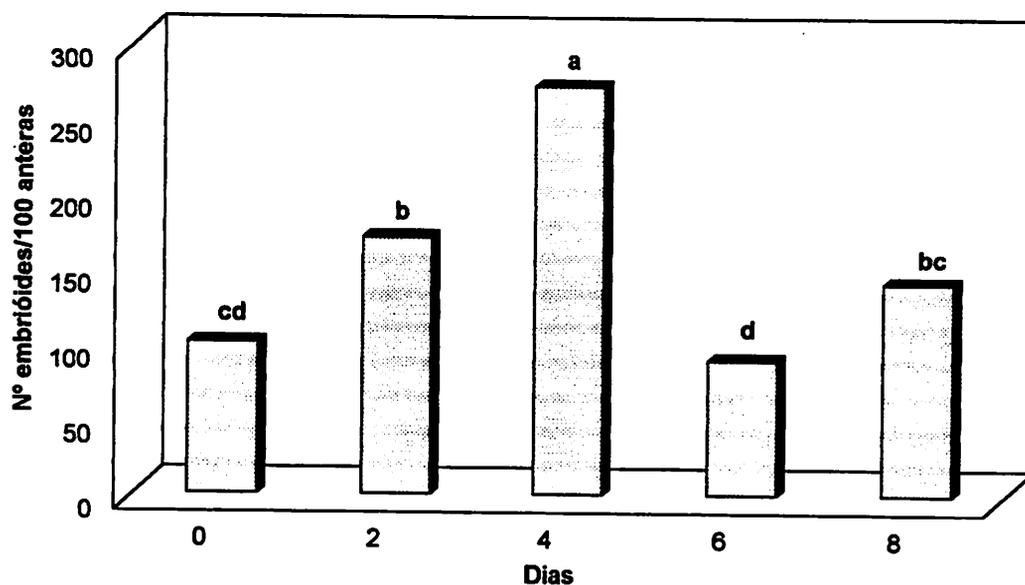


FIGURA 24. Número de embriões por 100 anteras, em diferentes tempos de permanência com ETHREL<sup>®</sup>, considerando dados de genótipos e meio de indução em conjunto. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Apesar dos tempos de 2 e 4 dias terem sido genericamente os melhores para a indução das anteras, e terem promovido os maiores números de embriões , não foram os mais eficientes quando na regeneração dos embriões em plântulas, e sim o período de 8 dias (Tabela 16). Verificou-se também que somente anteras provenientes do meio de indução C adicionado de 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ , regeneraram plântulas, e ainda constatou-se interação com o genótipo , sendo os mais responsivos PIX22C#31 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda (Tabela 16). O PIX21C12#35 x Agrônômico 8; não regenerou qualquer plântula permanecendo os embriões nos estádios globular e torpedo, até a completa necrose ao longo de 60 dias, mesmo quando transferidos para o meio R acrescido de 9,3  $\mu\text{M}$  de cinetina, assim como ocorreu nos experimentos anteriores. Os embriões dos outros genótipos, quando foram transferidos para o meio R + 9,3  $\mu\text{M}$  de cinetina, também não regeneraram em plântulas.

TABELA 16. Frequência de plantas do genótipos cultivados em meio C adicionado de 5 mg/L de AgNO<sub>3</sub>, em diferentes tempos de permanência com ETHREL<sup>®</sup>.

Genótipo	Tempo/ethrel <sup>®</sup> (dias)	N <sup>o</sup> total de anteras inoculadas	N <sup>o</sup> de plântulas	% plântulas
PIX21C04#04 x 004	4	90	1	1.1
	6	84	2	2.4
	8	81	2	2.5
PIX22C#31 x 004	4	89	3	3.4
	6	85	1	1.2
	8	93	12	12.9
PIX21C15#45 x Ikeda	8	83	2	2.4
PIX22C#21 x Ikeda	4	86	3	3.5
	6	88	1	1.1
	8	85	4	4.7
Total		864	31	3.6

As primeiras estruturas de desenvolvimento dos embriões em plântulas, começaram a surgir a partir de 50 dias após a inoculação, sendo que aproximadamente aos 70 dias (Figura 25), foram transferidas para o meio R sem reguladores de crescimento. Ocorreu o desenvolvimento de mais de uma planta em alguns tubos,

sendo as plantas individualizadas posteriormente a esta constatação. As plântulas atingiram o ponto de aclimatação por volta de 100 dias pós-inoculação das anteras (Figura 26).

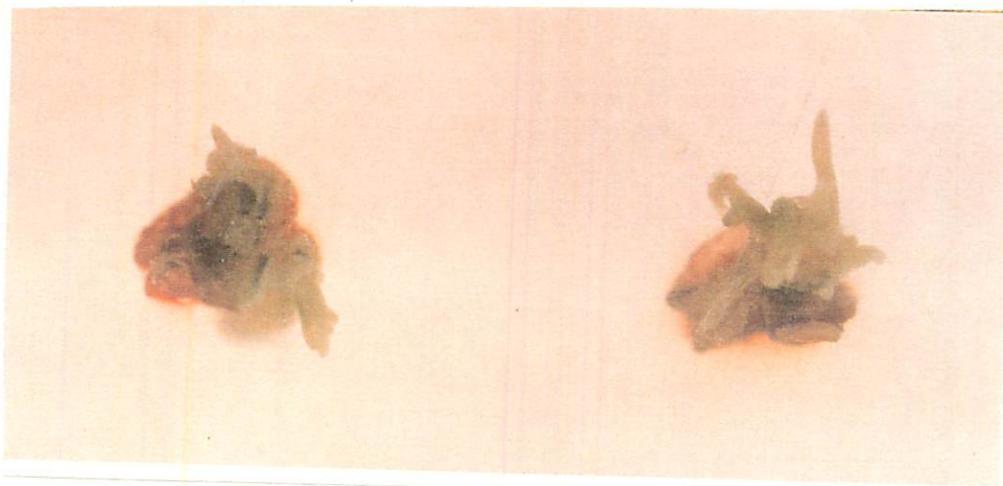


FIGURA 25. Estruturas de desenvolvimento dos embriões em plântulas. Anteras inoculadas em meio de indução C + 0,05  $\mu$ M de cinetina + 0,05  $\mu$ M de 2,4-D + 5mg/L de  $\text{AgNO}_3$  e tempo de 8 dias em ambiente com ETHREL<sup>®</sup>.



F<sub>1</sub> - PIX22C#21 x Ikeda

FIGURA 26. Plântula haplóide em estágio de desenvolvimento propício à aclimatação.

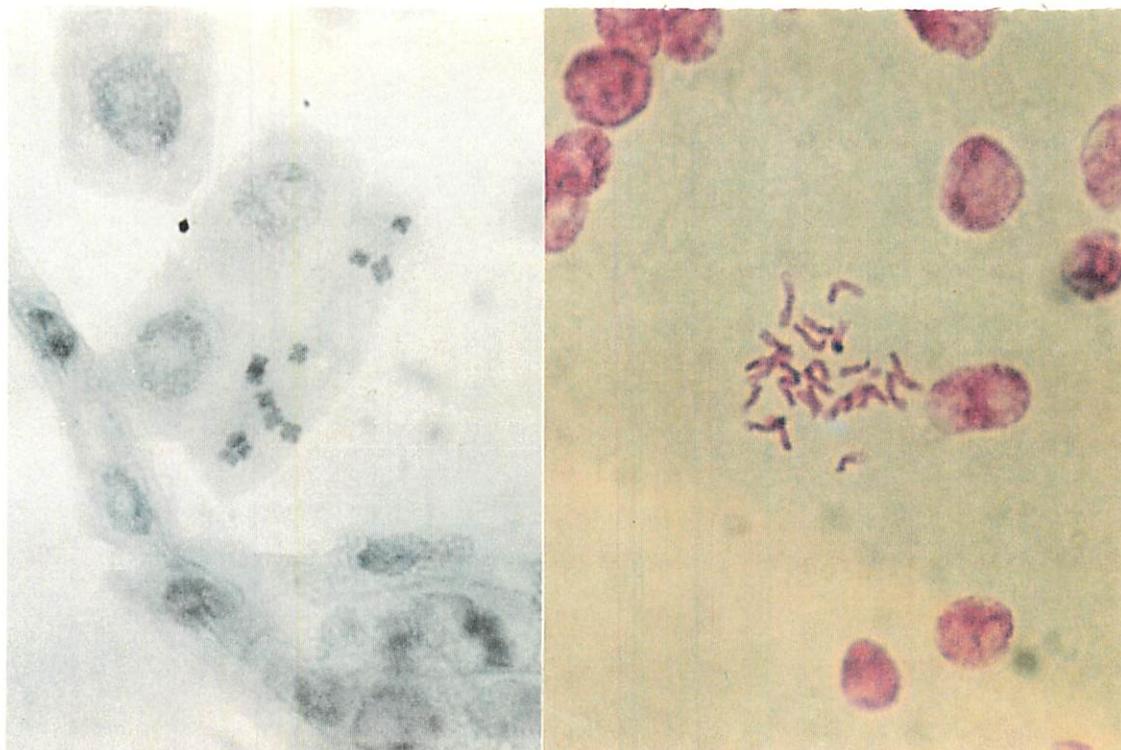


FIGURA 27. Planta haplóide em processo de aclimação com câmara úmida.

Algumas plantas não completaram o desenvolvimento *in vitro*, morrendo antes de estarem aptas para aclimação, já outras morreram ainda na aclimação.

#### 5.4.4 VERIFICAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA DAS PLÂNTULAS

A verificação da ploidia das primeiras plântulas regeneradas, foi realizada em raízes retiradas quando estas ainda encontravam-se *in vitro*, essa foi uma prática vantajosa no sentido de que teve-se mais uma oportunidade de se retirar pontas de raízes quando da aclimação daquelas plântulas onde não se obteve sucesso anteriormente, na contagem do número de cromossomos. Das plântulas analisadas houve a constatação de plântulas haplóides e diplóides (Figura 28). Considerando que a regeneração foi direta, sem passar por calos, supõe-se que as plântulas diplóides obtidas sejam provenientes dos micrósporos, portanto deve ter ocorrido uma diploidização *in vitro*, o que é desejável do ponto de vista prático, pois o emprego da colchicina tende a ser uma etapa longa e algumas vezes surgimento de diplóides é aleatória.



Haplóide

Diplóide

FIGURA 28. Células de ponta de raíz de plântulas regeneradas a partir de anteras do  $F_1$  (PIX22C#31 x 004). Planta haplóide ( $n=12$ ) e diplóide ( $n=24$ ).

Das plântulas em que se retirou pontas de raízes somente na aclimação e não se conseguiu metáfases mitóticas, foi feita uma nova coleta quando no transplante definitivo para vasos; contudo, esta prática não é aconselhável pois o transplante foi feito com raíz nua o que causou estresse às plantas tendo-se inclusive a perda de algumas delas. Outra desvantagem de se fazer a coleta nesta fase é que as raízes já encontravam-se bastante diferenciadas e portanto lignificadas, o que dificulta a obtenção de células em divisão.

Outras opções de se verificar a ploidia de plantas androgenéticas é a contagem de estômatos ou cloroplastos, o que foi usado com sucesso por Nervo et al.

(1994), e ainda, a verificação da frutificação da planta, já que plantas haplóides tendem à não formação de frutos.

Após as análises citológicas constataram-se 3 Plântulas haplóides e 1 diplóide a partir do genótipo PIX22C#31 x Linha 004, 1 plântula haplóide a partir PIX21C15#45 x Ikeda e 1 haplóide e um diplóide a partir de PIX22C#21 x Ikeda.

As taxas de regeneração foram em geral superiores as alcançadas por George e Narayanaswamy (1973) e Sibi, Dumas de Vaulx e Chambonnet (1979); são semelhantes as obtidas por Dumas de Vaulx, Chambonnet e Sibi (1981) e inferiores as dos trabalhos de Dumas de Vaulx, Chambonnet e Pochard (1981) e Nervo et al. (1994). Vale lembrar que todos estes estudos foram realizados com outros genótipos de pimentão.

Os resultados assemelham-se com o que ocorreu no trabalho de Nervo et al. (1994), no qual alcançaram altas frequências de embrióides mas com baixas taxas de conversão em relação ao número de embrióides; os autores afirmam que este é o ponto de estrangulamento da técnica, e sugere maiores estudos de fatores que possam estar relacionados com tal situação. Em função desta última consideração e de acordo com os resultados do presente experimento pode-se inferir seguramente que a taxa de conversão em plantas está diretamente ligada à produção e/ou inibição do etileno, tornando-se cada vez mais importante elucidar o real papel deste gás no controle não só da embriogênese, mas principalmente na fase de maturação dos embriões obtidos.

#### **5.4.5 CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA EMBRIOGÊNESE NAS ANTERAS.**

Com 8 dias de inoculação a antera do F<sub>1</sub> (PIX22C#31 x Linha 004) ainda não apresentava setor embriogênico definido, estando os micrósporos dispersos,

aparentemente sem divisão (Figura 29a). Mas segundo Reynolds (1990) a indução à embriogênese inicia-se já a partir de 6 horas após a inoculação, contudo esta verificação só foi possível com microscopia eletrônica.

No entanto aos 12 dias de inoculação verificou-se aumento no tamanho da antera e surgiram regiões de intensa divisão celular (Figura 29b), sendo as células de pequeno tamanho e fortemente unidas. Segundo KiKuchi et al. (1995) são características de células embriogênicas, tendo ainda, citoplasma denso, vacúolo pequeno, grande núcleo e nucléolo e alto acúmulo de amido (Reynolds, 1990). Constatação semelhante foi feita por Bohanec, Neskovic e Vujicic (1993) em anteras de *Fagopyrum esculentum* Moench, com 15 dias de inoculação, mas estes autores concluem que é difícil afirmar com certeza que a região em divisão é composta de células provenientes dos micrósporos ou da camada interna da parede da antera.

Com 19 dias de inoculação das anteras ou 7 dias no meio R, as anteras apresentaram a formação de elementos traqueais e envolta destes ocorreu grande número de células pequenas com citoplasma denso (Figura 30a). A presença dos elementos traqueais indica que estava ocorrendo diferenciação celular para posterior formação de xilema. Não se percebe mais a presença dos micrósporos o que pode levar a crer que as regiões em divisão são originárias destes. Este fato também suporta que as plantas diplóides ocorridas no último experimento com ethephon, provavelmente tenham sido originadas a partir do micrósporos e portanto ocorreu a diploidização *in vitro*.

Aos 27 dias verificou-se maior número de elementos traqueais. Próximo aos elementos traqueais permaneceu uma região de intensa divisão e pode-se verificar a presença de células maiores e de cor avermelhada (Figura 30b), o que

indica a síntese de celulose, característico de células diferenciadas e não mais meristemáticas. Com 32 dias a formação de regiões com elementos traqueais intensificou-se e tornaram-se mais bem definidos (Figura 30c), caracterizando um estágio mais avançado de diferenciação celular.

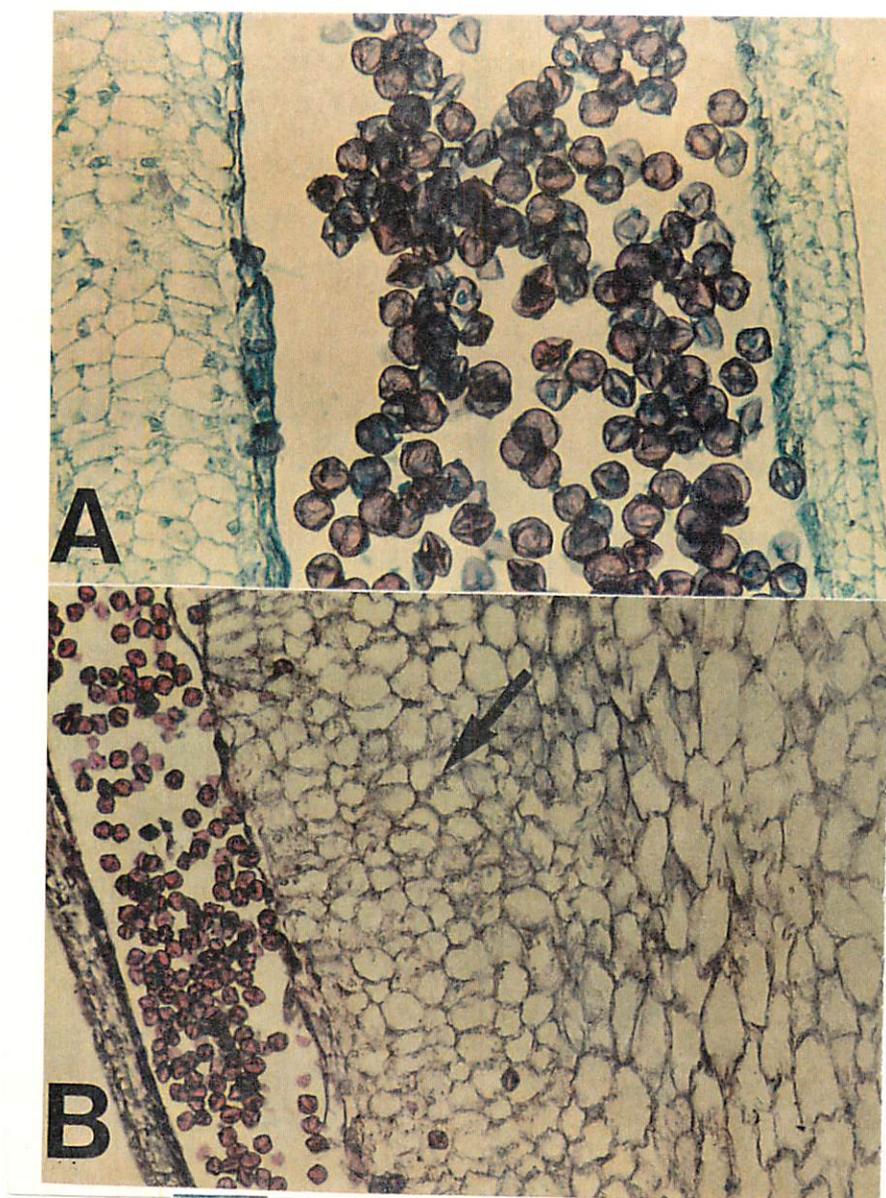


FIGURA 29. Cortes histológicos de anteras em diferentes períodos de inoculação:

A) 8 dias (A.T. 292 x); B) 12 dias (A.T. 146 x, **seta**=região de divisão celular).

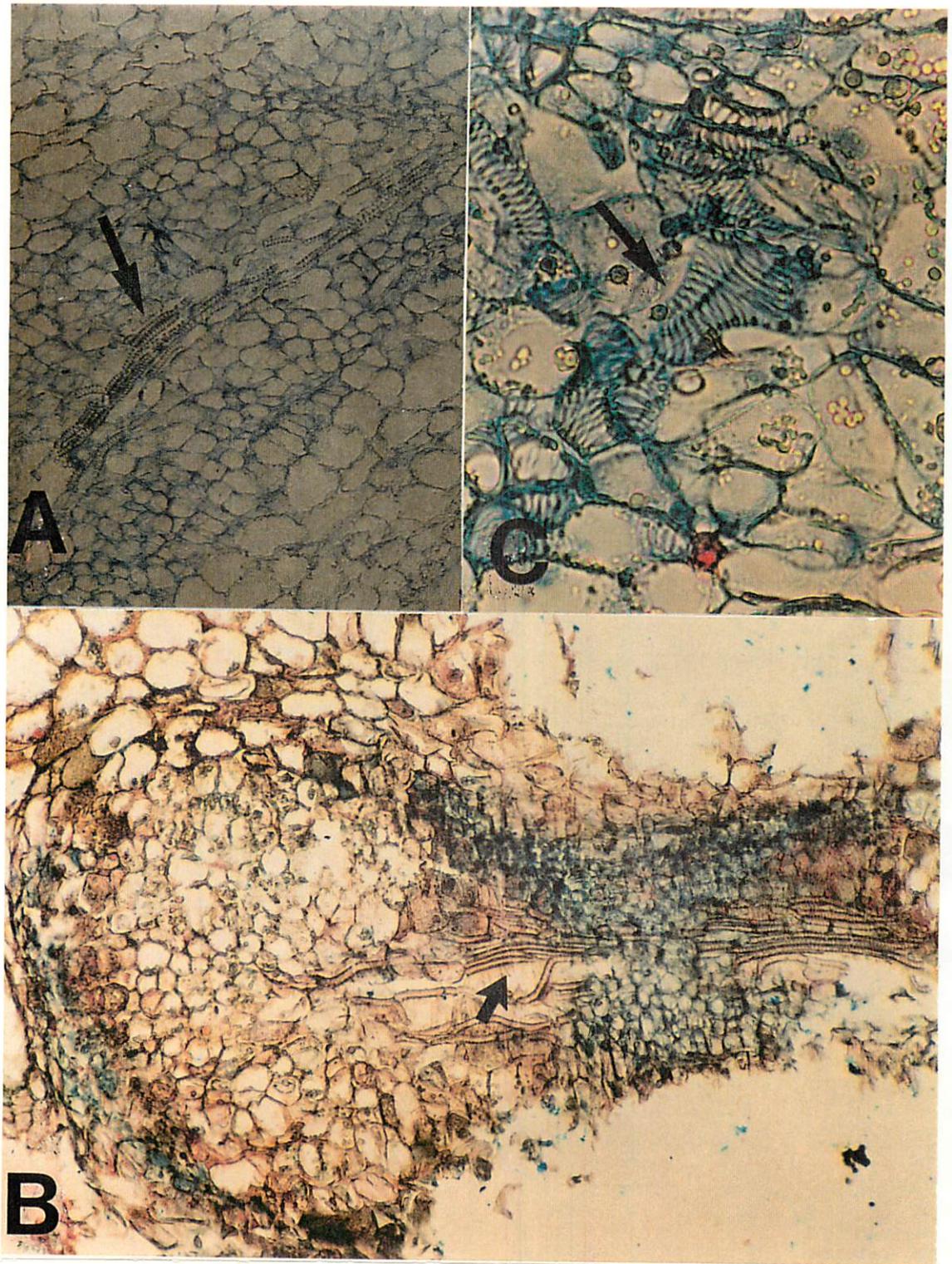


FIGURA 30. Cortes histológicos de anteras em diferentes períodos de inoculação:  
A) 19 dias (A.T. 292 x); B) 27 dias (A.T. 146 x); C) 32 dias (A.T. 584 x)  
(setas=elementos traqueais).

## 5.6 CONCLUSÕES

O  $\text{AgNO}_3$  à 5 mg/L no meio C, favoreceu a indução das anteras, com relação ao número de embrióides por 100 anteras.

O carvão ativado no meio C prejudicou a indução da embriogênese somática, e quando no meio R, não promoveu qualquer regeneração de plântulas, permanecendo os embrióides nos estádios globular e torpedo.

O ácido acetilsalicílico promoveu maior indução de anteras e maior número de embrióides, principalmente à 88,9  $\mu\text{M}$ , mas em concentrações mais altas de AAS promoveram maiores porcentagens de anteras necrosadas.

Os genótipos mais responsivos foram PIX22C#31 x linha 004, PIX21C04#4 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda. O pior genótipo foi PIX21C15#45 x Ikeda. Mas não houve qualquer regeneração em plantas mesmo no meios com  $\text{AgNO}_3$  ou AAS, permanecendo os embrióides nos estádios globular e torpedo.

No experimento com ethephon, para a porcentagem de anteras com embrióides e número de embrióides por 100 anteras, os tempos de 2 e 4 dias em exposição ao ETHREL<sup>®</sup> foi o mais favorável e as maiores induções de anteras ocorreram nos meios com TDZ e  $\text{AgNO}_3$ . O TDZ também promoveu uma maior indução de calos embriogênicos, sendo crescente com o aumento do período com ethephon e as maiores taxas de necrose ocorreram no meio com AAS e também foram crescentes com o incremento do período em ETHREL<sup>®</sup>, principalmente com 6 e 8 dias.

Somente anteras provenientes do meio de indução C adicionado de 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ , regeneraram plântulas, principalmente com 8 dias em ethephon, sendo os genótipos mais androgênicos o PIX22C#31 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda. As

plântulas eram na maioria haplóides e algumas diplóides. A análise histológica da indução e desenvolvimento dos embriões mostrou que com 12 dias de inoculação a antera apresentava setor embriogênico definido e a partir de 19 dias as anteras apresentavam a formação de elementos traqueais indicando a diferenciação celular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKINS, S. W.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; GRAY, S. J.; ADKINS, A. L. Effect of Ethylene and Culture Environment on Rice Callus Proliferation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.44, n.269, p.1829-1835, Dec.1993.
- AUBOIRON, E.; CARRON, M. P.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.21, p.31-37, 1990.
- AGARWAL, P. K.; BHOJWANI, S. S. Enhanced pollen grain embryogenesis and plant regeneration in anther cultures of *Brassica juncea* cv. PR-45. **Euphytica**, Dordrecht, v.70, p.191-196, 1993.
- BIDDINGTON, N. L.; ROBINSON, H. T. Ethylene production during anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var *gemmifera*) and its relationship with factors that affect embryo production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.25, p.169-177, 1991.
- BOHANEK, B.; NESKOVIC, M.; VUJICIC, R. Anther culture and androgenetic plant regeneration in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.35, p.259-266, 1993.
- CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. I. F. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: Fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 239p.
- DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D.; SIBI, M. Stimulation of "in vitro" androgenesis in Pepper (*Capsicum annuum* L.) by elevated temperature treatments. C.R.N.S.F. - C.N.R.A. **Meeting**, Orsay, Juillet 1980, Dr. Earle (Ed.), (Souspresse).
- DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D.; POCHARD, E. Culture in vitro d'anthers de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35°C. **Agronomie**, Versalhes, v.1, n.10, p.859-864, 1981.

- EVANS, J. M.; BATTY, N. P. Ethylene precursors and antagonists increase embryogenesis of *Hordeum vulgare* L. anther culture. **Plant Cell Reports**, New York, v.13, p.676-678, 1994.
- GEORGE, L.; NARAYANASWAMY, S.; Haploid *Capsicum* through Experimental Androgenesis. **Protoplasma**, New York, v. 78, p.467-470, 1973.
- GHAEMI, M.; SARRAFI, A.; ALIBERT, G. The effects of silver nitrate, colchicine, cupric sulfate and genotype on the production of embryoids from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.36, p.355-359, 1994.
- GUERRA, M.S. O uso de giemsa na citogenética vegetal: comparar entre coloração simples e bandeamento. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.37, n.2, p.190-193, 1955.
- HERMAN, E. B. **Recent advances in plant tissue culture: Regeneration, Micropropagation and Media 1988-1991**. New York, Agritech Consultants, Inc., Shrub Oak, 1991. 94p.
- KIKUCHI, A.; SATOH, S.; NAKAMURA, N.; FUJII, T. Differences in pectic polysaccharides between carrot embryogenic and non-embryogenic calli. **Plant Cell Reports**, New York, v.14, p.279-284, 1995.
- KRISTIANSEN, K.; ANDERSEN, S.B. Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. **Euphytica**, Wageningen, n.67, p.105-109, 1993.
- LESLIE, C. A.; ROMANI, R. J. Salicylic acid: A new inhibitor of ethylene biosynthesis. **Plant Cell Reports**, New York, v.5, p.144-146, 1986.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S. The metabolism of [<sup>14</sup>C]-thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.65, p.427-432, 1985.
- NERVO, G.; CARANNANTE, G.; AZZIMONTI, M.T.; ROTINO, G.L. Use of anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlets production. In: **INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE**, 1994. Firenze. **Anais...** Firenze: IAPTC, 1994. v.8, p.92.
- NISSEN, P. Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: Effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.92, p.397-403, 1994.
- OCKENDON, D.J.; McCLENAGHAN, R. Effect of silver nitrate and 2,4-D on anther culture of brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemnifera*). **Plant Cell tissue and Organ culture**, Dordrecht, v.32, p.41-46, 1993.

- REYNOLDS, T. L. Ultrstructure of Pollen Embryogenesis. in: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. v.12, p.66-82.
- SIBI,M.,DUMAS DE VAULX,R.,CHAMBONNET,D.Obtention de plantes haploides par androgenèse *in vitro* chez le Piment (*Capsicum annuum* L.). **Annales de l'Amélioration des Plantes**, v.29, n.5, p.583-606, 1979.
- VAGERA, J. Pepper (*Capsicum* spp.): In vitro Induction of Haploids. BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. v.2, p.374-392.
- WILDE, R. C. Practical applications f (2-Chloroethyl) Phosphonic acid in agricultural production. **HortScience**, Alexandria, v.6, n.4, p.364-370, Aug. 1971.
- YU, Y. B.; ADAMS, D. O.; YANG, S. F. 1-Aminocyclopropanecarboxylate Synthase, a Key enzyme in Ethylene Biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v.198, n.1, p.280-286, Nov. 1979.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

Os micrósporos em estágio de desenvolvimento uninucleado, adequado para obtenção de haplóides via cultura de anteras ocorreram para todos os genótipos, em botões florais cujas pétalas e sépalas tinham comprimentos aproximadamente iguais.

De maneira geral não houve diferença na indução das anteras para o período entre a 6<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana pós-transplante, ocorrendo respostas diferenciadas entre os genótipos, sendo a linha 004 a mais responsiva.

O Thidiazuron na concentração de 4,5  $\mu$ M combinado com 8 dias a 35°C, no escuro, promoveu melhor indução e formação de embriões, bem como a formação de calos embriogênicos. Houve respostas diferenciadas conforme os genótipos, mas não houve regeneração de plântulas, permanecendo os embriões nos estágios globular e torpedo.

O TDZ em combinação com o meio MS foi pouco eficiente na regeneração de plântulas, necessitando de maiores estudos com este regulador presente em meio para maturação.

O  $\text{AgNO}_3$  à 5 mg/L no meio, favoreceu a indução das anteras, com relação ao número de embriões por 100 anteras. O carvão ativado prejudicou este parâmetro, e quando no meio de regeneração, não promoveu qualquer desenvolvimento em plântulas, permanecendo os embriões nos estágios globular e torpedo.

O AAS promoveu maior indução de anteras e maior número de embriões, principalmente a 88,8  $\mu\text{M}$ . Mas em concentrações mais altas, o AAS promoveu maiores porcentagens de anteras necrosadas. Não houve qualquer regeneração em plântulas, permanecendo os embriões nos estádios globular e torpedo.

Na relação do etileno com componentes do meio, verificou-se que o tempo de 4 dias em exposição ao Ethrel foi o mais favorável e as maiores induções de anteras ocorreram nos meios com TDZ e  $\text{AgNO}_3$ . O TDZ promoveu uma maior indução de calos sendo crescente com o aumento do período com ethephon. As maiores taxas de necrose ocorreram no meio com AAS e também foram crescentes com o incremento do período em Ethrel, principalmente com 6 e 8 dias.

Somente anteras provenientes do meio de indução C adicionado de 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ , regeneraram plântulas, sendo os genótipos mais responsivos para esta característica o PIX22C#31 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda. As plântulas obtidas foram na maioria haplóides e algumas diplóides. A verificação histológica da indução e desenvolvimento dos embriões constatou que aos 12 dias as anteras apresentavam setores embriogênicos definidos e a partir de 19 dias apresentavam a formação de elementos traqueais indicando a diferenciação celular para posterior formação de xilema.

Os resultados de maneira geral mostraram que para os genótipos estudados, ocorreram altas taxas de indução de embriões, mas com nenhuma ou baixas taxas de conversão em plantas, sendo portanto este o ponto de estrangulamento da técnica, o que sugere maiores estudos de fatores que possam estar relacionados com tal situação, principalmente no que diz respeito à produção e/ou inibição do etileno, tornando-se cada vez mais importante elucidar o real papel deste gás no controle não só no da embriogênese, mas principalmente na fase de maturação dos embriões obtidos.