MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO

EFEITO DE CULTIVARES E MEIOS DE CULTURA NA INDUÇÃO DE CALOS DE ANTERAS DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do grau de MESTRE.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS
1989

EFEITO DE CULTIVARES E MEIOS DE CULTURA NA INDUÇÃO DE CALOS DE ANTERAS DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

APROVADA:

p/ Prof. Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Prof. Dr. Moacir Pasqual

Prof. Ph.D. César Augusto Brasil Pereira Pinto

Eng. Agr.Ph.D. Marcos Paiva

Aos meus pais Marcio e Maria José,

a meus irmãos Alexandre, Lucia,

Maria Beatriz e Guilherme,

pelo incentivo e amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Às seguintes instituições que contribuíram para a realização deste trabalho:

- Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL)
- Laboratório de Cultura de Tecidos da ESAL
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Florestas Rio Doce S/A (FRDSA)
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPE)
- Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

À amizade, apoio, incentivo e colaboração de:

- Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
- Prof. Dr. Moacir Pasqual
- Eng. Agr. Ph.D. Marcos Paiva
- Prof. Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto
- Prof. Dr. Magno Antônio Patto Ramalho
- Prof. Dr. João Bosco dos Santos
- Prof. Dr. Geraldo Helcio Seoldo Rodrigues

- Prof. Dr. José da Cruz Machado
- Prof. Dr. Fábio Portela
- Eng. Agr. Ph.D. Edilson Paiva
- Eng. Agr. Antônio Tadeu da Silva
- Nut. Rosângela Maria Neves Bezerra
- Eng. Agr. M.Sc. Francisco Augusto Alves Câmara
- Eng. Flo. M.Sc. Dulcinéia de Carvalho
- Arq. Maria Beatriz de Castro Silva
- Tec. Lab. Tales Marcio de Oliveira Giarola
- Bib. Luís Carlos de Miranda
- Lab. Evaldo de Souza Arantes
- Lab. Vantuil Antonio Rodrigues.

SUMÁRIO

Página

Página

LISTA DE FIGURAS

Figuras Página

LISTA DE QUADROS

ABREVIAÇÕES

A caracterização do meio de cultura e as diversas substâncias que compõe o meio são referidas no decorrer do trabalho através de abreviaturas cujo significado é dado a seguir:

MS - MURASHIGE & SKOOG (1962)

67-V - Meio de VELIKY & MARTIN (1970)

ANA - Ácido naftaleno acético

AIA - Ácido indol acético

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxi-acético

HCl - Ácido clorídrico

NaOCl - Hipoclorito de sódio

PFP - Para fluorfenilalanina

Complemento 1 - 5mg/l AIA + 1mg/l Cinetina + 60ml/l Arginina + 50mg/l Ácido aspártico + 10 mg/l Cisteína

Complemento 2 - 2mg/l AIA + 0,2mg/l Cinetina + 1mg/l ANA + 1mg/l 2,4-D + 0,5mg/l Ácido glutâmico + 25mg/l Glicina + 10mg/l Histidina.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de feijão, no entanto sua produtividade é extremamente baixa, cerca de 405 kg/ha (4). Entre as causas do baixo rendimento das cultivares estão a suscetibilidade a pragas e doenças, não adaptação às diversas condições de cultivo e porte inadequado. Aliado a estes problemas há a necessidade de se melhorar o valor nutricional do feijão, especialmente em relação à qualidade de suas proteínas, que possuem baixos teores de metionina e cisteína.

Existem evidências de variabilidade genética para todos estes caracteres, por essa razão o melhoramento genético é a alternativa para a obtenção de cultivares melhoradas. A maioria dos programas de melhoramento de feijoeiro tem por objetivo a obtenção de linhas puras. Vários métodos de melhoramento podem ser utilizados, dependendo do objetivo em questão. A hibridação seguida de seleção das progênies, o método da população e o retrocruzamento são comumente utilizados. A partir da hibridação são gastos de 6 a 8 gerações para se proceder a seleção das linhagens, havendo um significativo gasto de tempo.

O desenvolvimento de técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos vegetais tem recebido uma considerável atenção nos últimos anos e sua utilização em programas de melhoramento tem sido bastante observada, HANZEL et alii (40). Dentre as técnicas de cultivo "in vitro", a cultura de anteras apresenta-se como uma ferramenta de grande utilidade em programas de melhoramento, principalmente por reduzir o tempo necessário à obtenção das linhagens. Entretanto, alguns problemas têm dificultado a utilização desta técnica em culturas de importância econômica. A baixa regeneração de plantas e a falta de estudos básicos de bioquímica, genética e fisiologia, têm sido um entrave ao sucesso dos trabalhos.

O estudo de fatores endógenos e exógenos às plantas é de grande interesse pois, a partir de seus conhecimentos, acredita-se que tais limitações venham a ser superadas.

O presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- identificar o tamanho do botão floral que proporcione uma alta androgênese;

- verificar se as cultivares de feijoeiro apresentam diferenças quanto a capacidade de androgênese;

- testar alguns meios de cultura capazes de promover a androgênese "in vitro" nas diferentes cultivares.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Considerações gerais

Em 1953 TULECKE (88) verificou a possibilidade de ocorrência de tecido haplóide em cultura asséptica de Ginkgo biloba. Posteriormente, GUHA & MAHESHWARI (37) observaram o desenvolvimento de embriões provenientes de micrósporos de Datura innoxia cultivados"in vitro". A partir daí, mais de 170 espécies abrangendo cerca de 60 gêneros e 26 famílias de angiospermas foram estudados, HU & ZENG (43).

O grande interesse despertado pela cultura de anteras está relacionado com sua aplicabilidade para a genética e melhoramento de plantas. Além de reduzir o tempo necessário à obtenção de linhagens homozigóticas, esta técnica permite o estudo de mutações recessivas, visto que indivíduos haplóides por constituirem-se de apenas um complemento cromosômico, não apresentam problemas de dominância e recessividade, BAJAJ (5), DUNWELL (26) e FERNANDES (31).

A ocorrência de haplóides pode se dar espontaneamente

na natureza como resultado da partenogênese. Além da cultura de anteras, existem outras formas de indução de haplóides, como a eliminação cromosômica a partir da cultura de embriões provenientes de hibridação interespecífica, aplicação de substâncias químicas, indução da partenogênese "in vitro", choques térmicos, cultura de pólen e radiação ionizante, (48, 53, 58 e 65).

Apesar das dificuldades encontradas na regeneração de plantas de interesse econômico em larga escala, alguns resultados significativos foram observados em trabalhos com arroz, YIN et alii (95); trigo, CHIN-CHING CHU (18) e fumo, DEVREUX (22). Entretanto, o estudo de fatores como o meio de cultura, genótipo, condições de incubação e o estádio de desenvolvimento dos micrósporos, é indispensável para o estabelecimento da técnica de cultura de anteras como rotineira nos trabalhos de genética e melhoramento de plantas, MAHESHWARI et alii (59).

2.2. Pólen e indução da androgênese

Os grãos de pólen representam os gametas masculinos em plantas superiores e são os responsáveis pela formação de plantas haplóides a partir da cultura de anteras. De acordo com o estádio de maturação, são classificados em binucleares e trinucleares, KNOX (54).

O tipo binuclear é formado pelas gymnospermas e por dois-terços das angiospermas. É composto por um núcleo vegetativo

que está relacionado com o metabolismo e crescimento do tubo polínico, e de um núcleo generativo que se divide dentro do tubo polínico para produzir dois núcleos reprodutivos. Dentre as espécies do grupo binuclear, isto é, onde a segunda mitose só ocorre após a germinação do pólen no estigma, estão as Gramineae e Cruciferae, SUNDERLAND & DUNWELL (84).

O tipo trinuclear é composto pelo restante das famílias, sendo que o núcleo generativo divide-se precocemente, por isso, todos os três núcleos estão presentes dentro do grão de pólen maduro, KNOX (54).

A germinação do pólen"in vivo"ou"in vitro"inicia-se a partir de sua hidratação sendo portanto, o teor de umidade um fator preponderante, KNOX (54). Condições ideais de germinação "in vitro"foram estabelecidas por BREWBAKER & KWACK (7), onde estudaram uma grande variedade de tipos de pólen através da variação do conteúdo de boro e de carbohidratos no meio. A maior dificuldade encontrada se deu na regeneração de pólen do tipo trinuclear. Nestes grãos de pólen o modo de hidratação indicou ser o problema.

De acordo com GEORGE & SHERRINGTON (34), a partir de um meio apropriado, os micrósporos de algumas espécies de plantas podem ser induzidos a formar células vegetativas ao invés de grãos de pólen. Esta alteração,no desenvolvimento do sistema gametofítico em um sistema esporofítico, parece iniciar-se numa das fases iniciais do ciclo celular, onde a transcrição de genes relacionados com o desenvolvimento do sistema gametofítico é bloqueada e os genes relacionados com o desenvolvimento esporofítico são

ativados, SUNDERLAND & DUNWELL (85). Portanto, a célula gamética masculina pode reverter seu desenvolvimento dando origem a um novo indivíduo, VASIL et alii (89).

Após a indução, a androgênese se dá de duas maneiras: a androgênese direta e a androgênese indireta (via calo). Normalmente a regeneração de plantas via calo se dá com maior frequência. BAJAJ (5) cita que as plântulas originadas de calos são geralmente indesejáveis porque apresentam vários níveis de ploidia. A partir da formação de calc , a regeneração de plantas se dá através da embriogênese ou organogênese, BARWALE et alii(6).WHITE (94) verificou que na organogênese, a formação de meristema apical e radicular se dá em função de um balanço entre auxinas e citocininas, enquanto que a embriogênese ocorre a partir de simples células que desenvolvem-se semelhantemente aos embriões zigóticos. Quando isto ocorre, está relacionado a uma redução de elevados teores de auxinas, principalmente 2,4-D.

O calo embriogênico caracteriza-se por apresentar uma coloração branca, um aspecto compacto e por constituir-se de pequenas células, enquanto que o calo não embriogênico possui um aspecto granular, translúcido e friável, apresentando uma coloração que vai do amarelo ao cinza, dependendo da espécie, HANZEL et alii (40). Ao trabalharem com cereais, NABORS et alii (66) verificaram uma regeneração de plantas 33 vezes superior quando utilizaram calo embriogênico. Resultados semelhantes foram observados em Festuca rubra L., TORELO et alii (87) e milho, DUNCAN et alii (24). Entretanto, ao trabalharem com diferentes genótipos de soja, BAWARLE et alii (6) observaram 100% de regeneração de plan-

tas a partir da organogênese e 65% a partir da embriogênese.

Com relação à androgênese direta, LIANG et alii (56) trabalhando com trigo, observaram algumas de suas vantagens: redução no tempo gasto na obtenção das plantas, economia de material e espaço. GEORGE & SHERRINGTON (34) verificaram ainda uma menor possibilidade de ocorrência de variação genética quando comparada com a androgênese indireta.

2.3. Fatores que influenciam a androgênese

Os primeiros trabalhos que tiveram êxito em cultura de anteras foram obtidos em algumas espécies das famílias Solanaceae e Gramineae, BAJAJ (5). Atualmente, o número de trabalhos estendeu-se a inúmeras espécies de diferentes famílias; apresentando contudo, uma baixa frequência de regeneração de plantas haplóides. CARLSON & POLACCO (12) acreditam ser este um problema essencialmente técnico. Todos os componentes do sistema responsável pela produção de uma planta adulta são afetados e respondem diferentemente aos vários aspectos de procedimento das culturas, DUNWELL (26). Desta maneira, faz-se necessário o estudo de fatores que direta ou indiretamente estão relacionados ao sucesso da androgênese.

2.3.1. Genótipo

A indução de haplóides na cultura de anteras é provavelmente mais influenciada pelo genótipo do que qualquer outro fator, GEORGE & SHERRINGTON (34). Deste modo, a expansão da androgênese"in vitro"é um reflexo da constituição genética dos micrósporos e, por isso, são verificadas respostas diferenciadas entre plantas de uma mesma espécie.

Segundo COLLINS (20), na maior parte dos trabalhos iniciais com cultura de anteras eram estudadas apenas uma cultivar de uma espécie. A partir da constatação de que a resposta das anteras estava diretamente ligada ao genótipo das plantas, verificou-se a utilização de um maior número de genótipos nos trabalhos.

Em seu trabalho, GRESSHOFF & DOY (35) estudaram 43 cultivares de tomate e observaram a indução de tecido haplóide em apenas três cultivares.

RINES (79) inoculou 65.000 anteras de sete cultivares e seis híbridos F_1 de aveia. Destas, somente uma planta haplóide da cultivar Stout foi obtida.

GUHA & MUKHERJEE (38) estudaram vinte variedades de arroz para verificar a capacidade de formarem embriões e plantas a partir da cultura de anteras. Os resultados indicaram uma grande diferença entre as respostas, sendo que apenas quatro variedades produziram embrióides.

PETOLINO & JONES (74) trabalharam com 40 genótipos

elites de milho e obtiveram uma porcentagem de resposta variando entre 0 e 11,7%.

2.3.2. Estádio ideal dos micrósporos

A determinação do estádio de desenvolvimento dos micrósporos é de grande importância no sucesso da cultura de anteras, podendo entretanto, diferir entre as espécies DUNWELL (26).

Após uma extensa revisão, BAJAJ (5) observou que o micrósporo no estádio uninucleado ou um pouco antes da ocorrência da primeira mitose é o mais susceptível aos estímulos externos para a indução da androgênese.

HE & OUYANG (41) trabalhando com trigo, determinaram que os micrósporos no estádio médio ou final do período uninucleado, apresentavam maior frequência de indução de calos. O mesmo estádio de desenvolvimento foi obtido por SHAEFFER et alii (81) trabalhando com trigo.

Ao trabalharem com a origem de calo androgenético e plantas haplóides de gerânium, ABO EL-NIL & HILDEBRANDT (1) determinaram que o estádio ideal dos micrósporos era o uninucleado. A partir daí, estabeleceram uma correlação entre o estádio do micrósporo com o diâmetro das flores, ou seja, 3 à 4 mm.

Em milho, GENOVESI & COLLINS (32) e PETOLINO & JONES (74) determinaram que o estádio uninucleado é o mais favorável à

androgênese"in vitro".

HADDON & NORTHCOTE (39) ao trabalharem com feijoeiro, verificaram que 10% das anteras inoculadas no estádio uni e binucleado apresentaram um crescimento de calo proveniente das anteras e não do filamento. PETERS et alii (73) trabalhando com a cultivar de feijoeiro Bico de Ouro, estabeleceram o tamanho do botão floral de 6 mm.

A explicação sobre a causa do estádio uninucleado ser o mais recomendado na androgênese, foi proporcionada por MASCARENHAS (61) e VASIL et alii (89). Eles verificaram que no micrósporo, os genes do RNA ribosômico e transportador parecem ser desligados 24 horas após a ocorrência da primeira mitose. A partir deste momento, não seria mais possível reverter o desenvolvimento e a célula seguiria a rota normal para a formação do grão de pólen (Figura 1).

A correlação entre o estádio do micrósporo e aspecto morfológico da planta, em alguns casos não tem sido válida . HIMHIM (42) verificou que durante o florescimento, botões florais de determinado tamanho morfológico apresentavam uma grande variação no estádio de desenvolvimento dos micrósporos. Através de estudos citológicos de amostras das anteras, pode-se verificar com maior precisão o estádio real de desenvolvimento dos micrósporos.

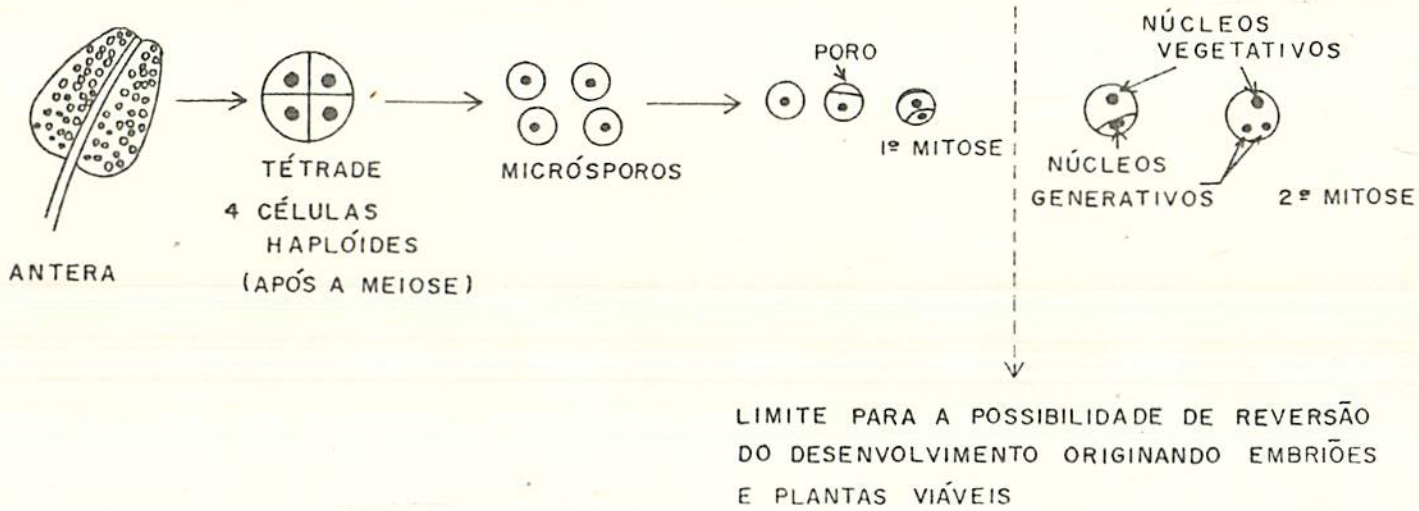


FIGURA 1 - Estádios do desenvolvimento normal do pólen, FERNANDES (31).

2.3.3. Composição do meio de cultura

Segundo BAJAJ (5), a composição do meio de cultura é um dos fatores mais importantes, não apenas no sucesso da cultura de anteras, mas também com o seu modo de desenvolvimento. HU & ZENG (43) citam em seu trabalho que o meio de cultura é o principal fator ambiental para o controle do desenvolvimento de plântulas intactas provenientes de grãos de pólen.

Normalmente, o meio de cultura não fornece apenas os macro e micronutrientes, mas também os carbohidratos, geralmente a sacarose e alguns componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento, SUNDERLAND (84).

O crescimento"in vitro"em um meio adequado ocorre numa faixa de pH de 4,0 a 7,2, sendo que a morfogênese depende diretamente do pH do meio, GEORGE & SHERRINGTON (34). VELIKY & MARTIN (90) ajustaram o pH do meio"67-V"usado na cultura de anteras de feijoeiro para 4,5, enquanto que o meio básico de MURASHIGE & SKOOG (64) requer o ajuste do pH para 5,7.

2.3.3.1. Macro e micronutrientes

Os macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) são indispensáveis ao desenvolvimento de uma planta.

Ao se estabelecer os macronutrientes em um meio de cultura, deve-se levar em conta a correta concentração e balanceamento dos sais. Normalmente os sais usados como fonte dos macronutrientes fornecem Na e Cl. Devido ao fato das plantas tolerarem elevadas concentrações de sais, os íons Na e Cl são freqüentemente ignorados, embora sejam necessários em algumas funções nas plantas, GEORGE & SHERRINGTON (34). SMITH & McCOMB (82) verificaram uma diminuição no crescimento de calos de feijoeiro com o aumento da salinidade. CLAPHAM (14) verificou que altas concentrações de íons amônium inibiam a formação de calos de pólen de arroz e cevada.

A maior parte dos trabalhos com o desenvolvimento de soluções de macronutrientes tem se preocupado com a tentativa de otimizar os níveis dos vários sais com a indução de haplóides em espécies particulares.

Os micronutrientes essenciais (Fe, Mn, Zn, B, Cu, Co e Mo) são componentes das proteínas celulares das plantas apresentando importância fisiológica e metabólica, GEORGE & SHERRINGTON (34). REINERT & BAJAJ (77) verificaram que o ferro apresenta um papel muito importante na androgênese em fumo; sendo indispensável, visto que os pró embriões não se desenvolvem além do estádio globular. MALAVOLTA (60) comenta em seu trabalho que a ausência de boro prejudica a germinação do grão de pólen.

A morfogênese em algumas espécies póde ser promovida pelo aumento dos níveis dos micronutrientes recomendados por MURASHIGE & SKOOG (64). A embriogênese pode ser efetivamente induzida em calo de Hevea brasiliensis provenientes de anteras, atra -

vés da duplicação da concentração dos micronutrientes no meio"MS", enquanto que ao mesmo tempo foi verificada uma redução no nível dos macronutrientes de 60 a 80% do original, GEORGE & SHERRINGTON (34).

2.3.3.2. Suplementos orgânicos

Vários constituintes orgânicos são adicionados ao meio de cultura na tentativa de favorecer a androgênese. Normalmente são utilizadas as vitaminas, aminoácidos, fontes de carbono e reguladores de crescimento. Entretanto, muitas vezes são adicionados ao meio componentes denominados de "indefinidos", tais como: suco de frutas, extrato de anteras, extrato de leveduras, leite de côco, água de côco, caseína hidrolizada, extrato de batatas, etc. Tais substâncias apresentam níveis endógenos de fitohormônios, aminoácidos e outros metabólitos, que podem ser úteis na androgênese, GEORGE & SHERRINGTON (34).

2.3.3.2.1. Vitaminas

As vitaminas são importantes no cultivo"in vitro" de plantas por apresentarem um papel catalítico essencial ao metabolismo. As vitaminas mais freqüentemente usadas na cultura de teci

dos de plantas são a tiamina (B_1), ácido nicotínico (niacina) e piridoxina (B_6), GEORGE & SHERRINGTON (34).

Segundo DUNWELL (26), não há evidências de que as vitaminas sejam necessárias a indução e crescimento de calos ou embriões derivados dos micrósporos. Entretanto, existem trabalhos que relatam justamente o contrário. BARWALE et alii (6) verificaram que níveis crescentes de tiamina no meio, aumentaram a embriogênese em calos de soja em 20%. E ainda, que a utilização de altos teores de ácido nicotínico resultou num efeito favorável através de um aumento de 18% na embriogênese. Entretanto, a adição de pantotenato de cálcio combinada com glicina e asparagina reduziu acentuadamente a iniciação de calo em três tipos de meio usados na regeneração de cevada, HANZEL et alii (40).

PETERS et alii (73) verificaram que o ácido nicotínico na concentração de 200 mg/l, aumentou o crescimento de células em calos de feijoeiro bem como a formação de raízes. Resultados divergentes foram obtidos por PHILIPS & COLLINS (75) ao trabalharem com trevo amarelo. Eles observaram que o ácido nicotínico inibiu o crescimento de células em cultura de calos de anteras quando cultivadas em intervalos inferiores a três semanas, mas quando cultivados em intervalos superiores a 6 semanas, foi observado o crescimento dos calos. Neste mesmo trabalho os autores compararam mais de 20 meios de cultura para avaliar o papel das vitaminas tiamina, piridoxina e ácido nicotínico. No melhor meio responsável pelo crescimento dos calos, as três vitaminas não influenciaram o seu crescimento, mas aumentaram o peso fresco do calos.

O mio-inositol não é considerado uma vitamina no sen-

tido animal. MURASHIGE (63) considera sua adição ao meio de cultura não essencial, mas como sua presença em pequenas concentrações é normalmente benéfica, a substância é classificada como sendo uma vitamina para as plantas. Sua participação se dá na biossíntese do ácido D-galacturônico, levando à formação de constituintes celulares como o ácido ascórbico e pectina.

2.3.3.2.2. Aminoácidos

Os aminoácidos proporcionam às células das plantas uma fonte imediata de nitrogênio e sua assimilação pode ser mais rápida do que o nitrogênio reduzido no mesmo meio. GEORGE & SHERRINGTON (34) citam em seu trabalho que o suprimento de nitrogênio reduzido é geralmente necessário para a ocorrência de embriogênese em calos, entretanto, a adição direta de aminoácidos ou através de suplementos indefinidos em um meio, pode ser desnecessária se um balanceamento correto de sais inorgânicos for desenvolvido para espécies particulares de plantas.

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos com relativo sucesso. REINERT et alii (78) verificaram que o ácido glutâmico, ou uma mistura de aminoácidos, promoveram a formação de embriões em calos de cenoura.

TONIN et alii (86) estudaram o efeito de treze aminoácidos no crescimento de calos e formação de raízes em feijoeiro . Eles observaram que a adição dos aminoácidos arginina, ácido as -

pártico e cisteína promoveu uma melhor morfogênese. O melhor crescimento de calo foi obtido quando o meio foi composto por glicina, histidina e ácido glutâmico.

2.3.3.2.3. Fonte de carbono

Estudos têm indicado que somente um número bastante reduzido de células de plantas cultivadas"in vitro", apresenta a capacidade de suprir toda a sua necessidade por carbohidratos, a partir da assimilação de dióxido de carbono durante a fotossíntese. Portanto, torna-se indispensável a incorporação de açúcares no meio de cultura. A sacarose além de ser a principal e mais efetiva fonte de carbohidratos, regula a pressão osmótica do meio, KELLER et alii (52) e HU & ZENG (43).

Resultados têm indicado que maiores ou menores concentrações de sacarose no meio estão relacionados aos tipos de grãos de pólen, ou seja, binucleares ou trinucleares. SUNDERLAND & DUNWELL (85) e DUNWELL (26) indicaram que elevados teores de sacarose (8 a 12%) produzem melhores resultados em indivíduos do grupo dos trinucleares enquanto que menores concentrações de sacarose (2 a 4%) favorecem a androgênese em indivíduos binucleares. O maior requerimento de sacarose por parte dos trinucleares, segundo REINERT & BAJAJ (77), se dá mais em função de um efeito osmótico do que precisamente uma maior necessidade de carbohidratos.

RINES (79) verificou que elevadas concentrações de sa

carose (10 a 12%) aumentaram a frequência de iniciação de calos em anteras de aveia. Ao trabalhar com anteras de arroz, CHEN (15) verificou que aumentando a concentração de sacarose até 6%, houve um aumento na produção de calos. Entretanto, em meio com 9% de sacarose apareceram inúmeras plantas albinas. A ocorrência deste fenômeno foi explicada por GEORGE & SHERRINGTON (34) como sendo uma perda na habilidade de sintetizar clorofila.

ZAMIR et alii (96) trabalhando com anteras de tomate verificaram que a adição de 2% de sacarose ao meio favoreceu a produção de calos, enquanto que uma redução na concentração para 1% aumentou a regeneração de plantas mas reduziu acentuadamente a proliferação do calo.

A utilização de carvão ativado no meio de cultura tem proporcionado bons resultados no desenvolvimento de tecidos cultivados "in vitro". Segundo GEORGE & SHERRINGTON (34), as funções do carvão são as seguintes: absorver componentes secretados de tecidos cultivados ou presentes no ágar que poderiam inibir o crescimento; prevenir o crescimento indesejado de calos; promover a morfogênese, principalmente a embriogênese; e promover a formação de raízes (devido a sua habilidade de proporcionar o escurecimento do meio). Entretanto, a sua utilização pode estimular o crescimento de fungos contaminantes, como observado por BUTLER & BIKAN (9).

ANAGNOSTAKIS (3) verificou que a incorporação de carvão ao meio, estimulou a indução da androgênese em anteras de fumo. Resultados semelhantes foram conseguidos por REINERT & BAJAJ

(77), onde verificaram um aumento de 41 a 91% na androgênese de fumo.

O aumento da resposta conferido pela adição de carvão ativado no meio de cultura foi observado ainda em milho, GENOVESI & COLLINS (32); batata, SOPORY (83); centeio, WENZEL et alii (92) e aveia, RINES (79).

2.3.3.2.4. Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento são substâncias químicas sintéticas que possuem atividades fisiológicas semelhantes às substâncias de crescimento das plantas, tendo a habilidade de modificar o seu crescimento. Quando os químicos são adicionados ao meio de cultura de plantas, são chamados de reguladores de crescimento para indicar que eles foram aplicados exogenamente, GEORGE & SHERRINGTON (34). Existem várias classes de reguladores de crescimento: as auxinas, citocininas, etileno, giberelinas e abcisinas. Segundo REINERT & BAJAJ (77), os requerimentos de auxinas e citocininas dependem dos níveis endógenos das plantas, portanto, o crescimento e a morfogênese"in vitro"são regulados por uma interação e balanceamento entre os reguladores de crescimento incorporados ao meio e as substâncias produzidas endogenamente pela cultura de células.

A utilização de substâncias reguladoras de crescimento no meio de cultura é tão importante na androgênese que SUNDER-

LAND & DUNWELL (85) classificaram as espécies em dois grupos: o primeiro grupo é formado pelas espécies independentes de hormônios e o segundo grupo pelas espécies dependentes de hormônios . No primeiro grupo estão incluídas algumas espécies que apresentam os grãos de pólen do tipo binuclear, incluindo Datura innoxia, Nicotiana tabacum, N. sylvestris, N. knightiana, N. paniculata, Paeonia hibrida e Hyposcyamus niger. O segundo grupo é composto por espécies do grupo binuclear e trinuclear. Entretanto, os requerimentos nutricionais variam de espécie para espécie.

NISHI & MITSUOKA (70) verificaram que meios de cultura ricos em reguladores de crescimento favorecem a proliferação de outros tecidos além dos micrósporos, e que estes apresentavam diferentes níveis de ploidia.

A utilização de altos níveis de sacarose no meio permite que sejam utilizados relativamente elevadas concentrações de auxinas, o que em circunstâncias normais, induziria a formação de calo REINERT & BAJAJ (77). O mesmo resultado foi observado por BAJAJ (5) onde verificou que para a ocorrência de embriogênese direta nas anteras, seriam necessários meios mais simplificados e com níveis baixos de auxinas. CAPPADOCIA & SREE RAMULU (11) também verificaram que a porcentagem de anteras de tomate mostrando proliferação de calos foi quatro vezes superior às anteras não tratadas com 2,4-D. Um outro aspecto interessante foi observado por DUNWELL & SUNDERLAND (27) que, ao trabalharem com concentrações de auxinas superiores a 1 mg/l em cultura de anteras de batata, obtiveram crescimento de tecidos somáticos bem como a indução dos micrósporos.

A presença de cinetina no meio para cultura de anteras de feijoeiro, segundo HADDON & NORTHCOTE (39), provocou a iniciação de calo em 20% das anteras cultivadas.

2.3.3.2.5. Outras fontes orgânicas

Apesar de existir uma tendência de se evitar a incorporação de substâncias tidas como "indefinidas" no meio de cultura, sua utilização vem propiciando resultados positivos em várias espécies. O principal motivo citado para a não recomendação do uso destas substâncias, está relacionado com a grande variabilidade observada em tais substâncias, principalmente por serem bastante influenciadas pelo genótipo e ambiente, DUNWELL (25). Entretanto, com um melhor balanceamento entre os sais inorgânicos e o entendimento do efeito dos reguladores de crescimento, seu uso tem declinado, GEORGE & SHERRINGTON (34).

CHUANG et alii (19) citaram a grande utilização do extrato de batatas na cultura de anteras de cereais.

Ao trabalharem com cultura de calos de feijoeiro, LIAU & BOLL (57) verificaram que a adição de leite de côco desproteinizado no meio proporcionou um maior efeito estimulatório no crescimento dos calos do que a adição de leite de côco fresco. Observaram ainda, que a caseína hidrolizada aumentou a produção de calos em 15%.

2.3.3.3. Tipo de meio

DUNWELL (26) cita em seu trabalho que grande parte dos tipos de ágar usados para solidificar os meios de cultura, apresentam substâncias deletérias à sobrevivência do pólen. Portanto, deve-se evitar a sua utilização ou então, lavá-los em água destilada. Entretanto, o meio sólido tem prevalecido entre os sistemas de suporte dos explantes.

A utilização de meio líquido segundo DUNWELL (26) apesar de proporcionar uma maior produção de calos, apresenta uma pequena porcentagem de regeneração de plantas. Entretanto, WERNICKE & KOLENBACH (93) verificaram que o meio líquido estimula a androgênese. À mesma conclusão chegaram SHAEFFER et alii (81) trabalhando com anteras de trigo.

RAJASEKARAN & MULLINS (76) cultivando anteras de uva em meio líquido, regeneraram plantas inteiras. Todavia, em anteras de feijoeiro cultivadas em meio líquido, HADDON & NORTHCOTE (39), apesar de verificarem o crescimento de calos, observaram uma alteração no crescimento das células aliada a uma acelerada perda do potencial morfogenético.

2.3.4. Idade e condições da planta doadora

A idade e as condições fisiológicas das plantas doado

ras exercem um profundo efeito na eficiência da androgênese. Por isso, o fotoperíodo, a temperatura e a intensidade luminosa devem ser ajustados para propiciar condições ideais ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Recomenda-se ainda, a utilização de botões florais de plantas no início do período do florescimento, NARAYANASWAMY & CHANDY (68) e DUNWELL (26).

BAJAJ (5) cita que a irrigação quinzenal das plantas com a solução nutritiva de HOAGLAND' , aumentou o vigor das plantas.

Ao trabalharem com cultura de anteras em batata, DUNWELL & SUNDERLAND (25) verificaram que as plantas cultivadas no inverno produziram flores anormais que abriam prematuramente ou caíam logo após sua emergência.

DUNWELL (25) trabalhando com anteras de fumo, obteve os melhores resultados quando cultivou as plantas doadoras em câmaras de crescimento com temperatura constante de 20 + 0,5°C , 14000 lux de intensidade luminosa e 16 horas de fotoperíodo.

Segundo SUNDERLAND (84), a manutenção de plantas sadias e vigorosas provavelmente está relacionada a uma alteração dos níveis hormonais endógenos. Entretanto, apesar das constatações de que fatores ambientais são importantes na obtenção das plantas doadoras dos micrósporos, os requerimentos ótimos para cada espécie são diferentes, não existindo condições gerais de recomendação, DUNWELL (26).

2.3.5. Pré-tratamento dos explantes

Tratamentos químicos e físicos das anteras anteriormente ou logo após a sua inoculação no meio de cultura, podem alterar a produção de plantas haplóides, COLLINS (20).

WANG et alii (91) submeteram botões florais de arroz à temperatura de 10°C durante 48 horas, para aumentar a frequência de indução de haplóides. Estudando o efeito da ação de substâncias químicas na androgênese em arroz, os mesmos autores verificaram um aumento da atividade embriogênica quando as anteras foram tratadas com o ácido 2-cloro-etilfosfônico.

Comparando o efeito de temperaturas altas e baixas na androgênese em aveia, RINES (79) verificou que o pré-tratamento a frio não promoveu um efeito indutivo nas anteras. O mesmo autor verificou ainda que submetendo as anteras a temperaturas até 35°C, nenhum resultado significativo foi observado. Resultados contraditórios foram observados por KELLER & ARMSTRONG (51), que submeteram anteras de Brassica campestris a temperaturas elevadas, verificando um aumento bastante significativo na embriogênese e recuperação de haplóides.

O efeito do tratamento a frio nos botões florais parece ter, segundo BAJAJ (5), um efeito inibitório na formação das fibras do fuso, causando em muitos casos, uma alteração na primeira mitose. O mesmo autor, ainda em ~~em~~ seu trabalho, comenta que o pré-tratamento a frio não induz a androgênese, mas aumenta a via-

bilidade do pólen cultivado. Por isso, o efeito deste tratamento é indireto, não sendo um pré-requisito para o sucesso da cultura de anteras.

2.3.6. Condições de incubação

As condições ótimas de incubação das anteras devem ser determinadas para cada espécie de planta.(20, 43 e 85), acreditam que a temperatura e a luminosidade são os principais fatores a serem observados durante a incubação. Entretanto, os autores mencionam ainda, a importância do volume atmosférico do recipiente, a densidade das anteras e a orientação do explante no sucesso da androgênese.

A temperatura é provavelmente a variável mais importante. Ao cultivarem anteras de trigo sob temperatura elevada, GENOVESI & MAGIL (33) observaram um aumento na frequência de formação de calo. Resultados semelhantes foram obtidos por HU & ZENG (43). Entretanto, ao trabalhar com espécies de Solanum, IRIKURA & SAKAGUCHI (44) utilizaram a temperatura de 20°C.

Geralmente a luz não é considerada na indução de plantas haplóides, embora existam trabalhos que comprovem a sua utilidade, COLLINS (20). GRESSHOFF & DOY (36) verificaram um aumento na frequência de indução de calo haplóide de uva quando as anteras foram iluminadas durante as primeiras 24 horas de incubação. Resultados contraditórios foram observados por RAJASEKARAN & MUL-

LINS (76) ao avaliarem o comportamento de anteras de híbridos de uva. A produção de calos foi mais rápida e abundante quando as anteras foram incubadas inicialmente no escuro.

GUHA & MUKHERJEE (38) incubaram anteras de arroz no escuro durante as três primeiras semanas, posteriormente as anteras foram transferidas para 10.000 lux de intensidade luminosa Procedimento semelhante foi efetuado por CAPPADOCIA & RAMULU (11) ao trabalharem com anteras de híbridos de tomate. As anteras foram mantidas no escuro durante a primeira semana de incubação e, em seguida, foram transferidas para condições anternativas de luminosidade (6.000 lux por 16 horas) e escuridão (8 horas). Um outro aspecto interessante foi observado neste trabalho. O sucesso da cultura de anteras somente foi alcançado quando as anteras (5) provenientes de um mesmo botão floral, foram colocadas juntas no mesmo tubo. Quando as anteras foram incubadas separadamente, elas degeneraram em um mês.

DUNWELL (26) verificou a importância da atmosfera dentro do recipiente de cultura. Trabalhando com anteras de fumo observou-se que o maior número de plântulas foi obtido com uma atmosfera dentro do tubo de 5,5 ml por antera. O pequeno volume de 0,5 ml por antera praticamente suprimiu a indução de embriões.

2.4. Regeneração de plantas

O principal obstáculo enfrentado pelas técnicas de

cultivo"in vitro"está relacionado com a baixa eficiência na regeneração de plantas e produção de haplóides em culturas de interesse econômico, BAJAJ (5).

Existem certos fatores que contribuem para o declínio na capacidade regenerativa das células em cultura, ou seja, o aumento no tempo de cultura e a presença em proporções elevadas de células não morfogênicas, WHITE (94).

Os genes responsáveis pela maneira em que os tecidos e órgãos cresçam ou exibam morfogênese"in vitro", não estão envolvidos exclusivamente com este propósito, caracterizando-se um caso de pleiotropia. Acredita-se que a influência dos genes em culturas de tecidos são secundárias em relação às suas funções normais. A atuação destes genes vem sendo relacionada à regulação dos níveis das substâncias de crescimento presentes nas plantas, GEORGE & SHERRINGTON (34).

Ao trabalhar com numerosos genótipos de milho, DUNCAN et alii (24) procuraram estabelecer uma correlação entre os genes responsáveis pela regeneração das plantas com os genes responsáveis pela germinação precoce das sementes. Entretanto, não foi verificada nenhuma correlação significativa.

Um aspecto interessante foi observado por GEORGE & SHERRINGTON (34) quando observaram que híbridos, quando comparados com linhagens endogâmicas, favorecem a formação de calo. Neste trabalho, os autores verificaram ainda, que a herdabilidade para o crescimento do calo de couve-flor foi de 0,47. DUNCAN et alii (24) também indicaram que a capacidade de formar calo regene

rável em milho tem uma base herdável.

A maior parte dos trabalhos envolvendo a cultura de anteras, com algumas exceções, tem apresentado um nível de frequência de haplóides bastante baixa, além de se verificar o aparecimento de poliplóides, aneuplóides e indivíduos albinos, OONO (71).

Segundo REINERT & BAJAJ (77), a ocorrência de indivíduos albinos está mais relacionada aos cereais. Ao trabalharem com anteras de trigo, SCHAEFFER et alii (81), observaram que 42% das plantas regeneradas eram albinas.

LIANG et alii (56) encontraram 95% de plântulas haplóides ao trabalharem com anteras de trigo. Os autores acreditam que os resultados positivos foram devidos ao pequeno período de incubação. Os mesmos 95% de plântulas haplóides foram encontrados por KASPERBAUER et alii (49) ao trabalharem com anteras de Festuca arundinaceae.

Apesar de alguns resultados significativos, SCHAEFFER (80) trabalhando com anteras de arroz, verificou que a regeneração de plântulas foi de apenas 1 a 2%. Resultados semelhantes foram observados por HANZEL et alii (40) ao trabalharem com cevada; IVERS et alii (45) que não verificaram a regeneração de nenhuma plântula de soja e ZAMIR et alii (96), que ao trabalharem com anteras de tomate, não verificaram a regeneração de nenhuma plântula haplóide, mas observaram que 90% das plântulas eram diplóides e que estas originaram-se da parede da antera.

Em seu trabalho sobre a influência do genótipo sobre

a regeneração de plantas de milho, DUNCAN et alii (24) indicaram que mesmos genótipos com baixa capacidade regenerativa podem produzir plantas desde que sejam feitas manipulações no meio e que sejam estabelecidas condições ótimas para cada genótipo.

2.5. Ploidia e instabilidade cromosômica

A determinação da ploidia das células a partir da contagem do número de cromosomas tem dificultado alguns trabalhos. MOK & MOK (62), ao identificarem cromosomas de feijão, comentaram que a observação de cromosomas na metáfase mitótica é bastante difícil em função do seu reduzido tamanho. Por isso, observaram as células na prófase meiótica. CHENG (17) comenta em seu trabalho a dificuldade de se usar células do pólen para a identificação cromosômica, devido ao pequeno tamanho dos cromosomas de feijão. PETERS et alii (73) enfrentaram uma grande dificuldade ao contar cromosomas de calos de feijoeiro devido ao baixo índice mitótico. Dificuldades semelhantes foram observadas em outras espécies por KOCHAR et alii (55) e NAKATA & TANAKA (67).

Repetidamente tem se observado que células em cultura exibem instabilidade cromosômica. Os maiores problemas enfrentados pela cultura de células haplóides são a manutenção da estabilidade durante as sub-culturas e maior regeneração de plantas, DAMATO (21).

A presença de plantas não haplóides ocorre frequente-

mente em muitas espécies, SUNDERLAND & DUNWELL (85) e DUNWELL(27). FELDMAN & SEARS (30) observaram a presença de aneuplóides derivados de anteras de trigo. Ao trabalharem com anteras de arroz, NIIZEKI & OONO (69) e NISHI & MITSUOKA (70) verificaram a presença de vários níveis de ploidia, variando de haplóides a pentaplóides. A regeneração de petúnias triplóides a partir da cultura de anteras foi observada por ENGVILD (28).

CHEN & CHEN (16) em seu trabalho sobre as alterações do número de cromosomas em calos de arroz ao longo de sucessivas subculturas, observaram uma redução de 98 para 69% de células haplóides após a quarta subcultura. Baseados nestes resultados, os autores sugeriram que as células haplóides além de serem instáveis durante as culturas, não são capazes de competir com células de outros níveis de ploidia.

A maioria das plantas obtidas a partir da cultura de anteras é oriunda dos micrósporos, sendo poucos os casos em que plantas diplóides derivadas da cultura de anteras originam-se de tecido somático, NIIZEKI & OONO (69). Para verificar qual a origem das plantas derivadas das anteras, ZAMIR et alii (96) citam que podem ser utilizados marcadores genéticos que permitem que sejam feitas observações morfológicas e enzimáticas (através de técnicas de eletroforese).

A utilização de uma substância que consiga manter a haploidia de células em cultura é um passo importante para o sucesso da androgênese. A possibilidade de se usar a para-fluor-fenilalanina (PFP) na tentativa de estabilizar as células haplóides

em cultura, tem causado resultados díspares, REINERT & BAJAJ(77). O uso do PFP em cultura de células de fumo com diversos níveis de ploidia, reduziu o crescimento de células diplóides e manteve inalterado o número de células haplóides, CARLSON et alii (13). Entretanto, DIX & STREET (23), apesar de observarem uma inibição no crescimento de células diplóides em culturas de Nicotiana sylvestris, não observaram alteração no crescimento das células haplóides, concluindo que não é o nível de ploidia mas o genótipo quem determina a sensitividade ao PFP.

2.6. Diploidização

Para a utilização de plantas haplóides em programas de melhoramento, faz-se necessário o restabelecimento da condição diplóide, JENSEN (46).

O desenvolvimento de um método eficiente para conversão de um grande número de haplóides em diplóides é um crítico pré-requisito para um uso prático dos haplóides em programas de melhoramento, BURK et alii (8).

O aparecimento de diplóides e poliplóides pode se dar espontaneamente através de endomitoses ou através da fusão dos núcleos polares a partir da cultura de ovários, BAJAJ (5). A ocorrência de endomitoses (duplicação cromosômica sem divisão nuclear) é comumente relatada na maioria dos trabalhos, indicando que a origem dos diplóides se dá a partir dos micrósporos, SUNDER

LAND & DUNWELL (85). O cultivo de segmentos de caules de plântulas haplóides induz a formação de calos que se diploidizam através de endomitoses (47, 50 e 55).

O uso de substâncias químicas tem sido bastante utilizado na tentativa de restauração da condição diplóide. A colchicina, uma substância inibidora das fibras de fuso, tem sido extensivamente usada, BAJAJ (5). O tratamento com colchicina é um método simples e rápido na produção de plantas diplóides, BURK et alii (8). As plantas haplóides podem ainda, ser tratadas com uma pasta de colchicina-lanolina 0,4% e aplicadas nas axilas das folhas,REINERT & BAJAJ (77). Apesar de sua larga utilização a colchicina apresenta algumas limitações como a mutagenicidade; perda de vigor em metade das linhagens de fumo diploidizadas e aparecimento de plantas com altos níveis de ploidia, BURK et alii (8).

2.7. Cultura de anteras e melhoramento de plantas

A obtenção de plantas a partir do cultivo "in vitro" de anteras é relativamente recente. Os primeiros trabalhos são datados do início da década de 70. Nos trabalhos realizados, a principal dificuldade encontrada tem sido a baixa regeneração de plantas haplóides e, em alguns casos, a não regeneração. Convém ressaltar ainda, problemas relacionados ao processo de diploidização.

A situação atual evoluiu bastante quando comparada

com os resultados iniciais. HU & ZENG (43) em seu trabalho, citam algumas variedades de arroz, milho, trigo, fumo e cana-de-açúcar, que já são cultivadas.

Uma das vantagens citadas da cultura de anteras (Figura 2) sobre o melhoramento convencional é a redução do tempo necessário à obtenção de linhas puras. Isto porque, o tempo gasto nas gerações de autofecundação para obtenção das linhagens é normalmente longo. Este aspecto, entretanto, está relacionado com o ciclo de cada cultura. No caso do feijão, podem ser feitos até 3 ciclos de autofecundação por ano. Sendo assim, o tempo necessário à obtenção das linhagens é inferior à uma cultura que apresente um ciclo de vida maior. No entanto, após a obtenção dos materiais diploidizados, requer-se um tempo adicional para a estabilização do material homozigótico e a avaliação das linhagens, FEHR (29). Desta maneira, este aspecto deve ser observado por ocasião do uso desta técnica em um programa de melhoramento.

Uma outra vantagem da cultura de anteras é comentado por FERNANDES (31). Segundo o autor, utilizando-se a cultura de anteras numa espécie autógama, o melhorista necessitaria da raiz quadrada do tamanho da população normalmente utilizada pelos métodos convencionais, para ter teoricamente, a mesma chance de selecionar o genótipo desejado. Isto porque, supondo que o material desejado seja AABB por exemplo, em uma população F_2, a sua freqüência seria de 1/16, e na cultura de anteras a freqüência do gameta AB seria de 1/4 (Figura 3).

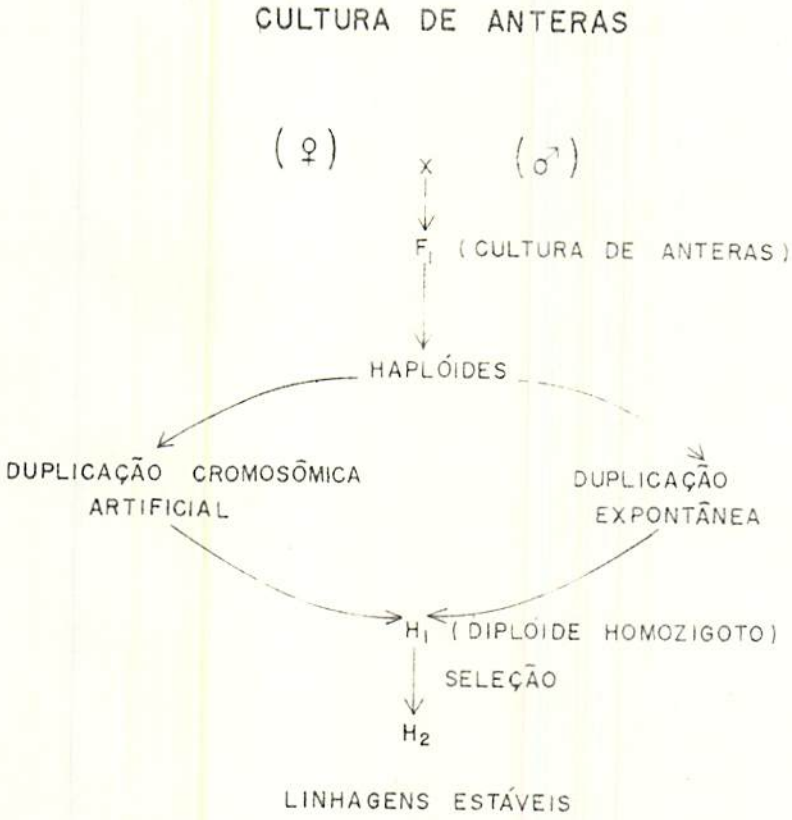


FIGURA 2 - Esquema de obtenção de linhagens pela técnica da cultura de anteras.

AAbb x aaBB (geração paternal)

↓

AaBb F_1

AB Ab | aB ab Gametas

↓ ↓

Autofecundação

↓

Genótipos possíveis após a autofecundação das plantas

Cultura de anteras

↓

Genótipos possíveis após a cultura de anteras

Plantas haplóides - AB; Ab; aB; ab

↓

Duplicação cromosômica

↓

Plantas diplódes - AABB; AAbb; aaBB; aabb

♀ \ ♂	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

FIGURA 3 - Tamanho necessário de uma população F_2, considerando dois genes, para se obter um genótipo desejado, FERNANDES (31).

Os melhoristas contra-argumentam dizendo que na geração F_2, a seleção não é comumente utilizada, principalmente se os caracteres possuírem herdabilidade baixa. E mesmo que ela seja realizada, o que se deseja é manter os alelos favoráveis, assim sendo, todo o genótipo que tiver os alelos A e B, não importa se em homozigose ou heterozigose, deve ser retirado. Neste caso, a probabilidade disto ocorrer é de 9/16, portanto, maior que 1/4. E ainda, ao se selecionar materiais em F_2, inúmeros locos estão em heterozigose, sendo portanto, passíveis de segregação.

É necessário comentar também que ao se trabalhar com a cultura de anteras deve-se levar em consideração o tamanho da população. No caso da freqüência de regeneração das anteras ser igual à intensidade de seleção efetuada pelo melhorista, na geração F_2, o número de plantas provenientes do cultivo "in vitro" deve ser proporcionalmente superior ao número de plantas utilizadas pelo melhoramento convencional. Isto deve-se ao fato de que procedendo-se uma seleção em uma população, são selecionados indivíduos heterozigóticos que, através da segregação, podem originar combinações desejáveis. No entanto, ao se regenerar plantas oriundas do cultivo "in vitro" e proceder a diploidização, as plantas apresentam-se na condição homozigótica. Desta forma, não há mais a possibilidade de se obter uma freqüência alélica desejável devido ao fato de não ser mais possível a ocorrência de segregação. Sendo assim, faz-se necessário um tamanho da população superior ao requerido pelo melhoramento convencional.

Um outro aspecto que deve ser observado é a ocorrência da androgênese em apenas alguns genótipos de uma população .

Não sendo influência do acaso, a regeneração de apenas alguns genótipos pode proporcionar uma restrição da variabilidade genética e comprometer o programa de melhoramento. Deve-se observar ainda, se há a ocorrência de ligação entre os genes responsáveis pela regeneração de plantas e genes relacionados a características desejáveis ou não. Neste caso, deve-se verificar a possibilidade de quebrar estas ligações através de permuta para o aparecimento de combinações alélicas desejáveis.

Dentre os métodos utilizados no melhoramento do feijoeiro, o método da população (BULK) e o método genealógico (PEDIGREE) são os mais amplamente utilizados. O método da população consiste em conduzir a população por algumas gerações utilizando uma mistura do material segregante da geração anterior. Este procedimento é repetido até ser atingido o nível desejado de homozigose, ALLARD (2). Ao final do processo são selecionadas massalmente às melhores plantas, cujos descendentes (progênies) são avaliados em ensaios com repetição. A ocorrência de seleção natural faz com que os indivíduos mais adaptados apresentem maior descendência. Desta forma, os materiais quando submetidos a 6 ou 8 ciclos de endogamia, apresentam maior adaptabilidade ao local onde o processo foi realizado. No caso da cultura de anteras isto não ocorre, já que todo o processo é realizado no laboratório e em casa de vegetação.

No método genealógico, a seleção inicia-se a partir da F_2. Os indivíduos selecionados são semeados em linha para a obtenção da geração seguinte no próximo plantio. Nesse plantio as linhas são selecionadas e dentro delas são identificadas as melho

res plantas. Este processo é repetido até a obtenção do nível de homozigose desejado. No final, as linhagens selecionadas são avaliadas em ensaios com repetição, FEHR (29). Neste método, como a seleção de caracteres de alta herdabilidade é feita a partir da F_2, o melhorista deve ter uma percepção sobre os efeitos do ambiente sobre a seleção, e caracteres com baixa herdabilidade podem mascarar a expressão fenotípica e comprometer o progresso da seleção, ALLARD (2). Com relação a cultura de anteras, este método também apresenta a vantagem de sofrer a ação da seleção natural, favorecendo a adaptação de alguns genótipos. Um outro aspecto é que por sofrer uma seleção já a partir da geração F_2, ao final do processo já foram eliminados inúmeros genótipos, facilitando a identificação das melhores progênies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no período de 1987 a 1988, no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, em Lavras, MG.

3.1. Material

Foram utilizadas quatro cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): Eriparza, Jalo, Carioca e Rio Vermelho. A escolha das cultivares foi baseada nas características de precocidade (Eriparza), flores grandes (Jalo), mais plantado (Carioca) e flores pequenas (Rio Vermelho). Todos os materiais foram provenientes do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do Departamento de Biologia da ESAL.

A semeadura foi feita em vasos situados no telado do Departamento de Biologia da ESAL. Foram cultivadas 3 plantas por vaso. Quinzenalmente eram feitas aplicações da solução de HOA-

GLAND e somente as plantas sadias e vigorosas no início do período de floração, forneceram botões florais para o cultivo "in vitro" das anteras.

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação do estádio de desenvolvimento dos micrósporos

Inicialmente procurou-se determinar o estádio de desenvolvimento dos micrósporos das quatro cultivares de feijoeiro estudadas. Objetivou-se identificar o tamanho do botão floral correspondente ao estádio uninucleado do micrósporo até a ocorrência da primeira mitose. Para tal, foram colhidos diversos tamanhos de botões florais, desde o início de sua formação até à sua quase abertura (Figura 4).

A fim de proporcionar uma melhor visualização e um bom contraste entre o núcleo e o citoplasma, foram utilizados os seguintes corantes: carmin-acético (2 e 4%); carmin-propiônico (2%); orceína-aceto-lática (1%) e reagente Feulgen.

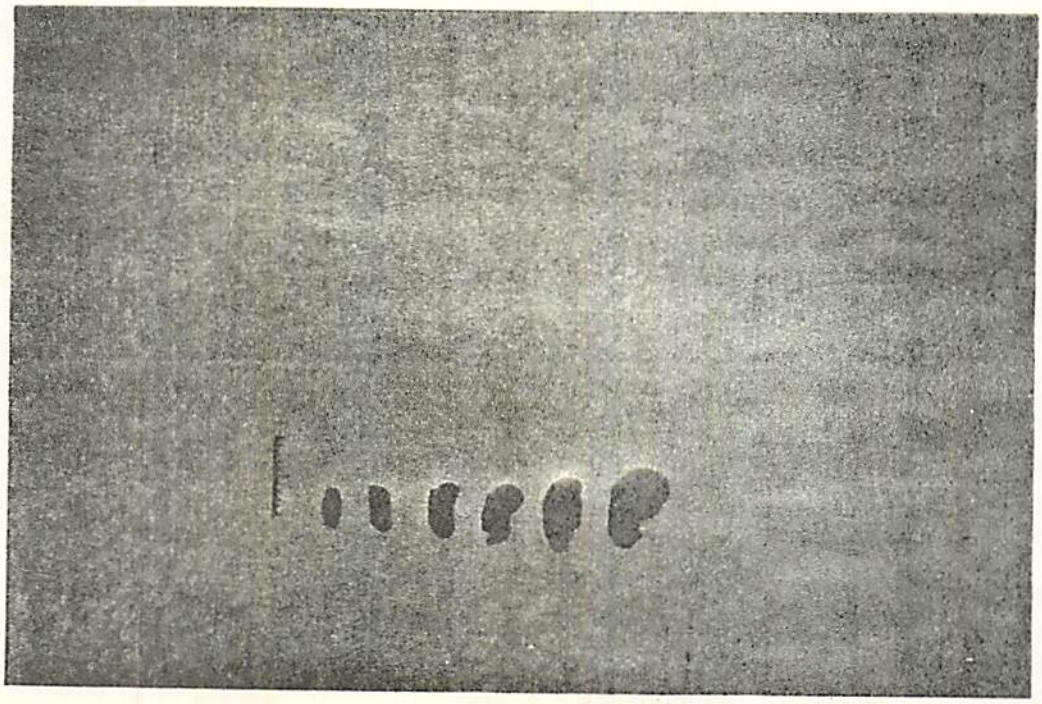


FIGURA 4 - Diferentes tamanhos de botão floral de feijoeiro usa - dos na calogênese. ESAL, Lavras-MG, 1989.

3.2.2. Assepsia do explante

Os botões florais selecionados foram submetidos ao processo de desinfestação através de uma solução 1% de NaOCl por um período de 15 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, os botões florais foram lavados quatro vezes em água destilada autoclavada. Em seguida, com o auxílio de um estereomicroscópio e pinças de ponta fina, foram removidos o perianto, estandarte, asas e quilhas. Durante este procedimento procurou-se não causar injúria às anteras, visto que poderia haver a formação de calos provenientes de outras partes além dos micrósporos.

3.2.3. Experimentos

Foram utilizados os sais e vitaminas do meio de VELIKY & MARTIN (90), conhecido como"67-V" e o meio básico de MURASHIGE & SKOOG (64), conhecido como"MS". Ao todo, foram testados 10 tratamentos (meios de cultura) subdivididos em três experimentos. O experimento 1 foi composto pelos tratamentos 1, 2 e 3. No segundo experimento foram utilizados os tratamentos 4, 5 e 6. O terceiro e último experimento foi composto pelos tratamentos 7, 8, 9 e 10. Os tratamentos foram os seguintes:

TRATAMENTO 1: Meio 67-V + 1 mg/l de 2,4-D

TRATAMENTO 2: Meio 67-V + 1 mg/l de 2,4-D+Extrato botões florais

TRATAMENTO 3: Meio 67-V + Extrato de botões florais

TRATAMENTO 4: Meio 67-V + 1 mg/l de 2,4-D + 1% carvão ativado

TRATAMENTO 5: Meio 67-V + 1% carvão ativado

TRATAMENTO 6: Meio 67-V + 1 mg/l de 2,4-D + 1% carvão ativado + extrato de botões florais

TRATAMENTO 7: Meio 67-V + Complemento 1

TRATAMENTO 8: Meio MS + Complemento 1

TRATAMENTO 9: Meio MS + Complemento 2

TRATAMENTO 10: Meio 67-V + Complemento 2

Complemento 1: 5 mg/l AIA + 1 mg/l Cinetina + 60 mg/l Arginina + 50 mg/l Ácido aspártico e 10 mg/l Cisteína

Complemento 2: 2 mg/l AIA + 0,2 mg/l Cinetina + 1 mg/l ANA + 1mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l Ácido glutâmico + 25 mg/l Glicina e 10 mg/l Histidina.

3.2.3.1. Utilização do extrato de botões florais na calogênese

Este experimento teve como objetivo avaliar a influência do extrato de botões florais em um meio utilizado na indução e formação de calo de feijoeiro (67-V). A presença de um extrato de botões florais em um meio de cultura pode favorecer a androgê-

nese visto que apresenta teores endógenos de fitohormônios e metabólitos.

Obtenção do extrato de botões florais

Foram coletados ao acaso, aproximadamente 100 botões florais de feijoeiro das 4 cultivares (aproximadamente 1,5 g), apresentando um comprimento entre 4 e 7 mm. Em seguida, foram desintegrados em um liquidificador contendo 100 ml de água destilada e filtrados em 3 camadas de gase. Posteriormente, o filtrado foi adicionado a 1 litro de meio.

No Experimento I foram inoculadas aproximadamente 5.000 anteras, divididas igualmente entre as quatro cultivares.

3.2.3.2. Efeito do carvão ativado na calogênese

Neste experimento procurou-se verificar o papel do carvão ativado na androgênese de feijoeiro. A partir da incorporação do carvão ativado no meio de cultura, a possibilidade de ocorrência de calogênese fica bastante reduzida. Desta forma, objetivou-se a ocorrência de androgênese direta.

No Experimento II foram inoculadas aproximadamente 3.000 anteras, divididas semelhantemente entre as cultivares estudadas.

3.2.3.3. Efeito dos meios "67-V" e "MS" modificados na formação de calos e morfogênese

Utilizando-se dos meios "67-V" e "MS" modificados, foram testadas algumas combinações de aminoácidos e reguladores de crescimento para promover a calogênese e/ou a morfogênese. Estabeleceu-se ainda, uma comparação entre os meios "67-V" e "MS" para verificar qual o melhor meio de cultura na indução, formação de calos e morfogênese.

No sétimo e oitavo tratamentos procurou-se promover a androgênese direta, enquanto que no nono e décimo tratamentos procurou-se observar a capacidade de indução e formação de calo.

Ao final do Experimento III foram inoculadas em torno de 4.800 anteras. Portanto, ao final dos três experimentos foram inoculadas aproximadamente 13.000 anteras de feijoeiro.

Os meios de cultura foram autoclavados a 120°C e 1,3 kg cm^{-2} por um período de 20 minutos, CAMARA, F.A.A. (10).

3.2.4. Condições de incubação

As anteras, em número de dez, provenientes de cada botão floral foram inoculadas em um mesmo tubo de ensaio, contendo 10 ml do meio em questão. Os tubos (2,5 x 15,0 cm) foram selados

com parafilm e armazenados em câmaras, apresentando temperatura de 25 $\pm$ 1°C em 12 horas de fotoperíodo sob luz branca fria, com intensidade luminosa de 2.400 lux. Foram inoculados aproximadamente 120 tubos por tratamento.

Os materiais contaminados foram descartados e o efeito dos tratamentos foi avaliado aproximadamente aos 45 dias após a inoculação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Tamanho do botão floral e estádio de desenvolvimento dos micrósporos

Devido a falta de informação a respeito de uma correlação entre o estádio do micrósporo e um aspecto morfológico do feijoeiro, procurou-se associar o tamanho do botão floral com o desenvolvimento dos seus micrósporos.

Ao se testarem os corantes, constatou-se que o carmin acético 2% propiciou a melhor visualização do núcleo. A partir de observações citológicas estabeleceu-se o tamanho do botão floral de 4 a 7mm para as quatro cultivares de feijão. Apesar de haver uma variação no tamanho dos botões florais das cultivares, este intervalo corresponde ao estádio uninucleado até a ocorrência da primeira mitose. Ao trabalharem com a variedade Bico de Outo, PETERS et alii (73) estabeleceram o tamanho do botão floral em 6mm. Sendo assim, faz-se necessária a realização de estudos citológicos para cada genótipo devido a variação observada (Figura 5).

FIGURA 5 - Estádios uni e binucleados dos micrósporos de feijoeiro correspondentes ao tamanho dos botões florais de 4 e 7 mm respectivamente. ESAL, Lavras-MG, 1989.

4.2. Experimentos

4.2.1. Experimento 1

A utilização do extrato de anteras e botões florais vem sendo relatada com algum sucesso em trabalhos de cultura de anteras. Entretanto, ao se utilizar um extrato de botões florais para favorecer a androgênese em feijoeiro, pode-se observar que este procedimento proporcionou uma total inibição na indução e formação de calo (Quadro 1).

Por ser um material jovem, acredita-se que os botões florais tenham um metabolismo elevado com uma grande síntese de fitohormônios. Contudo, um efeito inibitório deste tratamento foi observado a partir do momento em que o extrato de botões florais foi incorporado ao meio de cultura. Portanto, é de se esperar que haja a presença de substâncias inibidoras que afetam a androgênese.

Um outro aspecto observado neste experimento foi a variação na resposta das cultivares. Somente nas cultivares Eriparza e Jalo foi verificada a formação de calo, indicando a necessidade de se adequar condições específicas para cada genótipo. Algumas considerações podem ser feitas baseadas nestes resultados. Primeiramente, pode-se supor que as cultivares Eriparza e Jalo, por serem as únicas a formar calo, apresentem genes comuns para a indução de tecido caloso "in vitro" ou que sejam derivadas de um ancestral comum. Em segundo lugar, apesar de se utilizar 1 mg/l de

QUADRO 1 - Influência das cultivares e meios de cultura com extrato de botões florais na androgênese de feijoeiro. ESAL, Lavras-MG, 1989.

Genótipo	Tratamento (meio cultura)	Nº anteras inoculadas (não contaminadas)	Frequência de calos/nº de tubos (%)
Eriparza	1	541	40,0
	2	475	0,0
	3	250	0,0
Jalo	1	477	12,2
	2	243	0,0
	3	246	0,0
Carioca	1	291	0,0
	2	253	0,0
	3	242	0,0
Rio Vermelho	1	484	0,0
	2	249	0,0
	3	246	0,0

Meio 1: 67-V + 1 mg/l de 2,4-D

Meio 2: 67-V + 1 mg/l de 2,4-D + extrato de botões florais

Meio 3: 67-V + extrato de botões florais.

2,4-D este não foi capaz de promover a calogênese nas cultivares Carioca e Rio Vermelho. O uso de 2,4-D no meio favorece a formação de calo, REINERT & BAJAJ (76).

4.2.2. Experimento 2

No presente trabalho entretanto, a presença do carvão ativado não promoveu a indução das anteras. Ao se trabalhar com o carvão ativado no meio de cultura, era esperada a ocorrência de morfogênese, pois sua presença favorece a androgênese direta. No entanto, durante o período de incubação, as anteras permaneceram com o mesmo aspecto que apresentavam por ocasião da inoculação(Figura 6). Este fato pode estar relacionado com a capacidade do carvão em absorver substâncias. No caso, poderia ter havido a absorção de substâncias importantes presentes no meio que seriam necessárias à indução das anteras.

4.2.3. Experimento 3

Neste experimento pode-se observar a calogênese em todos os tratamentos (7, 8, 9 e 10) a que foram submetidas as cultivares Eriparza e Jalo, indicando, como no experimento 1, uma certa homogenia entre estas cultivares. Para a cv Carioca, a forma -

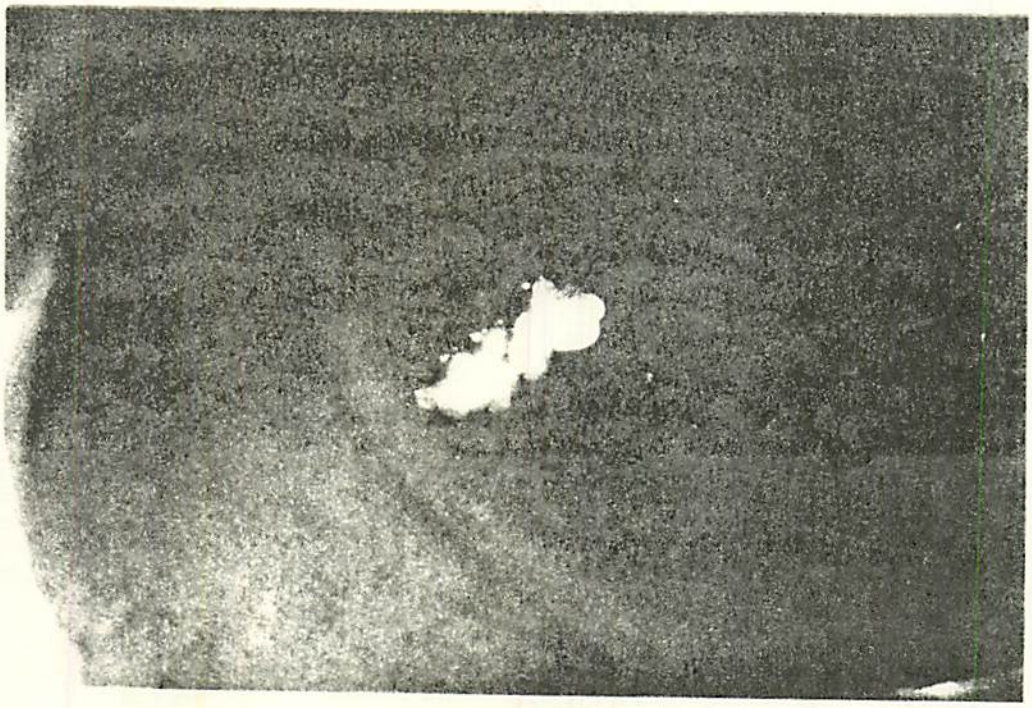


FIGURA 6 - A presença de carvão ativado no meio de cultura não promoveu a calogênese em anteras de feijoeiro. ESAL, Lavras-MG, 1989.

ção de calo somente foi observada nos tratamentos 7 e 9, apesar de apresentar uma freqüência muito baixa. Na cv Rio Vermelho não foi observada nenhuma formação de calo (Quadro 2). Esta variação nas respostas das cultivares indica a ocorrência de variabilidade genética para a regeneração de plantas entre os materiais estudados. Como não foi observada a formação de calo na cv Rio Vermelho e em freqüência muito baixa na Carioca, faz-se necessário a realização de estudos básicos e o estabelecimento de novas metodologias, visto que os tratamentos utilizados não foram capazes de promover a calogênese. Este aspecto está provavelmente associado ao fato das substâncias presentes no meio não serem capazes de ativar os genes relacionados a regeneração de plantas "in vitro".

Ao se observar os resultados obtidos neste experimento, pode-se observar que as freqüências de formação de calos foram superiores àquelas obtidas no experimento 1, notadamente nos tratamentos 7 e 8 para a cv Eriparza e nos tratamentos 7, 8 e 10 para a cv Jalo.

Um aspecto observado em todos os tratamentos que formaram calo foi que de maneira geral, os calos provenientes do meio "MS" apresentaram um melhor aspecto, com uma coloração clara, enquanto que uma significativa parte dos calos oriundos do meio "67-V" apresentou uma coloração escura, sendo que em vários calos, foi detectada a ocorrência de necrose. Como a aparência do calo influi diretamente na sua manutenção e regeneração de plantas, os trabalhos com calos provenientes do meio "67-V" certamente enfrentarão maiores dificuldades (Figura 7).

QUADRO 2 - Influência das cultivares e meios de cultura com extrato de botões florais na calogênese de feijoeiro. ESAL, Lavras-MG, 1989.

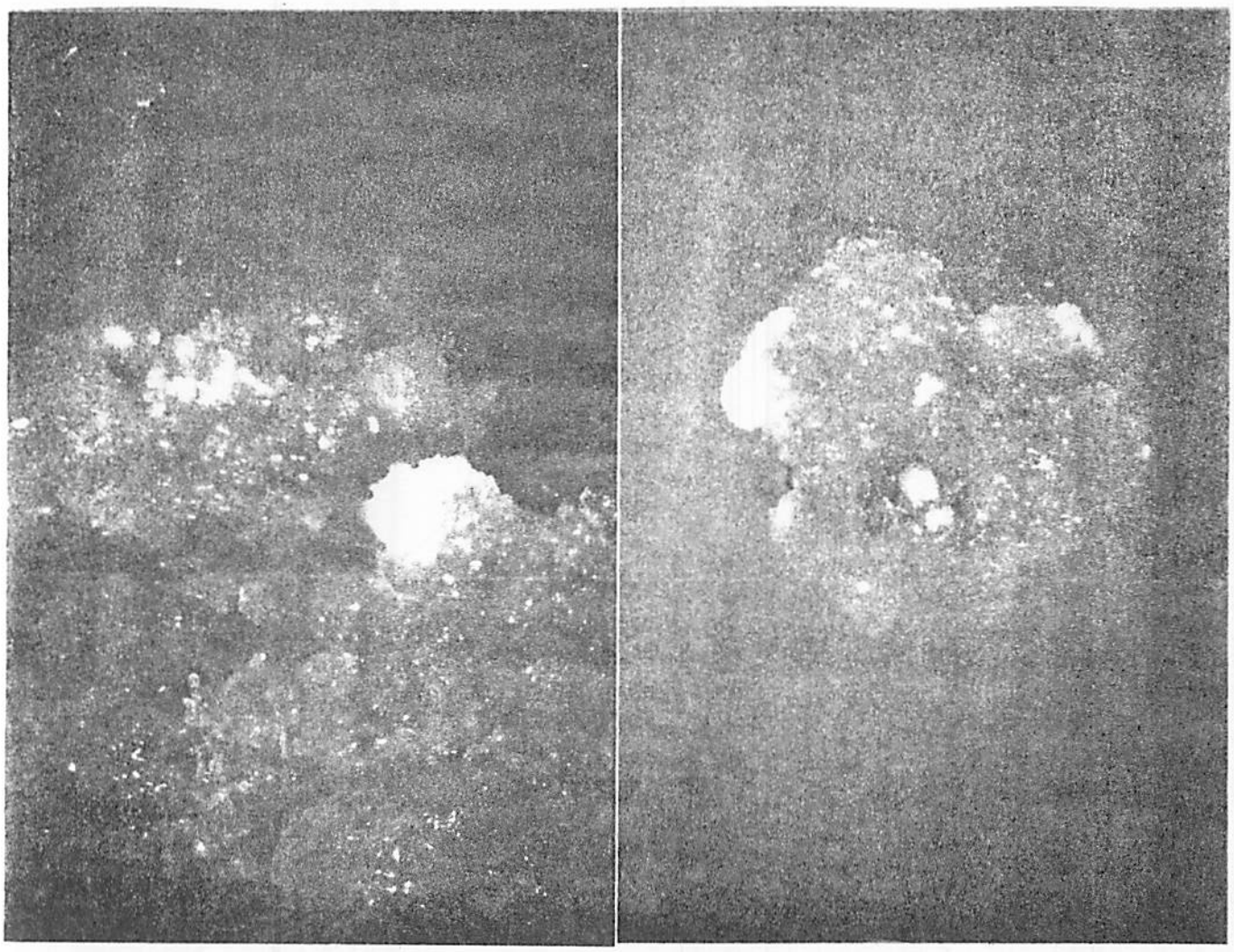
Genótipo	Tratamento (meio cultura)	Nº anteras inoculadas (não contaminadas)	Frequência de calos/nº de tubos (%)
Eriparza	7	258	61,5
	8	249	65,1
	9	391	17,5
	10	264	3,7
Jalo	7	228	56,5
	8	258	30,8
	9	338	11,8
	10	205	23,8
Carioca	7	239	4,2
	8	190	0,0
	9	441	2,2
	10	197	0,0
Rio Vermelho	7	251	0,0
	8	179	0,0
	9	329	0,0
	10	215	0,0

Meio 7: Meio 67-V + Complemento 1

Meio 8: Meio MS + Complemento 1

Meio 9: Meio MS + Complemento 2

Meio 10: Meio 67-V + Complemento 2.



(a) (b)

FIGURA 7 - Calos da cultivar Eriparza provenientes dos meios "67-V" (a) e "MS" (b). ESAL, Lavras-MG, 1989.

4.3. Aspectos citológicos do calo

A determinação do ploidia em calo de feijoeiro é um aspecto que merece algumas considerações. O calo apresenta algumas regiões meristemáticas, havendo portanto, a necessidade de identificá-las para a observação de mitoses. Entretanto, apesar de inúmeras tentativas, não foi possível a identificação de células em divisão. Dificuldades semelhantes foram observadas por PETERS et alii (73) que verificaram o baixo índice mitótico do calo de feijoeiro bem como o reduzido tamanho dos cromosomas.

4.4. Indução das anteras e diferenciação do calo

A indução das anteras e formação de calo somente foi observada nas cultivares Eriparza, Jalo e Carioca e em apenas alguns meios testados (Figura 8).

Apesar de ser verificada a formação de calos em vários tratamentos, a diferenciação do calo foi observada apenas na cultivar Eriparza que foi cultivada com o tratamento 8. Neste fato inédito em trabalhos com cultura de anteras de feijoeiro, foi observada a formação de raiz em apenas um tubo (Figura 9). Entretanto não observou-se a ocorrência de androgênese. O meio de cultura 8, segundo TONIN et alii (86), foi o melhor meio utilizado na morfogênese de folhas de feijoeiro cultivadas "in vitro". Nes-

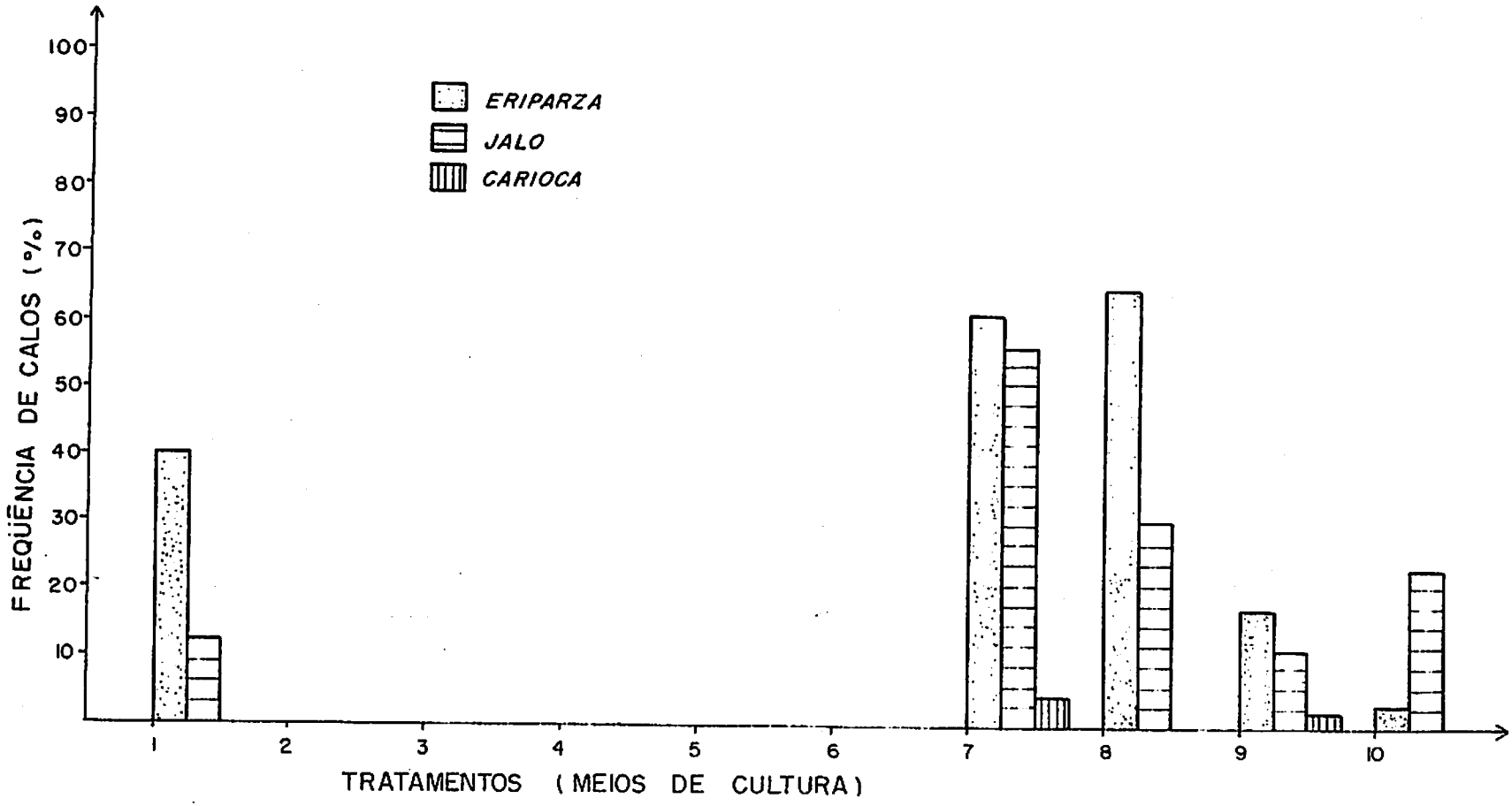


FIGURA 8 - Histograma das freqüências de calos observadas nas cultivares Eriparza Jalo e Carioca em função dos tratamentos usados. ESAL, Lavras-MG, 1989.

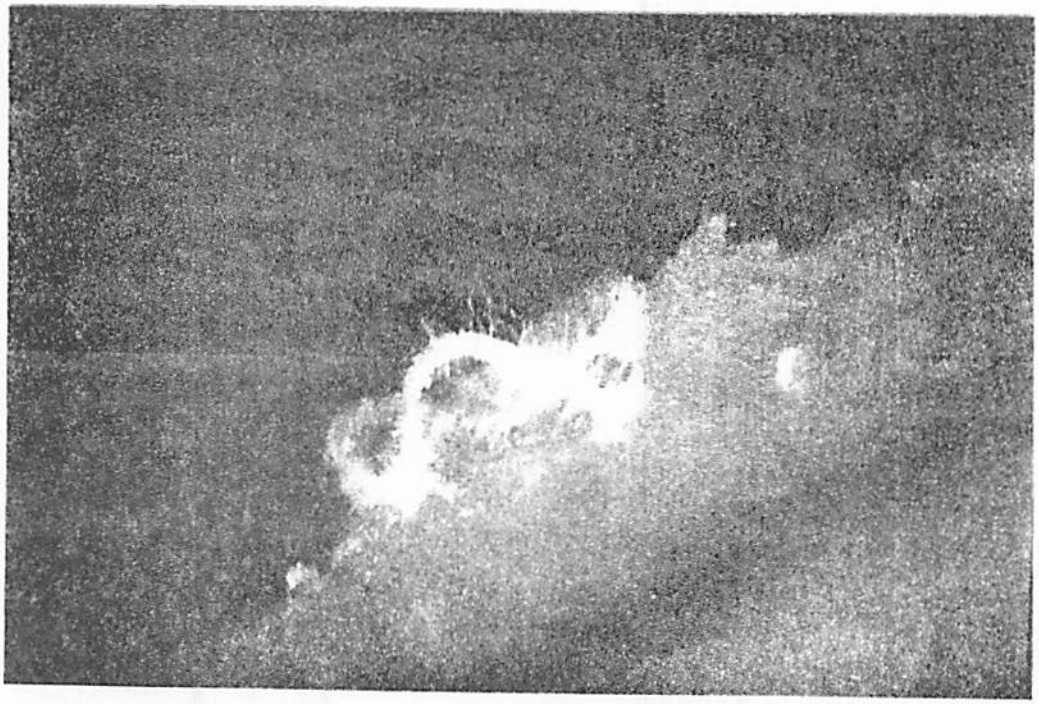


FIGURA 9 - Presença de raiz em calo da cultivar Eriparza obtido no meio de cultura 8. ESAL, Lavras-MG, 1989.

te meio, a relação 5:1 auxina-citocinina deve ter sido um fator importante na ocorrência deste fato.

Um outro aspecto que pode estar relacionado à formação da raiz, refere-se ao fato do calo ser proveniente do meio "MS".

Apesar da ocorrência de rizogênese em um calo da cv Eriparza, são necessários estudos básicos para o estabelecimento de uma metodologia eficiente para o sucesso dos trabalhos de cultura de anteras de feijoeiro. Sendo assim, problemas com a regeneração de plantas e diploidização do material possam ser superados e todo o potencial deste método venha a ser explorado nos programas de melhoramento.

5. CONCLUSÕES

1. O tamanho do botão floral de 4 a 7 mm corresponde ao intervalo entre o estádio uninucleado e a ocorrência da primeira mitose, para as cultivares estudadas.

2. Existe diferença entre as cultivares no que se refere à capacidade calogenética, indicando que a constituição genotípica exerce influência no sucesso dos trabalhos.

3. Com relação aos meios de cultura testados pode-se concluir que:
   - a utilização do extrato de botões florais não promoveu a indução e a formação de calo;
   - o carvão ativado não promoveu a calogênese;
   - os calos provenientes do meio "MS" apresentaram um melhor aspecto que os calos oriundos do meio "67-V".
   - dentre os meios testados o meio de cultura 8 apresentou os melhores resultados.

6. RESUMO

EFEITO DE CULTIVARES E MEIOS DE CULTURA NA INDUÇÃO DE CALOS DE ANTERAS DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Autor: MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO

Orientadores: Prof. Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Prof. Dr. Moacir Pasqual

Anteras de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) das cultivares Eriparza, Jalo, Carioca e Rio Vermelho foram cultivadas "in vitro" com o objetivo de obter plantas haplóides.

Inicialmente, determinou-se o tamanho dos botões florais de 4 a 7 mm como correspondente ao estádio uninucleado do micrósporo até a ocorrência da primeira mitose.

No primeiro experimento procurou-se estudar o efeito de um extrato de botões florais na androgênese. Para isso, foram testados os seguintes meios de cultura: 1) meio 67-V + 1 mg/l de 2,4-D; 2) meio 67-V + 1 mg/l de 2,4-D + extrato de botões florais; 3) meio 67-V + extrato de botões florais. Os resultados indicaram

um efeito inibitório à formação de calos.

No segundo experimento estudou-se a resposta das anteras à presença do carvão ativado. Desta forma foram utilizados os tratamentos: 4) meio 67-V + 1 mg/l de 2,4-D + 1% de carvão ativado; 5) meio 67-V + 1% de carvão ativado; 6) meio 67-V + 1 mg/l de 2,4-D + 1% de carvão ativado + extrato de botões florais. Não foi observado nenhum sinal de calogênese, sendo que as anteras permaneceram com o mesmo aspecto que apresentavam por ocasião da inoculação.

No terceiro experimento foram testados os meios: 7) meio 67-V + 5 mg/l de AIA + 1 mg/l de cinetina + 60 mg/l de arginina + 50 mg/l de ácido aspártico e 10 mg/l de cisteína; 8) meio MS + 5 mg/l de AIA + 1 mg/l de cinetina + 60 mg/l de arginina + 50 mg/l de ácido aspártico e 10 mg/l de cisteína; 9) meio MS + 2 mg/l de AIA + 0,2 mg/l de cinetina + 1 mg/l de ANA + 1 mg/l de 2,4-D + 0,5 mg/l de ácido glutâmico + 25 mg/l de glicina e 10 mg/l de histidina; 10) meio 67-V + 2 mg/l de AIA + 0,2 mg/l de cinetina + 1 mg/l de ANA + 1 mg/l de 2,4-D + 0,5 mg/l de ácido glutâmico + 25 mg/l de glicina e 10 mg/l de histidina, para promover a morfogênese e formação de calo. Dentre os meios testados, o que promoveu a melhor calogênese foi o meio de cultura 8. Geralmente, os calos provenientes do meio "MS" apresentaram um melhor aspecto, com uma coloração clara, enquanto que os calos oriundos do meio 67-V apresentaram em grande parte, uma coloração mais escura. Foi observado no meio 8, a formação de raiz a partir de um dos calos da cv Eriparza.

Os resultados mostraram ainda, uma variação na capacidade de calogênese por parte das cultivares, indicando que a constituição genotípica dos materiais apresenta uma influência no sucesso da calogênese.

7. SUMMARY

EFFECTS OF CULTIVARS AND CULTURE MEDIA ON ANTHER CALLUS INDUCTION OF DRY BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.)

Author: MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO

Advisers: Prof. Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Prof. Dr. Moacir Pasqual

Dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) anthers from four cultivars (Eriparza, Jalo, Carioca and Rio Vermelho) were cultured in vitro with the purpose of obtaining haploid plants.

At the beginning it was determined the size of the floral buds at 4 to 7 mm corresponding to the uninucleate stage of the microspore until the occurrence of the first mitosis.

The first experiment aimed to study floral bud extract effects on androgenesis. The following culture media were tested: 1) 67-V medium + 1 mg/l 2,4-D; 2) 67-V medium + 1 mg/l 2,4-D + floral bud extract; 3) 67-V medium + floral bud extract. Results indicated an inhibitory effect toward the development of

the anthers.

The second experiment studied the anthers response to the activated charcoal. The following treatments were tested: 4) 67-V medium + 1 mg/l 2,4-D + 1% activated charcoal; 5) 67-V medium + 1% activated charcoal; 6) 67-V medium + 1 mg/l 2,4-D + 1% activated charcoal + floral bud extract. No response was observed and anthers remained the same as when they were inoculated.

The third experiment was set up to test the medium: 7) 67-V medium + 5 mg/l IAA + 1 mg/l kinetin + 60 mg/l arginine + 50 mg/l aspartic acid + 10 mg/l cysteine; 8) MS medium + 5 mg/l IAA + 1 mg/l kinetin + 60 mg/l arginine + 50 mg/l aspartic acid + 10 mg/l cysteine; 9) MS medium + 2 mg/l IAA + 0,2 mg/l kinetin + 1 mg/l NAA + 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l glutamic acid + 25 mg/l glycine + 10 mg/l hystidine; 10) 67-V medium + 2 mg/l IAA + 0,2 mg/l kinetin + 1 mg/l NAA + 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l glutamic acid + 25 mg/l glycine + 10 mg/l hystidine, to promote morphogenesis and callus formation. Among the various media tested, the number 8 promoted the best calogenesis. Normally, the callus from "MS" medium showed a better aspect, with a clear color, while the "67-V" callus showed a dark coloration. It was also observed root formation from one callus of Eriparza cultivar in medium 8.

The results still showed a great variation among the cultivars with respect to the callogenesis potential, indicating that the genotypic constitution has influence on callogenesis success.

[redacted]

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABO EL-NIL, M.M. & HILDEBRANDT, A.C. Origin of androgenetic callus and haploid geranium plants. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 51(11):2107-9, Nov. 1973.

2. ALLARD, R.W. Princípios do melhoramento genético das plantas. São Paulo, Ed. Edgard Blücher, 1971. 371p.

3. ANAGNOSTAKIS, S.L. Haploid plants from anthers of tobacco enhancement with charcoal. Planta, Berlin, 115:281-3, 1974.

4. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1986. Rio de Janeiro, FIBGE, v.47, 1987. 627p.

5. BAJAJ, Y.P.S. In vitro production of haploids. In: EVANS, D. A.; SHARP, W.R.; AMIRATO, P.V. & YAMADA, Y. Handbook of plant cell culture. New York, Macmillan Publishing Company, 1984. v.1, p.228-87.

6. BARWALE, V.B.; KERNS, H.R. & WIDHOLM, J.M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via em - briogenesis and organogenesis. Planta, Berlin, 167(4):473-81, Apr. 1986.

[redacted]

7. BREWBAKER, J.L. & KWACK, B.H. The calcium ion and substances incluencing pollen growth. In: LINSKENS, H.F., ed. Pollen physiology and fertilization. Amsterdam, North Holland, 1964. p.143-51.

8. BURK, L.G.; GWYNN, G.R. & CHAPLIN, J.F. Diploidized haploids from asseptically cultured anthers of Nicotiana tabacum. The Journal of Heredity, Washington, 63(6):355-60, 1972.

9. BUTLER, E.E. & BIKAN, H. A medium for heterocaryon formation in Rhizoctonia solani. Phytopathology, Lancaster, 63:542-4, 1973.

10. CAMARA, F.A.A. Obtenção de plantas de alho (Allium sativum L.) a partir de meristemas e microbulbificação in vitro. Lavras, ESAL, 1987. 55p. (Tese MS).

11. CAPPADOCIA, M. & RAMULU, K.S. Plant regeneration from in vitro cultures of anthers and stem internodes in an interespecific hybrid, Lycopersicon esculentum L. x L. peruvianum MILL. adn cytogenetic analysis of the regenerated plants. Plant Science Letters, Amsterdam, 20(2):157-66, Dec. 1980.

12. CARLSON, P.S. & POLACCO, J.C. Plant cell cultures: genetic aspects of crop improvement. Science, Lancaster, 188 (4188):622-5, May 1975.

13. _____; SMITH, H.H. & DEARING, D.D. Parasexual interspecific plant hibridization. Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington, 69:2292-4, 1972.

14. CHAPHAM, D. Haploid Hordeum plants from anthers in vitro. Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung, Berlin, 69:142-55, 1973.

15. CHEN, C.C. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. Crop Science, Madison, 18 (5):905-6, Sep./Oct. 1978.

16. CHEN, CHI-CHIANG & CHEN, CHUNG-MONG. Changes in chromosome number in microspore callus of rice during successive subcultures. Canadian Journal of Genetics and Citology, Ottawa, 22(4):607-14, Oct./Dec. 1980.

17. CHENG, S.S. Cytogenetics studies of common bean (Phaseolus vulgaris L.) and the scarlet runner bean (Phaseolus coccineus). Gainsville, University of Florida, 1979, 90p. (Ph.D. Thesis).

18. CHIH-CHING, CHU. Haploids in plant improvement. In: VASIL, I.K.; SCOWCROFT, W.R.; FREY, K.J., ed. Plant improvement and somatic cell genetics. Orlando, Academic Press, 1981. Cap.7, p.129-58.

19. CHUANG, C.C.; OUYANG, T.W.; CHIA, H.; CHOU, S.M. & CHING, C. K. A set of potato media for wheat anther culture. In: PROCEEDINGS OF SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE. Beijing Science Press, 1978. p.51-6.

20. COLLINS, G.B. Production and utilization of anther-derived haploids in crop plants. Crop Science, Madison, 17(4):583-6, July/Aug. 1977.

21. D'AMATO, F. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organs culture. Heidelberg, Springer-Verlag, 1977. p. 343-57.

22. DEVREUX, M. New possibilities for the in vitro cultivation of plants. Euro Spectra, 9:105-10, 1970.

23. DIX, P.J. & STREET, H.E. Effects of p-fluorophenylalanine on the growth of cell lines differing in ploidy and derived from Nicotiana sylvestris. Plant Science Letters, Amsterdam, 3:283-8, 1974.

24. DUNCAN, D.R.; WILLIAMS, M.E.; ZEHR, B.E. & WIDHOLM, J.M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous Zea mays genotypes. Planta, Berlin, 165(3):322-32, Aug. 1985.

25. DUNWELL, J.M. Anther culture in Nicotiana tabacum: the role of the culture russel atmosphere in pollen embryo induc - tion and growth. Journal of Experimental Botany, Oxford, 30(116):419-28, June 1979.

26. _____. Haploid cell cultures. In: DIXON, R.A. Plant cell culture - a practical approach. Oxford, Irl. Press, 1985. p.21-35.

27. _____ & SUNDERLAND, N. Anther culture of Solanum tubero - sum L. Euphytica, Wageningen, 22(2):317-23, June 1973.

28. ENGVILD , K.C. Triploid petunias from anther cultures. He - reditas, London, 74:144-7, 1973.

29. FEHR, W.R. Principles of cultivar development: theory and technique. New York, Macmillan Pub.Co., 1987. v.1, 536p.

30. FELDMAN, M. & SEARS, E.R. The wild gene resources of wheat. Scientific American, New York, 244(1):102-13, Jan. 1981.

31. FERNANDES, M.I.B. de M. Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 22(9/10):881-96, set./out. 1987.

32. GENOVESI, A.D. & COLLINS, G.B. In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. Crop Science, Madison, 22(6):1137-44, Nov./Dec. 1982.

33. _____ & MAGILL, C.W. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. Crop Science, Madison, 19(5):662-64, Sep./Oct. 1979.

34. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture. Eversley, Eastern Press, 1984. 709p.

35. GRESSHOFE, P.M. & DOY, C.H. Development and differentiation haploid Lycopersicon esculentum (tomato). Planta, Berlin, 107:161-70, 1972.

36. GRESSHOFF, P.M. & DOY, C.H. Derivation of a haploid cell line from Vitis vinifera and the importance of the stage of meiotic development of anther for anther culture of this and other genera. Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie, Jena, 73:132-41, 1974.

37. GUHA, S. & MAHESHWARI, S.C. In vitro production of embryos from anthers of Datura. Nature, London, 204:497, 1964.

38. GUHA-MUKHERJEE, S. Genotypic differences in the in vitro formation of embryoids from rice pollen. Journal of Experimental Botany, Oxford, 24(78):139-44, Feb. 1973.

39. HADDON, L. & NORTHCOTE, D.H. The effect of growth conditions and origin of tissue on the ploidy and morphogenetic potential of tissue cultures of bean (Phaseolus vulgaris L.). Journal of Experimental Botany, Oxford, 27(100):1031-51, Oct. 1976.

40. HANZEL, J.J.; MILLER, J.P.; BRINKMAN, M.A. & FENDOS, E. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. Crop Science, Madison, 25(1):27-31, Jan./Feb. 1985.

41. HE, D.G. & OUYANG, J.W. Effect of stages of anther development on anther culture of wheat (Triticum aestivum L.). In: ANNUAL REPORT OF THE INSTITUTE OF GENETICS. Beijing, Academia Sinica, 1979. p.74.

42. HIM HIM, P.V. Determinação de metodologias para cultura de anteras de tomateiro (Lycopersicon esculentum MILL). Piracicaba, ESALQ-USP, 1987. 129p. (Tese de Doutorado).

43. HU, H. & ZENG, J.Z. Development of new varieties via anther culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMIRATO, P.V. & YAMADA, Y. Handbook of plant cell culture. New York, Macmillan Publishing Company, 1984. v.3. p.65-90.

44. IRIKURA, Y. & SAKAGUCHI, S. Induction of 12-chromosome plants from anther culture in a tuberous Solanum. Potato Research, New Brunswick, 15:170-3, 1973.

45. IVERS, D.R.; PALMER, R.G. & FEHR, W.R. Anther culture in soy beans. Crop Science, Madison, 14(6):891-3, Nov./Dec. 1974.

46. JENSEN, C.J. Chromosome doubling techniques in haploids. In: KASHA, K.J., ed. Haploids in higher plants: advances and potentials. Guelph, Univeristy of Guelph, 1974. p. 153-90.

47. KAMEYA, T. & HINATA, K. Induction of haploid plants from pollen grains of Brassica. The Japan Journal of Breeding, Tokyo, 20:82-7, 1970.

48. KASHA, K.J. & KAO, K.N. High frequency haploid production in barley (Hordeum vulgare L.). Nature, London, 225:874-6, 1970.

49. KASPERBAUER, M.J.; BUCKNER, R.C. & SPRINGER, W.D. Haploid plants by anther panicle culture of tall fescue. Crop Science, Madison, 20(1):103-7. Jan./Feb., 1980.

50. KASPERBAUER, M.J. & COLLINS, G.B. Reconstitution of diploids from leaf tissue of anther-derived haploids in tobacco. Crop Science, Madison, 12(1):98-101, Jan./Feb. 1972.

51. KELLER, W.A. & ARMSTRONG, K.C. Stimulation of embryogenesis and haploid production in Brassica campestris anther cultures by elevated temperature treatments. Theoretical Applied Genetics, Berlin, 55:65-7, 1979.

52. _____; RAJHATHY, T. & LACAPRA, I. In vitro production of plants from pollen in Brassica campestris. Canadian Journal of Genetics and Citology, Ottawa, 17:55-66, 1975.

53. KIMBER, G. & RILEY, R. Haploid angiosperms. The Botanical Review, Lancaster, 90:480-531, 1963.

54. KNOX, R.B. Pollen-pistil interactions. In: LINSKENS, H.F. & HESLOP-HARRISON, J., ed. Cellular interactions. New York, Springer-Verlag, 1984. v.17. p.508-92. (Encyclopedia of Plant Physiology. New Series).

55. KOCHAR, T.; SABHARWAL, P. & ENGELBERG, I. Production of homozygous diploid plants by tissue culture technique. The Journal of Heredity, Washington, 62:59-61, 1971.

56. LIANG, G.H.; XU, A. & TANG-HOANG. Direct generation of wheat haploids via anther culture. Crop Science, Madison, 27(2): 336-9, Mar./Apr. 1987.

57. LIAU, DENG-FONG & BOLL, W.G. Callus and cell suspension culture of bush bean (Phaseolus vulgaris). Canadian Journal of Botany, Ottawa, 48(6):1119-30, June 1970.

58. MAGDON, M.L. & KHANNA, K.R. Haploids. Caryologia, Firenze, 16:191-235, 1963.

59. MAHESHWARI, S.G.; TYAGI, A.K. & MALHOTRA, K. Induction of haploidy from pollen grains angiosperms - the current status. Theoretical Applied Genetics, Berlin, 58:193-206, 1980.

60. MALAVOLTA, E. Nutrição mineral. In: FERRI, M.G. Fisiologia vegetal 1. 2.ed. rev.atu. São Paulo, EPU, 1979. p.97-114.

61. MASCARENHAS, J.P. RNA and protein synthesis during pollen development and tube growth. In: HESLOP HARRISON, J., ed. Pollen; development and physiology. London, Butterworth, 1971. p.201-2.

62. MOK, D.W.S. & MOK, M.C. A modified Giemsa technique for identifying bean chromosomes. The Journal of Heredity, Washington, 67(3):187-8, May/June 1976.

63. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 25:135-66, 1974.

64. _____ & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Koafnhauv, 15(3):473-97, 1962.

65. MURGAI, P. In vitro culture of the inflorescences, flowers and ovaries of an apomict, Aerva tomentosa Forsk. Nature, London, 184:72-3, 1959.

66. NABORS, M.W.; HEYSER, J.W.; DYKES, T.A. & DeMOTT, K.J. Long duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. Planta, Berlin, 157(5):385-91, Apr. 1983.

67. NAKATA, K. & TANAKA, M. Differentiation of embryoids from developing germ cells in anther culture of tobacco. The Japan Journal of Genetics, Mishima, 43:65-71, 1968.

68. NARAYANASWAMY, S. & CHANDY, L.P. In vitro induction of haploid, diploid and triploid androgenic embryos and plantlets in Datura metel L. Annals of Botany, New York, 35: 535-42, 1971.

69. NIIZEKI, H. & OONO, K. Rice plants obtained by anther culture. Les cultures de tissus de plantes. Colloques internationeaux du centre national de la recherche scientifique (CNRS). Paris, 193:251-7, 1971.

70. NISHI, T. & MITSUOKA, S. Plants from anther and ovary culture of rice plant. Japan Journal of Genetics, Mishima, 44: 341-6, 1969.

71. OONO, K. Production of haploid plants of rice (Oryza sativa) by anther culture and their use for breeding. In: Bulletin of the National Institute of Agriculture Sciences Series D, N.26. Tokyo, 1975. p.139-222.

72. PETERS, J.E.; CROCOMO, D.J. & SHARP, W.R. Effect of caffeine and nicotine on the callus growth and root morphogenesis of Phaseolus vulgaris tissue cultures. Turrialba, Turrialba, 26(4):337-41, Oct./Dic. 1976.

73. PETERS, J.E.; CROCOMO, D.J.; SHARP, W.R.; PADDOCK, E.F.; TE - GENKAMP, I. & TEGENKAMP, T. Haploid callus cells from anthers of Phaseolus vulgaris.. Phytomorphology, New Delhi, 27(1):79-85, 1977.

74. PETOLINO, J.F. & JONES, M. Anther culture of elite genotypes of maize. Crop Science, Madison, 26(5):1072-4, Sept./Oct. 1986.

75. PHILLIPS, G.C. & COLLINS, G.B. In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Science, Madison, 19(1):59-64, Jan./Feb. 1979.

76. RAJASEKARAN, K. & MULLINS, M.G. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. Journal of Experimental Botany, Oxford, 30(116):339-407, June 1979.

77. REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Anther culture: haploid production and it's significance. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Plant cell, tissue and organ culture. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.251-92.

78. _____; TAZAWA, M. & SEMENOFF, S. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis in vitro. Nature, London, 216: 1215-6, 1967.

79. RINES, H.W. Oat anther culture: genotype effects on callus initiation and the production of a haploid plant. Crop Science, Madison, 23(2):268-72, Mar./Apr. 1983

80. SHAEFFER, G.W. Recovery of heritable variability in anther-derived doubled haploid rice. Crop Science, Madison, 22 (6):1160-4, Nov./Dec. 1982.

81. _____; BAENZIGER, P.S. & WORLEY, I. Haploid plant development from anthers and in vitro embryo culture of wheat. Crop Science, Madison, 19(5):697-702, Sept./Oct. 1979.

82. SMITH, M.K. & McCOMB, J.A. Effect of NaCl on the growth of whole plants and their corresponding callus cultures. Australian Journal of Plant Physiology, East Melbourne, 8:267-75, 1981.

83. SOPORY, S.K. Effect of sucrose, hormones and metabolic inhibitors on the development of pollen embryoids in anther cultures of dihaploid Solanum tuberosum. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 57(3):2691-4, Dec. 1979.

84. SUNDERLAND, N. Anther culture as a means of haploid induction. In: KASHA, K.J., ed. Haploids in higher plants: advances and potentials. Guelph, University of Guelph, 1974. p.91-122.

85. _____ & DUNWELL, J.M. Anther and pollen culture. In: STREET, 4.E. Plant tissue and cell culture. Berkeley, Univeristy of California Press, 1977, p.223-65.

86. TONIN, G.S.; DE CARVALHO, M.T.V.; SHARP, W.R. & CROCOMO, O.J. Aminoacids in the callus growth and root morphogenesis of bean (Phaseolus vulgaris L.) leaves cultured in vitro. Turrialba, Turrialba, 31(3):245-52, July/Sept. 1981.

87. TORELLO, W.A.; SYMINGTON, A.G. & RUFNER, R. Callus initia - tion, plant regeneration, and evidence of somatic embryo - genesis in red fescue. Crop Science, Madison, 24(6):1037-40, Nov./Dec. 1984.

88. TULECKE, W. A tissue derived from the pollen of Ginkgo biloba. Science, Lancaster, 117:599-600, 1953.

89. VASIL, I.K.; AHUJA, M.R. & VASIL, V. Plant tissue cultures in genetics and plant breeding. Advances in Genetics, New York, 20:127-215, 1979.

90. VELIKY, I.A. & MARTIN, M. A fermenter for plant cell suspension cultures. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 16:223-6, 1970.

91. WANG, C.C.; SUN, C.S. & CHU, C.C. On the condition for the induction of rice pollen plantlets and certain factors affecting the frequency of induction. Acta Botanica Sinica, Beijing, 16:43-54, 1974.

92. WENZEL, G.; HOFFMANN, F. & THOMAS, E. Heterozygous microspore derived plants in rye. Theoretical Applied Genetics, Berlin, 48:205-8, 1976.

93. WERNICKE, W. & KOHLENBACH, H.W. Investigations on liquid culture medium as a means of anther culture in Nicotiana. Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie, Jena, 79:189-98, 1976.

94. WHITE, D.W.R. Plant regeneration from long-term suspension cultures of white clover. Planta, Berlin, 162(1):1-7, Sept. 1984.

95. YIN, K.C.; KSU, C.; CHU, C.Y.; PI, F.Y.; WANG, S.T.; KIU, T. Y.; CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C. A study of the new cultivar of rice raised by haploid breeding method. Scientia Sinica, Peking, 19:227-42, 1976.

96. ZAMIR, D.; JONES, R.A. & KEDAR, N. Anther culture of male sterile tomato (Lycopersicon esculentum Mill) mutants. Plant Science Letters, Amsterdam, 17(3):353-61, Feb. 1980.