

DETERMINAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA CULTURA
DE ANTERAS DE TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* MILL.)

PEDRO VALENTIN HIM HIM
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. AKIHIKO ANDO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1987

A meus pais

Valentin e Isabel

pela confiança e apoio

em todas as etapas de

minha **vida**

Dedico com

AMOR E GRATIDÃO

A meus irmãos:

Juan

Doralis

Fátima

Marcia

Paula

meus sobrinhos e demais familiares

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Às seguintes Instituições que fizeram possível a realização do curso e desenvolvimento deste trabalho de tese:

- Instituto de Investigação Agropecuária de Panamá (IDIAP).
- Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo.
- Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos por um ano.
- Ao Prof. Dr. Akihiko Ando, pela orientação, apoio, colaboração e amizade.
- A todos os professores do Departamento de Genética pela compreensão e ensinamentos dispensados.
- Ao prof. Dr. Cyro Paulino da Costa por ceder a semente F_2 , assim como, aos colegas Paulo César Tavares de Melo e Arlete Benedetti Marchi pela concessão da semente F_1 e amizade.
- Ao Prof. Dr. Yoshitaka Tanaka pela orientação e colaboração dos estudos citológicos e amizade.
- Aos Drs. Clovis Pompílio de Abreu e Marinéia de Lara Haddad pelas análises estatísticas.

- Aos Drs. Augusto Tulmann Neto, José Otávio Machado Menten, Moacir Pasqual, Beatriz Madalena J. Mendes e Neusa de Lima Nogueira, pelo incentivo e amizade.
- Às colegas Judith Viegas, Magali de Araujo e Maria Helena de S. Goldman, pela revisão do texto, solidariedade e amizade.
- À Sra. Benedita Inês F. Possignolo Rodrigues pela colaboração dos trabalhos de laboratório e amizade.
- À Sra. Dirce Alessi Pelegrino e demais funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela atenção e cordialidade.
- Às secretárias: Gerda Spruck, Maria Helena Redi e Maria de Lourdes D. Razera, pela atenção e amizade.
- Aos Srs. José Benedito Alves, Paulo Cassieri Neto, Wlamir de Aguiar Godoy, Cleusa Pereira Cabral, Maria Lígia Malavolta, Suzineide de Fátima Manesco de Almeida e Francisco Carlos Antonioli pela amizade e camaradagem nas horas de trabalho.
- À Sra. Terezinha de Jesus L. Barrete, pelo auxílio na listagem bibliográfica, datilografia do rascunho e amizade.
- A todos que de uma forma ou outra possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Brasil, pela hospitalidade e acolhida.

INDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
2.1. Considerações gerais sobre a cultura de anteras	05
2.2. Fatores importantes relacionados ao sucesso na cultura de anteras	11
2.2.1. Genótipo da espécie cultivada	13
2.2.2. Meio de cultura	17
2.2.2.1. Macro e micro-nutrientes ...	17
2.2.2.2. Constituintes orgânicos	19
2.2.2.2.1. Vitaminas	19
2.2.2.2.2. Fonte de carbono	21
2.2.2.2.3. Reguladores de crescimento	23
2.2.2.2.3.1. Auxinas	24
2.2.2.2.3.2. Citocininas	26
2.2.2.2.3.3. Giberelinas e outros fitohormônios	26
2.2.2.2.3.4. Fatores físicos e químicos que afetam concentrações de fitohormônios no meio de cultura ..	28
2.2.3. Estágio do explante	28
2.3. Condições de cultivo e idade da planta doadora	31
2.4. Condições físicas da cultura de anteras	33
2.5. Mutagênese induzida	34
2.6. Ploidia e instabilidade citológica em cultura de células haplóides	36
2.7. Regeneração de plantas	39
2.8. Mecanismo de duplicação do material haplóide	41

2.9. Aplicações de haplóides em pesquisas básicas e no melhoramento de plantas	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. Material	44
3.2. Métodos	45
3.2.1. Assepsia do explante	45
3.2.2. Seleção do explante	47
3.2.3. Meio de cultura	47
3.2.4. Condições de cultura	51
3.2.5. Citologia do material estudado	51
3.2.6. Irradiação do material	52
3.2.7. Delineamento experimental e análise estatística	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Assepsia do explante	54
4.2. Tamanho ideal do explante	56
4.3. Resposta dos explantes aos meios de cultura.	66
4.4. Irradiação do material	76
4.4.1. Irradiação de anteras	76
4.4.2. Irradiação de meio de cultura	81
4.4.3. Irradiação da interação: antera- meio de cultura	85
4.5. Estudos citológicos da planta doadora, do <u>ex</u> plante e do calo	90
4.6. Desenvolvimento da antera, crescimento e diferenciação do calo	96
5. CONCLUSÕES	108
6. LITERATURA CITADA	111

ABREVIÇÕES

As denominações dos diferentes meios nutritivos e as várias substâncias componentes dos meios foram abreviadas no presente trabalho:

MS = MURASHIGE & SKOOG (1962)

MBD = Meio basal definido

Meio "a" = MS + 2 mg/l NAA + 2 mg/l cinetina

Meio "b" = MS + 5 mg/l NAA + 3 mg/l cinetina

Meio "c" = MS + 2 mg/l 2,4-D

Meio "d" = MS + 4 mg/l 2,4-D

Meio "e" = MS + 6 mg/l 2,4-D

Meio "f" = MS + 8 mg/l 2,4-D

Meio "j" = MS + água de côco maduro (50 ml/l)

Meio "k" = MS + água de côco maduro (100 ml/l)

Meio "l" = MS + água de côco maduro (150 ml/l)

Meio "m" = MS + água de côco maduro (200 ml/l)

Meio "n" = MS + suco de tomate (150 ml/l)

Meio "o" = MS + suco de tomate (200 ml/l)

Meio "p" = MS + suco de tomate (250 ml/l)

Meio "q" = MS + 3 mg/l NAA + 2 mg/l cinetina

Meio "r" = MS + 3 mg/l NAA

NAA = ácido naftalenoacético

IAA = ácido indolacético

2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxi-acético

IBA = ácido indolbutírico

2iP = DMAAP = 2-isopenteniladenina

6BA = BA = BAP = benzil aminopurina

CPA = ácido p-clorofenoxiacético

GA₃ = ácido giberélico

PFM = parafluorofenilalanina

zeatina = trans-6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enilamino)purina

**"DETERMINAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA CULTURA DE ANTERAS
DE TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

Autor: PEDRO VALENTIN HIM HIM

Orientador: Prof. Dr. Akihiko Ando

RESUMO

Anteras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) de 5 híbridos F_1 (Mottelle x Zambão; Raminho x Zambão; Colorado; Olho Roxo x Zambão; Sunny) e de 4 populações F_2 (c.v. Santa Cruz x mutante folha de batata) foram cultivadas "in vitro" com o propósito de obter plantas haplóides.

Pelos resultados obtidos, verificou-se que a expressão da androgênese é dependente do genótipo, bem como identificou-se o tamanho do botão floral ideal para este material como o de 5,0-6,9 mm, que corresponde ao estágio do grão de pólen uninucleado da microsporogênese.

Entre os vários hormônios testados no meio básico MS, NAA e cinetina promoveram maior frequência de indução de calos (38,18%) na população F_2 , sendo que a concentração ótima destes hormônios foi de 2 mg/l. Para a população F_1 , NAA e cinetina também mostraram-se eficientes para a indução de calos nas concentrações de 5 mg/l e 3 mg/l, respectivamente (22,73%).

Anteras, meio de cultura, e ambos anteras e meio de cultura, conjuntamente foram irradiados com diferentes doses (2, 4, 6 e 8 KR) de raios γ para a determinação da radiosensitividade em relação à formação de calos e organogênese.

A dose da irradiação 2,0 KR apresentou melhor eficiência para a formação de calos no híbrido "Sunny" e, entre as doses aplicadas, 8,0 KR mostrou ser letal para todas as populações testadas (F_1 e F_2).

Os estudos citológicos da ponta de raiz mostram $2n = 24$ cromossomos e nas anteras e calos foram observados $n = 12$ cromossomos.

As regenerações da parte aérea ("caule") e da raiz foram obtidas com uma frequência de 0,90% na população F_2 , com o uso de 5 mg/l IAA + 3 mg/l BAP para parte aérea e 0,6 mg/l IAA + 0,6 mg/l zeatina + 2 g/l carvão vegetal ativado para raiz, sendo adicionado 10 g/l de sacarose para este balanço hormonal.

DETERMINATION OF METHODOLOGY FOR ANTHHER CULTURE
OF TOMATO (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Author: PEDRO VALENTIN HIM HIM

Adviser: Prof. Dr. Akihiko Ando

SUMMARY

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) anthers from 5 F₁ - hybrids (Motelle x Zambão; Raminho x Zambão; Colorado; Olho Roxo x Zambão; Sunny) and 4 F₂ populations (c.v. Santa Cruz x potato leaf mutant) were cultivated "in vitro" with the purpose of obtaining haploid plants.

From results obtained in this study, it has been noted that the genotype is an important factor of success in androgenesis, and that the ideal size of the floral bud for this material was 5,0-6,9 mm which corresponds to the uninucleate stage of microsporogenesis.

Among the various hormones tested with the basic medium (MS), NAA and kinetin promoted a higher frequency of callus induction (38,18%) in the F₂ population, and the optimum concentration of these hormones was 2 mg/l. For the F₁ populations, NAA and kinetin were also efficient for callus induction in concentrations of 5 mg/l and 3 mg/l, respectively (22,73%).

Anthers, culture medium, and both anther and culture medium were irradiated with different doses (2, 4, 6 and 8 KR) of γ rays to determine radiosensitivity concerning callus formation and organogenesis.

Irradiation with 2,0 KR showed higher frequency of callus formation in "Sunny" hybrid compared with other hybrids, and among the used dosages, 8,0 KR showed to be lethal to all the tested populations (F_1 and F_2).

Cytological studies of the root-tip cells showed that they have $2n = 24$ chromosomes. In the anthers and callus, $n = 12$ chromosomes were observed.

Regenerate aerial part ("stem") and roots were obtained with a frequency of 0,90% in the F_2 population when applied concentrations of 5 mg/l IAA + 3 mg/l BAP to the aerial part and 0,6 mg/l IAA + 0,6 mg/l zeatina + 2 g/l activated charcoal to the root, with the addition of 10 g/l saccharose to this hormone balance.

1. INTRODUÇÃO

O tomate é uma das hortaliças mais importantes na maioria dos países do mundo, sendo que, no Brasil, é a primeira em importância econômica.

Os atributos do tomate como alimento são indiscutíveis: além de ter excelente palatabilidade, é altamente nutritivo e sadio como fonte de diversos sais minerais e vitaminas (A e C). Por apresentar baixo valor energético, torna-se recomendável para dietas, constituindo-se também num alimento de fácil digestão.

No Brasil, a produção de tomate é cerca de 2 milhões de toneladas ao ano (PROGNÓSTICO 85/86) e isto torna necessário empreender pesquisas visando o melhoramento genético de vários caracteres, tais como maior produção e resistência a diversas moléstias, entre outros.

É preciso, portanto, desenvolver material que reúna características desejáveis para solucionar os problemas acima mencionados. Hibridação e seleção dos genótipos desejados são métodos comumente utilizados para tais finalidades.

Recentes avanços na tecnologia de cultura de órgãos, tecidos e células têm aberto novos caminhos nos estudos de genética aplicada a plantas superiores. Esta ferramenta, colocada em mãos dos biólogos, geneticistas, melhoristas de plantas e outros pesquisadores, poderá ajudar em diversos estudos a nível celular, assim como na criação, seleção e propagação de plantas economicamente importantes.

Embora o entendimento do processo celular básico tenha aumentado consideravelmente, através da cultura "in vitro" de tecidos e células vegetais, o progresso na aplicação desta tecnologia para remediar problemas específicos ou para produzir material vegetal economicamente importante, tem sido relativamente lento. Talvez isto seja devido ao fato de que as células ou tecidos, de um grande número de plantas cultivadas, não respondem às condições "in vitro" e, particularmente, porque a manipulação da cultura de tecidos implica em alterações no conteúdo genético das células ainda nos estágios iniciais do desenvolvimento.

Existem diversos métodos para a obtenção de plantas haplóides. No entanto, uma das maneiras mais rápidas é obtê-las através da cultura de anteras. Em diversos países, têm sido conseguidos sucessos na cultura de anteras de uma série de plantas cultivadas, tais como arroz, fumo, trigo, nabo, centeio e batata, entre outras.

Entretanto, a diploidização de plantas haplóides poderá ser um método bastante rápido e eficaz para obtenção de plantas diplóides homozigotas com genótipos desejados.

Por outro lado, sabe-se que os raios γ induzem mutações, que são responsáveis pela variabilidade genética. Caso se consiga obter o diplóide a partir de haplóide originário de pólen irradiado, o tempo para a obtenção de mutantes homozigotos seria extremamente curto.

As tentativas para obtenção de plantas haplóides em tomate têm sido feitas por vários pesquisadores a partir do cultivo de grãos de pólen imaturos, mas os resultados têm demonstrado que são necessárias pesquisas mais detalhadas sobre o potencial androgenético desta espécie.

A formulação dos meios, o ambiente para a cultura de antera, o estágio citológico dos micrôsporos e o genótipo da espécie cultivada, entre outros, influenciam a produção de plantas haplóides e devem ser considerados ao se procurar obter plantas haplóides de quaisquer espécies. É importante, também, a análise do grau de ploidia das células em cultura, devido às mudanças no número de cromossomos que geralmente ocorrem durante o cultivo.

No presente estudo, foram utilizadas anteras de plantas visando estabelecer a metodologia para obtenção de haplóides a partir de grãos de pólen segregantes e, ao mesmo tempo, procurar a possibilidade para seleção de dihaplóides homozigotos com a produtividade mais alta do que as linhagens parentais. Esta estratégia poderá trazer vantagens no futuro para os trabalhos de melhoramento genético. Também foram utilizadas anteras de plantas F_2 (c.v. Santa Cruz x mutante folha de batata), cujos marcadores fenotípi

cos são: tipo de folha (batata e recortada) e cor do hipocótilo (verde e roxo). Assim, pode-se estudar a segregação gênica e recuperar os parentais a partir da cultura de anteras e posterior dihaploidização, em menor tempo quando comparado com os métodos convencionais.

No presente trabalho, objetiva-se:

1. Identificar o estágio mais indicado do explante, através de análises citológicas, para a cultura de antera de um determinado genótipo, assim como a melhor assepsia do explante e melhor meio nutritivo para a indução e desenvolvimento de calos.

2. Determinar o grau de ploidia dos calos, através de análises citológicas.

3. Desenvolver uma metodologia para a obtenção de diferenciação (parte aérea e raiz) e regeneração de plantas haplóides, a partir dos calos formados.

4. Determinar o efeito da radiação em relação a formação e desenvolvimento de calos e organogênese, quando foi feita a irradiação de anteras, meio de cultura e ambos antera e meio de cultura, simultaneamente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A CULTURA DE ANTERAS

O trabalho pioneiro de GUHA & MAHESHWARI (1964), com *Datura innoxia*, mostrou que grande número de plantas haplóides poderiam ser obtidas de grãos de pólen imaturos quando anteras eram cultivadas em um meio de cultura adequado. Isto causou um grande impacto tecnológico, estimulando as pesquisas em muitos países do mundo para a produção de haplóides através da cultura de anteras.

A obtenção do material haplóide a partir de cultura de anteras representa um grande valor tanto para a genética básica como para a genética aplicada. Além deste material haplóide ser livre de problemas de dominância e recessividade, este método também permite desenvolver linhagens puras diplóides homozigotas em uma única etapa. Estas linhagens homozigotas representa, também, uma especial vantagem na criação de recombinantes desejáveis (COLLINS, 1975).

Apesar de existir uma série de dificuldades na técnica de anteras para a obtenção de material haplóide de

culturas agrícolas, vários países do mundo já tem conseguido cultivares de importância comercial. Na China, segundo YIN et alii (1976), foram obtidas cultivares de arroz (Huayu 1, Huayu 2 e Tanfong 1) e também de fumo e trigo como citado por CHIH-CHING CHU (1981). COLLINS & LEGG (1980) referem-se aos cultivares de fumo obtidos nos Estados Unidos e no Japão. No Canadá as pesquisas foram promissoras com nabo silvestre (KELLER & STRINGAM, 1978). Cultivares de nabo, centeio e batata também foram obtidas na Alemanha (WENZEL, 1980).

Os gêneros e espécies encontrados produzindo haplóides estão relacionados em revisões como as de KIMBER & RYLEY (1963), KHATOVA (1970) e KASHA (1974). BAJAJ (1984) apresenta uma listagem das investigações realizadas através da técnica de cultura "in vitro" pelo cultivo de anteras excisadas e/ou pólen isolado, onde foram observados tecidos haplóides ou plantas de várias espécies (Tabela 1).

Além da cultura "in vitro" de anteras, a indução de haplóides pode ser obtida também pela estimulação dos óvulos através de vários métodos que incluem a irradiação ionizante, o tratamento com radioisótopos, choques térmicos, hibridação distante, atração da polinização, aplicação de pólen abortivo e fumigação com várias substâncias químicas. Outros caminhos para a obtenção de material haplóide incluem a cultura de pólen isolado, protoplastos, eliminação de cromossomos pela cultura de embriões jovens, adição de cromossomos e partenogênese "in vitro" (KIMBER & RILEY, 1963; MANGOON & KHANNA, 1963).

Tabela 1. Espécies de plantas na qual tecidos haplóides, embriões ou plantas têm sido obtidos por cultura de anteras/pólen (BAJAJ, 1984).

ESPÉCIES DE PLANTAS	FAMÍLIA	MODO DE DESENVOLVIMENTO	REFERÊNCIA
<i>Aegilops caudata</i> x <i>A. umbellulata</i>	Gramíneae	C, P	KIMATA & SAKAMOTO (1972)
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Hippocastanaceae	E	RADOJEVIC (1978)
<i>Agropyron</i>	Poaceae	C, E	ZENKTELER et alii (1975)
<i>Anemone</i> spp	Ranunculaceae	C, E	SUNDERLAND & DUNWELL (1977); JOHANSSON & ERIKSSON (1977); GEORGIEV & CHAYDAROV (1974)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cruciferaeae	C, P	GRESSHOFF & DOY (1972b); AMOS & SCHOLL (1978); SCHOLL & AMOS (1980)
<i>Arachis glabrata</i> ; <i>A. hypogaea</i> ;	Leguminosaeae	C, E, P	BAJAJ et al. (1980a, 1981); MROGINSKY & FERNANDEZ (1980)
<i>A. villosa</i>			
<i>Arpasus officinalis</i>	Liliaceae	C, E, P	PELLETIER et al. (1972); HONDELMANN & WILBERG (1973)
<i>Atropa belladonna</i>	Solanaceae	C, E, P	ZENKTELER (1971); NARAYANASWAMY & GEORGE (1972); RASHID & STREET (1973, 1974a); BAJAJ et alii (1978)
<i>Beta vulgaris</i>	Chenopodiaceae	C	ATANOSOV (1973)
<i>Brassica campestris</i>	Cruciferaeae	C, P	KELLER et al. (1975); KELLER & ARMSTRONG (1979)
<i>B. napus</i>	Cruciferaeae	C, E, P	THOMAS & WENZEL (1975a); KELLER & ARMSTRONG (1977)
<i>B. oleracea</i>	Cruciferaeae	C, P	KAMEYA & HINATA (1970); QUAZI (1978)
<i>B. oleracea</i> x <i>B. alboglabra</i>	Cruciferaeae	C, P	KAMEYA & HINATA (1970)
<i>Bromis inermis</i>	Gramíneae	E	ZENKTELER et alii (1975)
<i>Cajanus cajan</i>	Leguminosaeae	C, E	BAJAJ et alii (1980b)
<i>Capsicum annuum</i>	Solanaceae	C	KUO et al. (1973); WANG et al. (1973); GEORGE & NARAYANASWAMY (1973); NOVAK (1974)
<i>Capsicum frutescens</i>	Solanaceae	C	NOVAK (1974)
<i>Cassia fistula</i>	Leguminosaeae	C, E	BAJAJ et alii (não publicado)
<i>Cicer arietinum</i>	Leguminosaeae	C, E	GOSAL & BAJAJ (não publicado)
<i>Citrus limon</i>	Rutaceae	C, E	DRIRA & BENDALIS (1975)
<i>C. medica</i>	Rutaceae	C, E	DRIRA & BENDALIS (1975)
<i>Coffea arabica</i>	Rubiaceae	C, E	SHARP et alii (1973)
<i>Cerchorus</i>	Tiliaceae	C	IYER & RAINA, 1972
<i>Chrysanthemum</i>	Compositae	C	WATANABE et alii (1972)
<i>Datura innoxia</i>	Solanaceae	E, C, P	GUHA & MAHESHWARI (1964); NORREEL (1970); ENGVILD et al. (1979); FORCHE et al. (1981).
<i>D. metel</i>	Solanaceae	E	NARAYANASWAMY & CHANDY (1971); IYER & RAINA (1972); GUPTA & BARBAR (1980)
<i>D. meteloides</i>	Solanaceae	E, C, P	KOHLENBACH & GEIER (1972); NITSCH (1972); GEIER & KOHLENBACH (1973)
<i>D. muricata</i>	Solanaceae	E	NITSCH, 1972
<i>D. stramonium</i>	Solanaceae	E	GUHA & MAHESHWARI (1967)
<i>D. wrightii</i>	Solanaceae	E	KOHLENBACH & GEIER (1972)
<i>Digitalis purpurea</i>	Scrophulariaceae	C, P	CORDUAN & SPIX (1975)
<i>Festuca arundinacea</i>	Gramíneae	C, P	NIIZEKI & KITA (1974); KASPERBAUER et alii (1980)

(continua)

ESPECIES DE PLANTAS	FAMILIA	MODO DE DESENVOLVIMIENTO	REFERENCIA
<i>F. pratensis</i>	Gramineae	E	NITZSCHE (1970); ZENKTELER & MISIURA (1974)
<i>Fragaria virginiana</i>	Rosaceae	C	FOWLER et al. (1971); ROSATI et al. (1975)
<i>Freesia</i> spp	Iridaceae	C,P	BAJAJ & PIERIK (1974)
<i>Gладиолус</i>	Iridaceae	C	BAJAJ et alii (1982)
<i>Glycine max</i>	Leguminosae	C	IVERS et alii (1974)
<i>Gossypium</i> spp	Malvaceae	C,E	BAJAJ (1982)
<i>Helieborus foetidus</i>	Ranunculaceae	E	ZENKTELER et alii (1975)
<i>Hevea brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	E,C	SATCHUTHANANTHAVALÉ & IRUFALBANDARA (1972); CHEN et alii (1979)
<i>Hordeum vulgare</i>	Gramineae	E,C,P	CLAPHAM (1973; 1977); ZENKTELER & MISIURA (1974); KAO (1981); XU et alii (1981)
<i>Hyoscyamus albus</i>	Solanaceae	E	RACHAVAN (1975); DODDS & REYNOLDS (1980) SUNDERLAND & WILDON (1979)
<i>H. muticus</i>	Solanaceae	E,C,P	WERNIGKE et alii (1979)
<i>H. niger</i>	Solanaceae	E,C,P	RACHAVAN (1975; 1978); CORDUAN (1975)
<i>H. pusillus</i>	Solanaceae	E	RACHAVAN (1975)
<i>Iberis amora</i>	Cruciferae	C,E,P	BABBAR et alii (1980)
<i>Lilium longiflorum</i>	Liliaceae	C,P	SHARP et alii (1971a)
<i>Lolium multiflorum</i>	Gramineae	C,P	CLAPHAM (1971)
<i>L. multiflorum x Festuca arundinacea</i>	Gramineae	C,P	NITZSCHE (1970)
<i>L. perenne</i>	Gramineae	C,P	CLAPHAM (1971)
<i>Lotus corculatus</i>	Leguminosae	C	NIIZEKI & GRANT (1971)
<i>Luffa cylindrica</i>	Cucurbitaceae	C	SINHA et alii (1978a)
<i>L. echinata</i>	Cucurbitaceae	F	SINHA et alii (1978b)
<i>Lycium halimifolium</i>	Solanaceae	E	ZENKTELER (1972)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Solanaceae	C,P	SHARP et al. (1971b); GRESSHOFF & DOY (1972a); LEVENKO et al. (1977); ZAMIR et al. (1980, 1981)
<i>L. peruvianum</i>	Solanaceae	C	GRESSHOFF & DOY (1972a)
<i>L. pimpinellifolium</i>	Solanaceae	C,E	NITSCH & NITSCH (1969); DEBERGH & NITSCH (1973)
<i>L. esculentum x L. peruvianum</i>	Solanaceae	C,P	CAPPADOCIA & RAMULU (1980)
<i>Malus</i>	Rosaceae	C	KUBICKI et alii (1975)
<i>Nicotiana affinis</i>	Solanaceae	E,P	NITSCH & NITSCH (1969)
<i>N. alata</i>	Solanaceae	E	NITSCHH (1969, 1972)
<i>N. attenuata</i>	Solanaceae	E	COLLINS & SUNDERLAND (1974)
<i>N. cleveandii</i>	Solanaceae	E	VYSKOT & NOVAK (1974)
<i>N. glutinosa</i>	Solanaceae	E	NITSCH (1969)
<i>N. knightiana</i>	Solanaceae	E	COLLINS & SUNDERLAND (1974)
<i>N. langsdorffii</i>	Solanaceae	E	COLLINS & SUNDERLAND (1974)
<i>N. otophora</i>	Solanaceae	E	DURR & FLECK (1980)
<i>N. plumbaginifolia</i>	Solanaceae	E	COLLINS et alii (1972)
<i>N. raimondii</i>	Solanaceae	E,P	TRAN THAN VAN & TRINH (1980)
<i>N. rustica</i>	Solanaceae	E	COLLINS & SUNDERLAND (1974)
<i>N. sanderae</i>	Solanaceae	E	NITSCH & NITSCH (1969)
<i>N. suaveolens x N. langsdorffii</i>	Solanaceae	E	VYSKI & NOVAK (1974)
<i>N. sylvestris</i>	Solanaceae	C	GUO (1972)
	Solanaceae	E,C,P	BOURGIN & NITSCH (1979); RASHID & STREET (1974b); BUTTERFASS & KOHLENBACH (1979b); De PAEPE et alii (1981)

(continua)

ESPECIES DE PLANTAS	FAMILIA	MODO DE DESEN- VOLVIMENTO	REFERENCIA
<i>N. tabacum</i>	Solanaceae	E, P, C	NITSCH & NITSCH (1969, 1970); BAJAJ (1972, 1978b); and numerous others
<i>Oryza sativa</i>	Gramineae	C, E, P	NIIZEKI (1968) NISHI & MITSUOKA (1969); WANG et al. (1980), CHALEFF & STOLARZ (1981); CHANG & HONG-YUAN (1981) SUNDERLAND (1974)
<i>Paeonia hybrida</i>	Ranunculaceae	C; E	ONO & TSUKIDA (1978)
<i>P. lactifolia</i>	Ranunculaceae	E	ZENKTELER et alii (1975)
<i>P. lutea</i>	Ranunculaceae	E	ZENKTELER et alii (1975)
<i>P. suffruticosa</i>	Ranunculaceae	C, P	ABO EL-NIL & HILDEBRANDT (1971, 1973); ABO EL-NIL et alii (1976)
<i>Pelargonium hortorum</i>	Geracuaceae		
<i>Petunia axilaris</i>	Solanaceae	C, P	ENGWILD (1973), DORESWAMY & CHACKO (1973)
<i>P. hybrida</i>	Solanaceae	C, P	IYER & RAINA (1972); BINDING (1972); BAJAJ (1978b); MITCHELL et alii (1980)
<i>P. hybrida</i> x <i>P. axilaris</i>	Solanaceae	C, P	RAQUIN & PELET (1972)
<i>Pharbitis nil</i>	Convolvulaceae	E	SANGWAN & NORREEL (1975)
<i>Phaseolus aureos</i>	Leguminosae	E, C	BAJAJ & SINGH (1980)
<i>P. vulgaris</i>	Leguminosae	C	PETERS et alii (1977)
<i>Phleum pratense</i>	Gramineae	C	NIIZEKI & KITA (1973)
<i>Pisum sativum</i>	Leguminosae	E, C	BAJAJ GOSAL (não publicado)
<i>Poinciana regia</i>	Leguminosae	E, C	BAJAJ et alii (não publicado)
<i>Populus ssp</i>	Salicaceae	C, P	SATO (1974)
<i>Primula obconica</i>	Primulaceae	C, P	BAJAJ (1981b)
<i>Prunus amygdalus</i>	Rosaceae	C	MICHELON et alii (1974)
<i>P. annals</i>	Rosaceae	C	SEIRLIS et alii (1979)
<i>P. armenica</i>	Rosaceae	C	HARN & KIM (1972)
<i>P. avium</i>	Rosaceae	E, C	JORDAN (1974); ZENKTELER et al. (1975)
<i>P. persica</i>	Rosaceae	C	MICHELON et alii (1974)
<i>Saccharum spontaneum</i>	Gramineae	C, P	FITCH & MOORE (1981)
<i>Saintpaulia tonantha</i>	Gesneriaceae	C, E, P	HUGHES et alii (1975); WEATHERHEAD et alii (1982)
<i>Scopolia carnicotica</i>	SOLANACEAE	E	WERNICKE & KOHLENDACH (1975)
<i>S. lurida</i>		E	WERNICKE & KOHLENBACH (1975)
<i>S. physaloides</i>		E	WERNICKE & KOHLENBACH (1975)
<i>Secale cereale</i>	Gramineae	C, E, P	WENZEL & THOMAS (1974); THOMAS & WENZEL (1975b) WENZEL et alii (1975, 1977)
<i>S. montanum</i>		E	ZENKTELER & MISIURA (1974)
<i>Setaria italica</i>	Gramineae	C	BAN et alii (1971)
<i>Solanum dulcamara</i>	Solanaceae	E	ZENKTELER (1973)
<i>S. mammosum</i>		C	ANAND & GOVINDAPPA (1979)
<i>S. melongena</i>		C, P	RAINA & IYER (1973); GUY et alii (1979) HARN (1971, 1972)
<i>S. tuberosum</i>		C, E, P	IRIKURA & SAKAGUCHI (1972, 1975); DUNWELL & SUNDERLAND (1973); SOPORY et alii (1978); SOPORY & TAN (1979)
<i>S. surattense</i>		E, C	SINHA et alii (1978b, 1979)
<i>S. verrucosum</i>		C, P	WEATHERHEAD & HENSHAW (1979)
<i>Tradescantia reflexa</i>	Commelinaceae	C	YAMADA et alii (1963)
<i>Trifolium alexandrinum</i>	Leguminosae	C, P	MOKHTARZADEH & CONSTANTIN (1978)
<i>T. pratense</i>		C, P	MOKHTARZADEH & CONSTANTIN (1978)
<i>Triticale</i>	Gramineae	C, P	WANG et alii (1973); ONO & LARTER (1976); BERNARD (1980)

(continua)

ESPÉCIES DE PLANTAS	FAMÍLIA	MODO DE DESEN- VOLVIMENTO	REFERÊNCIA
<i>Triticum aegilopoides</i>	Gramineae	C	FUJII (1970)
<i>T. aestivum</i>		C,P	OUYANG et al. (1973); PICARD & DE BUYSER (1973); WANG et al. (1973); SCHAEFFER et al. (1979); De BUYSER & HENRY (1980); SHIMADA (1981)
<i>T. dicocoides</i>		C	FUJII (1970)
<i>Ulmus americana</i>	Ulmaceae	C	REDENBAUGH et alii (1981)
<i>Vicia faba</i>	Leguminosae	C	HESEMANN (1980)
<i>Vigna unguiculata</i>	Leguminosae	C,S	LADEINDE & BLISS (1977)
<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	C,P	GRESSHOFF & DOY (1974); HIRABAYASHI et alii (1976); RAJASEKARAN & MULLINS (1979)
<i>Withania somnifera</i>	Solanaceae	C,P	VISHNOI et alii (1979)
<i>Zea mays</i>	Gramineae	C,P	MURAKAMI et al. (1972); OPATRYNY et alii (1977); NITSCH (1977)

C = CALOS

E = EMBRIÕES

P = PLANTAS

É evidente que a produção de plantas haplóides, a partir da cultura "in vitro" de anteras daquelas espécies onde a cultura ainda não foi bem sucedida, demanda estudo criterioso de vários fatores que possam influenciar a resposta das anteras em cultura. Entre estes, os mais importantes a serem considerados são: o genótipo da espécie a ser cultivada, o meio de cultura, o estágio ideal do explante, condições fisiológicas e a idade da planta, entre outros (MAHESHWARI *et alii*, 1980).

BAJAJ (1984) apresenta de forma esquemática os caminhos para a obtenção de planta haplóide, a partir da cultura de antera e/ou pólen, e duplicação deste material haplóide pelo uso de colchicina (Fig. 1).

2.2. FATORES IMPORTANTES RELACIONADOS AO SUCESSO NA CULTURA DE ANTERAS

Segundo SUNDERLAND (1974), a indução "in vitro" de haplóides pela cultura de anteras foi, inicialmente, restrita a poucas espécies, principalmente ao grupo das famílias Solanaceae e Graminaeae. No entanto, a androgênese está sendo conseguida em muitas outras espécies ainda que com baixa frequência (Tabela 1). Atualmente, um dos maiores obstáculos encontrados nas pesquisas com cultura de anteras é justamente esta baixa frequência da androgênese.

BAJAJ (1977), SANGWAN-NORREELL (1977), CHEN (1978) e MARESHWARI *et alii* (1980) vêm se preocupando em estudar os fatores que controlam a androgênese, pois para propósitos práticos de melhoramento é necessária uma alta frequência de produção de haplóides.

2.2.1. Genótipo da espécie cultivada

A resposta das anteras colocadas em cultura é muito dependente do genótipo da planta. As primeiras investigações da cultura de anteras envolveram o uso de uma ou poucas cultivares de uma espécie. Entretanto, com o aumento destas pesquisas, mostraram-se variações na produção de haplóides obtidos de anteras de diferentes genótipos, evidenciando a importância do genótipo da planta doadora (COLLINS, 1975).

A ação dos genes é mostrada 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 nos trabalhos de produção de material haplóide (NITZSCHE & WENZEL, 1977).

Os trabalhos mais relevantes que marcam a importância do genótipo em relação à frequência de haplóides foram realizados por GRESSHOFF & DOY (1972a,b). Segundo esses autores, cultivares de *Lycopersicon esculentum* e 18 linhagens de *Arabidopsis thaliana* induziram tecidos haplóides em apenas três casos em cada espécie.

MATTINGLY & COLLINS (1975), trabalhando com anteras de fumo, cultivar Burley, no estágio de mitose do pólen, obtiveram 50% a 90% de plantas haplóides. Quando trabalharam nas mesmas condições com a cultivar Red Russian, somente 2,6% das anteras produziram plantas.

VYSKOT & NOVAK (1974) observaram significantes efeitos genotípicos na produção de plantas haplóides em dez cultivares e espécies de *Nicotiana*.

GUHA & MUKHERJEE (1973) selecionaram vinte variedades diferentes de arroz para representar um amplo conjunto genotípico. Destas, apenas quatro variedades produziram embriões e doze não produziram nem calo. Relataram ainda que a subespécie japônica mostra maior produção de plantas haplóides quando comparada com a subespécie índica.

Randolph^{1/}, Stadley^{2/}, Chase^{3/}, Seany^{4/}, Coe Jr.^{5/} e Sarkar & Coe Jr.^{6/}, todos citados por CHASE (1969),

^{1/} RANDOLPH, L.F. Some effects of high temperatures on polyploid and other variations in maize. Proc. Natl. Acad. Sci., Washington, 18: 222-9, 1932.

^{2/} STADLEY, L.J. Frequency of haploides. In: COOPERATIVE CORN INVESTIGATIONS. Annual Report 1942. Columbia, Missouri Agric. Expt. Sta., 1942. p.234-46.

^{3/} CHASE, S.S. Monoploids in maize. In: Gowen, J.W. ed. Heterosis. Ames, Iowa State College Press, 1952. p.389-99.

^{4/} SEANY, R.R. Studies on monoploid in maize. Ithaca, 1955. 215p. (Ph. D. - Cornell University).

^{5/} COE JUNIOR, E.H. A line of maize with high haploid frequency. Amer. Nat., Lancaster, 93: 381-2, 1959.

^{6/} SARKAR, K.R. & COE JUNIOR, E.H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. Genetics, Princeton, 54: 453-453-64, 1966.

encontraram diferenças marcantes com relação ao genótipo em seus trabalhos para obtenção de haplóides em milho. O mesmo foi encontrado na obtenção de haplóides através da cultura de anteras por THOMPSON (1969) em *Brassica*; por WORHMANN (1964) e FRANDSEN (1967) em batata; MARKS (1973) em aspargo; TURCOTTE & FEASTER (1974) em algodão; NITSCH (1972) e TOMES & COLLINS (1976) em várias espécies de *Nicotiana*; IRIKURA (1975) em *Solanum*; WENZEL et alii (1977) em centeio e BAJAJ (1977) em trigo. Todos eles observaram marcantes diferenças nas culturas de diferentes genótipos, comprovando a importância do genótipo no sucesso da cultura de anteras.

Interações entre plantas parentais são importantes, uma vez que cruzamentos interespecíficos e intergenéricos podem ser utilizados na produção de haplóides em frequências satisfatórias, como é o caso de *H. vulgare* x *H. bulbosum* (SYMKO, 1969; KASHA & KAO, 1970; LANCE, 1971).

Pesquisadores chineses observaram que os dihaplóides, originados de parental com alta produção de plantas haplóides, muitas vezes são também produtoras de plantas haplóides (OUYANG et alii, 1973; KUO et alii, 1978). Isto indica que genes ou recombinações gênicas podem afetar a androgênese (SOPORY et alii, 1978). Outros casos de recombinações de genomas favorecendo a androgênese têm sido demonstrados em centeio (WENZEL et alii, 1977) e em batata (SOPORY et alii, 1978).

Cruzamentos entre plantas com diferentes níveis de ploidia podem originar material haplóide, como no

caso de *Medicago sativa* (BINGHAM, 1969; BINGHAM & BINEK, 1969), e petúnia (STRAUB, 1973). A frequência de haplóides pode ser melhorada se plantas, com diferentes níveis de ploidia, de diferentes espécies, forem utilizadas, como tem sido observado em diversas espécies de *Solanum*, das quais o cruzamento de *S. tuberosum* ($2n=48$) x *S. phureja* ($2n=24$) é um exemplo (JORGENSEN, 1928; HOUGLAS & PELOQUIM, 1957; MONTELONGO ESCOBEDO, 1969; NUKETOVA, 1971).

Para obtenção de melhor seleção na recombinação gênica é vantajoso o uso de marcadores genéticos. Tanto haplóides obtidos via androgênese ou partenocárpica como semigaméticos podem ser identificados pelos métodos de genes marcadores. Marcadores morfológicos são de grande ajuda, como os genes que produzem determinadas características com manifestações nas sementes ou plântulas (NITSCHKE & WENZEL, 1977).

As mutações espontâneas também podem contribuir para a produção de haplóides. Apesar da frequência ser muito baixa, brotos haplóides podem ser esperados após ocorrência de mutação espontânea. Não obstante, haplóides têm sido observados em um pequeno número de plantas após indução de mutação. Uma simples mutação de um gene em tomate pode influenciar a indução de calos a partir do pólen, com subsequente regeneração de plantas (ZAMIR et alii, 1980).

O método de redução do número de cromossomos por tratamento com mutagênico tem a vantagem de ser universal, entretanto o baixo grau de sucesso obtido o faz inviável na prática (NITZSCHE & WENZEL, 1977).

2.2.2. Meio de cultura

Segundo SOPORY (1972), a importância da composição do meio basal foi reconhecida cedo, através dos estudos clássicos de GUHA & MAHESHWARI (1964) com *Datura innoxia*. Nestas investigações, os meios basais de Nitsch e de White davam melhor resposta que o meio de Blaydes ou de Murashige & Skoog.

Geralmente, os meios contêm uma fonte de energia (como sacarose), vitaminas (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, biotina, etc.), sais minerais (como N, P, K, Ca, Mn, Fe, Zn, etc.) e reguladores de crescimento (auxinas, citocininas ou giberelinas). Em alguns casos, as células exigem a adição de substâncias complexas para seu crescimento, tais como fitohormônios, água de côco e sucos de frutas (suco de tomate, leite de coco, etc.) (SUNDERLAND, 1974).

Em sua revisão sobre meios de cultura de tecidos vegetais, SUNDERLAND (1974) compara os cinco meios de cultura clássicos utilizados em diferentes tipos de explantes (Tabela 2).

O meio MS, segundo PADMANABHAN *et alii* (1974), geralmente tem sido usado para estudos de tecidos com espécies de *Lycopersicon*, particularmente cultivado.

2.2.2.1. Macro e micronutrientes

Existem meios pobres em sais, como o de WHITE

Tabela 2. Diferentes meios usados em cultura de tecidos.

Componentes do meio de cultura	Código dos meios				
	B	M	A	MS	BS
	Componentes minerais (mg/l)				
NO ₃ ⁻	5,0	20,0	40,0	39,4	24,7
NH ₄ ⁺	5,0	10,0	20,0	20,6	20,2
(H ₂ ⁴ O ₄) ⁻	0,1	1,0	2,0	1,25	1,05
K ⁺	2,0	10,0	20,0	20,05	24,7
Ca ⁺⁺	2,0	4,0	6,0	5,98	2,04
Mg ⁺⁺	1,0	3,0	6,0	3,0	2,02
Cl ⁻	3,9	4,0	6,0	5,98	2,04
Fe ⁺⁺	0,02	0,1	0,2	0,2	0,1
SO ⁻	1,12	4,14	7,78	3,46	4,17
(Na ⁴⁺)	0,1	2,0	3,5	0,2	1,05
BO ₃ ⁻²	0,03	0,15	0,45	0,30	0,15
Mn ⁺⁺	0,02	0,1	0,2	0,2	0,12
Zn ⁺⁺	0,002	0,04	0,08	0,06	0,014
Cu ⁺⁺	0,00002	0,0002	0,003	0,0002	0,0002
MoO ₄ ⁻	0,00002	0,0002	0,002	0,002	0,002
Ca ⁺⁺	0,0002	0,001	0,002	0,0002	0,0002
I ⁻	0,0005	0,0025	0,005	0,005	0,0045
(EDTA) ⁻⁻⁻	0,02	0,1	0,2	0,2	0,1
(H ⁺) ₃	0,03	0,15	0,45	0,30	0,146
Total cátions	10,17	29,39	56,44	50,60	32,21
Total anions	10,17	29,39	56,44	50,60	32,21
	Vitaminas e aminoácidos (mg/l)				
Inositol	20	20	100	100	100
Ác. nicotínico	0,5	0,5	5,0	0,5	1,0
Piridoxina HCl	0,5	0,5	5,0	0,5	1,0
Tiamina HCl	1,0	1,0	10,0	0,1	10,0
Biotina	0	0,05	0,05	0	0
D-Ca-Pantotenato	0	0,5	0,5	0	0
Riboflavina	0	0,5	0,5	0	0
Ác. ascórbico	0	0,2	0,2	0	0
Ác. fólico	0	0,5	0,5	0	0
Cloridrato de colina	0	0,1	0,1	0	0
Glcina	0,5	0,1	0,0	0	0
Caseína hidrol.	0	1000	1000	1000	
	Sacarose (g/l)				
Sacarose	30		60	30	20

B = meio com baixa concentração; M = meio com média concentração; A = meio com alta concentração; B, M e A - segundo NEAL e TOPOLESKI (1983); MS = meios de MURASHIGE e SKOOG (1962); BS = meio de GAMBORG *et alii* (1968).

(1978) para cultura de tomate, e os ricos em sais, como os de MURASHIGE & SKOOG (1962) e de LINSMAIER & SKOOG (1965), utilizados para diversas culturas.

Comumente, os macronutrientes e micronutrientes mais usados nos meios de cultura "in vitro" estão contidos na Tabela 3.

2.2.2.2. Constituintes orgânicos

Entre os constituintes orgânicos utilizados nos meios de cultura, há vitaminas, fonte de carbono, reguladores de crescimento, aminoácidos e complexos naturais (água de côco, leite de côco, suco de frutas, extratos de leveduras, caseína hidrolizada, peptona, triptona, etc.). A adição de ágar em concentrações adequadas e o ajuste do pH melhoram as condições físicas do meio de cultura "in vitro" (SUNDERLAND, 1974).

Extratos de anteras e tubérculos de batatas têm estimulado androgênese em tabaco (NITSCH & NORREEL, 1973). Às vezes, tanto serina como glutamina têm melhorado a cultura de pólen isolado (NITSCH, 1974).

2.2.2.2.1. Vitaminas

OHIRA *et alii* (1976), em seus estudos, demonstraram que o baixo nível de vitaminas influencia na capacidade de diferenciação, como observado pela necessidade de requerimentos exógenos de tiamina. A adição de vitaminas em cultura de células de plantas é necessária, uma vez que as plantas são auxotróficas.

Tabela 3. Macronutrientes e micronutrientes mais usados nos meios de cultura "in vitro" (EVANS *et alii*, 1984).

Macronutrientes	MS		BS		WH ^a	
	μM	mg/l	μM	mg/l	μM	mg/l
NH_4NO_3	20,6	1650	-	-	-	-
KNO_3	18,8	1900	25	2500	0,8	80
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,0	440	1,0	150	-	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	370	1,0	250	3,0	737
KH_2PO_4	1,25	170	-	-	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	1,0	134	-	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	1,0	150	0,12	19
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	1,2	288
KCl	-	-	-	-	0,9	65
Na_2SO_4	-	-	-	-	1,4	200

Macronutrientes	MS		BS		WH ^a	
	μM	mg/l	μM	mg/l	μM	mg/l
KI	5	0,83	4,5	0,75	4,5	0,75
H_3BO_3	100	6,3	50	3,0	(25)	(1,5)
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100	22,3	-	-	29,8	6,65
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	60	10	-	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30	8,6	7	2,0	9,3	2,67
$\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	0,25	1,0	0,25	-	-
MnO_3	-	-	-	-	(0,007)	(0,0001)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,025	0,5	0,025	(0,004)	(0,0001)
$\text{CaSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,025	0,1	0,025	-	-
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	-	-	-	-	6,3	2,5
Na_2DETA	100	37,3	100	37,3	-	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100	27,8	100	27,8	-	-

MS = MURASHIGE & SKOOG (1962)

BS = GAMBORG *et alii* (1968)WH^a = WHITE (1963)

Provavelmente, uma das vantagens de se adicionar vitaminas no meio de cultura poderia ser a de minimizar o "stress" sobre o explante. O "stress" resultaria em uma baixa capacidade de expressão na síntese de vitaminas. As vitaminas comumente utilizadas nos meios de cultura são: vitamina B (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina e ácido pantotênico); vitamina E (dl-alfa-tocoferol acetato), entre outras (SUNDERLAND, 1974; OHIRA *et alii*, 1976) (ver Tabela 2).

2.2.2.2.2. Fonte de carbono

A sacarose é indispensável no meio basal, não somente como fonte de carbono, mas também por estar envolvida nos processos de osmorregulação. Normalmente, 0,058-0,12M de sacarose é suficiente, porém altas concentrações (0,17 - 0,29 M) têm dado melhores resultados em algumas culturas como trigo, cevada, batata e arroz (OUYANG *et alii*, 1973; CLAPHAM, 1973; SOPORY *et alii*, 1978; CHEN, 1978).

KELLER *et alii* (1975) e SANGWAN & NORREEL (1977) indicaram que a sacarose é a melhor fonte de carboidrato, não podendo ser substituída por outro dissacarídeo. Entretanto, WENZEL *et alii* (1977) mostraram que a glicose pode ser usada em cultura de antera de centeio e KELLER & ARMSTRONG (1978) observaram que a frutose pode ser utilizada, porém menos efetivamente.

A concentração da sacarose pode variar de acordo com a cultura, como tem sido observado por vários autores. Nas culturas de fumo e arroz, a concentração de 2-5%

de sacarose no meio tem se mostrado eficiente para a formação de calo e geração de planta (NITSCH & NITSCH, 1969; KUO *et alii*, 1978; CHU, 1978). Entretanto, para a cultura de batata, trigo, triticale e cevada, são necessários altos níveis de sacarose: 6-12% (SOPORY *et alii*, 1978; KELLER *et alii*, 1975; CHU *et alii*, 1978; SUN *et alii*, 1980; CLAPHAM, 1973). Na cultura de milho, a melhor resposta tem sido obtida com níveis de 12-15% (MIAO *et alii*, 1978; KU *et alii*, 1978), enquanto que para a cana-de-açúcar, o nível de sacarose tem atingido 20% (CHEN, 1978).

Existem evidências de que a produção de alguns metabólitos, pelos tecidos de plantas, pode ser efetuada pelas concentrações de sacarose (TABATA, 1977).

A adição de carvão vegetal ativado no meio de cultura é uma fonte que promove o bom desenvolvimento de tecidos vegetais. Entretanto, o uso desta fonte de carbono estimula o crescimento de vários fungos contaminantes, como observado por PARMENTIER (1970) e BUTLER & BIKAN (1973). Os trabalhos realizados por diferentes pesquisadores mostraram que a cultura "in vitro" de vários vegetais utilizando carvão ativado como fonte de carbono, resulta no crescimento de fungos (PROSKAUER & BERMAN, 1970; KLEIN & BOPP, 1971; KATO, 1973; ERNEST, 1974). Apesar desta dificuldade, ANAGNOSTAKIS (1974), trabalhando em cultura de fumo, observou um aumento de 15 para 45% na produção de anteras androgenéticas. Resultados similares foram obtidos por BAJAJ (1977) que, cultivando anteras de fumo com 2% de carvão ativado, obteve um

aumento de anteras androgenéticas de 41 para 91%. Outros resultados similares têm sido observados em anêmona (JOHANSSON & ERIKSSON, 1977), em centeio (WENZEL *et alii*, 1977) e em batata (SRPORY *et alii*, 1978).

2.2.2.2.3. Reguladores de crescimento

Os hormônios atuam nas plantas para regular, coordenar e guiar os processos de desenvolvimento normal, tanto no crescimento como na diferenciação de tecidos, uma vez que as atividades celulares e os metabolismos celulares são controlados pelos hormônios. A adição de reguladores de crescimento no meio de cultura para a obtenção de calos nem sempre é necessária, contudo, é imprescindível para a diferenciação (RAGHAVEN, 1975).

A concentração e o tipo de hormônio mostram ser uma forte estratégia para a obtenção de plantas haplóides em culturas de anteras. Em geral, para cada etapa de desenvolvimento do explante, calo, broto e raiz, são necessários meios de cultura com concentração hormonal diferenciada (CLAPHAM, 1977).

NITSCH (1969) observou que a androgênese do pólen pode ser induzida em um simples meio mineral - sacarose com plantas semelhantes a fumo. Já RAGHAVEN (1975) mostra que, para completar a androgênese em *Hyoscyamus*, é necessário adicionar certos reguladores de crescimento. CLAPHAM (1977) reconhece que, para a cultura de antera de cereais, é necessário adicionar certos reguladores de crescimento.

to, tanto auxinas como citocininas. No caso de utilizar meios complexos enriquecidos com auxinas semelhantes a 2,4-D, estas substâncias ajudam na formação de calos, entretanto podem ocasionar instabilidade genética.

2.2.2.2.3.1. Auxinas

Segundo a revisão de SOEDING (1961) e THIMANN (1972), a ausência de auxinas inibe a síntese de DNA, e torna-se difícil analisar seu efeito e modo de ação. O papel das auxinas na divisão celular está relacionado com a fase G_1 do ciclo celular. As auxinas mais utilizadas em meio de cultura, para diferenciação, são classificadas de acordo com sua atividade, em: IAA, IBA, NAA, CPA e 2,4-D, sendo que IAA é a auxina natural e a menos ativa do grupo, além de ser facilmente metabolizada no tecido. As concentrações comumente utilizadas estão compreendidas entre 0,01-10,0 mg/l. Os mesmos autores citam que as auxinas controlam os processos de dominância apical, alongação da célula em raízes e brotos, alteração na permeabilidade do plasmalema, formação de etileno, indução e formação de raízes adventícias, aumento da taxa de respiração e a formação de frutos partenocáricos em algumas espécies. Elas também inibem a formação de embrião em cultura de células em suspensão, causam irregularidades mitóticas em cultura de tecidos de longa duração e, em altas concentrações, induzem a desorganização do crescimento.

Na Figura 2, pode-se apreciar a estrutura química das auxinas mais utilizadas na cultura de tecidos de plantas.

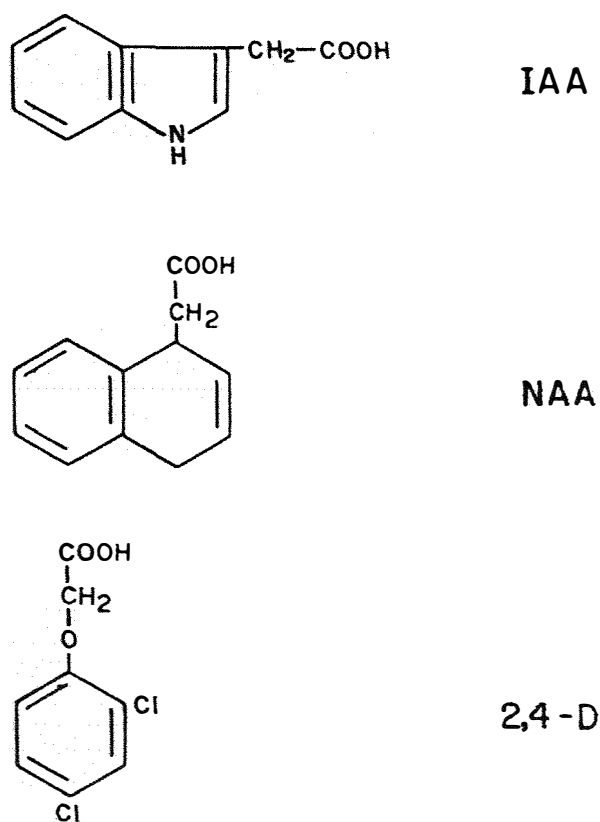


Figura 2. Auxinas mais utilizadas na cultura de tecidos de plantas (Segundo SOEDING, 1961 e THIMANN, 1972).

2.2.2.2.3.2. Citocininas

SKOOG (1971) cita que, ao contrário das auxinas e substâncias similares, as citocininas representam um grupo homogêneo. Dentro deste grupo temos: cinetina, 2iP (DMAAP), zeatina e BA (BAP). A mais usada é a cinetina, mas não é uma citocinina natural. Segundo este mesmo autor este hormônio participa de vários processos: crescimento celular; diferenciação do tecido; dormência; várias fases de florescimento, frutificação e da senescência; duplicação do DNA (mitose); desenvolvimento dos cloroplastos; estímulo da germinação (quebra de dormência); pegamento e crescimento dos frutos; retração na senescência da folha.

Na Figura 3, são mostradas as estruturas químicas das quatro citocininas mais utilizadas nos meios de cultura para vegetais.

2.2.2.2.3.3. Giberelinas e outros fitohormônios

Segundo WESCOTT *et alii* (1977), o efeito das giberelinas, do ácido abscísico e do etileno, nas células vegetais, tem sido muito limitado na cultura "in vitro". Talvez os efeitos de hormônios deste grupo sejam pouco estudados e, conseqüentemente, os resultados são pouco significativos. Estes autores observaram indução de crescimento de brotos de diversas espécies de *Solanum* pelo uso de giberelinas.

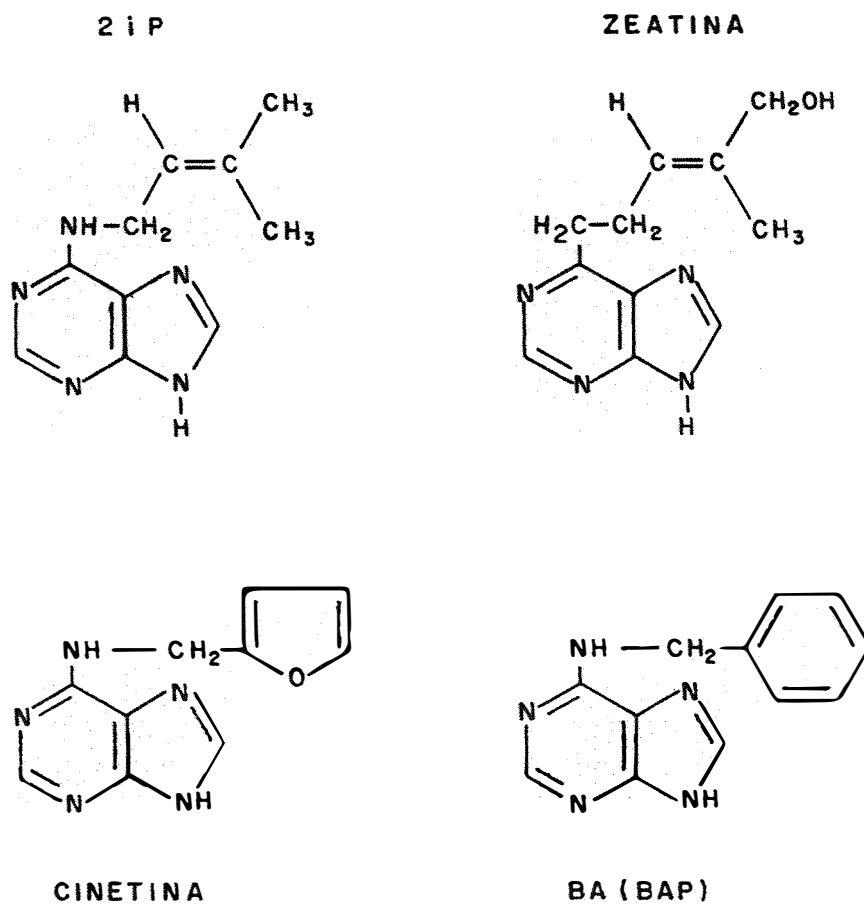


Figura 3. Citocininas mais utilizadas na cultura de tecidos de plantas (Segundo SKOOG, 1971).

2.2.2.2.3.4. Fatores físicos e químicos que afetam a concentração de fitohormônios no meio de cultura

Os pré-requisitos para a ação dos fitohormônios são a estabilidade e a facilidade de absorção dos mesmos pelas células dos tecidos. A atividade dos fitohormônios irá depender da sua concentração, da estabilidade dos hormônios no meio de cultura durante a preparação e esterilização do meio e, também, da translocação e metabolismo dos fitohormônios nos tecidos durante o período de cultivo (SEMBDNER *et alii*, 1980).

Os mesmos autores acima citados observaram ainda que, em soluções aquosas, a auxina nativa (IAA) é degradada por ácidos, radiações ionizantes, luz ultravioleta, luz visível e oxigênio ou peróxidos. O NAA e o 2,4-D são mais estáveis a estes fatores do que o IAA. Entretanto, o IAA é facilmente degradável durante a autoclavagem e por processo de descarboxilação. LOEWENBERG (1965) salienta que o IAA pode ser destruído na presença de Mn^{2+} , ácido cítrico e oxigênio. Por outro lado, DEKHUIJZEN (1971), usando técnica cromatográfica, comenta que as citocininas (cinetina, zeatina e 2iP) não são degradadas em soluções aquosas após uma hora de autoclavagem.

2.2.3. Estágio do explante

Anteras, contendo micrôsporos em estágio ôti-

mo de desenvolvimento em um meio de cultura adequado, resultam em uma maior produção de calos e conseqüentemente de plantas haplóides. Por outro lado, não parece haver um estágio único, nem mesmo para espécies intimamente relacionadas (SUNDERLAND, 1973).

Nos casos de angiospermas que possuem um número indeterminado de botões por inflorescência, estes podem estar organizados de forma tal que as anteras cubram quase todos os estágios da microsporogênese. Diferentes estágios podem, provavelmente, estar correlacionados com diversos comprimentos das anteras. Em espécies com número determinado de botões por inflorescência, uma série de botões é requerida para completar o mesmo nível de estágio. Por outro lado, uma seqüência da microsporogênese pode ser organizada observando-se botões de inflorescências de diversas idades (SUNDERLAND, 1973).

No entanto, vários estudos com espécies diferentes têm demonstrado que a correlação entre a morfologia floral do botão e o estágio do micrósporo não é sempre válida. Botões de determinado tamanho morfológico variam grandemente no estágio de desenvolvimento dos micrósporos contidos nas anteras durante o período de floração. Através de preparações citológicas, de uma amostra de anteras, pode-se constatar realmente o estágio de desenvolvimento do micrósporo, já que o tamanho do botão e o comprimento da antera não são indicadores reais do estágio do micrósporo, como em *Datura innoxia*. Portanto, estes não podem ser usados como critério

único na determinação do estágio dos micrôsporos para o cultivo de anteras (SOPORY & MAHESHWARI, 1976).

De acordo com os resultados obtidos por alguns pesquisadores, o estágio ótimo do micrôsporo para a cultura pode variar de uma espécie para outra e, possivelmente, de uma cultivar para outra. Isto pode, também, ser influenciado pelas condições ambientes dentro da qual a planta doadora está em crescimento (SUNDERLAND, 1973).

Foi sugerido por vários pesquisadores que a primeira mitose do pólen, no micrôsporo uninuclear, seja estágio ótimo para a cultura em muitas espécies (NAKATA & TANAKA, 1968; NITSCH, 1970; KAMEYA & HINATA, 1970; ABO & HILDEBRANDT, 1971; OUYAND *et alii*, 1973; WANG *et alii*, 1974; TOMES & COLLINS, 1976; KUO *et alii*, 1978; CHEN, 1978 e SUNDERLAND, 1974). Entretanto, COLLINS & SUNDERLAND (1974) consideram que o estágio binuclear inicial é o ideal para o cultivo de anteras de *Nicotiana attenuata* e *N. knightiana*.

Trabalhos realizados por GRESSHOFF & DOY (1972a, b) mostram que o estágio de metáfase I da meiose, da célula mãe do pólen, foi o melhor para *Arabidopsis thaliana* e *Lycopersicon esculentum*. Dados contraditórios a estes resultados foram encontrados por ZAMIR *et alii* (1980) em *Lycopersicon*, onde o melhor estágio foi o uninucleado do pólen. Em cultura de anteras de fumo (NITSCH & NITSCH, 1969), de cevada (CLAPHAN, 1971) e de arroz (NIIZEKI & OONO, 1971), a fase 2 (uninucleada do pólen) representa o estágio mais favorável. Em *Brassica oleracea*, as anteras na fase 3 (binuclear do pó-

len) apresentam maior frequência de calos (KAMEYA & HINATA, 1970). BAJAJ (1978) recomenda a fase unicelular do pólen como a mais propícia para testes experimentais de cultura de anteras.

Por outro lado, o nível de ploidia de plantas regeneradas está relacionado ao estágio do pólen. Por exemplo, quando foram cultivadas as plantas obtidas de anteras, como observado em fumo (ENGVILD, 1974). *Datura* (ENGVILD et alii, 1972) e *Hyoscyamus* (CORDUAN, 1975), os cultivos a partir de pólen de estágios uninucleados foram haplóides, enquanto que, de estágios mais tardios, encontravam-se vários níveis de ploidia.

2.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO E IDADE DA PLANTA DOADORA

Plantas mantidas em condições saudáveis representa a fonte ideal de material para a cultura. Assim, as condições de umidade e fertilidade, sob as quais as plantas são cultivadas, bem como luz e temperaturas fornecidas, influenciam grandemente a produção de plantas haplóides de anteras. Os níveis hormonais endógenos também estão relacionados com o sucesso da cultura (SUNDERLAND, 1974).

Segundo ANAGNOSTAKIS (1974), flores e plantas relativamente jovens são mais adequadas que os botões florais de plantas que estão no fim de seu período de crescimento, mostrando que, em geral, a idade assim como outras

condições fisiológicas da planta influenciam consideravelmente a eficiência da androgênese. SUNDERLAND (1971) e TOMES & COLLINS (1976) estabeleceram a importância da idade da planta para a cultura de anteras, mostrando efeitos significantes do número de dias que as plantas tinham estado florescendo com relação à produção de plantas haplóides.

NITSCH & NORREEL (1973) mostraram a influência da temperatura para o crescimento das plantas, baseados no experimento com *Datura*, onde as plantas que cresceram a 24°C deram uma alta frequência de androgênese (45%), enquanto aquelas que cresceram a 17°C apresentaram apenas 8% de androgênese. Fato contraditório foi observado em *Brassica napus* (KELLER & STRINGAM, 1980), onde foram verificados melhores resultados com anteras excisadas de plantas cultivadas a baixas temperaturas.

A remoção das flores idosas em *Datura* (NITSCH, 1975) e da porção apical da inflorescência do trigo (PICARD, 1973) causa um aumento na frequência de androgênese. BAJAJ (1972), trabalhando com *Triticum aestivum*, observou que anteras de plantas crescidas em campo foram mais saudáveis e mais robustas e deram melhores resultados na androgênese que as crescidas em casa de vegetação com iluminação limitada. SUNDERLAND (1978) observou que anteras de fumo excisadas de plantas com deficiência de nitrogênio, são mais produtivas que plantas sem esta deficiência.

2.4. CONDIÇÕES FÍSICAS DA CULTURA DE ANTERAS

Durante as investigações sobre androgênese, os fatores químicos têm recebido maiores atenções. Entretanto, nos últimos anos, além dos fatores químicos, as condições físicas para a cultura de anteras têm sido consideradas de grande importância (SUNDERLAND, 1971).

MAHESHWARI *et alii* (1980) demonstraram que vários fatores, tais como temperatura, luz, forma de colocar as anteras em meio sólido, número de anteras por vaso de cultura e a atmosfera do vaso de cultura, afetam a resposta das anteras. SUNDERLAND (1971), trabalhando com *Nicotiana tabacum*, e SOPORY & MAHESHWARI (1976), com *Datura innoxia*, observaram que a temperatura ótima para a cultura de anteras está compreendida entre 25 a 30°C, enquanto que a temperatura inferior ou superior causa um declínio muito rápido.

SANGWAN-NORREEL (1977) e SUNDERLAND & ROBERTS (1977), trabalhando com *Datura innoxia* e *Nicotiana tabacum*, respectivamente, observaram que um período inicial de escuridão seguido por luz resulta em efeitos positivos, salientando o papel importante do fotoperíodo na indução de haplóides a partir de pólen.

Segundo NITSCH (1977), na cultura de pólen de fumo, a luz vermelha é mais apropriada do que a luz azul ou branca. Uma generalização sobre os efeitos inibitórios dos diferentes tipos de luz utilizados nos trabalhos de androgênese é difícil. Apesar da discussão a respeito de que a luz

azul mediana tem efeito sobre fitocromos (SOPORY & MAHESHWAMI, 1976).

2.5. MUTAGÊNESE INDUZIDA

A idéia de usar células em cultivo para induzir e estudar mutações em plantas superiores regeneradas teve início em 1958, com calos haplóides de *Antirrhinum majus*, obtendo-se multiplicação de células em suspensão e, subsequentemente, tratamento com raios X. A radiosensitividade das células em cultura foi menor quando comparada aos tecidos de meristema (MALISA et alii, 1973).

CHOUREY et alii (1973), trabalhando com raios X em *Nicotiana tabacum*, e EPIEGEL-ROY & KOCHBA (1980), trabalhando com citrus, salientam que a irradiação reduz os níveis de auxinas, aos sub-ótimos.

O material haplóide é especialmente útil para estudos de mutagênese, pois não existe a relação de dominância e recessividade. A mutação é imediatamente expressa nos haplóides, enquanto que no material diplóide isto não ocorre, uma vez que a maioria das mutações é recessiva e a presença do gene dominante não mutado poderá mascarar a mutação (NITZSCHE & WENZEL, 1977).

Células de calos haplóides têm sido utilizadas em vários trabalhos para estudo do efeito de vários mutagênicos, tanto físicos como químicos. Em células haplóides

em cultura, os mutantes podem ser isolados em várias espécies de plantas, como observado por vários pesquisadores em linhas celulares, tecidos e plantas inteiras resistentes a estreptomicina (BINDING *et alii*, 1970; MALIGA *et alii*, 1973), sulfoximina de metionina (CARLSON, 1973), nematóide (WENZEL & UHRIG, 1981), e temperaturas (GEBHARDT *et alii*, 1981).

NITSCH *et alii* (1969) submeteram plantas jovens de fumo (durante a emergência das anteras) a várias doses (1500-3000 rad) de raios γ , e relataram que as plantas obtidas através de cultura destas anteras irradiadas mostraram anormalidades em tamanho, forma e cor das flores e que algumas eram quimeras. Posteriormente, NITSCH (1972) obteve mutantes de flores brancas e marrons, quando anteras de fumo foram cultivadas num meio suplementado com 10^{-6} μ M de N-3-nitrofenil-N-fenilureia. DEVREUX & SACCARDO (1971) irradiaram o botão floral de *Nicotiana tabacum*, cultivar "Bright", com raios X (1000 R) e as anteras excisadas foram subsequentemente cultivadas. Os resultados mostram que 50% das plantas obtidas eram fenotipicamente anormais e 6% com aberrações cromossômicas. Protoplastos haplóides de fumo (GALUN & RAVEH, 1975) mostraram radiosensitividade diferencial para a radiação γ .

Aparentemente, no processo de utilização de mutagênicos químicos e físicos "in vitro", o problema maior não está na indução de mutação a nível celular, mas sim no isolamento e seleção dos mutantes. Provavelmente, uma das soluções seria extrapolar ou aproximar as técnicas de isola-

mento e identificação de mutantes utilizadas para microrganismos, visando contornar estas dificuldades. Outro problema que pode ser encontrado é a preservação destas mutações induzidas, uma vez que longo período de cultivo "in vitro" poderá promover outras alterações genéticas do material. A perspectiva de solução deste problema pode ser a criobiologia ou seja, a técnica de preservação de tecidos em nitrogênio líquido (Bajaj & Reinert*, citado por BAJAJ, 1984).

2.6. PLOIDIA E INSTABILIDADE CITOLÓGICA EM CULTURA DE CÉLULAS HAPLÓIDES

Segundo BOURGIN & NITSCH (1967) e SUNDERLAND (1971), a maioria das plantas cultivadas a partir de pólen de fumo é haplóide. McCOM (1978) refere que, em todas as espécies testadas pela técnica da cultura de anteras e/ou pólen "in vitro", obteve-se mais facilmente diplóides, poliplóides ou aneuplóides do que haplóides.

ENGVILD (1973, 1974) e ENGVILD *et alii* (1972), trabalhando com *Datura* e *Nicotiana*, observaram que a proporção de plantas diplóides e poliplóides aumentava quando anteras idosas eram cultivadas. BINDING (1974) relata que existe relação entre a proporção de haplóides e os constituintes

* BAJAJ, Y.P.S. & REINERT, J. Cryobiology of plant cell cultures and establishment of gene banks. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture**. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.757-77.

hormonais no meio de cultura, desde que as auxinas têm marca da influência na ploidia de cultura de células.

São poucos os casos em que plantas diplóides, derivadas de cultura de anteras, podem ter sido originadas do tecido somático (NIIZEKI & OONO, 1971) ou de micrósporo não reduzido (WENZEL *et alii*, 1976). A maioria das plantas obtidas de cultura de pólen é realmente oriunda de micrósporos. A confirmação deste fato é obtida através da análise genética de plantas diplóides derivadas de anteras de híbridos, que diferem em muitas características, porém suas progênes são muito uniformes (NIIZEKI & OONO, 1971; OUYANG *et alii*, 1973; YIN *et alii*, 1976; HSU *et alii*, 1975). Os diplóides espontâneos e poliplóides observados têm sido atribuídos, geralmente à endomitose e à fusão nuclear em pólen cultivado (RAQUIN & PILET, 1972; ENGVILD, 1973 e 1974; CHU, 1978; HU *et alii*, 1978), enquanto que os aneuplóides, possivelmente, surgem por causa de mitoses irregulares de calos de pólen (HU *et alii*, 1978).

Repetidamente, tem sido observado que células em cultura exibem instabilidades citológicas. Linhas de células cultivadas "in vitro" têm uma grande tendência para aumentar o nível de ploidia, como observado por SACRISTAN (1971) quando, utilizando linhas celulares haplóides, notou o aparecimento de diplóides, enquanto que os cultivos de diplóides originaram tetraplóides. Esta tendência, das células em cultura, de sofrer endomitose é um dos principais obstáculos para a manutenção de células haplóides em cultura.

Portanto, faz-se necessário descobrir um mecanismo que permita manter as células no mesmo nível de ploidia, quando cultivadas em meio de cultura.

DAY & JONES (1971) relataram que o PFP (parafluorofenilalanina) induz haploidização em *Aspergillus* e *Ustilago*. CARLSON et alii (1972) estenderam este trabalho para calos de *Nicotiana tabacum*, variedade "Havana Wisconsin", e observaram que, em culturas mixoplóides, o crescimento de células diplóides foi progressivamente inibido com o aumento da concentração de PFP (1-9 mg/l), enquanto que o crescimento de células haplóides não foi afetado. Resultados similares foram observados por REINERT et alii (1977) em *N. tabacum* e *Atropa belladonna*, utilizando 15-20 mg/l de PFP. Eles concluíram em seus trabalhos que é possível manter culturas de células haplóides estáveis e selecioná-las quando se utiliza um sistema de populações mistas. DIX & STREET (1974) observaram inibição de crescimento de células diplóides de *Nicotiana glauca* quando utilizaram PFP na concentração de 37,5 mg/l. Não foi observada seleção de linhas celulares utilizando culturas mistas. Estes autores concluíram que o genótipo determina a sensibilidade a PFP e não o nível de ploidia. Resultados similares foram relatados em *Datura* e fumo por MATTHEWS & VASIL (1975), os quais observaram inibição do crescimento de linhas haplóides e diplóides. Estes trabalhos sugerem que o PFP pode prevenir a reversão de haplóides, como também prolongar a fase haplóide em cultura de algumas espécies.

COLLINS & LEGG (1974) e COLLINS (1975) sugerem que, embora não existam informações concretas sobre as causas que provocam a instabilidade genética e cromossômica de linhagens haplóides e haplóides duplicadas, este obstáculo não é um problema de magnitude suficiente para restringir os trabalhos com haplóides.

2.7. REGENERAÇÃO DE PLANTAS

As técnicas "in vitro" em plantas superiores dependem grandemente do sucesso da regeneração de plantas. Poucas espécies de cultivo, tais como fumo e cenoura, têm sido bastante exploradas "in vitro" por causa de sua facilidade na regeneração. Nos últimos anos, entretanto, através dos trabalhos de regeneração de plantas "in vitro", têm-se aberto caminhos para a obtenção de variabilidade genética em plantas que estão sendo cultivadas. Por outro lado, devido ao uso intensivo de cultivares já melhoradas, a variabilidade genética tem sido reduzida, sendo que a cultura "in vitro" representa uma nova fonte de variabilidade genética, que pode ser usada para o desenvolvimento de novas variedades de cultivo. As técnicas de cultura de células e tecidos, utilizadas tanto no grupo dos cereais como das leguminosas, têm contribuído no desenvolvimento de novas técnicas de regeneração de plantas de outras espécies de cultivo (SUNDERLAND, 1974).

As plantas da família Solanaceae têm sido uti

lizadas como sistemas modelos de estudos "in vitro": a totipotência foi primeiro mostrada em *Nicotiana tabacum*, pela regeneração de plantas imaturas a partir de simples células somáticas (VASIL & WILDERBRANDT, 1965); a produção de plantas haplóides pela cultura "in vitro" de anteras excisadas foi relatada primeiramente em *Datura innoxia* (GUHA & MAHESHWATI, 1964); a regeneração de planta a partir de protoplastos isolados foi obtida em *Nicotiana tabacum* (TAKEBE et alii, 1971) e o primeiro híbrido somático foi obtido em *N. langsdorffii* e *N. glauca* (CARLSON et alii, 1972).

Os primeiros trabalhos sobre a concentração de fitohormônios, como o realizado por SKOOG & MILLER (1953), mostraram que não existe a relação entre a concentração de citocininas e auxinas para formação de broto ou raiz. Entretanto, estudos posteriores realizados por DURAND et alii (1973) salientam que uma alta concentração de auxinas no meio de cultura e baixa de citocininas favorecem a formação de raiz, e que a alta concentração de citocininas e baixa de auxinas induzem à formação de brotos. Outros trabalhos realizados por DHIRA (1970), GAUTIER (1972) e CHYLAH et alii (1975) evidenciaram que a sacarose no meio de cultura pode reverter os efeitos dos fitohormônios.

Segundo KARTHA et alii (1976), em tomate e espécies relacionadas, a formação de brotos pode ocorrer com uma baixa frequência, usando meio para indução de calos ou com maior frequência com alta concentração de citocinina. Os mesmos autores mostraram que raízes podem ser obtidas com

alta concentração de auxinas tais como NAA e IAA. COLEMAN & GREYSON (1977) demonstram que o GA_3 , também induz a formação de raiz em plantas da família Solanaceae.

HERMAN & HASS (1978) consideram o tomate como uma cultura difícil para técnicas de cultura de tecidos em comparação com outras espécies de Solanaceae, uma vez que as culturas de calos apresentam menor habilidade para diferenciação.

Trabalhando com calos obtidos a partir de explantes de folhas de tomate, ZENKTELER (1972) conseguiu regeneração de brotos utilizando BAP e IAA no meio de cultura.

Já em 1978, MEREDITH não conseguiu a regeneração de plantas de tomate, mesmo em calos, produzidos por explante de folhas, cultivadas por um longo período de tempo. Posteriormente, este mesmo autor relata que linhas de calos foram capazes de produzir plantas normais após quatro meses de cultivo. Entretanto, após dezessete meses, obtiveram-se plantas anormais, incapazes de formar raízes. GRESSHOFF & DOY (1972a) conseguiram regenerar plantas haplóides anormais a partir da cultura de antera, e de igual modo, ZAMIR et alii (1980) também obtiveram sucesso com um mutante macho estéril, ambos trabalhando com tomate.

2.8. MECANISMO DE DUPLICAÇÃO DE MATERIAL HAPLÓIDE

A condição haplóide é vantajosa quando a condição homozigota simplifica ou busca a identificação de ca-

racteres controlados por fatores genéticos recessivos. Em geral, as plantas haplóides são estéreis e a manutenção dessa linhagem para produção de sementes e, subsequentemente, para a manipulação genética, exige o estabelecimento da condição diplóide (JENSEN, 1974).

Os métodos empregados para a duplicação dos cromossomos em haplóides são variados. Geralmente, ocorre duplicação espontânea ou pode ser provocada através da poda de plantas haplóides (JENSEN, 1974). TANAKA & NAKATA (1969) obtiveram diplóides de fumo a partir da diploidização de pólen, induzida pelo tratamento do botão da planta doadora com colchicina. Já BURK *et alii* (1972) diploidizaram, com colchicina, a muda de fumo proveniente de cultura de antera. Além da colchicina, YIN *et alii* (1976) demonstraram que a duplicação cromossômica em fumo pode ocorrer usando fenilmercúrio-p-toluonossulfonilido que é um germicida.

Outro método descrito por KASPERBAUER & COLLINS (1972) envolve o uso de cultura de calos, a partir de segmentos de folhas, talos ou raízes de plantas haplóides. Foi também relatado por vários pesquisadores, que culturas somáticas de plantas haplóides originaram diplóides homozigotos (NITSCH *et alii*, 1969; KASPERBAUER & COLLINS, 1972; WEATHERHEAD & HENSHAW, 1979).

2.9. APLICAÇÕES DE HAPLÓIDES EM PESQUISAS BÁSICAS E NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

Em sua revisão sobre a utilização de haplóide

des em pesquisas fisiológicas e bioquímicas, ZENK (1974) salienta a importância deste material haplóide em: identificação e seleção de mutantes auxotróficos para a elucidação de caminhos bioquímicos; seleção de resistência a antibióticos, análogos de base e herbicidas; seleção para adaptação das condições ambientais; e seleção para uma grande produção de metabólitos.

Segundo CARLSON & POLACCO (1975), várias revisões têm sido feitas sobre a aplicação de técnicas genéticas celulares, inclusive a utilização de células haplóides, no estudo de plantas superiores.

Outros pesquisadores têm dirigido sua atenção a aplicações específicas de haplóides ao melhoramento de plantas, como refere CHU (1981), que salienta: produção rápida e utilização imediata de linhagens homozigotas, principalmente em espécies autoincompatíveis, dióicas e de propagação vegetativa; utilização em hibridações distantes, como formação de linhagens híbridas férteis entre sub-espécies; adições e substituições de cromossomos em híbridos interespecíficos e transferência de genes entre espécies; e aproveitamento rápido das mutações espontâneas ou induzidas, de interesse para o melhoramento vegetal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP.

3.1. MATERIAL

O material (semente de tomate, população F_2 do cruzamento co. Santa Cruz x mutante folha de batata) utilizado para estes trabalhos foi proporcionado pela Seção de Melhoramento de Hortaliças do Departamento de Genética, ESALQ - USP, cujos genes marcadores "A" e "a" controlam o fenótipo folha recortada e folha de batata respectivamente, assim como também o gene "C" e "c" são responsáveis pelos fenótipos cor do hipocótilo roxo e verde respectivamente, ambos de herança monogênica.

Outro material (semente F_1), descrito abaixo, foi fornecido pela ASGROW do Brasil Sementes Ltda:

Motelle x Zambão (A)

Raminho x Zambão (B)

Colorado (C)

Olho Roxo x Zambão (D)

Sunny (E)

A semeadura foi feita em vasos, em casa de vegetação, e somente as plântulas mais vigorosas e sadias foram selecionadas para servirem de plantas doadoras de anteras.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Assepsia do explante

A assepsia dos botões florais foi feita basicamente de acordo com o método apresentado por ZAMIR *et alii*, (1980), ou seja, esterilização da superfície do botão floral com álcool a 70% e hipoclorito de sódio, com posteriores lavagens do material, quatro a seis vezes em água destilada e esterilizada. Os botões florais foram colhidos das 8:00 às 9:00 am, sendo as anteras removidas (excisão) assepticamente em câmara de fluxo laminar, com ajuda de um estereomicroscópio. A Foto 1 apresenta uma inflorescência do material utilizado (Foto 1-1), diversos tamanhos do botão floral e frutos (Foto 1-2) e o material utilizado para manipulação das anteras na câmara de fluxo laminar (Foto 1-3).

Para identificar a melhor condição de assepsia, foram testadas as seguintes modificações na técnica inicialmente utilizada pelos autores acima mencionados: álcool 70%

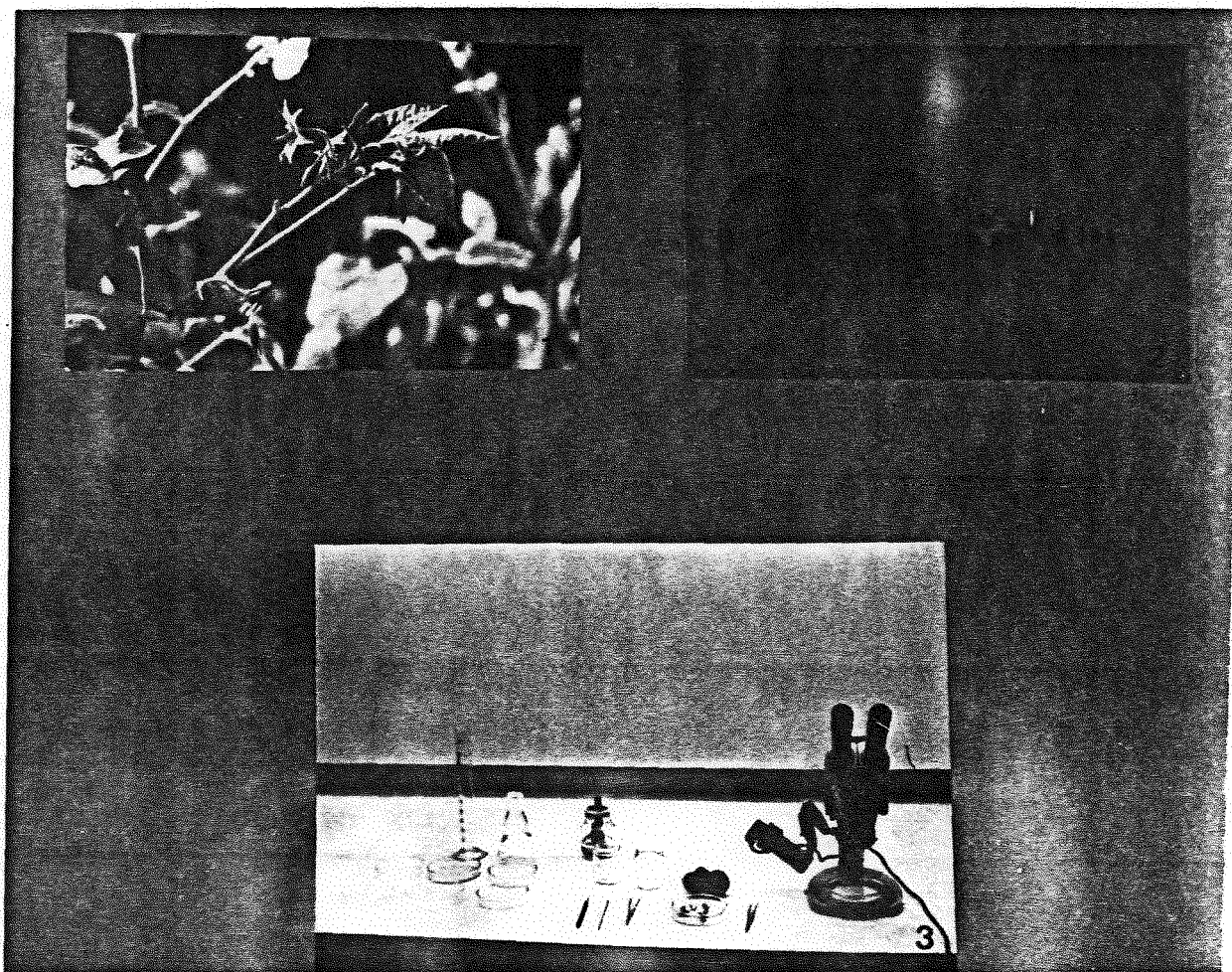


Foto 1. Materiais utilizados na cultura de anteras.

1. Inflorescência da planta do tomate.
2. Diferentes tamanhos do botão, flor e fruto do tomate.
3. Materiais e equipamentos da cultura de anteras.

por 10, 15 e 20 segundos e hipoclorito de sódio a 2%, 3% e 5% por 2, 3, 4 e 5 minutos.

3.2.2. Seleção do explante

Na seleção das anteras a serem inoculadas, foi utilizado o critério de tamanho do botão floral, a fim de se identificar o estágio ideal que produzisse maior frequência de indução de calos. Para as plantas da população F_2 , as primeiras a serem testadas, os botões florais foram agrupados a partir do menor tamanho, o que possibilitou uma boa manipulação das anteras sob observação ao estereomicroscópio. Foram então, agrupados em intervalos regulares formando quatro classes de botões florais: 1,0 a 2,9 mm; 3,0 a 4,9 mm; 5,0 a 6,9 mm e 7,0 mm em diante (Foto 2).

Partindo da experiência com as plantas F_2 , que mostraram que os botões florais de menor tamanho não formaram calos, as classes escolhidas para as plantas F_1 , foram 2,0 - 4,9 mm; 5,0 - 5,9 mm e 7,0 mm em diante.

3.2.3. Meio de cultura

No presente trabalho, utilizou-se como meio basal o de MURASHIGE & SKOOG (1962), conhecido como MS que, segundo PADMANABHAN et alii (1974), tem sido usado de maneira

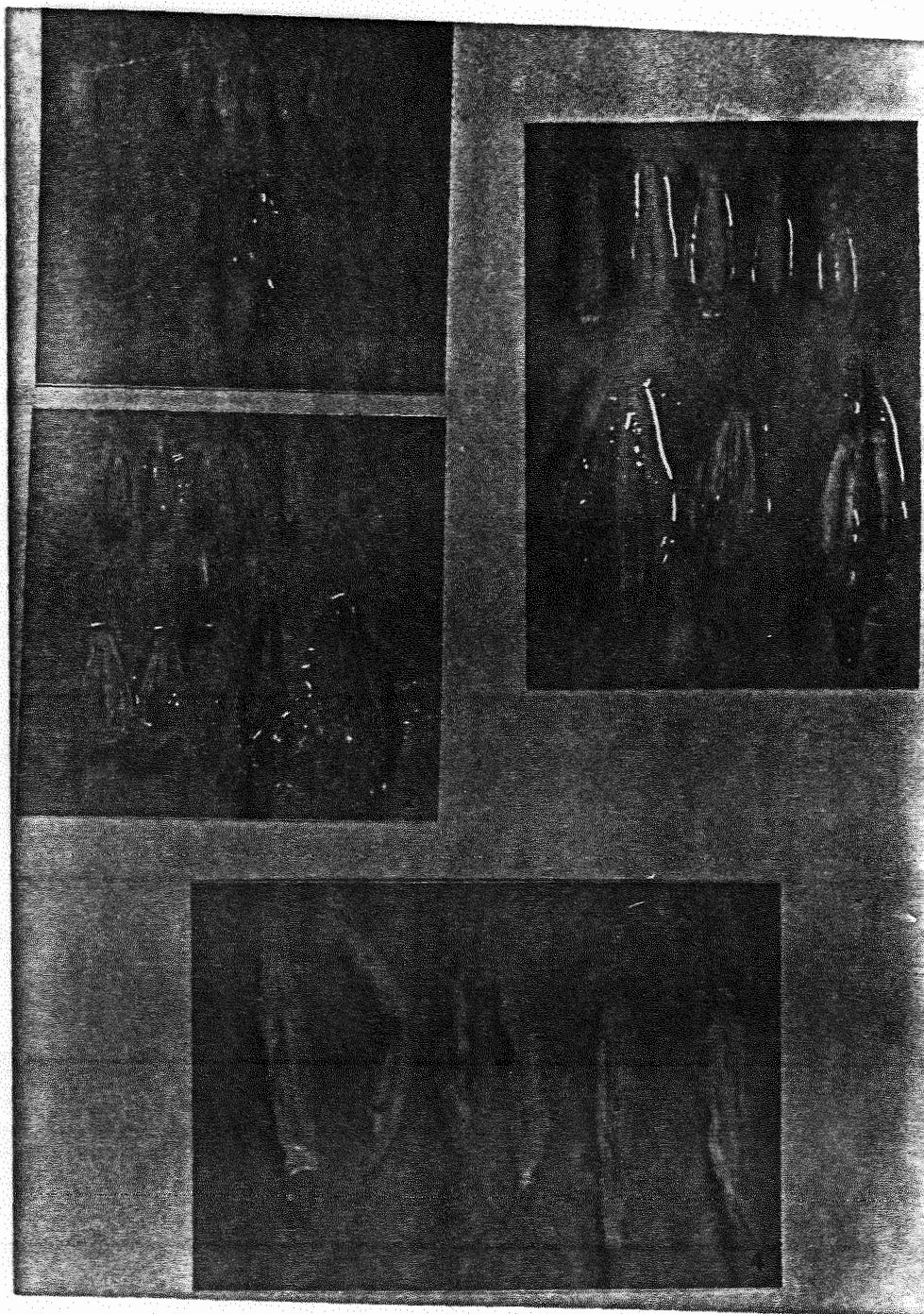


Foto 2. Tamanho do botão floral (x 16).

1. 1,0 mm - 2,9 mm
2. 3,0 mm - 4,9 mm
3. 5,0 mm - 6,9 mm
4. maior de 7,0 mm

universal nos trabalhos de cultura "in vitro" e, em especial, no grupo de espécies da família Solanaceae.

Baseados nos trabalhos de GRESSHOFF & DOY, (1972), foram realizados testes com as seguintes substâncias adicionadas ao meio MS, para a indução e formação de calos: 2 a 5 mg/l de NAA; 2 a 3 mg/l de cinetina; 2 a 8 mg/l de 2,4-D; 50 a 200 ml/l de água de coco maduro; 150 a 250 ml/l de suco de tomate (Tabela 4).

Para crescimento e aumento de peso dos calos, foi utilizado o meio basal definido (MBD) de GRESSHOFF & DOY (1972).

O meio para diferenciação dos calos foi baseado nos trabalhos de GRESSHOFF & DOY (1972) e ZAMIR *et alii* (1980), que utilizaram MS como meio basal e diferentes concentrações hormonais. Foram testadas as combinações hormonais descritas por estes autores e, posteriormente, uma série de combinações similares para diferenciação: 0,25 a 20 mg/l de NAA; 1,0 a 25 mg/l de cinetina; 0,25 a 5,0 mg/l de IAA; 0,2 a 0,6 mg/l de zeatina; 2,25 a 4,5 mg/l de BAP; 1,0 a 5,0 mg/l de gibberelina (Tabela 5). Devido a importância da concentração de sacarose no meio de diferenciação (TABATA, 1977), foram adicionadas concentrações de 5 a 30 g/l de sacarose.

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 120°C a 1 atm por 15 a 20 minutos.

Tabela 4. Meios de cultura testados, no presente trabalho, para indução de calos em anteras de tomates.

Meios de cultura	Meio básico	Fito-hormônios (mg/l)		Substâncias com plexas (mg/l)		Sacarose	pH	Ágar G/l
				Suco de tomate				
		NAA	Cinetina 2,4-S	Água de côco				
a	MS	2,0	2,0	-	-	30	5,8	8,0
b	MS	5,0	3,0	-	-	30	5,8	8,0
c	MS	-	-	2,0	-	30	5,8	8,0
d	MS	-	-	4,0	-	30	5,8	8,0
e	MS	-	-	6,0	-	30	5,8	8,0
f	MS	-	-	8,0	-	30	5,8	8,0
j	MS	-	-	-	-	30	5,8	8,0
k	MS	-	-	-	50,8	30	5,8	8,0
l	MS	-	-	-	100,0	30	5,8	8,0
m	MS	-	-	-	150,0	30	5,8	8,0
n	MS	-	-	-	200,0	30	5,8	8,0
o	MS	-	-	150,0	-	30	5,8	8,0
p	MS	-	-	200,0	-	30	5,8	8,0
q	MS	3,0	2,0	250,0	-	30	5,8	8,0
r	MS	3,0	-	-	-	30	5,8	8,0

Obs.: MS = meio basal de MURASHIGE & SKOOG (1962).

3.2.4. Condições de cultura

As anteras de cada botão floral foram inoculadas em tubos de ensaio (10 x 2 cm), contendo de 10 a 15 ml do meio para indução de calos, mantidos à temperatura de 25 a 27°C, em câmara escura, por um tempo mínimo de oito semanas.

Depois do aparecimento dos calos, cada um deles foi transferido para tubo de ensaio (10 x 2 cm) com 15 ml do meio de crescimento e cultivado à temperatura de 25 a 27°C, em câmara escura. Após 15 a 30 dias, os calos foram transferidos para tubos de ensaio (10 x 2 cm) com 15 ml do meio para diferenciação e cultivados em câmara com ciclo alternado de luz: escuridão, de 16:8 horas, à temperatura média de 27°C.

3.2.5. Citologia do material estudado

Para o estudo dos cromossomos meióticos e dos estágios da microsporogênese, assim como para a identificação do nível de ploidia dos calos, os botões florais e os calos foram pré-tratados com solução de 8 hidroxiquinoleína 0,001M, por duas horas, em geladeira. Após a lavagem do material em água corrente por quinze minutos, foi feita a fixação em fixador Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético glacial) por 24 horas. Após a fixação, foi realizada a lavagem do material em água corrente por dez minutos, sendo feita a hidrólise em solução de HCl 1 N a 60°C por um minuto, e lavado imediatamente com

água destilada. As anteras retiradas do botão floral e os calos foram corados, pelo método de esmagamento, com orceína acética a 1% e examinados ao microscópio.

Para a contagem dos cromossomos somáticos, sementes de plantas F_1 e F_2 foram germinadas em placa de Petri, à temperatura ambiente. Foram utilizadas as pontas das raízes de cerca de 1 cm de comprimento.

O pré-tratamento e a fixação das pontas das raízes foram idênticos aos botões florais. Após a fixação, as pontas das raízes foram colocadas em álcool 95% por dez minutos e em álcool 70% por trinta minutos, sendo lavadas em água corrente por dez minutos. A hidrólise foi realizada em HCl 1 N a 60°C por quatro a cinco minutos e lavadas em seguida com água destilada. A observação citológica foi realizada pelo método de esmagamento com o corante orceína acética a 1%.

3.2.6. Irradiação do material

A irradiação do material foi realizada com raios-gama da fonte de ^{60}Co do CENA-USP, nas doses de 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 KR, nas seguintes combinações:

- anteras irradiadas e meio não irradiado
- anteras não irradiadas e meio irradiado
- anteras e meio, ambos irradiados
- antera e meio, ambos não irradiados (controle).

As anteras foram irradiadas em botões florais, de 5,0 - 6,9 mm de comprimento, tanto para a população F_1 , como a F_2 , logo após coletados da planta. O meio de cultura utilizado foi MS + 2 mg/l de NAA e de cinetina para a população F_2 , e MS + 5 mg/l NAA + 3 mg/l cinetina, para a população F_1 .

3.2.7. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado no presente trabalho, para os estudos da identificação do estágio ideal do explante para a formação de calos, da melhor combinação de hormônios para os meios de indução de calos e do efeito da irradiação sobre o material estudado, foi o inteiramente casualizado com esquema fatorial e quatro repetições por tratamento. Para as análises estatísticas, os dados de contagem foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

Para a comparação entre as médias dos dados estudados, utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ASSEPSIA DO EXPLANTE

Uma das etapas cruciais em um experimento de cultura de tecidos é a assepsia do material utilizado. A maneira de realizar esta assepsia pode ser diferente de laboratório para laboratório, pois o grau de contaminação do material a ser cultivado irá depender das condições de cultivo da planta doadora, se em campo ou em estufa, assim como dos contaminantes do próprio ambiente do laboratório.

Fora realizados testes para identificar a melhor metodologia de assepsia do botão floral de tomateiro para inoculação das anteras no meio de cultura, a fim de se obter o menor grau de contaminação possível. A Tabela 5 mostra os resultados deste teste, onde o melhor método de assepsia foi o de álcool 70% por 20 segundos e hipoclorito de sódio a 5% por 5 minutos. Nossos dados concordam com os do trabalho de ZAMIR *et alii* (1980), em relação à imersão do botão floral em hipoclorito de sódio, sendo que, para as condições de nosso laboratório, o tempo em álcool 70% teve de ser aumentado. Uma

Tabela 5. Teste para metodologia de assepsia com hipoclorito de sódio e álcool a 70%.

Nº de anteras	Tempo em álcool 70% (seg)	Hip. Sódio (%)	Tempo (min)	Contaminação (%)
100	10	2	2	55
(a) 100	10	2	3	53
100	10	2	4	52
100	10	2	5	52
100	15	3	2	10
(b) 100	15	3	3	16
100	15	3	4	5
100	15	3	5	1
100	20	4	2	20
(c) 100	20	4	3	8
100	20	4	4	3
100	20	4	5	1
100	20	5	2	10
(d) 100	20	5	3	8
100	20	5	4	2
100	20	5	5	0

vez conseguida a assepsia do explante, é importante ter muito cuidado com a excisão das anteras, para que estas não sejam danificadas, pois as que resultam danificadas poderiam produzir calos de outras partes da antera, coisa indesejada para este tipo de trabalho. Tanto ZAMIR *et alii* (1980), como GRES-SHOFF & DOY (1972), trabalhando com cultura de anteras de tomate, enfrentaram este problema de produção de calo de tecido maternal (parede da antera), assim como também outros pesquisadores em diversas culturas, fatos estes que nos fazem refletir na identificação de uma eficiente assepsia para evitar contaminação e cuidadosa retirada das anteras em estado perfeito, para garantir um maior % de calos provenientes do grão de pólen.

4.2. TAMANHO DO EXPLANTE

Devido à grande variação, citada na literatura, que ocorre em relação ao tamanho ideal do explante para a formação de calo, verificou-se o tamanho do botão floral que produzia uma maior frequência de calos, tanto para as plantas F_2 , como para os híbridos F_1 .

Na Tabela 6, observa-se que, para a população F_2 , o tamanho do botão floral de 5,0 a 6,9 mm foi o que apresentou maior frequência de calos: 38,18% para as cultivares folha batata-hipocótilo verde e folha recortada-hipocótilo roxo e 35,45% para os outros dois genótipos. As anteras de botões

Tabela 6. Diferentes tamanhos do botão floral para indução e formação de calos (F₂).

Genótipo	Tamanho do botão floral (mm)	Anteras inoculadas	Calos formados	Frequência (%)
Folha batata	1,0-2,9	110	0	0
hipocótilo	3,0-4,9	110	2	1,82
verde	5,0-6,9	110	42	38,18
	>7,0	110	1	0,91
Folha recortada	1,0-2,9	110	0	0
hipocótilo	3,0-4,9	110	1	0,91
verde	5,0-6,9	110	39	35,45
	>7,0	110	3	2,73
Folha batata	1,0-2,9	110	0	0
hipocótilo	3,0-4,9	110	1	0,91
roxo	5,0-6,9	110	39	35,45
	>7,0	110	1	0,91
Folha recortada	1,0-2,9	110	0	0
hipocótilo	3,0-4,9	110	2	1,82
roxo	5,0-6,9	110	42	38,18
	>7,0	110	2	1,82

Obs.: Número de anteras por amostra: 5 - 6

As anteras foram cultivadas em câmara escura (25 - 27°C)

florais de tamanho de 1,0 a 1,9 mm não apresentaram capacidade de formação de calos, enquanto que as anteras de botões com 3,0 a 4,9 mm e maior que 7,0 mm apresentaram uma taxa de formação de calo bastante menor que as de botão floral de 5,0 a 6,9 mm, em todos os genótipos de F_2 .

Na análise da variância dos dados sobre indução de calos em relação ao tamanho do botão floral da população F_2 , apresentada na Tabela 7, observa-se que o valor de $F = 0,49$ para genótipos indica não haver diferenças significativas entre os mesmos. Já o valor de $F = 277,77$ para tamanho do botão floral mostra diferença altamente significativa, a nível de 1% de probabilidade. A interação entre estas duas causas de variação não se mostrou significativamente diferente ($F = 0,32$).

Tabela 7. Análise da variância do tamanho do botão floral, em relação à indução de calos da população F_2 .

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Genótipos	3	0,12	0,04	0,49 ns
Tamanho do botão floral	3	65,85	21,95	277,77 **
Interação: Genótipos x tamanho do botão floral	9	0,23	0,03	0,32 ns
Resíduo	48	3,79	0,08	

n.s. = Não significativo

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

A Tabela 8 mostra o número médio de calos obtidos de acordo com os diferentes tamanhos de botões florais na população F_2 e o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, mostra que a média relativa ao tamanho de 5,0 a 6,9mm difere significativamente das outras em termos de produção de calos, sendo a de melhor resposta.

A Figura 4 apresenta o histograma das médias do número de calos obtidos em relação aos diversos tamanhos do botão floral da população F_2 . Observa-se que para todos os genótipos de F_2 , o tamanho do botão floral de 5,0 a 6,9 mm é o ideal para indução de calos e que corresponde ao estágio uninucleado da microsporogênese.

Na Tabela 9 observa-se que, para os híbridos F_1 , o tamanho do botão floral que apresentou maior frequência de calos foi também o de 5,0 a 6,9 mm: 22,73% para o híbrido A; 18,18% para os híbridos C e E; 7,27% para o híbrido B e 6,36% para o híbrido D.

As anteras de botões florais, com 2,0 a 4,9 mm e maior que 7,0 mm de todos os híbridos, apresentaram também, como as da população F_2 , uma taxa de formação de calos bastante menor que as de botão floral de 5,0 a 6,9 mm.

Na análise da variância dos dados sobre produção de calos com relação ao tamanho do botão floral da população híbrida F_1 , apresentada na Tabela 10, verifica-se que os híbridos F_1 não mostraram diferenças significativas entre si para a indução de calos ($F = 0,14$).

Tabela 8. Número médio de calos obtidos de acordo com os diferentes tamanhos de botões florais da população F_2 .

Genótipo	Tamanho do botão floral (mm)			
	1,0 a 2,9	3,0 a 4,9	5,0 a 6,9	maior que 7,0
Folha batata - hip. verde	0,7071	0,9659	3,1283	0,8365
Folha recortada - hip. verde	0,7071	0,8365	3,1156	0,8365
Folha batata - hip. roxo	0,7071	0,8365	3,1156	0,8365
Folha recortada - hip. roxo	0,7071	0,9659	3,3067	0,9659
Médias	0,7071 ^b	0,9012 ^b	3,1812 ^a	0,9336 ^b

Obs.: As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey - 5%.

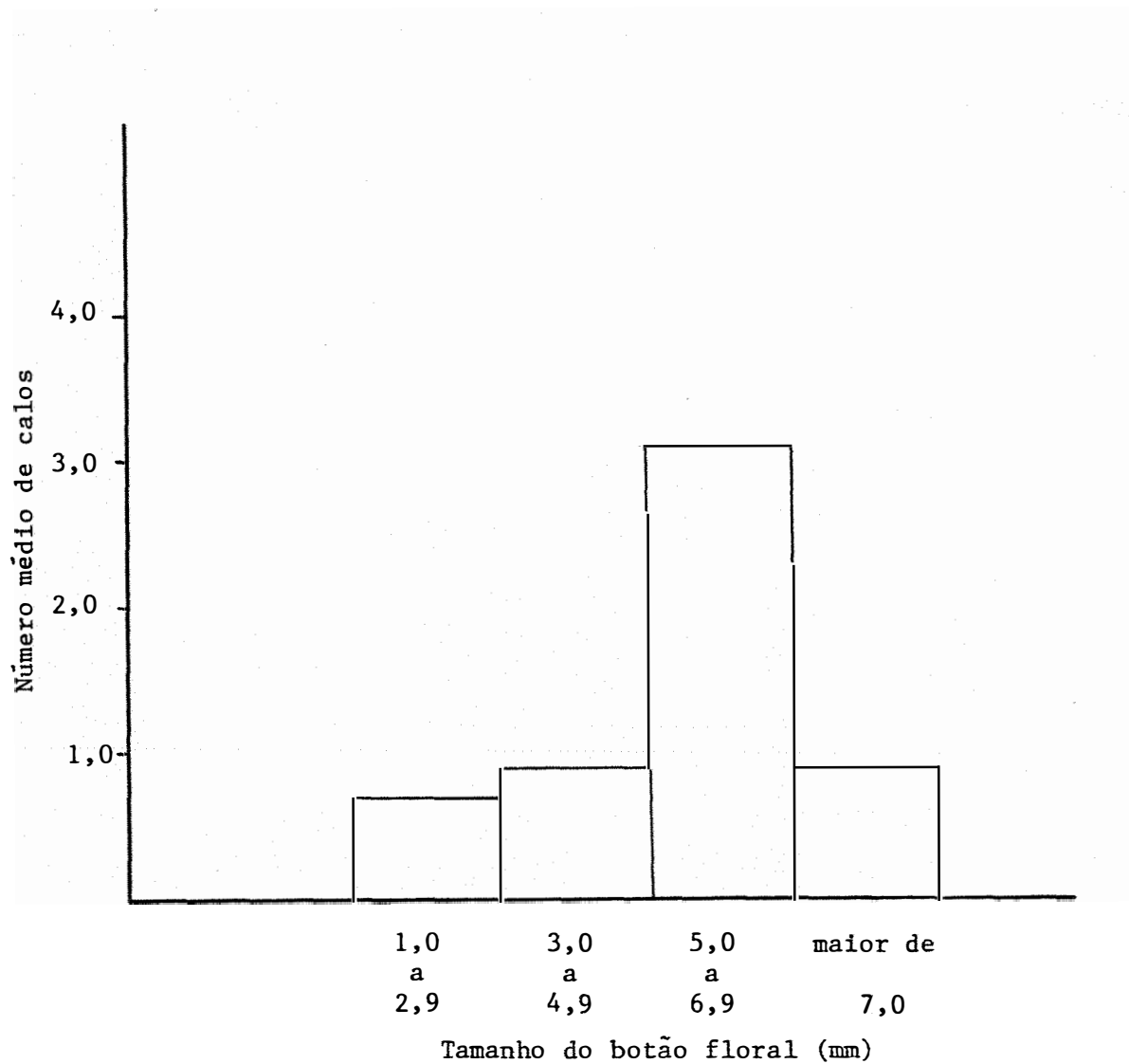


Figura 4. Histograma das médias do número de calos obtidos em relação aos diversos tamanhos de botão floral da população F_2 .

Tabela 9. Diferentes tamanhos do botão floral para a indução e formação de calos (F_1).

Genótipo	Tamanho do botão floral (mm)	Anteras inoculadas	Calos formados	Frequência (%)
Híbrido A	2,0-4,9	110	2	1,82
	5,0-6,9	110	25	22,73
	>7,0	110	2	1,82
Híbrido B	2,0-4,9	110	2	1,82
	5,0-6,9	110	8	7,27
	>7,0	110	1	0,91
Híbrido C	2,0-4,9	110	2	1,82
	5,0-6,9	110	20	18,18
	>7,0	110	3	2,73
Híbrido D	2,0-4,9	110	2	1,82
	5,0-6,9	110	7	6,36
	>7,0	110	1	0,91
Híbrido E	2,0-4,9	110	2	1,82
	5,0-6,9	110	20	18,18
	>7,0	110	2	1,82

Obs.: Número de anteras por amostra: 5 - 6

As anteras foram cultivadas em câmara escura (25 - 27°C)

Tabela 10. Análise da variância do tamanho do botão floral, em relação à indução de calos, da população F_1 .

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Genótipos	4	0,06	0,01	0,14 ns
Tamanho do botão floral	2	2,13	1,07	11,05 **
Interação: Genótipos x tamanho do botão floral	8	0,05	0,01	0,06 ns
Resíduo	45	4,35	0,10	

n.s. = Não significativo.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Na Tabela 11, verifica-se que, na população F_1 , também a média de calos obtidos de botão floral de 5,0 a 6,9 mm difere significativamente das outras, sendo a de melhor resposta.

A Figura 5, apresenta o histograma das médias do número de calos obtidos em relação aos diversos tamanhos do botão floral da população F_1 . Observa-se que, para todos os híbridos, também o tamanho de 5,0 a 6,9 mm é o ideal para a produção de calos, e citologicamente este tamanho corresponde ao estágio uninucleado da microsporogênese, o que será visto posteriormente no item 4.5.

O tamanho ideal do explante, encontrado no presente trabalho (5,0 a 6,9 mm), tanto para a população F_1 como F_2 , é bem maior do que o encontrado por GRESSHOFF & DOY (1972),

Tabela 11. Número médio de calos obtidos de acordo com os diferentes tamanhos de botão floral da população F_1 .

	Tamanho do botão floral		
	2,0 a 4,9	5,0 a 6,9	maior de 7,0
Híbrido A	0,9659	1,2247	0,8365
Híbrido B	0,9659	1,3460	0,8365
Híbrido C	0,9659	1,3138	0,8365
Híbrido D	0,9659	1,2735	0,8365
Híbrido E	0,9659	1,3626	0,9659
Médias	0,9659 ^b	1,3041 ^a	0,8624 ^b

Obs: As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey - 5%.

que citam botões florais de 2,0 a 3,0 mm como ideais em diferentes cultivares utilizados. Estas diferenças exemplificam o fato constatado em outras espécies de que o estágio ideal do explante não é o mesmo de espécie para espécie, encontrando-se diferença mesmo entre cultivares de uma mesma espécie (SUNDERLAND, 1974; ZAMIR *et alii*, 1980). Os resultados presentes (estágio uninucleado) coincidem com os obtidos por outros pesquisadores trabalhando com diferentes culturas (NAKATA & TANAKA, 1968; SUNDERLAND, 1974; BAJAJ, 1978).

Os resultados obtidos, tanto na população F_1 como F_2 , demonstram que realmente o tamanho do botão floral é um fator importante na androgênese, pois os tamanhos meno-

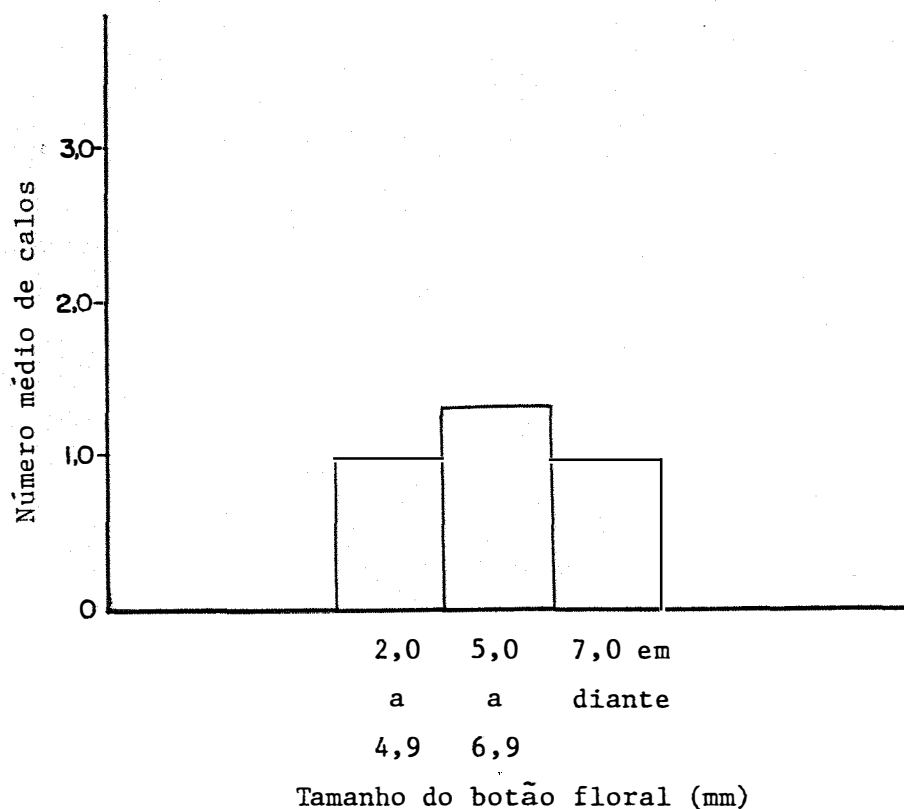


Figura 5. Histograma das médias do número de calos obtidos em relação aos diversos tamanhos do botão floral da população F_1 .

nores e maiores que 5,0 - 6,9 mm (tamanho ideal) foram ineficientes para a produção de calos. Provavelmente os tamanhos inferiores ao tamanho ideal encontravam-se na fase de meiose e os tamanhos superiores ao tamanho ideal encontravam-se em fase binuclear, fatos estes que mostram que conhecer o estágio de micrósporo é importante e que nem sempre é válida a correlação entre a morfologia do botão floral e o estágio do micrósporo. Assim, é necessário fazer preparações citológicas de diferentes tamanhos de anteras a serem cultivadas, para a identificação do estágio de desenvolvimento do micrósporo. Tam

bém, acredita-se que em um tamanho da antera em fase avançada à uninucleada, ou seja, o estágio binucleado, as plantas originadas apresentam outros níveis de ploidia diferentes do desejado, por isso é importante a identificação do estágio ótimo do explante.

4.3. RESPOSTA DOS EXPLANTES AOS MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura é de grande importância não só para a indução do calo, mas também para o desenvolvimento do mesmo. A presença dos fitohormônios no meio de cultura é de suma importância para o desenvolvimento ótimo dos calos e a diferenciação.

Na Tabela 12, observa-se que, para os genótipos da população F_2 , foi obtida a maior produção de calos no meio "a" (folha batata-hipocótilo verde: 30,54%, folha recortada - hipocótilo verde: 28,36%; folha batata - hipocótilo roxo: 28,36%; folha recortada - hipocótilo roxo: 30,54%).

Resultados similares foram obtidos com o meio de cultura "q" (folha batata-hipocótilo verde: 30,91%; folha recortada - hipocótilo verde: 28,18%; folha batata - hipocótilo roxo: 28,18% e folha recortada - hipocótilo roxo: 30,91%). Por outro lado, um caso bem contrastante foi o de três meios de cultura onde não ocorreu formação de calos, nos meios "n", "o" e "p" a frequência foi 0%. Já nos genótipos folha recortada - hipocótilo verde e folha batata - hipocótilo roxo também

Tabela 12. Meios de cultura para a indução de calos (F₂).

Folha batata - hipocótilo verde															
Genótipo	a	b	c	d	e	f	j	k	l	m	n	o	p	q	r
Meio de cultura usado															
Nº de anteras inoculadas	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110
Calos formados	42	25	2	2	1	2	3	2	1	2	0	0	0	34	10
Frequência (%)	30,54	22,73	1,81	1,81	0,90	1,81	2,73	1,81	0,90	1,81	0	0	0	30,91	9,09
Folha recortada - hipocótilo verde															
Genótipo	a	b	c	d	e	f	j	k	l	m	n	o	p	q	r
Meio de cultura usado															
Nº de anteras inoculadas	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110
Calos formados	39	20	0	0	0	0	1	3	2	3	0	0	0	31	6
Frequência (%)	28,36	18,18	0	0	0	0	0,90	2,73	1,81	2,73	0	0	0	28,18	4,54
Folha batata - hipocótilo roxo															
Genótipo	a	b	c	d	e	f	j	k	l	m	n	o	p	q	r
Meio de cultura usado															
Nº de anteras inoculadas	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110
Calos formados	39	30	0	0	0	0	1	3	1	3	0	0	0	31	8
Frequência (%)	28,36	27,27	0	0	0	0	0,90	2,37	0,90	2,73	0	0	0	28,18	6,06
Folha recortada - hipocótilo roxo															
Genótipo	a	b	c	d	e	f	j	k	l	m	n	o	p	q	r
Meio de cultura usado															
Nº de anteras inoculadas	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110
Calos formados	42	22	4	2	1	1	1	3	1	1	0	0	0	34	4
Frequência (%)	30,54	20	3,63	1,81	0,90	0,90	0,90	2,73	0,90	0,90	0	0	0	30,91	3,03

OBS.: Tamanho do botão floral: 5,0 - 6,9 mm

Número de anteras por amostra: 5 - 6

As anteras foram cultivadas em câmara escura (25 - 27°C)

não houve formação de calos quando foram usados os meios "c", "d", "e" e "f", sendo que nos outros dois genótipos (folha batata-hipocótilo verde com 0,90 a 1,81% e folha recortada - hipocótilo roxo com 0,90 a 3,63%) a taxa de formação de calo foi muito pequena.

Na análise da variância dos dados sobre indução de calos em relação aos meios de cultura na população F_2 , apresentada na Tabela 13, observa-se que o valor de $F = 1,60$ para genótipos indica não haver diferenças significativas entre as mesmas. Já o valor de $F = 200,54$ para variação entre meios mostra diferença altamente significativa sendo que a interação entre estas duas causas de variação não se mostrou significativa ($F = 1,12$).

Tabela 13. Análise da variância dos meios de cultura, em relação à indução de calos, da população F_2 .

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Genótipos	3	0,28	0,93	1,60ns
Meio de cultura	14	163,15	11,65	200,54**
Interação: genótipos x meio de cultura	42	2,73	0,06	1,12ns
Resíduo	180	10,46	0,06	

n.s. = Não significativo.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

A Tabela 14 mostra o número médio de calos obtidos de acordo com os diferentes meios de cultura usados na população F_2 e o teste Tukey a 5% de probabilidade confirma que os meios "a" e "q" comportaram-se como os melhores para a formação de calos, sendo os piores "n", "o" e "p". Os meios de cultura "c", "d", "f", "j" e "l" não mostram diferenças significativas. Por outro lado, os genótipos responderam diferentemente entre eles com relação aos meios "b", "k" e "r".

A Figura 6 apresenta o histograma das médias do número de calos obtidos em relação aos diversos meios de cultura usados na população F_2 . Observa-se que, para todos os genótipos da população F_2 , os meios de cultura "a" e "q" foram os mais eficientes, seguidos dos meios "b" e "r", para a produção de calos.

Na Tabela 15 observa-se que, para os híbridos F_1 , o meio de cultura "b" foi o melhor (híbrido A: 22,73%; híbrido B: 7,27%; híbrido C: 18,18%; híbrido D: 6,36% e híbrido E: 18,18%); apesar de que os híbridos "A", "C" e "E" apresentaram maior produção de calos e os híbridos "B" e "D", produção bem menor. Observa-se, também, uma relação bem contrastante no híbrido "A" com relação aos meios "a" e "b", pois no meio "b" a produção do híbrido "A" foi de 22,73% e, quando foi usado o meio "a", a produção de calo foi de 3,64%.

A análise da variância dos dados para produção de calos, com relação aos meios de cultura da população híbrida F_1 , apresentada na Tabela 16, evidencia que os híbridos da

Tabela 14. Número médio de calos obtidos de acordo com os diferentes meios de cultura na população F₂.

Meios de cultura	Genótipos						Médias
	Folh. bat. hip. verde	Folh. rec. hip. verde	Folh. bat. hip. roxo	Folh. rec. hip. roxo	Folh. rec. hip. roxo	Folh. rec. hip. roxo	
"a"	3,1283	3,1743	3,1156	3,3067	3,1812a		
"b"	2,3403	2,8137	2,4269	2,4269	2,5405b		
"c"	0,9659	0,7071	0,7071	1,2247	0,9012def		
"d"	0,9659	0,7071	0,7071	0,9659	0,8365def		
"e"	0,8365	0,7071	0,7071	0,8365	0,7718ef		
"f"	0,9659	0,7071	0,7071	0,8365	0,8042def		
"j"	1,0953	0,8365	0,8365	0,8365	0,9012def		
"k"	0,9659	1,0953	1,0953	1,0953	1,0629d		
"l"	0,8365	0,9659	0,8365	0,8365	0,8688def		
"m"	0,9659	1,0953	1,0953	0,8365	0,9982de		
"n"	0,7071	0,7071	0,7071	0,7071	0,7071f		
"o"	0,7071	0,7071	0,7071	0,7071	0,7071f		
"p"	0,7071	0,7071	0,7071	0,7071	0,7071f		
"q"	2,9864	2,8687	2,8687	2,9864	2,7275a		
"r"	1,6995	1,3863	1,5645	1,1844	1,4586c		

Obs.: As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey = 5%.

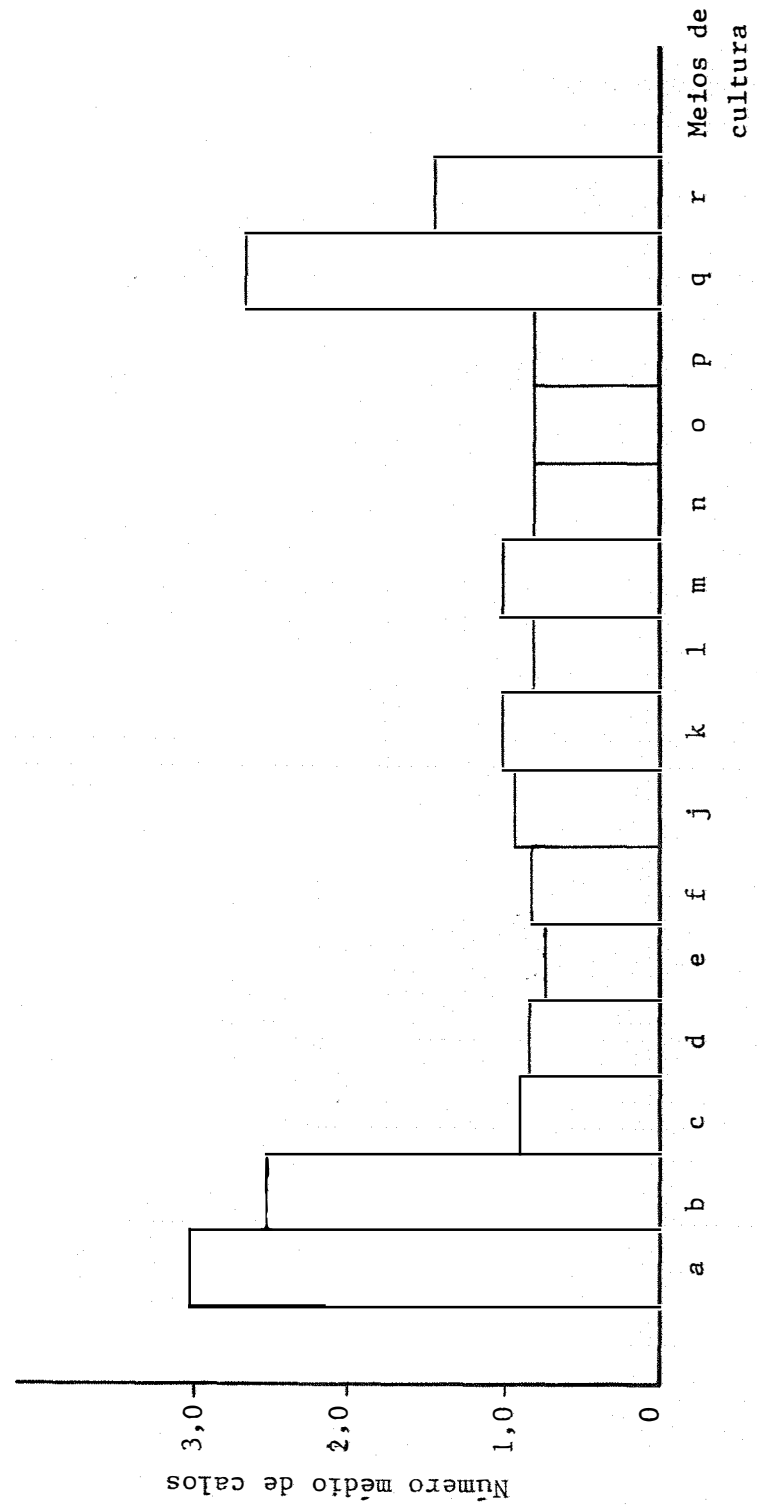


Figura 6. Histograma das médias do número de calos obtidos em relação aos diversos meios de cultura da população F₂.

Tabela 15. Diferentes meios de cultura para a indução de calos (F₁).

	Híbrido A		Híbrido B		Híbrido C		Híbrido D		Híbrido E	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Meio de cultura usado	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110
Nº de anteras inoculadas	4	25	6	8	5	20	5	7	6	20
Calos formados	3,64	22,73	5,45	7,27	4,55	18,18	4,55	6,36	5,45	18,19
Frequência (%)										

Obs.: Tamanho do botão floral: 5,0 - 6,9 mm

Número de anteras por amostra: 5-6

As anteras foram cultivadas em câmara escura (25 - 27°C).

F_1 mostraram diferenças significativas entre si para a produção de calos: $F = 3,84$, ou seja, os híbridos responderam diferentemente aos meios de cultura. Para o valor de $F = 42,76$, para meios de cultura, nota-se diferenças altamente significativas para a produção de calos. A interação entre estas duas causas de variação também foi significativa: $F = 3,27$.

Tabela 16. Análise da variância dos meios de cultura em relação à indução de calos, da população F_1 .

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Genótipos	4	2,14	0,54	3,84*
Meio de cultura	1	5,98	5,98	42,76**
Interação: genótipos x meio de cultura	4	1,83	0,46	3,27*
Resíduo	30	4,19	0,14	

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Segundo o teste de Tukey (Tabela 17), o meio de cultura "b" foi altamente significativo para os híbridos estudados, sendo que, o meio de cultura "b" foi mais favorável para a produção de calos em comparação com o "a", e que os híbridos "A" "C" e "E" apresentaram melhores respostas para a produção de calos que os híbridos "B" e "D", os quais não di-

ferem entre si no meio "b". No meio "a", não apresentam diferenças significativas.

Como foi observado através dos resultados obtidos, tanto na população F_2 como F_1 , os meios de cultura têm um papel importante para a produção de calos, pois na população F_2 observaram-se os exemplos de meios mais eficientes (meios "a" e "q") quando comparados com os demais testados (meios "n", "o" e "p" sendo os piores), ou em outras palavras, os genótipos diferentes podem responder diferentemente entre elas, com relação aos meios de cultura estudados.

Foi também observado que os híbridos responderam diferentemente aos meios de cultura, sendo que estes fo-

Tabela 17. Número médio de calos obtidos de acordo com os diferentes meios de cultura na população F_1 .

	Meios de cultura	
	a	b
Híbrido A	1.2247	2.5534
Híbrido B	1.2165	1.5645
Híbrido C	1.3138	2.3316
Híbrido D	1.2735	1.4754
Híbrido E	1.3626	2.3316
Médias	1.2782 ^b	2.0513 ^a

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey - 5%.

ram altamente significativos para a formação de calos. Assim, como o teste de Tukey a 5% mostrou que o meio de cultura é específico para cada genótipo, para a produção de calo, não será possível generalizar o melhor meio de cultura para todos os híbridos estudados. Nos trabalhos de GRESSHOFF & DOY 1972 a), assim como nos de ZAMIR *et alii* (1980), que trabalharam com a cultura de anteras de *L. esculentum*, quando comparados com o presente trabalho, encontram-se diferenças nas respostas, e isto provavelmente é devido ao uso de genótipos diferentes. No presente estudo, também pode-se constatar que existem diferenças para a produção de calos, na população F_2 , quando comparada com população F_1 . Também o genótipo exerce um papel importante, pois como exemplo tem-se o caso dos híbridos "B" e "D", que não foram bons produtores nem no meio "a" nem no meio "b".

Já no caso da população F_2 , os genótipos não apresentaram diferenças significativas entre si, o que se justifica por serem genótipos de mesma origem parental. Já os híbridos da F_1 apresentaram diferenças significativas entre si, enquanto os híbridos "A", "C" e "E" mostraram-se bons produtores no meio "b", os híbridos "B" e "D" tiveram pouca produção de calos.

Esta influência do genótipo sobre a produção de calos é observada também no trabalho de ZAMIR *et alii* (1980). Os quatro genótipos férteis por eles estudados, já citados anteriormente, tiveram produção nula ou mínima (0.7%). Quando testaram estes mesmos genótipos com mutações para macho este-

rilidade, observaram que dos 16 mutantes **ms** obtidos, apenas um deles, o **ms 10³⁵** apresentava uma produção consistente de calos, de 14,7 a 37,3%.

Constata-se então, a existência de uma resposta diferencial do genótipo a diversos meios de cultura, assim como uma resposta diferencial de vários genótipos em um meio de cultura, ocorrendo então uma especificidade genótipo-meio de cultura, o que dificulta, em tomate, a generalização de um melhor meio de cultura para os diversos genótipos.

4.4. IRRADIAÇÃO DO MATERIAL

4.4.1. Irradiações de anteras

Com o propósito de se identificar o efeito da irradiação γ no material estudado, testou-se uma série de doses para comparação e verificação de quais as melhores para a produção de calos, assim como também, para constatar entre as doses aplicadas, qual era a mais prejudicial (letal).

A Tabela 18 mostra que, para a população F_2 , o controle foi o que apresentou maior frequência de calos (30,54%) para os genótipos folha batata-hipocótilo verde e folha recortada-hipocótilo roxo e 28,36% para os outros dois genótipos.

Entre as doses de irradiação aplicadas, a dose 2,0 KR comportou-se melhor na produção de calos, seguida da dose 4,0 KR, 6,0 KR, sendo a dose 8,0 KR letal para todos os genótipos.

Tabela 18. Efeito da irradiação em anteras para a indução e formação de calos (F₂).

	Dose (KR)	Anteras inoculadas	Calos formados	Frequência (%)
Folha batata-	2,0	110	14	12,72
hipocótilo	4,0	110	7	8,36
verde	6,0	110	1	0,90
	8,0	110	0	0
	0	110	42	30,54
Folha recortada-	2,0	110	6	5,45
hipocótilo	4,0	110	9	8,18
verde	6,0	110	5	4,55
	8,0	110	0	0
	0	110	39	28,36
Folha batata-	2,0	110	12	10,90
hipocótilo	4,0	110	6	5,45
roxo	6,0	110	1	0,90
	8,0	110	0	0
	0	110	39	28,36
Folha recortada-	2,0	110	8	7,27
hipocótilo	4,0	110	7	6,36
roxo	6,0	110	7	6,36
	8,0	110	0	0
	0	110	42	30,54

Obs.: Tamanho do botão floral: 5,0 - 6,9 mm

Número de anteras por amostra: 5 - 6

As anteras foram cultivadas em câmara escura (25 - 27°C)

A análise de variância dos dados sobre a indução de calos em relação a irradiação do material estudado da população F_2 , apresentada na Tabela 19, mostra o valor de $F = 0,99$ para os genótipos, indicando não haver diferenças significativas entre os mesmos. Por outro lado, o valor de $F = 160,24$ para as doses de irradiação mostrou diferenças altamente significativas, ao nível de 1% de probabilidade, entre as mesmas. Já a interação entre estas causas de variação mostrou-se significativa ($F = 2,11$), ou seja, que os genótipos comportaram-se distintamente às doses aplicadas.

Na Tabela 20, observa-se que, para os híbridos F_1 , a dose de irradiação que apresentou maior frequência de

Tabela 19. Análise da variância das doses de irradiação em relação à indução de calos, da população F_2 .

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Genótipos	3	0,26	0,09	0,99ns
Dose de irradiação	4	56,79	14,20	160,24**
Interação: dose de irradiação x genótipos	12	2,25	0,19	2,11*
Resíduo	60	5,32	0,09	

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

ns = Não significativo.

Tabela 20. Efeito da irradiação em anteras para a indução e formação de calos (F₁).

	Dose (KR)	Anteras inoculadas	Calos formados	Frequência (%)
Híbrido A	2,0	110	30	27,27
	4,0	110	8	7,27
	6,0	110	4	3,64
	8,0	110	0	0
	0	110	25	22,73
Híbrido B	2,0	110	4	3,64
	4,0	110	0	0
	6,0	110	0	0
	8,0	110	0	0
	0	110	8	7,27
Híbrido C	2,0	110	18	16,36
	4,0	110	5	4,55
	6,0	110	1	0,91
	8,0	110	0	0
	0	110	20	18,18
Híbrido D	2,0	110	5	4,55
	4,0	110	0	0
	6,0	110	0	0
	8,0	110	0	0
	0	110	7	6,36
Híbrido E	2,0	110	35	31,82
	4,0	110	7	6,36
	6,0	110	2	1,82
	8,0	110	1	0,90
	0	110	20	18,18

Obs.: Tamanho do botão floral: 5,0 - 6,9 mm

Número de anteras por amostra: 5 - 6

As anteras foram cultivadas em câmara escura (25 - 27°C)

calos foi 2,0 KR no híbrido "E" (31,82%) e no híbrido "A" (27,27%). Os híbridos "A", "B", "C" e "D" apresentaram-se extremamente sensíveis à dose de 8,0 KR (0% de produção de calos), sendo que o híbrido "E" foi o único em que esta dose não foi letal, apesar de ter uma frequência baixa (0,90%) de produção de calos. Os híbridos "B" e "D" apresentaram uma frequência nula (0%) de produção de calo, quando foram aplicadas as doses: 4,0, 6,0 e 8,0 KR.

A análise da variância dos dados sobre a produção de calos em relação às doses de irradiação usadas na população F_1 , apresentada na Tabela 21, mostra que os híbridos da F_1 apresentaram diferenças altamente significativas entre si para a produção de calos ($F = 40,61$). Isto quer dizer que os híbridos responderam diferentemente às doses de irradiação aplicadas.

Tabela 21. Análise da variância das doses de irradiação em relação à indução de calos da população F_1 .

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Genótipos	4	12,23	3,06	40,51**
Dose de irradiação	4	33,76	8,44	112,11**
Interação: genótipos x dose de irradiação	16	6,79	0,42	5,64**
Resíduo	75	5,65	0,08	

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Para as doses de irradiação, foram obtidas diferenças altamente significativas e, as análises estatísticas ($F = 112,11$) mostraram comportamentos similares entre os híbridos "A" e "E"; o mesmo foi observado com a dose 2,0 KR e o controle, mostrando serem os melhores para a produção de calos. A interação entre estas duas causas de variação também mostrou-se significativa.

4.4.2. Irradiação do meio de cultura

Na Tabela 22, observa-se que, para a população F_2 , entre as doses de irradiação do meio de cultura, o controle (0 KR) apresentou maior frequência de calos: 30,54% para os genótipos folha batata-hipocótilo verde e folha recortada-hipocótilo roxo e 28,36% para os outros dois genótipos. As frequências de produção de calos dos genótipos estudados, quando aplicadas as doses 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 KR, variaram de 0 a 6,3%, observando-se que estes valores são muito baixos ao se comparar com o controle.

A análise da variância dos dados sobre indução de calos, em relação às doses de irradiação do meio de cultura da população F_2 , apresentada na Tabela 23, indica que o valor de $F = 2,66$ para os genótipos não mostrou diferenças significativas. Para a dose de irradiação do meio de cultura, observam-se diferenças altamente significativas ($F = 233,78$).

Na Tabela 24, observa-se que, para a população híbrida F_1 , entre as doses de irradiação aplicadas no meio de

Tabela 22. Efeito da irradiação em meio de cultura para a indução e formação de calos (F₂).

	Dose (KR)	Anteras inoculadas	Calos formados	Frequência (%)
Folha batata-	2,0	110	4	3,64
hipocótilo	4,0	110	1	0,91
verde	6,0	110	0	0
	8,0	110	2	1,82
	0	110	42	30,54
Folha recortada-	2,0	110	1	0,91
hipocótilo	4,0	110	0	0
verde	6,0	110	0	0
	8,0	110	0	0
	0	110	39	28,36
Folha batata-	2,0	110	7	6,36
hipocótilo	4,0	110	3	2,73
roxo	6,0	110	1	0,91
	8,0	110	1	0,91
	0	110	39	28,36
Folha recortada-	2,0	110	2	1,82
hipocótilo	4,0	110	0	0
roxo	6,0	110	0	0
	8,0	110	0	0
	0	110	42	30,54

Obs.: Tamanho do botão floral: 5,0 - 6,9 mm

Número de anteras por amostra: 5 - 6

As anteras foram cultivadas em câmara escura (25 - 27°C)

Tabela 23. Análise da variância das doses de irradiação do meio de cultura, em relação à indução de calos, da população F_2 .

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Genótipos	3	0,59	0,20	2,66ns
Doses de irradiação	4	69,12	17,28	233,78**
Interação: Genótipos x doses de irradiação	12	0,85	0,71	0,96ns
Resíduo	60	4,43	0,74	

ns = Não significativo.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

cultura, o controle apresentou maior frequência de calos, sendo 22,73% para o híbrido "A", 18,18% para os híbridos "C" e "E" 7,27% para o híbrido "B" e 6,36% para o híbrido "D". No caso dos híbridos "B", "C" e "D", as doses 4,0, 6,0 e 8,0 KR causaram inibição total da formação de calos.

A análise de variância dos dados sobre produção de calos, em relação às doses de irradiação aplicadas ao meio de cultura (Tabela 25), mostrou diferenças significativas entre os híbridos estudados, doses e a interação entre estas duas causas de variação.

Tabela 24. Efeito da irradiação em meio de cultura para a indução e formação de calos (F₁).

	Dose (KR)	Anteras inoculadas	Calos formados	Frequência (%)
Híbrido A	2,0	110	4,	4,55
	4,0	110	1	0,91
	6,0	110	1	0,91
	8,0	110	1	0,91
	0	110	25	22,73
Híbrido B	2,0	110	1	0,91
	4,0	110	0	0
	6,0	110	0	0
	8,0	110	0	0
	0	110	8	7,27
Híbrido C	2,0	110	0	0
	4,0	110	0	0
	6,0	110	0	0
	8,0	110	0	0
	0	110	20	18,18
Híbrido D	2,0	110	1	0,91
	4,0	110	0	0
	6,0	110	0	0
	8,0	110	0	0
	0	110	7	6,36
Híbrido E	2,0	110	3	2,73
	4,0	110	1	0,91
	6,0	110	1	0,91
	8,0	110	0	0
	0	110	20	18,18

Obs.: Tamanho do botão floral: 5,0 - 6,9 mm

Número de anteras por amostra: 5 - 6

As anteras foram cultivadas em câmara escura (25 - 27°C).

Tabela 25. Análise de variância das doses de irradiação do meio de cultura, em relação à indução de calos, da população F_1 .

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Genótipos	4	2,16	0,54	9,58 **
Doses de irradiação	4	25,65	6,41	118,71 **
Interação: genótipos x doses de irradiação	16	2,81	0,18	3,25 **
Resíduo	75	4,05	0,5	

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

4.4.3. Irradiação da interação: antera-meio de cultura

Na Tabela 26, observa-se que, para a população F_2 , na irradiação da interação antera e meio de cultura, o controle foi o que apresentou maior frequência na produção de calos: 30,57% para os genótipos folha batata-hipocótilo verde e folha recortada-hipocótilo roxo, e 28,36% para os outros dois genótipos. Observa-se também que para os genótipos folha recortada-hipocótilo verde e folha recortada-hipocótilo roxo, quando irradiados com doses de 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 KR, a produção foi caindo até 0%.

A análise de variância dos dados sobre a produção de calos em relação à irradiação da interação antera -

Tabela 26. Efeito da irradiação na interação antera e meio de cultura para a indução e formação de calos (F_2).

	Dose (KR)	Anteras inoculadas	Calos formados	Frequência (%)
Folha batada-	2,0	110	2	1,82
hipocótilo	4,0	110	1	0,91
verde	6,0	110	5	4,55
	8,0	110	0	0
	0	110	42	30,57
Folha recortada-	2,0	110	0	0
hipocótilo	4,0	110	0	0
verde	6,0	110	0	0
	8,0	110	0	0
	0	110	39	28,36
Folha batata-	2,0	110	2	1,82
hipocótilo	4,0	110	1	0,91
roxo	6,0	110	3	2,73
	8,0	110	0	0
	0	110	39	28,36
Folha recortada-	2,0	110	0	0
hipocótilo	4,0	110	0	0
roxo	6,0	110	0	0
	8,0	110	0	0
	0	110	42	30,54

Obs.: Tamanho do botão floral: 5,0 - 6,9 mm

Número de anteras por amostra: 5 - 6

As anteras foram cultivadas em câmara escura (25 - 27°C)

-meio de cultura, mostra que os genótipos responderam diferentemente, que as doses afetaram à produção de calos e que o controle comportou-se melhor, quando comparado com as diferentes doses aplicadas (Tabela 27).

Tabela 27. Análise da variância da irradiação da interação antera-meio de cultura, em relação à produção de calos, da população F_2 .

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Genótipos	3	0,50	0,17	3,10 *
Dose de irradiação	4	72,04	18,01	335,76 **
Interação genótipos x dose de irradiação	12	0,01	0,84	1,57 ns
Resíduo	60	3,22	0,05	

ns = Não significativo.

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

A Tabela 28 mostra que, para a população F_1 , na irradiação antera-meio de cultura, o controle foi o que apresentou maior frequência na produção de calo: 22,73% (híbrido "A"), 18,18% (híbridos "C" e "E"), 7,27% (híbrido "B") e 6,36% (híbrido "D"). Vê-se também, que a dose 8,0 KR foi letal para todos os híbridos e que os híbridos "B", "C" e "D" apresentaram produção nula de calos quando foram aplicadas as doses de 6,0 KR.

Tabela 28. Efeito da irradiação de antera e meio de cultura para indução e formação de calos (F₁).

	Dose (KR)	Anteras inoculadas	Calos formados	Frequência (%)
Híbrido A	2,0	110	4	4,55
	4,0	110	2	1,82
	6,0	110	1	0,91
	8,0	110	0	0
	0	110	25	22,73
Híbrido B	2,0	110	1	0,91
	4,0	110	0	0
	6,0	110	0	0
	8,0	110	0	0
	0	110	8	7,27
Híbrido C	2,0	110	1	0,91
	4,0	110	0	0
	6,0	110	0	0
	6,0	110	0	0
	0	110	20	18,18
Híbrido D	2,0	110	0	0
	4,0	110	1	0,91
	6,0	110	0	0
	8,0	110	0	0
	0	110	7	6,36
Híbrido E	2,0	110	0	0
	4,0	110	2	1,82
	6,0	110	1	0,91
	8,0	110	0	0
	0	110	20	18,18

Obs.: Números de anteras por amostra: 5 - 6

As anteras foram colocadas em câmara escura (25 - 27°C)

A análise da variância dos dados sobre a produção de calos em relação à irradiação da interação antera - meio de cultura (Tabela 29) mostrou que os genótipos diferem significativamente entre si, da mesma forma que a dose e a interação.

Tabela 29. Análise da variância da irradiação da interação antera-meio de cultura, em relação à produção de calos, da população F_1 .

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Genótipos	4	1,89	0,47	9,75**
Dose de irradiação	4	25,38	6,34	130,92**
Interação: genótipos x dose de irradiação	16	3,43	0,21	4,43**
Resíduo	75	3,63	0,05	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Sabe-se que as mutações têm contribuído positivamente em uma série de espécies de plantas, apesar de ocorrerem em baixa frequência. No presente estudo, tentou-se explorar o efeito da mutação, através da irradiação, pois obtendo-se haplóides mutantes e duplicando-se o número de cromossomos, poderiam ser obtidas imediatamente plantas mutantes homozigotas. Pelos resultados obtidos na irradiação de antera, o con-

trole comportou-se melhor e, em alguns casos, como o híbrido "E", com a menor dose de irradiação aplicada (2,0 KR), as análises estatísticas mostraram comportamentos similares aos do controle. Provavelmente, estes resultados sugerem que as doses superiores a 4 KR foram muito altas para esse tipo de explante, e que pode-se explorar doses menores em trabalhos futuros.

Com relação ao efeito da irradiação em meio de cultura e na interação anthera-meio de cultura, os resultados obtidos com as doses aplicadas foram inferiores para a produção de calos quando comparados com o controle, sendo que, à medida que as doses aumentavam, as produções também diminuam. Isto sugere que o componente do meio de cultura, responsável pela produção de calos, foi atingido pela dose de irradiação, pois CHOUREY *et alii* (1973) e SPIEGEL *et alii* (1980) têm observado que a irradiação no meio de cultura tende a baixar os níveis de auxinas, e como é sabido, as auxinas exercem um papel importante na formação de calos. O mesmo foi observado no presente trabalho, ao usar as diferentes auxinas (NAA, IAA, 2,4-D), que, dependendo do tipo e concentração, causaram respostas variadas na produção de calos, assim como também ao usar diferentes doses de irradiação.

4.5. ESTUDOS CITOLÓGICOS DA PLANTA DOADORA, DO EXPLANTE E DO CALO

O processo de formação do pólen das plantas doadoras da população F₂ ocorre através do processo meiótico nor

mal, onde não foram detectadas anomalias da divisão, como pontes, fragmentos ou cromossomos retardatários. As Fotos 3a e 3b apresentam alguns estágios da meiose I e II do material da população F_2 (folha batata-hipocótilo verde), onde se observa também o número de 12 bivalentes em alguns estágios de meiose I. A Foto 3b apresenta, também, os estágios de tetrade e pólen maduro uninucleado, (Foto 3b-12).

Ao se estudar a meiose dos híbridos F_1 , a mesma também apresentou-se normal, com exceção do híbrido "A" (Foto 4) onde observam-se tétrades de dois tamanhos: uma de tamanho normal e outra bastante maior (tetrade gigante) (Foto 4-17).

O estudo da mitose em ponta de raiz mostrou, tanto para F_1 como para F_2 , uma contagem de cromossomos metafásicos de $2n = 24$ cromossomos, com exceção do híbrido "A" em que foram observadas algumas células com 25 cromossomos (Foto 5).

As contagens cromossômicas meióticas e mitóticas confirmam um complemento cromossômico $2n = 2x = 24$ cromossomos e $n = x = 12$ cromossomos (RICK & BUTLER, 1956).

Suspeita-se que o híbrido "A" examinado possa ser um mosaico com células normais ($2n = 24$) e células aneu - plóides trissômicas ($2n = 25$), devido às células com 25 cromossomos encontradas em metáfases mitóticas e aos dois tamanhos de tétrades que ocorrem na formação de pólen.

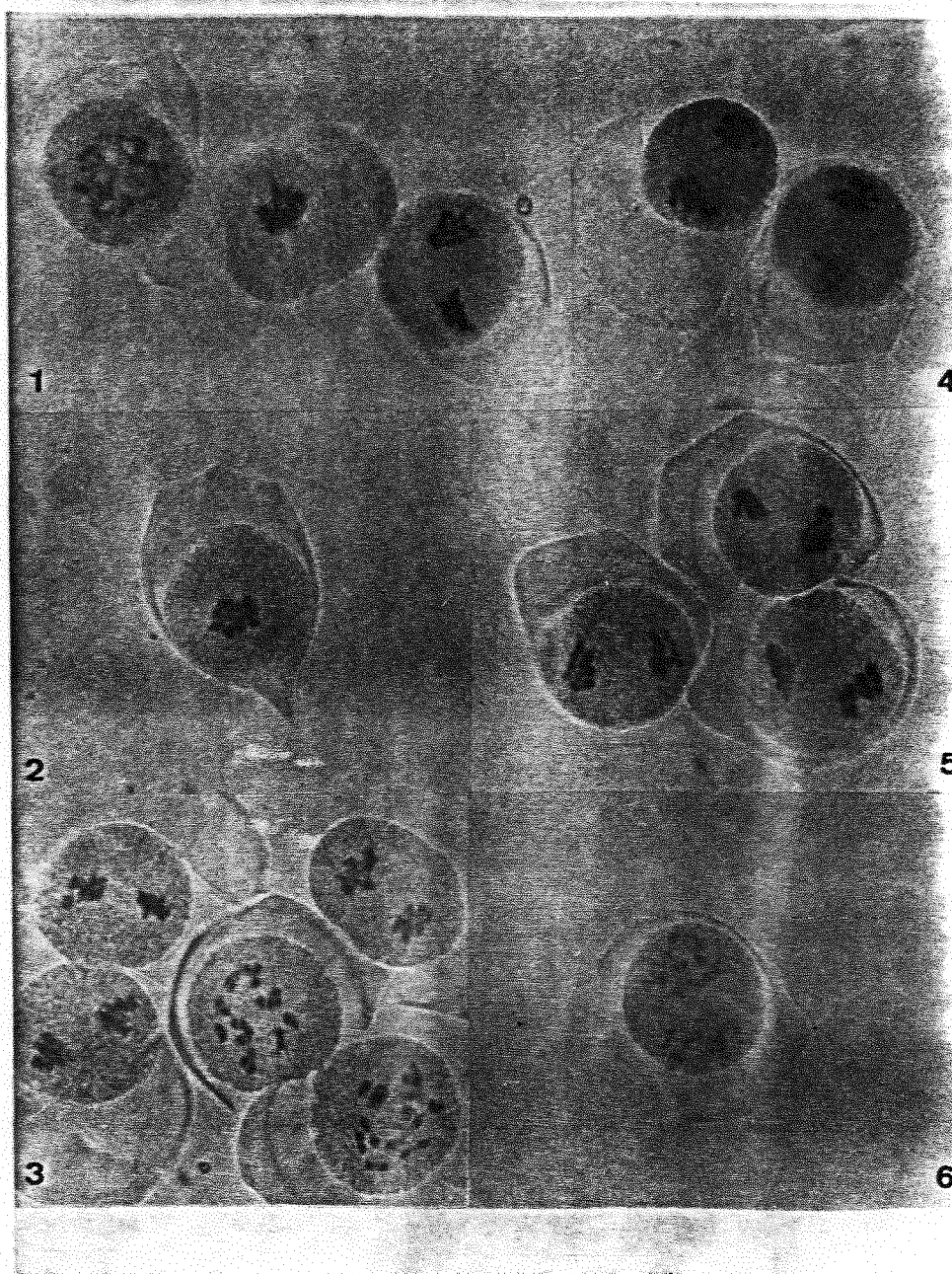


Foto 3a. Processo de formação de pólen de planta doadora F_2 ($\times 1000$).

1. Prófase, metáfase e anáfase em meiose I.
2. Metáfase I.
3. Diplôteno - diacinese
4. Anáfase I: 12 cromossomos são observados em cada pelo celular.
5. Anáfase I e telófase I.
6. Metáfase II

(continua)

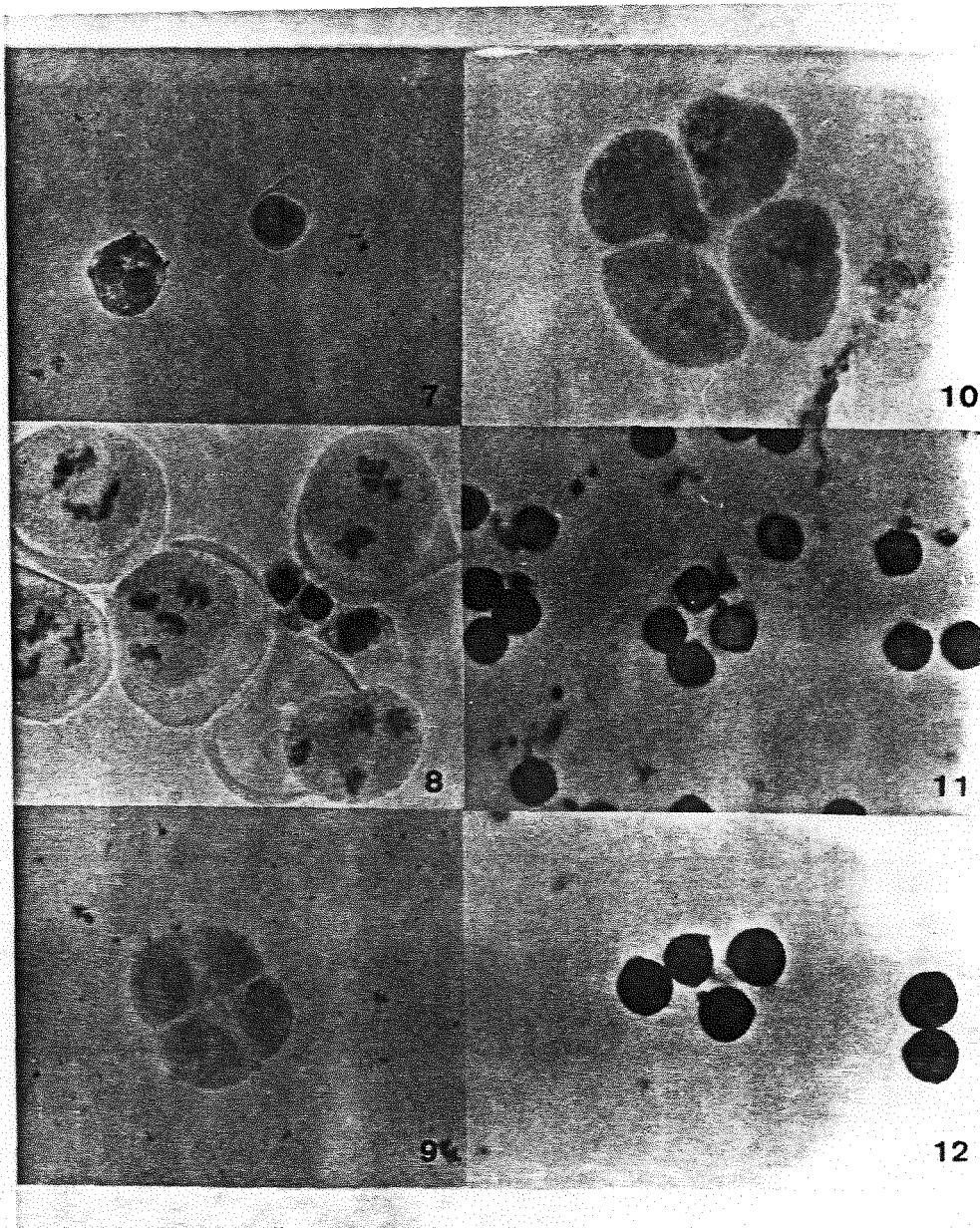


Foto 3b. (continuação)

- 7. Telófase I (x400)
- 8. Telófase II (x1000)
- 9 e 10. Tétrade em meiose II (x400 e x1000)
- 11. Pólen maduro originado de uma tétrede (x100)
- 12. Pólen maduro com um núcleo em cada grão de pólen (x200)

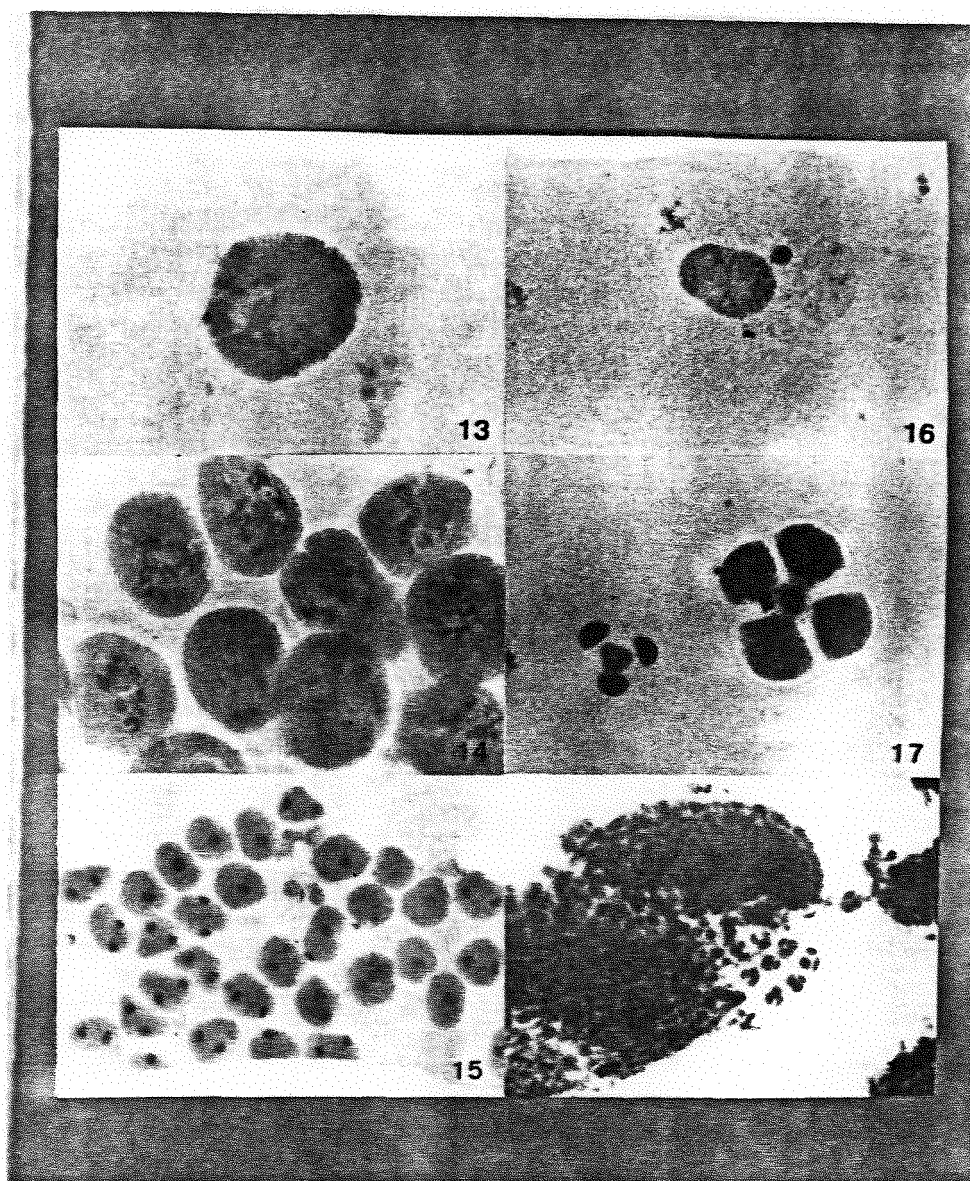


Foto 4. Meiose do material híbrido "A" (F_1).

13. Prófase I: diplóteno (x1000)
14. Prófase I: Fases de diplóteno e diacinese, com nucléolo aparente (x1000)
15. Metáfase I até Telófase I (x400)
16. Início da formação da téttrade (observação de 4 núcleos) (x400)
17. Dois tipos diferentes de téttrade: tamanho normal e com tamanho aumentado (téttrade gigante) (x200)
18. Tétrades normais (x100)

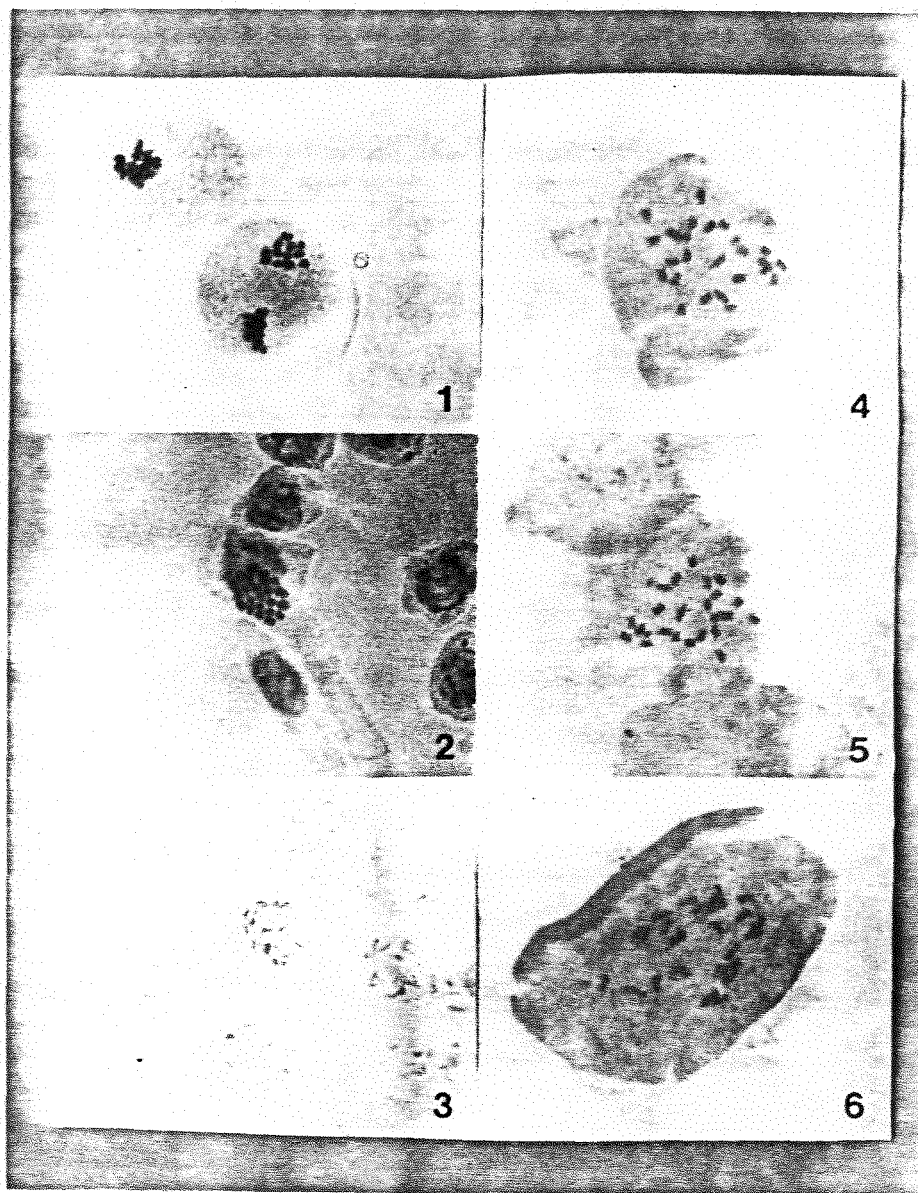


Foto 5. Metáfase da divisão celular da população F_2 e F_1 .

1. Metáfase de meiose II ($n = 12$). Cultivar Santa Cruz (x1000)
- 2 e 3. Metáfase de célula somática de ponta de raiz ($2n = 2x = 24$). Cultivar Santa Cruz (x1000)
- 4,5 e 6. Metáfase de híbrido "A". Foram observadas células com $2n$. 25 cromossomos (ponta de raiz) (x1000)

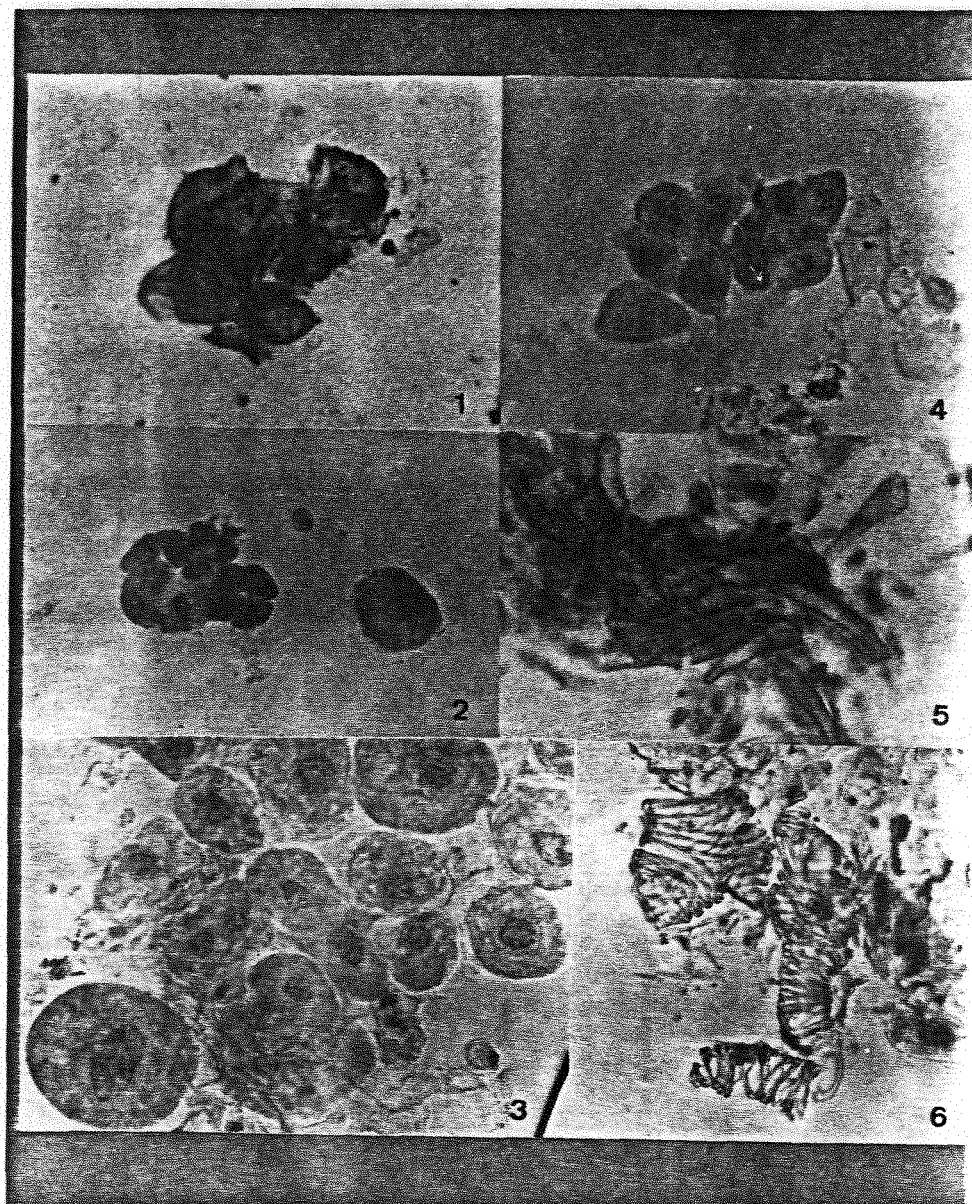
Ao se observar preparações citológicas de calos crescidos, encontram-se grupamentos de células que são resíduos de anteras (Foto 6-1). O tecido do calo apresenta células de vários tamanhos (Foto 6-2), assim como células com núcleos de tamanhos diversos ou binucleados (Foto 6-3). Células na fase de prófase apresentam de 10 a 12 corpúsculos heterocromáticos (Foto 6-4). Observam-se também bandas vasculares (Foto 6-5 e 6).

As células de vários tamanhos indicam diferenciação celular ativa no calo, enquanto que as com núcleos de diversos tamanhos sugerem diversos níveis de ploidia (células somáticas), o que é frequentemente citado na literatura (ZAMIR *et alii*, 1980).

Em princípio, o calo originado de grão de pólen deve apresentar complemento cromossômico haplóide. Os núcleos maiores, que sugerem outros níveis de ploidia ($2n$, $4n$, etc), podem ter se originado ou por endomitose ou por fusões nucleares (ZAMIR *et alii*, 1980). As células binucleadas podem ter sido originadas por mitose, onde ocorreu divisão nuclear sem divisão citoplasmática. As bandas vasculares sugerem um início da organogênese.

4.6. DESENVOLVIMENTO DA ANTERA, CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DO CALO

Ao longo do processo de desenvolvimento da antera (Foto 7), observa-se que o material diplóide da mesma



Fcto 6. Observação citológica de calo

1. Resíduo de células de anteras (x400)
2. Células com diferentes tamanhos (x1000)
3. Células com núcleos de tamanhos diferentes (x1000)
4. Prófase. Foram observadas de 10-12 corpúsculos heterocromáticos (x1000)
- 5 e 6. Iniciação do desenvolvimento de órgãos (bandas vasculares) (x200)

torna-se marrom e depois morre. Após 2-3 semanas, o saco polínico apresenta um inchamento (Foto 7a-2) e, a partir da quarta semana de cultivo, observa-se o aparecimento do calo (Foto 7a-3), que cresce lentamente (Fotos 7a-4, 7a-5 e 7a-6).

Durante o crescimento do calo, este pode apresentar uma série de características, vantajosas ou desvantajosas para a cultura e diferenciação (Foto 7b). O crescimento normal produz um calo com superfície branca e esponjosa (Foto 7b-7). A coloração marrom de alguns calos, provavelmente, indica um processo de degenerescência do tecido caloso (Fotos 7b-8 e 7b-9). Este tipo de calo não é adequado para cultivo nem regeneração.

Uma característica importante para a posterior manipulação dos calos é que os mesmos se apresentem com boa compactação (Fotos 7-10 e 7b-11). O calo em condições ideais permite cortes em várias porções para sua clonagem e regeneração (Foto 7b-12). Durante a execução do presente trabalho, observou-se que os calos desenvolvidos em meios que continham cinetina apresentavam-se mais compactos, enquanto que na ausência deste hormônio obtinham-se calos menos consistentes (brandos). Calos menos consistentes e de aparência translúcida foram obtidos com meios que continham apenas 2,4-D. Outra observação feita neste trabalho foi a de que o meio de crescimento de calos utilizado (MBD) leva a um aumento consistente do tamanho do calo em cerca de um mês de cultivo.

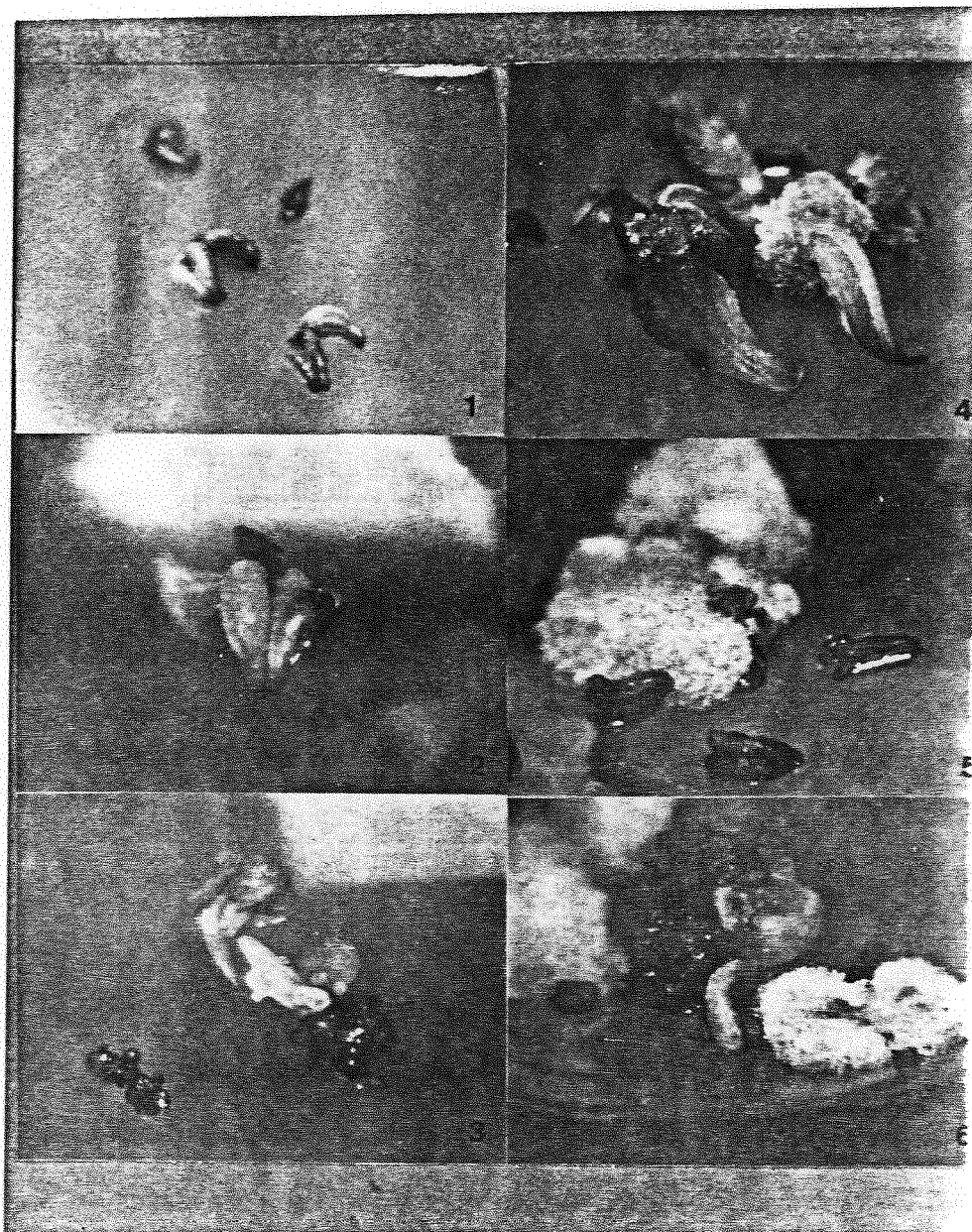


Foto 7a. Processo de desenvolvimento da formação de calo a partir do grão de pólen mediante a cultura de antera.

1. Inoculação das anteras no meio de cultura.
2. Início de inchamento da antera.
3. Aparecimento do calo.
4. Observação da formação do calo a partir do grão de pólen.
- 5 e 6. Crescimento do calo

(continua)

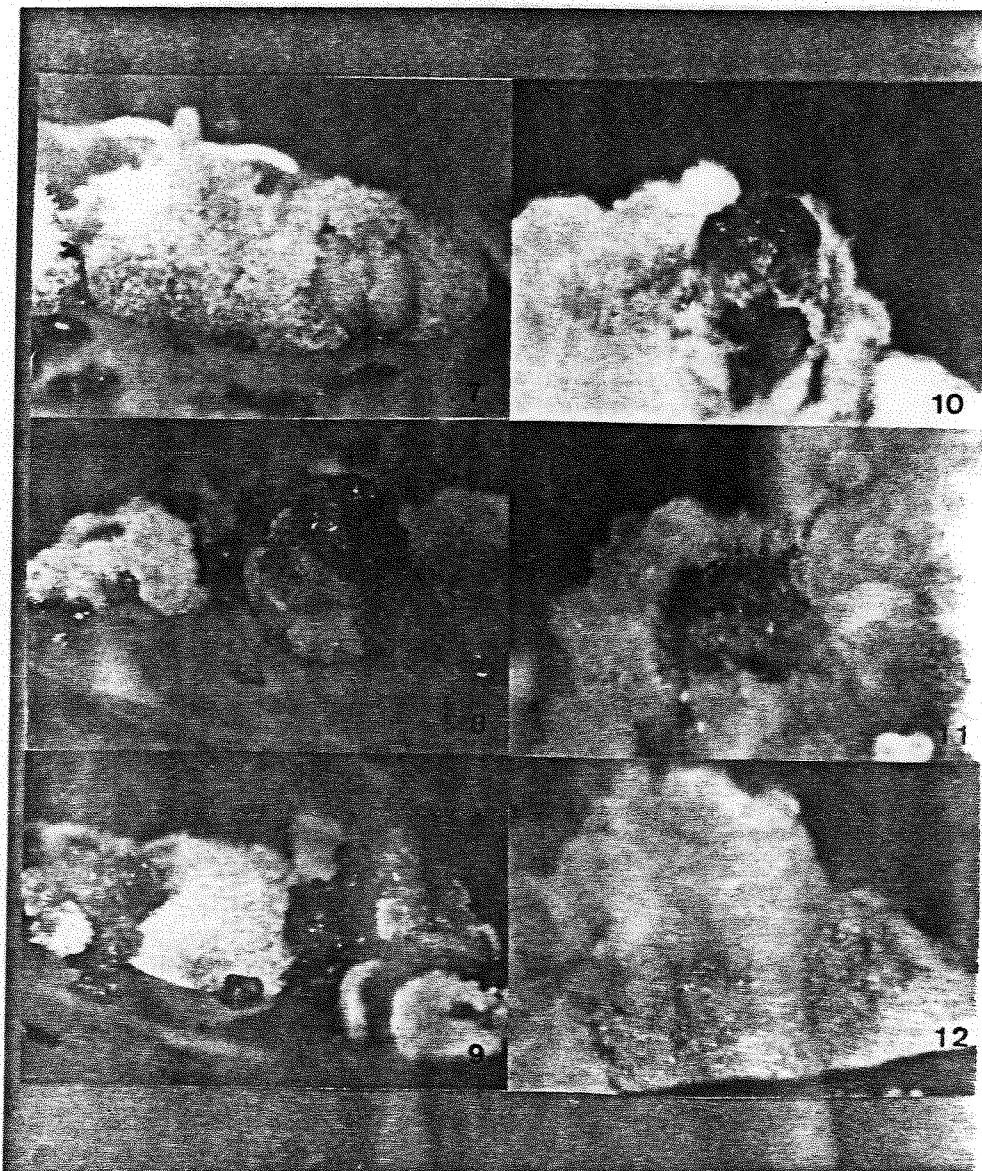


Foto 7b. (continuação)

- 7. Calo com superfície branca esponjosa.
- 8 e 9. Formação de tipos de calos diferentes, um normal e outro marrom.
- 10. Calo branco com o centro bem compactado.
- 11 e 12. Crescimento ideal do calo para posterior repicagem e para submetê-lo a regeneração.

Para a diferenciação do calo em parte aérea e raiz são utilizadas diversas combinações hormonais. A Tabela 30 mostra as combinações hormonais e níveis de sacarose testados neste trabalho.

Foi observado que ocorreu o esverdeamento de calos em uma série de meios (especificados na Tabela 30) e na Foto 7c são apresentados alguns calos clorofilados com o uso de diferentes tipos e combinações hormonais. Neste estudo, ocorreu o primeiro caso de aparecimento de raiz com a combinação 2 mg/l de NAA + 2 mg/l de cinetina + 10 g/l de sacarose (meio nº 9). Posteriormente, também obteve-se aparecimento de raiz com a combinação 0,6 mg/l IAA + 0,6 mg/l Zeatina + 10g/l de sacarose + 2,0 g/l de carvão ativo (meio nº 50). Ambos os casos foram obtidos com material da população F₂ (Foto 8-4).

Com a combinação hormonal 5,0 mg/l IAA + 3,0 mg/l BAP + 10,0 g/l de sacarose, observou-se o aparecimento de vários caules somente num calo (diferentes posições), porém nenhum caule desenvolveu-se em planta (Fotos 8-1, 8-2 e 8-3). Também pode-se constatar efeitos negativos das diferentes combinações hormonais para diferenciação, onde não ocorreu esverdeamento dos calos, como foi o caso dos meios de nºs 23, 24 e 25.

GRESSHOFF & DOY (1972), trabalhando com cultura de anteras em 43 cultivares de tomate, conseguiram regeneração de planta anormal em apenas três cultivares. ZAMIR et alii (1980), também trabalhando com cultura de antera de quinze mutantes macho-estéreis de tomate, conseguiram regene-

ração em apenas um mutante. Já no presente estudo, trabalhando com um total de nove genótipos, em apenas um genótipo pode-se conseguir diferenciação (folha batata-hipocótilo verde) em calos isolados, ou seja, aparecimento de caule e raiz em calos separados (Fotos 8-3 e 8-4). Estes fatos mostram que a regeneração em cultura de antera de tomate é muito difícil mas não impossível resultados estes que concordam com os comentários de HERMAN & HAAS (1978), que consideram o tomate como uma cultura difícil para técnicas de cultura de tecidos, quando comparada com outras espécies de Solanaceas. Estes autores consideram que as culturas de calos apresentam menor habilidade para diferenciação. Portanto, são necessários mais estudos nesta área (cultura de antera) e espécie (*L. esculentum*), para explorar melhor o potencial androgenético nos programas de melhoramento genético.

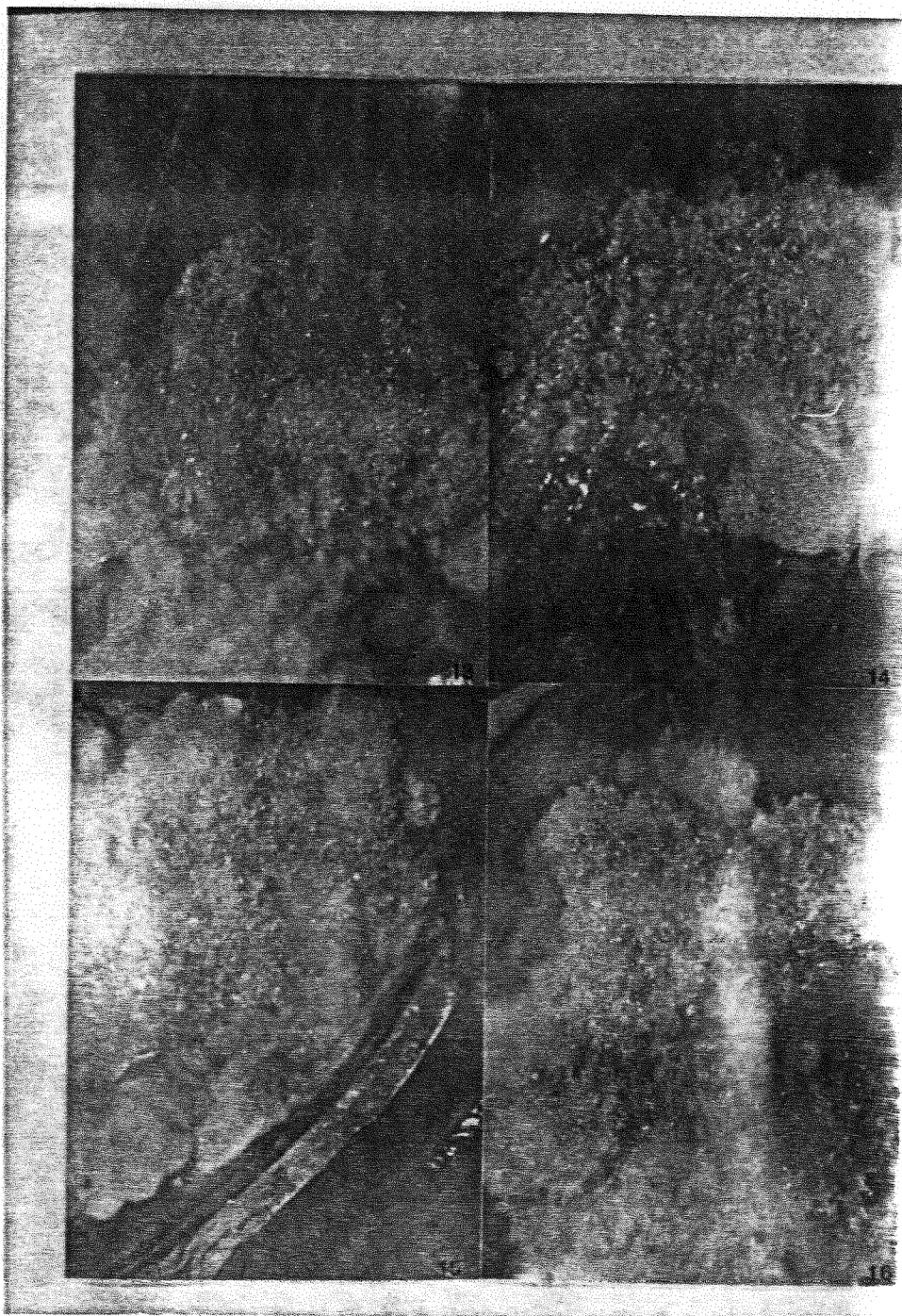


Foto 7c. O aparecimento de calos clorofilados, quando cultivados em diferentes tipos e combinações hormonais para a diferenciação (Tabela 30).

13. Esverdeamento do calo com o uso de NAA + cinetina (2 mg/l + 2 mg/l, respectivamente).
14. Esverdeamento do calo com o uso de IAA + BAP (5 mg/l + 3 mg/l, respectivamente).
15. Esverdeamento do calo com o uso de giberelinas (1 mg/l).
16. Esverdeamento do calo com o uso de IAA + zeatina (0,25 mg/l + 0,18 mg/l, respectivamente).

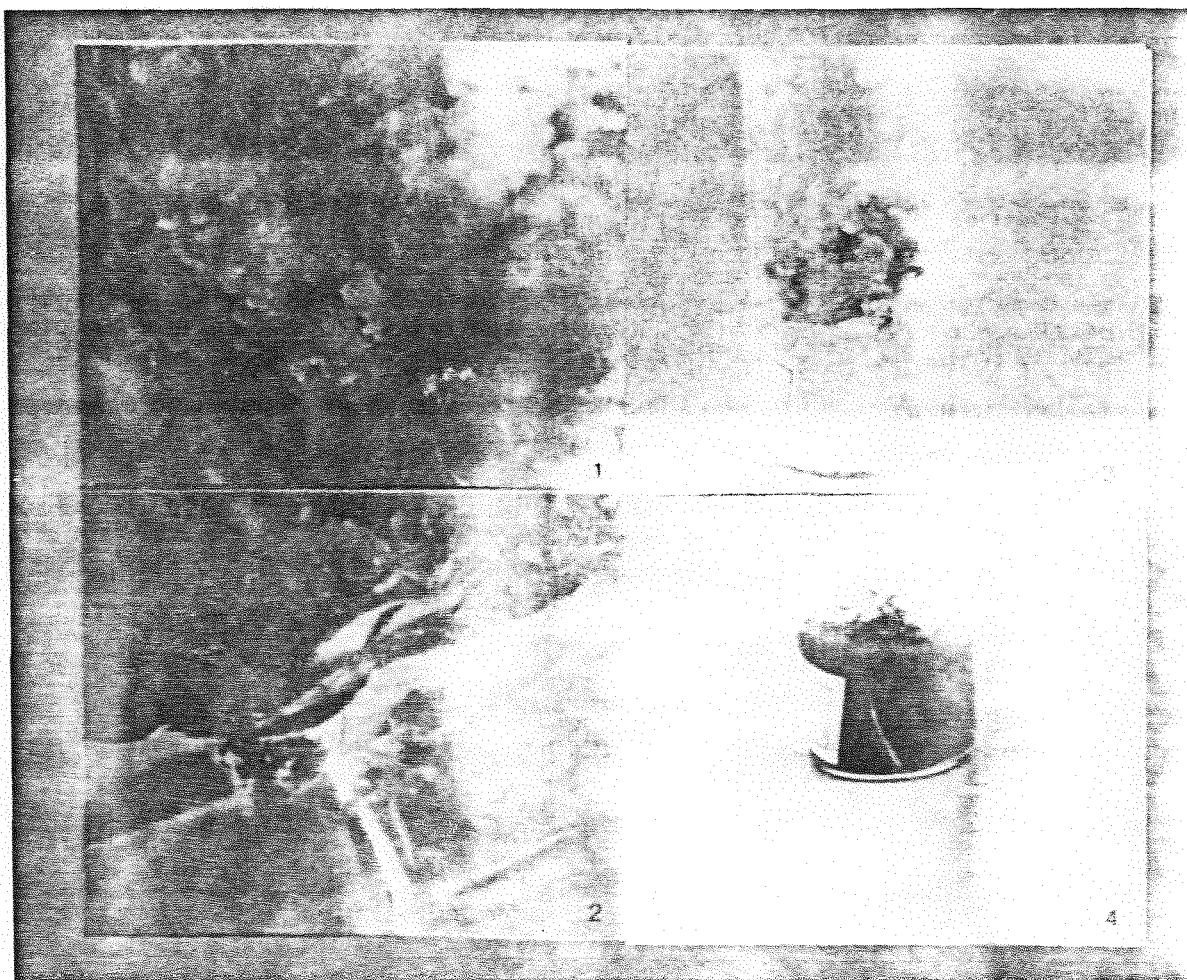


Foto 8. Diferenciação.

1. Vários caules, em diferentes posições, no mesmo calo.
- 2 e 3. Caule mais desenvolvidos.
4. Aparecimento da raiz.

Tabela 30. Combinações hormonais e níveis de sacarose para meios para diferenciação de calo (pH = 5,8).

Nº de combinações testadas (Meio nº)	Hormônios (mg/l)				Sacarose g/l	Carvão vegetal ativo (g/l)	OBSERVAÇÕES
	Auxinas NAA	Auxinas IAA	Cinentina	Citocininas Zeatina			
01	2,0		1,0		20		Calos sem esverdeamento e posteriormente observa-se degenerescência dos mesmos.
02	2,5		1,0		20		Calos sem esverdeamento e posteriormente observa-se degenerescência dos mesmos.
03	3,0		1,0		20		Calos sem esverdeamento e posteriormente observa-se degenerescência dos mesmos.
04	3,5		1,0		20		Calos sem esverdeamento e posteriormente observa-se degenerescência dos mesmos.
05	2,0		1,5		20		Calos sem esverdeamento e posteriormente observa-se degenerescência dos mesmos.
06	2,5		1,5		20		Calos sem esverdeamento e posteriormente observa-se degenerescência dos mesmos.
07	3,0		1,5		20		Calos sem esverdeamento e posteriormente observa-se degenerescência dos mesmos.
08	3,5		1,5		20		Calos sem esverdeamento e posteriormente observa-se degenerescência dos mesmos.
09	2,0		2,0		10		Aparecimento de uma raiz (F ₂)
10	2,5		2,0		10		Calos sem esverdeamento e posteriormente observa-se degenerescência dos mesmos.
11	3,0		2,0		10		Calos sem esverdeamento e posteriormente observa-se degenerescência dos mesmos.
12	3,5		2,0		10		Calos sem esverdeamento e posteriormente observa-se degenerescência dos mesmos.
13	0,1		1,5		30		Calos sem esverdeamento e posteriormente observa-se degenerescência dos mesmos.
14	0,1		2,5		30		Calos sem esverdeamento e posteriormente observa-se degenerescência dos mesmos.
15	0,1		3,0		30		Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)
16	2,0		2,0		30		Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)
17		1,8	11,0		20		Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)

(continua)

Tabela 30. (Continuação)

Nº de com- binações testadas (Meio nº)	Hormônios (mg/l)					Sacarose g/l	Carvão vege- tal ativo	OBSERVAÇÕES	
	Auxinas		Cinetina	Citocininas					Gibberelinas
	NAA	IAA		Cinetina	Zeatina				
18						2,25		Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)	
19						2,25		Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)	
20						4,50		Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)	
21		1,8	10,0					Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)	
22		1,8	15,0					Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)	
23	5,0		10,0					Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)	
24	5,0		25,0					Inibição do crescimento e esverdeamento	
25	20,0		10,0					Inibição do crescimento e esverdeamento	
26	20,0		25,0					Inibição do crescimento e esverdeamento	
27	2,0				5,63			Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)	
28	2,0				6,76			Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)	
29		0,25			0,1875			Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)	
30	0,25				0,1875			Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)	
31								Esverdeamento dos calos (F ₁ e F ₂)	
								Sem resposta	
					25,0			Sem resposta	
					50,0			Sem resposta	
					75,0			Sem resposta	
					100,0			Sem resposta	
					150,0			Sem resposta	
					200,0			Sem resposta	
32		0,45	11,0					Esverdeamento de calos	
33						2,25		Esverdeamento de calos	
34						3,38		Esverdeamento de calos	
35						4,50		Esverdeamento de calos	
36		0,5			0,25			Esverdeamento de calos	
37	4,0		4,0					Esverdeamento de calos	
38	2,0		2,0					Esverdeamento de calos	
39		0,1	2,0					Esverdeamento de calos	
40		5,0						Esverdeamento de calos	
41	0,833							Aparecimento de caule (F ₂)	
					0,625			Esverdeamento de calos (F ₁ e F ₂)	
42		1,8	10,0					Esverdeamento de calos (F ₁ e F ₂)	
43		1,8	15,0					Esverdeamento de calos (F ₁ e F ₂)	
44		1,8	20,0					Esverdeamento de calos (F ₁ e F ₂)	
45		0,50			0,50			Esverdeamento de calos (F ₁ e F ₂)	

(continua)

Tabela 30. (continuação)

Nº de com- binações testadas (Meio nº)	Hormônios (mg/l)						Sacarose	Carvão vege- tal ativo (g/l)	OBSERVAÇÕES
	Auxinas		Citocininas		Giberelinas				
	NAA	IAA	Cinetina	Zeatina	BAP				
46						1,0	5		Esverdeamento de calos (F ₁ e F ₂)
47						3,0	5		Esverdeamento de calos (F ₁ e F ₂)
48						5,0	5		Esverdeamento de calos (F ₁ e F ₂)
49						1,0	10	2,0	Esverdeamento de calos (F ₁ e F ₂)
50		0,6		0,6			10	2,0	Raiz F ₂
51		4,0			4,0		20	2,0	Raiz F ₂

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho, chegou-se às seguintes conclusões:

1. O genótipo é um fator importante no sucesso da androgênese do tomate, pois observou-se que tanto para a produção de calos como para a diferenciação, houve diferenças marcantes tanto na população F_1 e F_2 .
2. Os processos mitóticos e meióticos, assim como o número cromossômico das plantas doadoras (F_1 e F_2) são normais.
3. O tamanho do botão floral de 5,0 a 6,9 mm foi o que apresentou maior frequência de indução e formação de calos, tanto para os 5 híbridos (A, B, C, D e F) (6,36% a 22,72%), como para os 4 genótipos F_2 (22,73% a 35,45%). Este tamanho do botão floral corresponde ao estágio de antera com pólen uninucleado.

4. O meio de cultura "a" (MS + 2 mg/l NAA + 2 mg/l cinetina) foi o que proporcionou uma maior frequência de formação de calos para a população F_2 (28,36 a 30,54%), enquanto que para os híbridos da população F_1 , o melhor meio de cultura foi o "b" (MS + 5 mg/l NAA + 3 mg/l cinetina), que induziu a uma frequência de calos de 6,36 a 22,73%.
5. O hormônio cinetina (2 mg/l) adicionado ao meio de cultura favorece a formação de calos mais consistentes (compacto).
6. Entre os hormônios testados, NAA e cinetina mostraram-se eficientes para a formação de calos tanto para a população F_1 como a F_2 .
7. Obtiveram-se raízes quando os calos foram cultivados nos meios de cultura MS + 2 mg/l NAA + 2 mg/l cinetina e também no meio MS + 0,6 mg/l IAA + 0,6 mg/l zeatina com uma frequência de 0,90%, respectivamente. Foi observada a diferenciação de caule com uma frequência de 0,90% quando o calo foi cultivado no meio de cultura MS + 5,0 mg/l IAA + 3 mg/l BAP.
8. A dose de irradiação 2,0 KR apresentou melhor frequência para a formação de calos no híbrido Sunny (31,82%), do que no resto do material estudado.

9. A irradiação do meio de cultura, bem como a irradiação da interação antera-meio de cultura, não apresentaram respostas significativas na produção de calos.
10. A dose de 8,0 KR aplicada a antera, meio de cultura e a interação antera-meio de cultura foi letal em todos os casos tanto para a população F_1 , como para a F_2 .
11. A regeneração de planta a partir da cultura de antera de tomate é difícil, mas não impossível, e precisa de mais estudos no que se refere o seu potencial androgenético.

6. LITERATURA CITADA

ABO EL-NIL, M.M. Origin of androgenetic callus and haploid geranium plants. Can. J. Bot., Ottawa, 51: 2107-9, 1973.

ABO EL-NIL, M.M. & HILDEBRANDT, A.C. Differentiation of virus-symptomes geranium plants from callus. Plant Dis. Rep. Washington, 55: 1017-20, 1971.

ANAGNOSTAKIS, S.L. Haploid plants from anthers of tobacco-enhancement with charcoal. Planta, Berlin, 155: 281-3, 1984.

BAJAJ, Y.P.S. Regeneration of haploid tobacco plants from isolates grown in drop culture. Indian J. Exp. Biol., New Delhi, 16: 407-9, 1978a.

BAJAJ, Y.P.S. In vitro production of haploids. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.U.; YAMADA, Y., ed. Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding. New York, Macmillan, 1984. V.1, cap. 6, p.229. 87.

* BAJAJ, Y.P.S. In vitro induction of haploid in wheat (*Triticum aestivum* L.). Crop Improv., New York., 4: 54-64, 1977.

- BAJAJ, Y.P.S. & COCKING, E.C. The isolation and culture of microspore tetrads and microspore mother protoplasts of some angiosperms. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM YEAST PROTOPLAST, 3., Salamanca, 1972. Proceedings. Salamanca, 1982. p.79.
- BIBDING, H. Cell cluster formation by leaf protoplasts from axenic cultures of haploid *Petunia hybrida* L. Plant Sci. Lett., Amsterdam, 2: 185-8, 1974.
- BIGGI, E. Manual da cultura do tomate. São Paulo, E. Biggi, 1977. 164p.
- BINGHAM, E.T. Haploids and hexaploids of cultivated alfalfa materials for new research. Agron. Abstrs, Madison, 3., Apud Plant Breed. Abstr., Cambridge, 41: 689, 1971 (Resumo).
- BINGHAM, E.T. & BINEK, A. Comparative morphology of haploids from cultivated alfalfa, *Medicago sativa* L. Crop Science, Madison, 9: 749-51, 1969.
- BINDING, H.; BINDING, K.; STRAUB, J. Selektion in gewebe-kulturen mit haploiden zelle. Naturwissenschaften, Berlin, 57: 138-9, 1970.
- BOURGIN, J.P. & NITSCH, J.P. Obtention de *Nicotiana* haploids a partir d'etamines cultivees in vitro. Ann. Physiol. Veg., Paris, 9: 377-82, 1967.
- BUKETOVA, M.I. Choice of pollinators for producing dihaploids. Potato & Vegetables, (6): 12. Apud Plant Breed. Abstr., Cambridge, 41: 144, 1971. (Resumo).

- BURK, L.C.; GWYNN, G.R.; CHAPLIN, J.F. Diploized haploids from aseptically cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. A colchicine method applicable to plant breeding. J. Hered., Washington, 63: 355-60, 1973.
- BUTLER, E.E. & BIKAN, H. A medium for heterokaryon formation in *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, Lancaster, 63: 542-4, 1973.
- CARLSON, P. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. Science, Lancaster, 180: 1366, 1973.
- CARLSON, P.S. & POLACCO, J.C. Plant cell cultures: genetic aspects of crop improvement. Science, Lancaster, 188: 622-5, 1975.
- CARLSON, P.S.; SMITH, H.H.; DEARING, D.D. Parasexual interspecific plant hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci., Washington, 69: 2292-4, 1972.
- CHASE, S.S. Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). Bot. Rev., Lancaster, 35: 117-67, 1969.
- CHEN, C.-C. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. Crop Sci., Madison, 19: 905-6, 1978.
- CHYAH, A. TRAN THANH VAN, M. Differential reactivity in epidermal cells of *Begonia rex* excised and grown in vitro. Physiol. Plantarum, Koafnhan. 35: 16-20, 1975.
- * 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.

- CHOUREY, P.S.; SMITH, H.H.; COMBATTI, N.C. Effects of irradiation and isolacetic acid on especific peroxidase isozymes and pith tissue of a *Nicotiana* amphiploid. Amer. J. Bot., Ohio, 60(9): 853-7, 1973.
- CHU, C.C. The ng medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978. Proceedings. Peking, Science Press, 1978. p.43-56.
- CLAPHAM, D. In vitro development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. Z. Pflanzenzuchtg., Berlin, 65: 285-92, 1971.
- CLAPHAM, D. Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro. Z. Pflanzenzuchtg., Berlin, 69: 142-55, 1973.
- *CLAPHAM, D. Haploid induction in cereals. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ tissue culture. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.279-98.
- COLEMAN, W.K. & GREYSON, R.J. Promotion of root initiation by gibberellic acid in leaf discs of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultured in vitro. New Phytol., London, 78: 47-5, 1977.
- COLLINS, G.B. Use of anther derived haploids and derivatives in plant improvement programmas. In: BURRIS, R.H. & BLACK, C.C., ed. CO₂ metabolism and productivity of plants. Baltimore, University Park Press, 1975. p.359-84.
- COLLINS, G.B. & LEGG, P.D. The use of haploids in breeding allopolyploid species. In: KASHA, K.J., ed. Haploid in higher plants; advances and potentials. Guelph, Univ. of Guelph, 1974. p.231-47.

- COLLINS, G.B. & LEGG, P.D. Recent advances in the genetic applications of haploid in *Nicotiana*. In: DAVIES, D.R. & HOPWOOD, D.A., ed. Proc. Fourth John Innes Symp. - the plant genome and second international haploid conference. Norwich John Innes Institute, 1980. p.197-213.
- COLLINS, G.B. & SUNDERLAND, N. Pollen-derived haploids of *Nicotiana knightiana*, *N. raimondii* and *N. attenuata*. J. Exp. Bot., Oxford, 25: 1030-9, 1974.
- CORDUAN, G. Regeneration of anther-derived plants from *Hyoscyamus niger* L. Planta, Berlin, 127: 27-36, 1975.
- DAY, A.W. & JONES, J.K. p-Fluorophenylalanine-induced mitotic haploidization in *Ustilago violacea*. Genet. Res., London, 18: 299-309, 1981.
- DEKHUIJZEN, H.M. Sterilization of cytokinins. In: Effects of sterilization on components in nutrient media. Wageningen, 1971. p.129-32.
- DEVREUX, M. & SACCARDO, F. Mutazioni sperimentali osservate su piante aploid di tabacco ottenute per culture in vitro di entere irradiate. Atti. Assoc. Genet. Ital., Pisa, 16: 69-71, 1971.
- DIX, P.J. & STREET, H.E. Effects of p-fluorophenylalanine on the growth of cell lines differing in ploidy and derived from *Nicotiana silvestris*. Plant Sci. Lett., Amsterdam, 3: 283-8, 1974.
- DRIRA, A. Etude de la néoformation de méristèmes caulinares et radicaire chez les feuilles fragmentées d'une part et chez le tissu épidermique d'autre part de *Nautilocalyx lynche* (Jook). Thèse Doctorat 3^e cycle, Paris, 1970.

- DURAND, J.; POTRYKUS, I.; DONN, G. Plantes issues de protoplastes de *Petunia*. Z. Pflanzenphysiol., Jena, 69: 26-34, 1973.
- EAPEN, S. Effect of gamma-and ultraviolet-irradiation on survival and totipotency of haploid tobacco cells in culture. Protoplasma, Leipzig, 89: 149-55, 1976.
- ENGVILD, K.C. Triploid petunias from anther cultures. Hereditas, London, 74: 144-7, 1973.
- ENGVILD, K.G. Plantlet ploidy and flower-bud size in tobacco anther cultures. Hereditas, London, 76: 320-2, 1974.
- ENGVILD, K.C.; LINDE-LAURSEN, I.; LUNDQUIST, A. Anther cultures of *Datura innoxia*; flower bud stage and embryoid level of ploidy. Hereditas. London, 72: 331-2, 1972.
- ERNST, R. The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of *Paphtopedilum*. Am. Orchid. Soc. Bull., Washington, 43: 35-8, 1974.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.U.; YAMADA, Y., ed. Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding. New York, Macmillan, 1984. v.1, p.970.
- FRANSEN, N.O. Haploidproduktion aus einem kartofflezuchtmaterial mit intensiver wildarteinkreuzung. Der Zuchter, Berlin, 37: 120-34, 1967.
- GALUN, E. & RAVEH, D. In vitro culture of tobacco protoplasts; survival of haploid and diploid protoplasts exposed to X-ray radiation at different times after isolation. Radiat. Bot., London, 15: 79-82, 1975.

- GAUTIER, M. Etude des capacités néoformatrices des feuilles de *Torania fourrieri* en fonction des conditions d'environnement. D.E.A., Paris, 1972.
- GEBHARDT, C.; SCHNEBLI, V.; KING, P.J. Isolation of biochemical mutants using haploid mesophyll protoplasts of *Hyoscyamus muticus*, II. Auxotrophic and temperature - sensitive clones. Plant, Berlin, 153: 81-9, 1981.
- GRESSHOFF, P.M. & DOY, C.H. Development and differentiation haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta, Berlin, 107: 161-70, 1972a.
- GRESSHOPP, P.M. & DOY, C.H. Haploid *Aradidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. Austr. J. Biol. Sci., Melbourne, 25: 259-64, 1972b.
- GUHA, S. & MAHESHWARI, C. In vitro production embryos from anthers of *Datura*. Nature. London, 204: 497, 1964.
- x GUHA-MUKHERJEE, S. Genotypic differences in the "in vitro" formation of embryoids from rice pollen. J. Exp. Bot., Oxford, 24: 139-44, 1973 (Plant Breeding Abstracts, 43: 5924, 1973).
- HERMAN, E.B. & HAAS, G.J. Shoot formation in cultures of *Lycopersicon esculentum* (Mill). Z. Pflanzenphysiol., Jena, 89: 467-70, 1978.
- HERMSEN, J.G.Th. Tetrahaploids from colchicine-induced octaploid *Solanum acaule* subsp. *aemulans*. Euphytica, Wageningen, 20: 490-2, 1971.
- HO, K.M. & KASHA, K.J. Genetic control of chromosome elimination during haploid formation barley. Genetics, Princeton, 8: 263-75, 1975.

- HOU GAS, R.W. & PELOQUIN, S.J. A haploid plant of the potato variety Katahdin. Nature, Londres, 180: 1209-10, 1957.
- HSU, CH.; YIN, K. CH.; CHU, CH. Y.; BI, H.Y.; WANG, S. D.; LIO, D.Y.; WANG, F.L.; CHIEN, N.F.; CHU, CH. CH.; WANG, CH. CH.; SUN, CH. S. Inducting pollen plants of rice and observations of their progenies. Acta Genetics Sinica, Pelching, 2: 301, 1975.
- HU, H.; HSI, T.Y.; TSENG, C.C.; QUYANG, T.W.; CHING, C. K. Application of anther culture to crop plants. In: THORPE, T.A., ed. Frontiers of plant tissue culture. Calgary, Univ. Calgary Press, 1978. p.123-30.
- IRIKURA, I. Induction of haploid plants by anther culture in tuber-bearing species and interspecific hybrids of Solanum. Potato Res. New Branswick, 18: 133-40, 1975.
- JENSEN, C.J. Chromosome doubling techniques in haploids. In: KASHA, K.J., ed. Haploids in higher plants: advances and potentials. Guelph, University of Guelph, 1974. p.153-90.
- JOHANSSON, L. & ERIKSSON, T. Induced embryo formation in anther cultures of several Anemone species. Physiol. Plant. Koafnhavn, 40: 172-4, 1977.
- JORGENSEN, C.A. The experimental formation of heteroploid plants in the genus Solanum. J. Genet., London, 19: 133-211, 1928.
- KAMEYA, T. & HINATA, K. Induction of haploid plants from pollen grains of Brassica. Jpn. J. Breed., Tokyo, 20: 82-7, 1970.

- KARTHA, K.K.; GAMBORG, O.L.; SHYLUK, J.P.; CONSTABEL, F. Morphogenetic investigations on in vitro leaf culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* (Mill) cv. Starfire) and high frequency plant regeneration. Z. Pflanzenphysiol., Jena, 77: 292-301, 1976.
- KASHA, K.J. ed. Haploid in higher plants: advances and potentials. Guelph, Univ. Guelph Press, 1974.
- KASHA, K.J. & KAO, K.N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature, London, 225: 874-6, 1970.
- KASPERBAUER, M.J. & COLLINS, G.B. Reconstitution of diploids from leaf tissue of anther-derived haploids in tobacco. Crop Sci., Madison, 12: 98-101, 1972.
- KASPERBAUER, M.J. & COLLINS, G.B. Anther-derived haploids in tobacco, evaluation of procedures. Crop Sci., Madison, 14: 305-7, 1974.
- KATO, Y. Actice charcoal and vermiculite. Effective agents on growth and morphogenesis of fern gametophytes. Phytomorfology, New Delhi, 23 260-3, 1973.
- KELLER, W.A.; RAJHATHY, T.; LACAPRA, J. In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Can. J. Genet. Cytol., Ottawa, 17: 655-66, 1975.
- KELLER, W.A. & ARMSTRONG, K.C. High frequency production of microspore derived plants from *Brassica napus* anther cultures. Z. Pflanzenzuchtg, Berlin, 80: 100-8, 1978.

- KELLER, W.A. & STRINGAM, G.R. Production and utilization of microspore derived haploid plants. In: THORPE, R.A., ed. Frontiers of plant tissue culture. Calgary, Academic Press, 1978. p.113-22.
- KHATOVA, M.N. (Experimental production of maize haploid and homozygous lines from them). Apomiksis i selektivna 270-276; Plant Breeding Abstr., 43: 6817, 1973.
- KIMBER, G. & RILEY, R. Haploid angiosperms. Bot. Rev., Lancaster, 90: 480-531, 1963.
- KLEIN, B. & BOPP, M. Effect of activated charcoal in agar on the culture lower plants. Nature, London, 230: 474, 1971.
- KU, M.K.; CHENG, W.C.; KUO, L.C.; KUAN, Y.L.; AN, H.P.; HUANG, C.H. Introduction factor and morphocytological characteristics of pollen-derived plants in maize (*Zea mays*). In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978. Proceedings. Peking, Science Press, 1978. p.35-43.
- KUO, J.S.; WANG, Y.Y.; CHIEN, KU, S.J.; KUNG, M.L.; HSU, H. C. Investigations on the anther culture in vitro of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum annuum* L. Acta Bot. Sinica, Peking, 15: 36-52, 1973.
- KHOKHLOV, S.S.; GRISHINA, E.V.; ZAJCEVA, M.I.; TYRNOV, V.S.; MALISHEVAHINSKAJA, N.A. Haploids in Angiosperms. Saratov University Edition, 1970.
- LANGE, W. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. I. Production, morphological and meiosis of hybrids, haploids and dihaploids. Euphytica, Wageningen, 20: 14-29, 1971.

- LINSMAIER, E.M. & SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, Koafnham, 18: 100-27, 1965.
- LOEWENBERG, J.R. Promotion indoleacetic acid destruction by citric acid and L-alanine. Physiol. Plant, London, 18: 31.40, 1965.
- MAGDON, M.L. & KHANNA, K.R. Haploids. Caryologia, Firenze, 16: 191-235, 1963.
- MAHESHWARI, S.G.; TYAGI, A.K.; MALHOTRA, K. Induction of haploidy from pollen grains angiosperms - the current status. Theor. Appl. Genet., Berlin, 58: 193-206, 1980.
- MALIGA, P.; MARTON, L.; BREZNOVITS, A.S. 5-bromodeoxy-uridine-resistant cell lines from haploid tobacco. Plant Sci. Lett., Amsterdam, 1: 199-21, 1973.
- MARKS, G.E. Selecting asparagus plants as sources of haploids. Euphytica, Wageningen, 22: 310-6, 1973.
- MATTHEWS, P.S. & VASIL, I.K. The dynamics of cell proliferation in haploid and diploid tissues of *Nicotiana tabacum*. Z. Pflanzenphysiol., Jena, 77: 222-36, 1975.
- MATTINGLYM C.F. & COLLINS, G.B. Derivation and cytological analysis of aneuploids from tissue culture of monosomic *Nicotiana tabacum* L. Apud. Lines Agro Abstr., Amsteden., 5: p.58, 1975.
- McCOMB, J.A. Variation in ploidy levels of plants derived from anther culture. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978. Proceedings. Peking, Science Press, 1978. p.167-80.

- MEREDITH, C.P. Response of cultured tomato cell to aluminum. Plant Sci. Lett., Amsterdam, 12: 17-24, 1978.
- MIAO, S.H.; C.S.; KWEI, Y.L.; SUN, A.T.; KU, S.Y.; LU, W.L.; WANG, Y.Y. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE. Peking, 1978. Proceedings. Peking Science Press, 1978. p.23-4.
- MONTELONGO-ESCOBEDO, H., 1969. Factors influencing haploid frequency in tetraploid *Solanum tuberosum*. Diss. Abst, 29. p.4533; Plant Breed Abstr., 41: 3224, 1971.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol.Plant, Koafnhauv, 15: 473-97, 1962.
- NAKATA, K. & TANAKA, M. Differentiation of embryoids from developing germ cells in anther culture of tobacco. Jpn. J. Genet., Mishima, 43: 65-71, 1968.
- NIIZEKI, H. & CONO, K. Rice plants obtained by anther culture. Les cultures de tissus de plantes. Colloq. Int. CNRS, Paris, 193: 251-7, 1971.
- NITSCH, C. Culture of isolated microspores. In: REINHERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., ed. Plant cell, tissue, and organ culture, Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.268-78.
- NITZSCHE, W. & WENZEL, G. Haploids in plant breeding. Berlin, Paul Parey, 1977. 97p.
- NITSCH, J.P. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. Phytomorphology, New Delhi, 19: 389-404, 1969.
- NITSCH, J.P. Haploid plants from pollen. Z. Pflanzuechtung, Berlin, 67: 3-18, 1972.

- NITSCH, C. La culture de pollen isolé sur milieu synthétique. C.R. Acad. Sci., Ser. D, Paris, 278: 1031-4, 1974.
- NITSCH, C. Single cell culture of a haploid cells: The microspore. In: LEDOUS, L., ed. Genetic manipulations with plant material. London, Plenum Press, 1975. p.297-310.
- NITSCH, J.P. & NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. Science, Lancaster, 163: 85-7, 1969.
- NITSCH, C. & NORREEL, B. Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthère ou isolé de l'anthère. C.R. Acad.Sci., Paris, 276D, 1973a.
- NITSCH, J.P.; NITSCH, C.; HAMON, S. Production de *Nicotiana* diploides à partir de cals haploides cultivés in vitro. C.R. Acad. Sci. Ser. D, Paris, 269: 1275-8, 1969a.
- NITSCH, J.P.; NITSCH, C.; PEREAU-LEROY, P. Obtention de mutants à partir *Nicotiana* haploides issus de grains de pollen. Paris, C.R.Acad. Sci., 1969. p.1650-2.
- NITZSCHE, W. Herstellung haploider Pflanzen aus *Festuca lolium* Bastarden. Naturwissenschaften, Berlin, 1970, 57: 199-200.
- OHIRA, K.; IKEDA, M.; OJIMA, K. Thiamine requirements of various plant cells, in suspension culture. Plant Cell Physiol., Tokio, 17: 583, 1976.

- OUYNG, T.W.; HU, H.; CHUANG, C.C.; TSENG, C.C. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured "in vitro". Sci. Sin., Peking, 16: 79-95, 1973.
- PADMANABHAN, V.; PADDOCK, E.F.; SHARP, W.R. Plantlet formation from *Lycopersicon esculentum* leaf callus. Can.J.Bot., Ottawa, 52: 1429-32, 1974.
- PARMENTIER, G. L'incorporation de charbon actif aux milieux de culture de *Phytophthora infestans*. Parasitica. Bruxelles, 26: 31-40, 1970.
- PICARD, E. Influence de modifications dans les correlations internes sur le devenir du gamétophyte mâle de *Triticum aestivum* L. in situ et en culture "in vitro". C.R. Acad. Sci. Ser. D., Paris, 277: 777-80, 1973.
- PROGNOSTICO 1985/86. São Paulo, 12: 102-3, 1985.
- PROSKAUER, J. & BERMAN, R. Agar culture medium modified to approximate soil conditions. Nature, London, 227: 1161, 1970.
- RACHAVAN, V. Induction of haploid plants from anther culture of henbane. Z. Pflanzenphysiol., Jena, 76: 89-92, 1975.
- RAQUIN, C. & PILET, V. Production de plantules a partir d'antheres de *Petunias cultivares* "in vitro". C.R. Acad. Sci. Ser. D, Paris, 274: 1019-22, 1972.
- REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S.; HEBERLE, E. Induction of haploid tobacco plants from isolated pollen. Protoplasto, Leipzig, 84: 191-6, 1977.

- RICK, C.M. & BUTLER, L. Cytogenetics of the tomato. Advances in Genetics, New York, 8: 267-371, 1956.
- SPIEGEL, ROY, P. & ROCHBA, J. Embryogenesis in citrus tissue cultures. In: FIECHTER, A., ed. Advances in biochemical engineering. Berlin, Springer-Verlag, 1980. p.27-48.
- SMITH, H.H.. Polyploidy induced mutant. Bioscience, Washington, 34: 269-76, 1974.
- SACRISTAN, M.D. Karyotypic changes in callus cultures from haploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr. Chromosoma, Berlin, 33: 273-83, 1971.
- SANGWAN-NORREEL, B.S. Androgenic stimulating factors in the anthers and isolated pollen grain culture of *Datura innoxia* Mill. J. Exp. Bot., Oxford, 28: 843-52, 1977.
- SEMBDNER, G.; CROSS, D.; LIEBISCH, H.W.; SCHNEIDER, G. Biosynthesis and metabolism of plant hormones. In: MACMILLAN, J., ed. Encyclopedia of plant physiology: I. Hormonal regulation of development. Berlin, Springer-Verlag, 1980. v.9, p.336-444.
- SKOOG, F. Aspects of growth factor interactions in morphogenesis of tobacco tissue cultures. In: Les cultures de tissus de plantes. Colloques Intern. C.N.R.S., 193. Paris, 1971.
- SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol., London, 2: 118-31, 1953.

SOEDING, H. Die auxine-historische uebersicht. In: Ruhland, W., ed. Encyclopedia of plant physiology. Berlin, Springer-Verlag, 1961. p.450-84.

SOPORY, S.K. Physiology of development of pollen embryoids in *Datura innoxia* Mill. Delhi, 1972. p.225 (Ph.D - University of Delhi).

SOPORY, S.K. & MAHESHWARI, C. Development of pollen embryoids in anther cultures of *Datura innoxia*; I. General observations and effects of physical factors. J. Exp. Bot., Oxford, 27: 49-57, 1976.

SOPORY, S.K.; JACOBSEN, E.; WENZEL, G. Production of monoploid embryoids and plantlets in cultured anthers of *Solanum tuberosum*. Plant Sci. Lett., Amsterdam, 12: 47-54, 1978.

STRAUBm J. Die genetische variabilitat haploider Petunien. Z. Pflanzenzuchtg., Berlin, 70: 265-74, 1973.

SUN, C.S.; CHU, C.C.; TIGERSTEDT, P.M.A. Acta Bot. Sin., Beijing, 22: 25-31, 1980. Studies on the anther culture of *Triticale*.

SUNDERLAND, N. Polen and anther culture. In: Street, H.E., ed. Plant tissue and cell culture. Oxford, Blackwell, 1973. p.205-39.

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.

- SUNDERLAND, N. Anther culture, a progress report. Sci.Prof., London, 59: 527-49, 1971.
- SUNDERLAND, N. Strategies in the improvement of yields in anther culture. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978. Proceedings. Peking, Science Press, 1978. p.65-86.
- SUNDERLAND, N. & ROBERTS, M. New approach to pollen culture. Nature, London, 270: 236-8, 1977.
- SYMKO, S. Haploid barley from crosses of *Hordeum bulbosum* (2x) x *H. vulgare* (2x). Can. J. Genet. Cyt., Ottawa, 11: 602-8, 1969. Apud Plant Breed. Abstr., 40: 657, 1970. (Resumo).
- TABATA, M. Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. In: BARZ, W.; W. REINHARD, E.; ZENK, M.H., ed. Plant tissue culture and its bio-technological application. Berlin, Springer-Verlag., 1977. p.3.
- TAKEBE, I.; LABIB, G.; MELCHERS, G. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissen, Berlin, 58: 318-20, 1971.
- TANAKA, M. & NAKATA, K. Tobacco plants obtained by anther culture and the experiment to get diploid seeds from haploids. Jpn. J. Genet., Mishima, 44: 47-54, 1969.
- THIMANN, K.V. The natural plant hormones. In: STEWARD, F.C., edn. Plant physiology; a treatise. New York, Academic Press, 1972. p.1-359.
- THOMPSON, K.F. Frequencies of haploids in spring oil-sees rape (*Brassica napus*). Heredity, London, 24: 318-9, 1969.

- TOMES, D.T. & COLLINS, G.B. Factors affecting haploid plant production from in vitro anther cultura of *Nicotiana* species. Crop. Sci., Madison, 16: 837-40, 1976.
- TURCOTTE, E.L. & FEASTER, C.V. Semigametic production of cotton haploids. In: KASHA, K.J., ed. Haploids in higher plants. Guelph, Univ. Guelph., 1974. p.53-64.
- VASIL, V. & HILDERBRANDT, A.C. Differentiation of tobacco plants from single isolated cells in microculture. Science, Lancaster, 150: 889-92, 1965.
- VYSKOT, B. & NOVAK, F.J. Experimental androgenesis in vitro in *Nicotiana clevelandii* Gray. and *N. sanderae* hort. Theor. Appl. Genet., Berlin, 44: 138-40, 1974.
- WANG, C.C.; SUN, C.S.; CHU, C.C. On the condition for the induction of rice pollen plantlets and certain affecting the frequency and induction. Acta Bot. Sinica, Peking, 16: 43-53, 1974.
- WEATHERHEAD, M.A. & HENSHAW, C.G. The production of homozygous diploid plants of *Solanum verrucosum* by tissue culture techniques. Euphytica, Wageningen, 29: 765-8, 1979.
- WENZEL, G. Anther culture and its role in plant breeding. In: RAO, P.S.; HEBLE, M.R.; CHADHA, M.S., ed. Plant tissue culture genetic manipulation and somatic hybridization of plant cells. Bombay, Department of Atomic Energy, 1980. p.68-76.
- WENZEL, G. & UHRIG, H. Breeding methods and virus resistance in potato via anther culture. Theor. Appl. Genet., Berlin, 59: 333-40, 1981. WESTCOTT, R.J.; HENSHAW, G.G.; ROCA, W.M. Tissue culture storage of potato germplant: culture initiation and plant regeneration. Plant Sci. Lett., Amsterdam, 9: 309, 1977.

WENZEL, G.; HOFFMANN, F.; THOMAS, E. Heterozygous microspore-derived plants in rye. Theor. Appl. Genet., Berlin, 48: 205-8, 1976.

WENZEL, G.; HOFFMANN, F.; THOMAS, E. Increased induction and chromosome doubling of androgenetic haploid rye. Theor. Appl. Genet., Berlin, 51: 81-6, 1977.

WHITE, P.R. Vitamin B, in the nutrition of excised tomato roots. Plant Physiol., Lancaster, 12: 803-11, 1977.

WOHRMANN, K. Über den einfluss der temperatur auf die dihaploidenrate bei *Solanum tuberosum* L. Z. Pflanzenzüchtg., Berlin, 52: 1-7, 1964.

YIN, K.-C; HSU, 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. Sci. Sinica, Peking, 19: 227-42, 1976.

ZAMIR, D.; JONES, R.A.; KEDAR, N. Anther culture of male sterile tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) mutants. Plant Sci. Lett., Amsterdam, 17: 353-61, 1980.

ZENK, M.H. Haploids in physiological and biochemical research. In: KASHA, K.J., ed. Haploids in higher plant. Guelph, Univ. Guelph, 1974. p.91-122.

ZENKTELER, M. In vitro formation of plants from leaves of several species of the Solanaceae family. Biochim. Physiol. Pflanzen., Jena, 163: 509-12, 1972.