

RESUMO - Com o objetivo de se chegar rapidamente à obtenção de cultivares homozigóticas, fontes de conhecimentos novos de hereditariedade de certos caracteres a serem utilizados como base para programas de melhoramento, foi proposta a técnica de cultura de anteras de pessegueiro. Tal técnica se baseia em modificar, através de cultura *in vitro*, o processo normal de evolução do grão de pólen para a formação de maciços celulares, mais ou menos organizados, suscetíveis de formar posteriormente a planta haplóide, primeira etapa visando a homozigose. Os resultados obtidos permitem as conclusões resumidas a seguir: - ocorreu a formação de raízes sobre diferentes meios de cultura com ou sem repicagem; - obteve-se a formação de estruturas do tipo "embrionário" diretamente relacionadas com o período de indução e o meio de regeneração.

THE PEACH ANTHHER CULTURE

ABSTRACT - With the objective of quickly obtaining homozigous cultivars, new sources of knowledgements in inheritance of certain characters to be used as base for breeding program, was proposed the peach anther culture. Such technique is based in modifying through *in vitro* culture; the normal process of evolution of pollen grain, forming relatively organized callus which later on will form a haployd plant, the first stage to obtain homozigous plant. In some results that we obtained, so far, there was: - root formation in different culture media with or without transfer. - there was formation of embryo structures directly related to the period of induction and the regenerativy medium.

INTRODUÇÃO

O pessegueiro é cultivado nas mais variadas condições de clima. Pode-se encontrar cultivares com pouca exigência em frio hibernal, perfeitamente adaptadas a climas tropical e subtropical como também cultivares que só se desenvolvem bem em climas frios. A existência desta variabilidade de comportamento em relação ao fator climático permitiu a realização de um trabalho de criação e se-

^{1/}Engenheiro Agrônomo, PhD, EMBRAPA-UEPAE de Cascata. C.P. 403, 96.100 - Pelotas, RS.

leção de cultivares extremamente produtivo.

As novas cultivares são oriundas, seguidamente, de programas de hibridação estabelecidos sobre bases ainda muito empíricas, pois os genitores são escolhidos essencialmente pelas suas características fenotípicas onde a maioria das cultivares apresenta um nível de heterogeneidade elevada. Este método permitiu um progresso muito grande durante os últimos anos, mas uma renovação de metodologia aparece, atualmente, como necessária a todos os especialistas do melhoramento genético.

Entre os caminhos possíveis para acelerar o processo de criação de novas cultivares de pessegueiro, a procura de tipos homozigóticos diploidizados abre perspectivas que já foram sucesso no melhoramento de cereais autógamos.

Com o objetivo de se chegar rapidamente à obtenção de cultivares homozigóticos, fontes de conhecimentos novos de hereditariedade de certos caracteres a serem utilizados como base para programas de melhoramento, se propôs a utilização da técnica de cultura de antera. Tal técnica se baseia em modificar o processo normal de evolução do grão de pólen para a formação de maciços celulares mais ou menos organizados, suscetíveis de formar posteriormente a planta haplóide *in vitro*. A cultura de anteras teve seu primeiro sucesso com os trabalhos de produção de plantas haplóides de *Datura* spp, desenvolvido por GUHA & MAHESWARI (1964). Após, inúmeros trabalhos foram realizados, principalmente na França e Japão, sobre duas grandes culturas: o tabaco e o arroz. A mesma técnica foi aplicada a inúmeras outras espécies de grande interesse econômico, como trigo, tomate e batata.

Os trabalhos publicados reunidos por ACHARYA & RAMJI (1977), REINERT & RAJAJ (1977a), PIERIK (1979) e SUNDERLAND (1980) fornecem indicações segundo as quais a androgenese foi introduzida em cerca de uma centena de espécies. Referindo-se a plantas lenhosas, no entanto, poucos trabalhos foram publicados. SHARP et alii (1973) obtiveram o desenvolvimento de embriões e de tecidos haplóides de *Coffea arabica*; MICHELON et alii (1974) obtiveram calos de *Prunus persica* e *P. amygdalus*; KUBICKI et alii (1975) isolaram embriões de *Malus domestica*; MILEWSKA-PAWLICZUK & KUBICKI (1977) obtiveram embriões em estado de torpedo de *Malus domestica*; CHEN CHENG-HUA et alii (1978) regeneraram plantas de *Hevea brasiliensis* e, mais recentemente, SEIRLIS et alii (1978) obtiveram uma planta de *Prunus cerasifera*, cultivar "Ferracida".

Outros aspectos são também importantes, como no caso de determinados tipos homozigóticos que poderão apresentar grande interesse como porta-enxerto. Para as condições de solo adequadas, se poderia cultivar o pessegueiro sobre suas próprias raízes, sendo a propagação das cultivares feita através de sementes, sem recorrer ao processo de enxertia,

Estas considerações são a origem do presente trabalho, fundamentado

sobre a pesquisa de um método particular de androgenese *in vitro*, aplicado ao pessegueiro, em via da obtenção de haplóides, primeira etapa objetivando a homozigose.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram usadas anteras das cultivares Springtime e Nectared IV. A desinfestação do material foi efetuada por imersão de pedaços de ramos contendo 2 a 4 gemas de flor sem etanol a 70^o, durante quinze minutos. Imediatamente após, os fragmentos foram imersos em uma solução de hipoclorito de cálcio (90 g/l) durante quinze minutos. Um agente molhante, o Twen 20, foi adicionado ao hipoclorito. Após, o material vegetal foi lavada três vezes com água esterilizada.

A separação das anteras das flores (ainda pouco desenvolvidas) foi efetuada em condições de assepsia (capela com fluxo de ar filtrado) com o auxílio de uma lupa binocular.

Diversas soluções minerais, MURASHIGE & SKOOG (1962), MILLER (1965), NITSCH & NITSCH (1969), MARGARA - N 45 K (1978), foram usadas com ou sem modificações. O pH do meio foi ajustado a 5,6 (com KOH ou HCl antes da esterilização (110^oC durante 20 minutos) e solidificado com agar agar (0,8%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

a) Origem dos calos

Observações histológicas indicam que os microsporos de pessegueiro se dividem no interior dos sacos polínicos para dar origem a "formações" que saem para fora da antera, mais frequentemente pela fenda de deiscência. Mas os calos podem se originar igualmente da proliferação de outras células, além dos microsporos, como é o caso dos tecidos da antera. Os tecidos diplóides do filete, do conetivo e do interior da antera, podem proliferar para formar calos.

b) Influência do estado de evolução dos microsporos

Para determinar o estado de desenvolvimento mais favorável dos microsporos, utilizou-se como referência da evolução da gema a escala proposta por FLECKINGER (1948).

Assim, para o estado A, correspondente a gemas pouco desenvolvidas, o exame microscópico mostrou que durante sua existência, que se prolonga por várias semanas, ocorre a meiose das células-mães do grão de pólen. Pode-se encontrar células-mãe diplóides, antes da meiose, e grãos de pólen haplóides uninucleados, após a meiose.

No estado B, gema inchada, pode-se encontrar nos sacos polínicos dois tipos de grãos de pólen: uns uninucleados e outros binucleados, onde ocorreu a

primeira mitose polínica.

No estado C, quando o cálice torna-se visível, pode-se encontrar grãos de pólen binucleados e grãos de pólen mais evoluídos, de forma triangular. A partir deste estado, o grão se apresenta bastante diferenciado e continua sua evolução, até a deiscência da antera, que ocorre no estado F.

A partir destas observações, as gemas de flor da cultivar Springtime foram selecionadas nos diferentes estados fenológicos A, B e C. Para cada estado, 320 anteras foram cultivadas sobre o meio de MILLER (1965) adicionado de auxinas (2,4 D 1,0 mg/l e AIA 0,1 mg/l) e citocininas (BAP 1,0 mg/l e kinetina 0,2 mg/l). Após o cultivo, os frascos foram colocados na obscuridade e a 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Na TABELA 1, são apresentados os resultados relativos à indicação de calos que saíam pela fenda de deiscência das anteras.

A observação da TABELA 1 permite constatar que a maior formação de calos foi obtida quando se cultivava as anteras de gemas de flor no estado B. Após estas observações, baseadas no estado fenológico das gemas de flor, somente as anteras das gemas no estado B foram utilizadas, a fim de definir o estado mais favorável de evolução dos microsporos.

TABELA 1 - *Influência do estado fenológico da gema, sobre a formação de calo (dos levantados 49 dias após o cultivo)*

ESTADO FENOLÓGICO DA GEMA DA FLOR	Nº DE ANTERAS CULTIVADAS	Nº DE CALOS FORMADOS	% DE FORMAÇÃO DE CALOS
A	320	5	1,6 b*
B	320	38	11,8 a
C	320	9	2,8 b

* Tratamentos com letras comuns não são estatisticamente diferentes (teste χ^2).

Cinquenta gemas de flor da cultivar Nectared IV no estado fenológico B foram selecionadas para o cultivo. De cada flor, 20 anteras foram postas em cultivo, nas mesmas condições precedentes. As outras anteras foram fixadas (em CRAF) para observações microscópicas ulteriores. Após cinquenta dias de cultivo, observou-se dois tipos de repostas: as anteras de algumas flores formaram calos, enquanto outras, retiradas de flores diferentes, não manifestaram nenhuma calogênese. As anteras que foram fixadas correspondentes a estes dois tipos de repostas foram então observadas ao microscópio. O exame dos microsporos das anteras sem capacidade de formar calo revelou que eles se apresentavam uninucleados no momento do cultivo. Nas anteras que produziram calos, pôde-se observar uma mistura de microsporos uninucleados e de microsporos binucleados, on

de havia ocorrido a primeira mitose polínica.

Em cultura de antera, a determinação da fase de diferenciação dos microsporos, que fornece as melhores respostas, é fundamental, ainda mais se for possível coincidir o estado favorável com certas características morfológicas da gema de flor, pois as operações de cultivo serão grandemente facilitadas. Em tal caso, as observações microscópicas prévias não serão necessárias para cada gema de flor.

Para as cultivares de pessegueiro estudadas, o período ótimo engloba o momento da primeira mitose polínica. Os resultados apresentados estão de acordo com os apresentados por MICHELON et alii (1974), mas diferem das observações citadas por SEIRLIS et alii (1979) que utilizou anteras cujos microsporos se apresentavam no estado tetrade ou uninucleados. No caso de algumas espécies de *Nicotiana*, o estado da primeira mitose polínica representa o estado ótimo (SUNDERLAND 1974).

Para as cultivares estudadas, a mitose ocorre no estado B, segundo a escala de FLECKINGER (1948). Observou-se uma relação estreita entre as características da gema de flor, a evolução dos microsporos e a resposta ao cultivo. Estas relações permitem realizar o cultivo das anteras guiando-se simplesmente pelo aspecto da gema de flor. É possível que, em função das diferentes necessidades de frio das cultivares e de condições climáticas, modificações possam ser observadas na relação entre as características da gema de flor e o estado de evolução dos microsporos mais favorável à calogênese.

c) Influência do meio de cultura

Em uma primeira etapa, foram utilizados os meios de cultura preconizados por MILLER (1965) e MURASHIGE & SKOOG (1962). A análise destes ensaios preliminares mostrou que os dois meios forneciam respostas similares. A seguir foram feitas comparações entre os macro e micro-elementos de MILLER (1965), MARGARA (1978) e de NITSCH (1969) mantendo constante os componentes seguintes (representados por K na TABELA 2): inositol 100 mg/l, ácido nicotínico 0,1 mg/l, piridoxina-HCl 1,0 mg/l, tiamina-HCl 0,2 mg/l e sacarose 30 g/l. Ao meio de Miller, adicionado dos componentes K, foi acrescido o carvão ativo (Merck 2186 - 10 g/l).

A estes quatro meios de base foram adicionadas nove combinações de auxinas (2,4 D e AIA) e citocininas (BAP e Kin) nas concentrações apresentadas na TABELA 2. Os 36 meios tiveram seus pH corrigidos para 5,6 e foram solidificados com agar-agar (8 g/l). Após o cultivo, os frascos foram colocados no escuro a 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Quarenta anteras da cultivar Springtime, no estado B, foram cultivadas sobre cada um destes meios com oito repetições de cada.

Os resultados obtidos são apresentados na TABELA 2 onde os valores representam o número de calos formados para as 320 anteras cultivadas sobre cada meio.

TABELA 2 - *Influência de diferentes meios de cultura sobre a formação de calo*

MEIO DE CULTURA	AUXINAS mg/ℓ	REGULADORES DE CRESCIMENTO			TOTAL
		CITOCININAS EM mg/ℓ			
		BAP (1,0)	KIN (0,2)	BAP + KIN	
Miller + K	2,4 D (1,0)	28 ^{a/}	30	43	100
	AIA (0,1)	0	0	0	0
	2,4 D + AIA	54	23	56	133
	TOTAL	82	53	98	233
Margara N 45 K + K	2,4 D (1,0)	44	13	47	104
	AIA (0,1)	0	0	0	0
	2,4 D + AIA	73	10	52	135
	TOTAL	117	23	99	239
Nitsch + K	2,4 D (1,0)	18	20	41	79
	AIA (0,1)	0	0	0	0
	2,4 D + AIA	21	29	38	88
	TOTAL	39	49	79	167
TOTAL GERAL		238	125	276	639

^{a/}Cada valor representa o número de calos formados a partir de 320 anteras cultivadas em cada tratamento.

NOTA: Sobre o meio de Miller adicionado de carvão ativo Merck 2186 a 1% não foi induzida a formação de calo.

O exame dos resultados permite fazer as observações seguintes:

- Efeito de macro e micro-elementos

Para comparar os efeitos dos macro e micro-elementos, os resultados foram agrupados na TABELA 3, onde K é a parte constante, H corresponde às nove combinações de auxinas e citocininas.

Pode-se constatar que não existe diferença estatística quanto à formação de calo, quando as soluções minerais empregadas são aquelas propostas por MILLER e MARGARA. A solução de Nitsch propicia a menor produção de calo que difere estatisticamente das outras duas.

TABELA 3 - Efeito de macro e micro-elementos sobre a formação de calos

MEIOS	Nº DE ANTERAS CULTIVADAS	Nº DE CALOS FORMADOS
Miller + K + H	2.880	233 a*
Margara N 45K + K + H	2.880	239 a
Nitsch + K + H	2.880	167 b

*Tratamentos com letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 1% (teste de χ^2).

- Efeito de auxinas

Constatou-se que as anteras cultivadas sobre meios adicionados de AIA (0,1 mg/l), mas sem 2,4 D, não formam calos, mesmo em presença de citocininas.

O efeito do 2,4 D (1 mg/l) só ou associado ao AIA (0,1 mg/l) é apresentado na TABELA 4.

TABELA 4 - Efeito de 2,4 D só ou combinado ao AIA, na formação de calo

MEIOS	AUXINAS	Nº DE ANTERAS CULTIVADAS	Nº DE CALOS FORMADOS	TESTE χ^2
Miller + K	2,4 D	960	100	
+ citocininas*	2,4 D + AIA	960	133	S 5%**
Margara + K	2,4 D	960	104	
+ citocininas	2,4 D + AIA	960	135	S 5%
Nitsch + K	2,4 D	960	79	
+ citocininas	2,4 D + AIA	960	88	n.s.

* Citocininas: BAP (1,0 mg/l), Kin (0,2 mg/l) ou BAP + Kin (mesmas concentrações).

**S 5% - diferenças significativas ao nível de 5%.

n.s. - não significativo (teste χ^2).

A observação dos dados mostra que a adição de AIA (0,1 mg/l) ao meio, contendo 2,4 D (1,0 mg/l) melhora as respostas para as composições dos meios de Miller & Margara. Para o meio de Nitsch não se observam diferenças estatísticas entre o efeito do 2,4 D (1,0 mg/l) só ou combinado com AIA (0,1 mg/l).

- Efeito de citocininas

Os resultados são apresentados na TABELA 5.

O exame da TABELA 5 permite as seguintes considerações:

- Para o meio de Miller, o melhor resultado (98 calos sobre 640 anteras cultivadas) é obtido em presença de uma associação BAP (1,0 mg/l) + Kin (0,2 mg/l). Esta combinação é mais eficiente que a Kinetina (0,2 mg/l) isolada,

mas seu efeito é estatisticamente idêntico àquele da BAP (1,0 mg/l). A utilização de BAP (1,0 mg/l) fornece uma resposta superior e estatisticamente diferente (nível de 1%) à utilização só de Kinetina.

TABELA 5 - Efeito de citocininas na formação de calos (BAP 1,0 mg/l e Kinetina 0,2 mg/l)

MEIOS	CITOCININAS	Nº DE ANTERAS CULTIVADAS	Nº DE CALOS FORMADOS	ANÁLISE ES-TATÍSTICA
Miller + K + Auxinas	BAP	640	82	
	Kin	640	53	S 1%*
	BAP	640	82	
	BAP + Kin	640	98	n.s.
	Kin	640	53	
	BAP + Kin	640	98	S 1%
Margara + K + Auxinas	BAP	640	117	
	Kin	640	23	S 1%
	BAP	640	117	
	BAP + Kin	640	99	n.s.
	Kin	640	33	
	BAP + Kin	640	99	S 1%
Nitsch + K + Auxinas	BAP	640	39	
	Kin	640	49	n.s.
	BAP	640	39	
	BAP + Kin	640	79	S 1%
	Kin	640	49	
	BAP + Kin	640	79	S 1%

*S 1% = Diferenças significativas ao nível de 1%.

n.s. = Diferenças não significativas ao nível de 5% (Teste χ^2).

- Para o meio de Margara (N45K), a BAP (1,0 mg/l) origina a melhor res-
posta (117 calos sobre 640 anteras cultivadas) só ou associada à Kinetina. A ki-
netina isolada tem um efeito menos marcado.

- Para o meio de Nitsch a melhor resposta (79 calos sobre 640 anteras
cultivadas) é obtida com uma combinação de BAP (1,0 mg/l) e Kinetina (0,2 mg/l).
Esta associação origina um efeito melhor do que os efeitos das duas substâncias

empregadas isoladamente.

- Com relação ao carvão ativado, os resultados mostraram que a adição do produto na presença das nove combinações de auxinas e citocininas inibe a formação de calo.

Os ensaios mostraram que para certas combinações de macro e micro-elementos, as respostas são semelhantes quando se utilizam as mesmas associações de auxinas e citocininas.

O meio de Miller foi escolhido como meio de base em função das respostas obtidas durante os ensaios preliminares que confirmaram os dados bibliográficos de MICHELON et alii (1974) e SEIRLIS et alii (1979).

As anteras de certas espécies podem ser cultivadas sobre meios sem auxinas ou em concentrações pequenas de ANA, (0,1 mg/l) como é o caso de algumas solanáceas. No caso de gramíneas, ao contrário, para a iniciação das primeiras divisões da androgênese, as anteras necessitam concentrações elevadas de auxinas ativas, tais como o 2,4 D a 1,0 mg/l. A adição de 2,4 D parece indispensável no caso do pessegueiro.

Se o AIA é a única auxina associada às misturas de citocininas os calos não se formam.

Em relação às comparações possíveis entre os efeitos das citocininas utilizadas, a BAP (1,0 mg/l) originou as melhores respostas dentro de certos limites de concentração em macro e micro-elementos dos meios utilizados só ou associada é Kinetina (0,2 mg/l).

De maneira geral, para o pessegueiro, a BAP apresenta uma ação favorável mais marcada que a Kinetina, a Adenina ou a Zeatina o que é confirmado pelas observações de SEIRLIS et alii (1979).

Com relação ao carvão ativado, os resultados são seguidamente contraditórios. Segundo REINERT & BAJAJ (1977b) a adição de carvão ativado aumenta a percentagem de anteras que formam plantas de *Nicotiana tabacum* (41% para testemunha e 91% para o meio contendo 2% de carvão ativado). Ao contrário, tal produto manifesta um efeito inibidor (FRIDBORG & ERIKSSON 1975; CONSTANTIN et alii 1977; FRIDBORG et alii 1978). Sua ação é favorável quando o carvão ativado é capaz de adsorver substâncias inibidoras, como no caso do tabaco onde, segundo REINERT & BAJAJ (1977b) é a adsorção de tais substâncias que favorece o desenvolvimento dos microsporos. A ação é desfavorável quando ocorre a adsorção de auxinas e citocininas (WEATHERHEAD et alii 1978) ou de outras substâncias, como a tiamina e o ácido nicotínico (WEATHERHEAD et alii 1979). A presença de auxinas e citocininas é necessária à obtenção de calos a partir de anteras de pessegueiro. A adição de carvão ativado deverá, neste caso, adsorver estes reguladores de crescimento, o que pode, então, explicar as respostas negativas observadas nos experimentos.

d) Influência da luz e temperatura

Entre os fatores que interferem nos resultados obtidos, após o cultivo das anteras, a luz e a temperatura são muito importantes. Para verificar a influência destes fatores, as anteras da cultivar Nectared IV foram cultivadas sobre meio de Miller adicionado de 2,4 D (1,0 mg/ℓ) + AIA (0,1 mg/ℓ) + BAP (1,0 mg/ℓ) + Kin (0,2 mg/ℓ).

Os frascos foram então colocados em diferentes condições. Foram comparadas as temperaturas de 15°C, 25°C ($\pm 1^\circ$) e variável de laboratório. Com relação à luz, foram comparados: sem iluminação, luminosidade de 1.500 lux (fotoperíodo de dezesseis horas de luz e oito de escuro) e condições de iluminação de laboratório variáveis.

Os resultados dos levantamentos feitos aos 35 e 63 dias de cultivo são apresentados na TABELA 6.

TABELA 6 - Efeito da luz e da temperatura, na formação de calos a partir de anteras de pessegueiro

TRATAMENTO	Nº DE ANTERAS CULTIVADAS	Nº DE CALOS FORMADOS		% DE FORMAÇÃO DE CALOS	
		APÓS 35 (dias)	APÓS 63 (dias)	APÓS 35 (dias)	APÓS 63 (dias)
15°C - Escuro	400	0	43	0,0	10,7
1.500 lux	400	0	0	0,0	0,0
25°C - Escuro	400	97	101	24,3	25,2
1.500 lux	400	38	38	9,5	9,5
Variável - escuro	400	31	103	8,0	25,7
* - luz variável	400	2	12	0,5	3,0

*Condições de temperatura e luminosidade de laboratório variáveis.

Na primeira avaliação (35 dias de cultivo), a temperatura de 25°C ($\pm 1^\circ$) ocasionou os melhores resultados em relação às temperaturas variáveis do laboratório e à temperatura de 15°C. As anteras colocadas no escuro apresentaram as respostas mais favoráveis. Com relação ao efeito combinado da temperatura e luz ou temperatura e escuro, as condições de escuro e 25°C ($\pm 1^\circ$) propiciou os melhores resultados.

Na segunda avaliação (63 dias de cultivo) é ainda a temperatura de 25°C e condições de escuro que se observa o maior número de calos; no entanto, em ausência de luz o mesmo resultado foi obtido em condições de temperaturas variáveis de laboratório.

Com relação ao efeito desses dois fatores externos, as referências bibliográficas mostram respostas bastante diversas. Bons resultados foram obtidos com:

- luz contínua entre 100 lux e 2.500 lux;
- escuro durante o período inicial de cultivo;
- fotoperíodo variável (dezesseis horas de luz e oito de escuro ou, doze horas de luz e doze de escuro), com diferentes intensidades de luz.

Respostas diferentes foram obtidas em função da qualidade da luz (luz azul e vermelha, particularmente).

No que se refere ao efeito das temperaturas, aquelas compreendidas entre 25°C e 28°C fornecem os melhores resultados para um grande número de espécies vegetais.

No caso do pessegueiro, observou-se que as anteras colocadas no escuro a 25°C iniciaram a formação de um maior número de calos. A luz intensa ao contrário, acelerou o envelhecimento dos tecidos da antera. Observação semelhante foi descrita por PELLETIER & LLAMI (1972) na cultura de antera de tabaco.

e) Influência da densidade de cultivo

As anteras das gemas no estado B da 'Springtime' foram cultivadas sobre o meio de Miller (mesma composição do ensaio anterior) de duas maneiras: bem próximas, procurando-se encostar uma às outras, e espaçadas de 0,5 cm. Para cada repetição, 30 anteras foram utilizadas (quinze bem próximas e quinze espaçadas). 34 repetições de um frasco foram usadas formando um total de 510 anteras para cada tratamento. Após cultivo, os frascos foram colocados no escuro a 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Os dados levantados 46 dias após cultivo são apresentados na TABELA 7.

TABELA 7 - *Influência de densidade de cultivo das anteras de pessegueiro sobre a formação de calo*

TRATAMENTO	Nº DE ANTERAS CULTIVADAS	Nº DE CALOS FORMADOS	% DE FORMAÇÃO DE CALOS
Anteras bem próximas	510	103	20,2
Anteras espaçadas de 0,5 cm	510	86	16,9
TOTAL	1.020	189	18,5

Os dados da TABELA 7 permitem constatar que um maior número de calos são formados quando as anteras são cultivadas bem próximas uma das outras, embora as diferenças não sejam significativas estatisticamente (teste χ^2).

A tendência observada está de acordo com o conceito de que existe um fator bioquímico que se difunde a partir das anteras e que poderia ser o respon

sável pela proliferação dos microsporos em anteras próximas.

Este conceito foi estabelecido por PELLETIER & LLAMI (1972) que mostraram que o condicionamento das anteras se estabelecida nos primeiros dias de cultura e permanecia constante em seguida. No caso de arroz, FOULETIER (1974) conclui que a percentagem de calo aumentou em função da quantidade de anteras cultivadas numa mesma placa de Petri. Os resultados obtidos com anteras de pessegueiro, não diferentes estatisticamente, podem ser atribuídos à escolha do espaçamento entre as anteras. A distância empregada (0,5 cm), a difusão de substâncias estimulantes, embora pequena, poderia ainda se realizar.

f) Grau de ploidia dos calos formados

Vários métodos são indicados para a contagem de cromossomos e normalmente estas observações são efetuadas sobre folhas jovens, extremidades de ramos em crescimento e/ou extremidades de raiz. Para a contagem de cromossomos das células de calo de pessegueiro, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se a metodologia preconizada por SALESSES (1967, 1970) e LESPINASSE & SALESSES (1973).

As contagens cromossômicas revelaram a presença de células diplóides ($2n = 16$), triplóides ($3n = 24$) e tetraplóides ($4n = 32$). Até o presente não foi possível encontrar placas haplóides ($n = 8$) sobre o material observado.

Segundo MICHELON et alii (1974), a contagem cromossômica revelou a presença de células haplóides, diplóides e triplóides a partir de tecidos obtidos por cultura de antera da cultivar Nectared IV. SEIRLIS et alii (1979) observou em pessegueiro, que o calo se forma igualmente a partir dos tecidos mais profundos da antera mas, sua origem e grau de ploidia não pode ser precisado pelos autores.

O fato de não terem sido encontradas placas haplóides pode ser explicado da maneira seguinte:

- Uma possível competição entre o desenvolvimento dos tecidos diplóides da parede e do tecido haplóide formado a partir dos microsporos, em favor dos primeiros, pode diminuir as chances de detectar as células haplóides.

- As células diplóides têm como origem os microsporos mas um calo diplóide se forma a partir de células onde se produziu a fusão dos dois núcleos idênticos após a primeira mitose polínica.

- As células diplóides podem se formar em função da evolução de grãos de pólen diplóides.

- A endopoliploidização natural das células do calo formado a partir dos microsporos pode ser igualmente responsável pelas variações do grau de ploidia.

- Existem ainda outras possibilidades. Assim, segundo SUNDERLAND & DUNWELL (1974) a formação de células a $2n$, $3n$ e $4n$ seria devido, em *Datura*

innoxia, a fenômenos de endopoliploidia ao nível do núcleo reprodutor seguido de fusão nuclear.

g) Obtenção de raízes

As anteras cultivadas sobre o meio de Miller com diversas associações de reguladores de crescimento, na ausência de luz e a 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) formaram raízes 30 a 50 dias após cultivo. Observaram-se raízes nas seguintes combinações: -2,4 D (1,0 mg/l) + kinetina (0,2 mg/l) - um calo com raiz, -2,4 D (1,0 mg/l) + AIA (0,1 mg/l) + BAP (0,2 mg/l) + kinetina (0,2 mg/l) - três calos com uma raiz em cada -2,4 D (1,0 mg/l) + AIA (0,1 mg/l) + Kin (0,2 mg/l) - dez calos com uma raiz em cada.

Os outros calos formados, após várias repicagens sobre diferentes combinações de reguladores de crescimento, não mostraram nenhuma evolução no sentido da organogênese.

h) Obtenção de estruturas do tipo "embrionária"

Para certas condições houve a formação de estruturas que evoluíram a um estado intermediário entre o estado "coração" e estado "torpedo".

Estas estruturas se formaram realizando as seguintes manipulações:

Durante 30 dias as anteras foram cultivadas sobre o meio de Miller adicionado de inositol (100 mg/l), tiamina - HCl (0,2 mg/l); piridoxina - HCl (1,0 mg/l), ácido nicotínico (1,0 mg/l), 2,4 D (1,0 mg/l), BAP (1,0 mg/l), AIA (0,1 mg/l) e Kinetina (0,2 mg/l).

As anteras em cultivo foram colocadas no escuro e a 25°C ($- 1^\circ\text{C}$).

Após este período, as anteras foram repicadas sobre o mesmo meio com as modificações seguintes: 2,4 D (0,5 mg/l) + kinetina (1,0 mg/l). Desde a repicagem, as anteras foram expostas a uma luminosidade de cerca de 800 lux (foto período de dezesseis horas de luz e oito de escuro) à temperatura de 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Dezesete dias após a repicagem, observou-se a formação de estruturas do tipo "embrionária" que saíam pela fenda de deiscência das anteras.

CONCLUSÕES

Dos trabalhos conduzidos, pode-se concluir que:

1 - O período ótimo de cultivo das anteras engloba a primeira mitose polínica. Este estado pode ser identificado observando-se as características morfológicas das gemas de flor. Os melhores resultados foram obtidos efetuando o cultivo de anteras retiradas de gemas de flor no estado B.

2 - O meio de Miller (1965), acrescido de sacarose (3%) e de inositol (100 mg/l), ácido nicotínico (0,1 mg/l), piridoxina-HCl (1,0 mg/l) e tiamina-HCl (0,2 mg/l) origina respostas semelhantes às aquelas obtidas com as soluções propostas por MURASHIGE & SKOOG (1962) e MARGARA (1978) mantendo-se os outros

componentes constantes.

3 - Entre as auxinas utilizadas, a mais eficiente foi a 2,4 D, indispensável em concentrações de 1,0 mg/l.

4 - A combinação 2,4 D e AIA manifesta um fenômeno de sinergismo nas concentrações utilizadas (1,0 mg/l, respectivamente) pois propicia melhores resultados que no caso de emprego destas auxinas isoladamente.

5 - A BAP produz efeitos mais significativos do que a kinetina.

6 - O carvão ativado (Merck 2186) inibiu a formação de calo.

7 - A luz e a temperatura são fatores importantes. É em condições de escuro e à temperatura de 25°C que as anteras fornecem a maior quantidade de calo.

8 - As anteras cultivadas mais próximas umas das outras propiciam melhores resultados.

9 - Os calos formados, com diferentes graus de ploidia (2n, 3n e 4n) podem ter diversas origens. Certas observações indicam que os microsporos do pessegueiro se dividem no interior das lojas polínicas após o cultivo *in vitro*. Assim, a formação de dois núcleos idênticos é considerada, em geral, como o começo da evolução dos microsporos para a formação de tecidos haplóides. Do mesmo modo, as diferenças de tamanho dos microsporos encontradas nas observações realizadas aos dez dias após cultivo e a estrutura particular de certos microsporos, que não são obrigatoriamente relacionados a uma forte acumulação de amido, vêm reforçar esta afirmação.

10 - As anteras cultivadas em determinadas condições iniciam a formação de raízes.

11 - Foram encontradas estruturas semelhantes a certas etapas de evolução embrionária. Estas formações estão na dependência de condições muito precisas de indução e meio de regeneração. A luz que inibe a formação de raízes parece ter grande importância na formação de tais estruturas.

LITERATURA CITADA

- 01 - ACHARYA, B.C. & RAMJI, M.V. Experimental androgenesis in plants. A review. *Proc. Indian Acad. Sci.* Vol. 86 B, nº 6:337-60, 1977.
- 02 - CHEN, C.H.; CHEN, F.T.; CHIEN, C.F.; WANG, C.H.; CHANG, S.J.; HSU, H.E.; CU, H.H.; HO, Y.T. e LU, T.M. Obtaining pollen plants of *Hevea brasiliensis* Muell-Arg. *Proc. Symp. of Plant Tissue Cult. Peking*, 11-22, 1978.

- 03 - CONSTANTIN, M.J.; HENKE, R.R.; MANSUR, M.A. Effect of activated charcoal on callus growth and shoot organogenesis in tobacco. *In Vitro*, 13-293-6, 1977.
- 04 - FLECKINGER, M. Méthode de notation du développement des organes de fructification des arbres fruitiers. Rapport du Congrès Pomologique de France. Angers, 86-93, 1948.
- 05 - FOULETIER, B. Conditions favorisant la néoformation de cals haploïdes à partir d'anthers de riz cultivées in vitro. C.R.Acad. Paris D:2917-20, 1974.
- 06 - FRIDBORG, G. & ERIKSSON, T. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. *Physiol. Plantarum*, 34:306-8, 1975.
- 07 - _____; PEDERSEN, M.; LANDSTROM, L.E.; ERICKSSON, T. . The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiol. Plantarum*, 43-104-6, 1978.
- 08 - GUHA, A. & MAHESHWARI, S.C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204-497, 1964.
- 09 - KUBICKI, B.; TELEZYNSKA, J. & MILEWSKA-PAWLICZUK, E. Induction of embryoid development from apple pollen grains. *Acta Soc.Bot.Pol.*, 44:631-35, 1975.
- 10 - LESPINASSE, Y. & SALESSES, G. Application de techniques nouvelles à l'observation des chromosomes chez les genres *Malus* et *Pyrus*. *Ann. Amélior.Plantes*, 23(4):381-6, 1973.
- 11 - MARGARA, J. Mise au point d'une gamme de milieux minéraux pour les conditions de la culture in vitro. C.R.Acad.Agric.Franç., 654-60, 1978.
- 12 - MICHELON, R.; HUGARD, J.; JONARD, R. Sur l'isolement de colonies tissulaires de Pêcher (*Prunus persica* Batsch cultivars Dixiered et Nectared IV) et d'Amandier (*Prunus amigdalus*, stokes cultivar Ai) à partir d'anthers cultivées in vitro. C.R.Acad.Sci.Paris, t.278:1719-22, 1974.
- 13 - MILEWSKA-PAWLICZUK, E. & KUBICKI, B. Induction of androgenesis in vitro in *Malus domestica*. *Acta Horticulturae*, 78:271-6.

- 14 - MILLER, C.O. Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives compounds from maize which promote cell division. Proc. N.A.S. (54) :1052-58, 1965.
- 15 - MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum*, 15:473-97, 1962.
- 16 - NITSCH, J.P. Experimental androgenesis in Nicotiana. *Phytomorphol* 19:389-404, 1969.
- 17 - _____ & NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163 :85-7, 1969.
- 18 - PELLETIER, G. & LLAMI, M. Les facteurs de l'androgènèse in vitro chez Nicotiana tabacum. *Z. Pflanzenphysiol*, 68:97-114, 1972.
- 19 - REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ culture. Springer-Verlag, Berlin, 1977a.
- 20 - _____ & BAJAJ, Y.P. Anther culture: haploid production and its significance. In: APPLIED AND FUNDAMENTAL ASPECTS OF PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE. Springer-Verlog, Berlin, 251-67, 1977b.
- 21 - SALESES, G. Mise au point d'une méthode de comptage des chromosomes chez les arbres fruitiers à noyan. *Ann. Amélior. Plantes*, 17(2) : 207-10, 1967.
- 22 - _____. Etudes cytologiques chez les Prunus. I. Espèces de la section Euprunus. *Ann. Amélior Plantes*, 20(4):469-83, 1970.
- 23 - SEIRLIS, G.; MOURAS, A. & SALESES, G. Tentatives de culture in vitro d'anthères et de fragments d'organes chez les Prunus. *Ann. Amélior. Plants*, 29(2):145-61, 1979.

- 24 - SHARP, W.R.; CALDAS, L.S. & CROCOMO, O.J. Studies on the induction of *Coffea arabica* callus from both somatic and microsporogenous tissues, and subsequent embryoid and plantlet formation. *Am.J.Botany*, 60(4):13, 1973.
- 25 - SUNDERLAND, N. Anther and pollen culture 1974-1979. Fourth John Innes Symp. and Second International Haploid Conference, 171-83, 1980.
- 26 - SUNDERLAND, N. & DUNWELL, J.M. Pathways in pollen embryogenesis. In: STREET, H.E. (Ed.): Tissue Culture and Plant Science. International Congress of Plant Tissue and cell culture. Leincester, 1974.
- 27 - WEATHERHEAD, M.A.; BURDON, J. & HENSHAW, G.G. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Z.Pflanzenphysiol*, 89:141-7, 1978.
- 28 - _____; BURDON, J. & HENSHAW, G.G. Effects of activated charcoal as an additive plant tissue culture media. *Pout Z.Z. Pflanzenphysiol*, 94 399-405, 1979.