

# INDUÇÃO DE CALOS E REGENERAÇÃO DE PLÂNTULAS DE ANTERAS DE HÍBRIDOS DE ARROZ

ADELSON DE BARROS FREIRE<sup>1</sup>  
ANTÔNIO TADEU DA SILVA<sup>2</sup>  
ROSEMBERG MOURA DE OLIVEIRA<sup>3</sup>

**RESUMO** - As anteras de diferentes linhas F<sub>1</sub> de arroz, *Oryza sativa* L., provenientes de cruzamentos simples e triplos, foram coletadas no estágio uninucleado do micrósporo, tratadas a frio e cultivadas no meio de cultura N<sub>6</sub> suplementado. Os calos provenientes das anteras foram repicados e transplantados em meio básico MS modificado para a regeneração de plântulas. Observou-se correlação positiva entre a indução de calos e a regeneração de plântulas para os híbridos simples, e não significativa, para os híbridos triplos. Os híbridos CNAx

3234, CNAx 3304, CNAx 3305, CNAx 3610, CNAx 4048 e CNAx 4049 tiveram mais de 50% das anteras com habilidade para indução de calos, com a média geral de 26% e para regeneração de plântulas a média geral foi de 11,6%. Entre os híbridos estudados, existe variabilidade genética para, nas condições testadas, desenvolver calos e regenerar plântulas. A produção de albinos mostrou-se variável com o genótipo e manteve-se dentro dos níveis encontrados em outros trabalhos sobre o mesmo assunto.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** Cultura de anteras "in vitro", *Oryza sativa*, variabilidade genética.

## CALLI INDUCTION AND PLANTLET REGENERATION FROM ANTERS OF HYBRIDS IN RICE PLANTS

**ABSTRACT** - F<sub>1</sub> lines of rice *Oryza sativa* L. originated from single and triple crosses were harvested at the microspore uninucleated stage and submitted at cold treatment and cultivated in N<sub>6</sub> supplemented medium. The "calli" originated from the anthers were transplanted to MS modified medium for plant regeneration. Data indicated a positive significant correlation between induction and regeneration for single hybrids and non significant correlation for triple hybrids. The hybrids CNAx 3234, CNAx 3304, CNAx

3305, CNAx 3610, CNAx 4048 and CNAx 4049, presented frequencies more than 50% anthers with ability of "calli" induction, with 26% general means and 11.6% of the general means for regeneration. According to the tested conditions, there are genetic variability amongst the studied hybrids to develop "calli" and to regenerate plants. The frequency of albinos was variable according to genotypes, but remained at the same level as the other research results in this subject.

**INDEX TERMS:** Genetic variability, "in vitro" anther culture, *Oryza sativa*.

### INTRODUÇÃO

Um grande número de estudos sobre cultura de anteras em cereais vem sendo desenvolvido, trazendo resultados aplicáveis ao melhoramento de plantas; porém, a frequência de indução de calos e de regeneração de plântulas, no arroz, ainda apresenta baixa eficiência.

Nakano e Maeda (1979) estudaram tecidos de vários órgãos da planta de arroz e observaram a formação das

estruturas radiculares e foliares, ou seja, organogênese direta em calos, concluindo que a baixa eficiência na organogênese do arroz pode ser por falta de aptidão genética das plantas doadoras do explante ou a necessidade de mais pesquisas nos métodos para a cultura de anteras na criação de uma nova linhagem (Niizeki e Oono, 1968; Nishi, Yamada e Takahashi, 1968; Reiffers e Freire, 1990).

1. Pesquisador responsável pelo Laboratório de Cultura de Tecidos. EMBRAPA/CNPAF - Caixa Postal 179 - 74.001-970 - Goiânia - GO
2. Estagiário do Programa de Biotecnologia CNPAF/EMBRAPA-CNPq
3. Estudante de pós-graduação - Universidade Federal de Goiás - Caixa Postal 131 - Campus II - 74.001-970, ICB-I - Goiânia - GO - Bolsista da CAPES.

Tamura (1968) encontrou diferenças entre as variedades de arroz testadas, quanto à formação de calos e brotações, em função do efeito da relação AIA/Cinetina adicionado no meio de cultura. Porém, se a relação apropriada de regulador de crescimento é definida para determinada variedade, é possível sua avaliação genotípica para formação de calos e regeneração de plântulas (Yan e Zhao, 1982).

Skirvin (1978) chama a atenção para a necessidade de avaliar novos materiais provenientes da cultura de tecidos via calos de antera, bem como compará-los com os já existentes, para quantificar essas variabilidades genéticas. Yin et al. (1976) e Chu (1982) mencionam a possibilidade de surgir uma variedade ou linhagem do tipo "revolucionária", através de cultivos das anteras. É necessário, por isso, constante avaliação dos genótipos para definir as suas características.

Existem evidências de que se pode melhorar a metodologia da cultura "in vitro" dos cereais para se adequar os fatores do meio de cultura com a habilidade organogenética das variedades ou linhagens (Ko, Wong e Woo, 1983).

Há interesse em avaliar os híbridos produzidos no Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), da Embrapa, quanto ao seu comportamento quando em cultura de tecidos, pois existem vários materiais promissores agronomicamente, para o programa de melhoramento de sequeiro que não se comportam bem nas condições "in vitro". O método de fixação rápida dos genótipos consiste na produção de novas cultivares pelo uso de haplóides, com a redução do tempo e custo requeridos para obter a homozigose, com aumento da eficiência na seleção, tanto dos caracteres qualitativos como quantitativos, pela ausência da dominância da progênie (Zapata et al., 1982; Lentini, Martinez e Sanint, 1996).

O objetivo deste trabalho foi avaliar, pela androgênese, os híbridos provenientes de cruzamentos convencionais de arroz do CNPAP, usando meio de cultura específico para indução de calos e regeneração de plântulas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultivo da planta-doadora

As sementes originadas de cruzamentos convencionais, que estão detalhados no Quadro 1, foram germinadas em placa de Petri e transplantadas em vasos de 6 litros de solo. Foram realizadas três adubações de cobertura, oito a dez dias do transplante e as demais espaçadas de quinze dias. Os genitores usados para obtenção dos híbridos testados foram os seguintes: Guarani,

Cuiabana, Araguaia, Três Marias, Carreon, IAC-164 e algumas linhagens promissoras agronomicamente, para o melhoramento do arroz (Quadro 1).

### Coleta e pré-tratamento das panículas

A coleta de panículas florais juntamente com a bainha abarcante, na fase do emborrachamento, foi realizada quando a distância da junção da folha bandeira com sua bainha até a junção da penúltima folha estava entre 3-6 cm, época em que os grãos de pólen estão no estágio uninucleado do micrósporo, considerado ideal para a indução de calos, segundo Beauville (1976) e Chen e Lin (1987).

As panículas foram coletadas pela manhã, colocadas em saco de polietileno umedecido e levadas ao laboratório, onde foram colocadas em geladeira, a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  durante seis a oito dias (Zapata, Heu e Krush, 1982).

### Cultivo das anteras

As panículas foram desinfestadas com uma solução comercial de hipoclorito de sódio 5-6% (NaOCl) a 10% durante 15 minutos, enxaguadas e lavadas por três vezes em água destilada esterilizada. As espiguetas foram dissecadas sob fluxo laminar, em condições assépticas, e as anteras incubadas em placas de Petri, contendo 25 ml do meio de cultura  $\text{N}_6$  (Chu et al., 1975), suplementado com  $5,37\mu\text{M}$  de ácido naftaleno acético (ANA),  $175,28\text{mM}$  de sacarose, 7 g/l de ágar e pH ajustado para  $6,5 \pm 0,1$ . As placas foram levadas para câmara de crescimento a  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , no escuro, durante três a cinco semanas, quando os calos foram avaliados.

### Repicagem dos calos

Todos os calos desenvolvidos foram repicados em placas de Petri contendo 15ml do meio de cultura MS, suplementado com  $2,69\mu\text{M}$  de ANA,  $13,94\mu\text{M}$  de cinetina,  $116,85\text{mM}$  de sacarose, 7 g/l de ágar e pH ajustado para  $6,5 \pm 0,1$ . As placas foram levadas para câmara de crescimento com a temperatura diurna de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$  e temperatura noturna em torno de  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 16 horas de luz e intensidade de  $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , durante duas semanas, para avaliação da regeneração das plântulas que foram classificadas como verdes ou albinas.

### Avaliação e cálculo dos dados

Do total de anteras incubadas (TAI) para cada genótipo, só foram consideradas as anteras incubadas sa-

**QUADRO 1** - Híbridos provenientes do programa convencional de melhoramento do arroz, utilizados para a cultura de anteras "in vitro".

HÍBRIDOS	CRUZAMENTOS
<b>Híbridos simples</b>	
CNAx 3234	TOM 1-3/IAC-164
CNAx 3284	CNA 5180/CARREON
CNAx 3304	A8-204-1/BASMAT 370
CNAx 3305	A8-204-1/TRÊS MARIAS
CNAx 3610	IRAT 128/GUARANI
CNAx 3619	CNAx 2895/CNA 4194
CNAx 3634	CNAx 3317/LS 8553
CNAx 4048	CNA 3891/ARAGUAIA
CNAx 4049	CNA 3891/A8-204-1
CNAx 4056	MRC 5720-3427/CUIABANA
<b>Híbridos triplos</b>	
CNAx 4370	WC 255/ACC 94//WC 242
CNAx 4042	MG 1/GUARANI//A8-204-1
CNAx 4372	WC 255/ACC 94//WC 243
CNAx 4374	WC 255/ACC 94//WC 245
CNAx 4382	WC 250/WC 145//WC 244
CNAx 4386	WC 254/ACC 94//WC 242
CNAx 4387	WC 254/ACC 94//WC 243
CNAx 4388	WC 254/ACC 94//WC 244
CNAx 4389	WC 254/ACC 94//WC 245
CNAx 4401	WC 254/WC 210//WC 245
CNAx 4404	WC 5101/WC 145//WC 160
CNAx 4410	WC 5101/WC 145//WC 264

(IC) foi obtido pela fórmula ( $\% \text{ IND} = \text{CI} \times 6 / \text{AI} \times 100$ ), em que 6 (seis) corresponde às seis anteras contidas numa espiguetta, e CI o número de calos induzidos. O percentual de regeneração de plântulas (RP) é expresso pelo número de plântulas regeneradas (NPR)

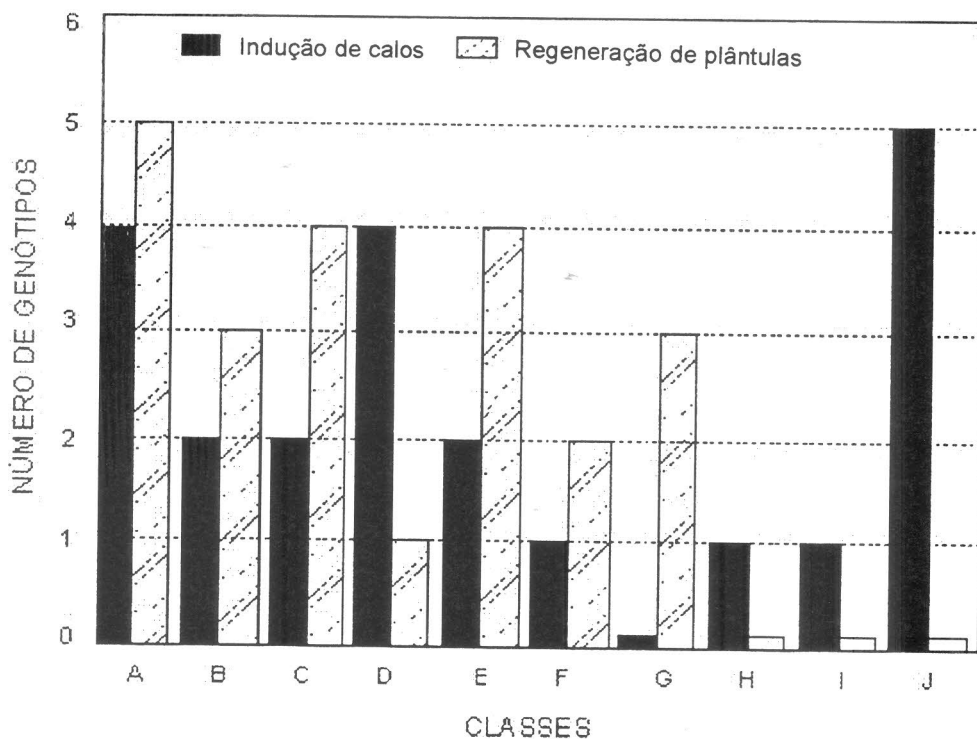
dividido pelo número de calos induzidos (CI) multiplicado por 100 ( $\% \text{ RP} = \text{NPR} / \text{CI} \times 100$ ). Para determinação da porcentagem de plantas albinas usou-se o seguinte cálculo:  $\text{N}^\circ \text{ de albinos} / \text{N}^\circ \text{ de plântulas verdes} \times 100$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Frequência da indução de calos

No Quadro 2, observa-se uma acentuada diferença entre os híbridos, tanto para indução como para diferenciação de calos e formação de plântulas normais e albinas, confirmando os resultados de Yin et al. (1976) quanto à baixa eficiência na indução de calos e regeneração de plântulas de arroz. Os resultados apresentados mostram a heterogeneidade de respostas dos híbridos, em que, nas condições testadas, alguns não chegaram nem mesmo a produzir calos ('CNAx 3619' e 'CNAx 4387'), sendo, portanto, genótipos menos aptos para a cultura de tecidos. Outros híbridos, como CNAx 3234, CNAx 3304, CNAx 3305, CNAx 3610, CNAx 4048 e CNAx 4049, apresentaram uma excelente capacidade de formação de calos (>50%), respondendo às condições de microcultivo utilizadas para o processo de metabolismo durante a diferenciação das células do pólen, situando-se muito acima da média geral encontrada nos trabalhos semelhantes com arroz (Yan e Zhao, 1982; Reddy,

Leevalathis e Sen, 1985; Reiffers e Freire, 1990). Diferenças no potencial androgenético foram reportadas por diversos autores, em várias espécies microcultivadas, dentre estas: milho (Beckert, Pollacsek e Caenen, 1983), arroz (Yin et al., 1976) e aveia (Grando et al., 1993). A frequência média de 26%, apresentada neste trabalho, é semelhante às reportadas por alguns autores, que obtiveram valores entre 0,6-51% (Niizeki e Oono, 1968; Torrizo e Zapata, 1986), intervalo aceitável, pois cada genótipo pode exigir condições especiais para a manifestação de seu potencial e expressar suas características, quando cultivado "in vitro". Segundo Ko, Wong e Woo (1983), a adição de ANA, cinetina e o aumento da concentração de açúcares foram necessários para a regeneração e desenvolvimento das plântulas de algumas cultivares de arroz. Wu e Li (1971) conseguiram sucesso na indução de calos provenientes de tecidos de vários órgãos em muitos híbridos de arroz, usando meio de cultura básico, suplementado com diversos níveis de cinetina, AIA e 2,4-D, mostrando que estes também são fundamentais no processo da indução da androgênese.



#### Legenda das classes

A = 0 - 2%    B = 2 - 5%    C = 5 - 10%    D = 10 - 15%    E = 15 - 20%    F = 20 - 25%  
 G = 25 - 35%    H = 35 - 45%    I = 45 - 55%    J > 55%

**FIGURA 1** -Histograma das frequências de indução de calos e regeneração de plântulas nos diferentes híbridos.

**QUADRO 2** - Calos, plântulas verdes, albinas e regeneradas de anteras “in vitro” de híbridos simples (HS) e triplos (HT) de arroz.

Híbridos	Anteras incubadas N <sup>o</sup>	ACONT	%			
			Calos	Plântulas verdes	Plântulas albinas	Plântulas regeneradas
CNAx 3234	1522	204	60,9 A	13,0C	3,0	16,0
CNAx 3284	3264	1408	11,0 D	1,0 D	1,1	2,1
CNAx 3304	2856	-	53,0 A	1,0 D	2,0	3,0
CNAx 3305	5660	2400	67,0 A	3,4 D	2,0	5,4
CNAx 3610	7336	405	71,0 A	4,0 D	2,8	6,8
CNAx 3619	1200	-	0,0	0,0	0,0	0,0
CNAx 3634	1200	-	18,0 C	0,8 D	1,5	2,3
CNAx 4048	2240	1020	73,0 A	13,0 C	3,0	16,0
CNAx 4049	2044	608	92,0 A	17,0 B	3,2	20,2
CNAx 4056	2860	200	13,0 D	10,0 C	3,0	13,0
Média (HS)	3018	20,7	45,8	6,3	2,2	-
CNAx 4042	5796	1500	23,0 C	4,0 D	6,0	10,0
CNAx 4370	10790	3060	7,3 D	10,3 C	5,2	15,5
CNAx 4372	2000	600	35,1 B	19,5 B	9,8	29,3
CNAx 4374	10428	2903	3,0 E	16,3 B	10,8	27,1
CNAx 4382	10416	612	0,5 E	0,1 D	0,0	0,1
CNAx 4386	5820	216	4,3 E	0,0	0,0	0,0
CNAx 4387	2420	1224	0,0	0,0	0,0	0,0
CNAx 4388	11546	1370	13,0 D	20,1 B	4,0	24,1
CNAx 4389	9156	1932	17,0 C	4,0 D	3,1	7,1
CNAx 4401	8750	2036	11,6 D	10,7 C	5,2	15,9
CNAx 4404	1800	504	0,0	0,0	0,0	0,0
CNAx 4410	10416	612	9,0 D	30,0 A	3,0	33,0
Média (HT)	4068	18,5	10,3	9,3	3,9	-
TOTAL	119680	22882	-	-	-	-
MÉDIA(G)	5440	19,7	26,0	8,4	3,0	-

\*DMS - Proveniente da análise multivariada de DUNCAN, com 5% de probabilidade.

As mesmas letras na vertical não diferem entre si (Steel e Torrie, 1960).

A frequência de calos (Figura 1) foi bastante variável e relacionada ao genótipo da planta, resultado também encontrado por Grando et al. (1993) e Mandal, Prashant Mohanraj e Bandyopadhyay (1994). Nota-se que a frequência da indução nos híbridos apresentou valores de classe específica, com a maioria dos híbridos, no intervalo com menos de 15% de indução de calos.

### Comparação das frequências da indução e regeneração

#### a) Frequência da indução de calos

Alguns dos híbridos avaliados (Quadro 2) produziram calos e não regeneraram plântulas nas condições impostas pelo meio de cultura e ambiente. Pelo Quadro 3, a análise da correlação, o percentual de calos induzidos e a regeneração de plântulas, apenas nos híbridos simples (HS), apresentaram correlação significativa, mas nos triplos (HT) e nos (HS + HT), ausência de correlação dos fatores, não podendo afirmar que genótipos aptos para indução de calos apresentem também capacidade de regeneração de plântulas. Segundo Chen e Lin (1976) e Chaleff (1978), a frequência da indução e da regeneração depende da composição do meio de cultura e das condições de teste.

A Figura 2 mostra o comportamento das funções das três correlações analisadas, sendo significativo o comportamento dos híbridos quando interpretados separadamente; comparando-se, no geral, a função é não-significativa (Quadro 3).

Observando o Quadro 2, nota-se que o percentual da indução foi maior que o da regeneração no mesmo material genético. Isto é uma característica inerente ao genótipo e à sua origem parental específica, uma vez

que o grupo da subespécie Japônica é superior ao grupo da subespécie Índica, para os trabalhos "in vitro" (Chen e Lin, 1976; Tsai e Lin, 1977 e Chaleff, 1978). Os híbridos simples apresentaram correlação direta entre a formação de calos e a regeneração de plântulas. Entretanto, isto não foi observado nos híbridos triplos.

Segundo Konar, Thomas e Street (1972) e Street e Withers (1974), quando ocorre correlação positiva entre indução e regeneração de plântulas, há evidências de que a indução, regeneração, diferenciação e embriogênese somática podem ocorrer diretamente nas células livres, quando em cultura de tecidos, e, mais indiretamente, quando em complexos poliembrióides e tecidos desorganizados (calos).

#### b) Frequência da Regeneração de Plântulas

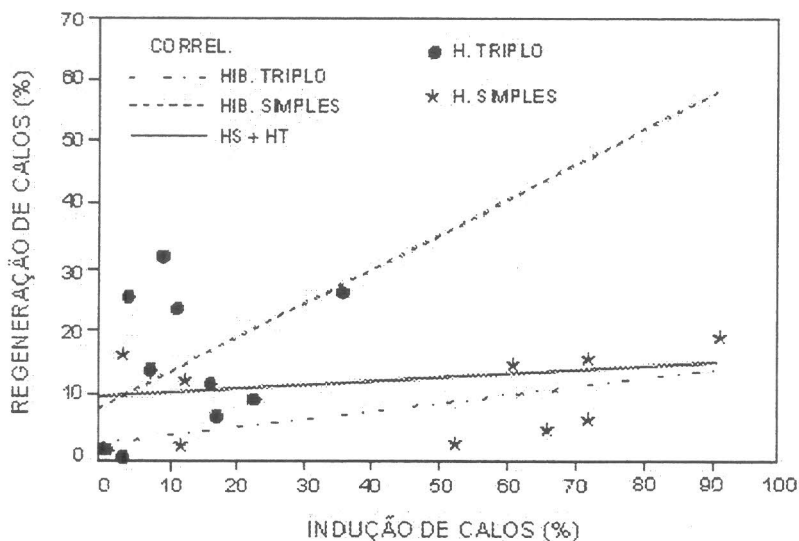
Não houve indução de calos em todos os híbridos simples nem nos triplos; conseqüentemente, nenhuma regeneração, sendo estes considerados recalci-trantes, nas condições do presente estudo (Quadro 2). Em ambos os casos, novos meios de cultura devem ser estudados.

Fazendo uma comparação dos híbridos simples x triplos (Quadro 2), notou-se que os simples apresentaram melhor comportamento "in vitro" somente para a indução de calos, e que na regeneração de plântulas os híbridos triplos responderam melhor, demonstrando que as condições foram favoráveis à regeneração de plântulas. Segundo Quimio e Zapata (1990), a capacidade de regeneração é predominantemente um efeito aditivo dos genes nas cultivares de origem da subespécie Japônica.

**QUADRO 3** - Correlação geral e entre híbridos em relação à indução de calos (x) e regeneração de plântulas (y).

		x	y	Equação estimada
Híbrido simples	x	1,000	0,6448	$y = 7.681 + 0,5632 x$
(HS)			0,0441*	$r^2 = 0,4750^*$
Híbrido triplo	x	1,000	0,4915	$y = 1,904 + 0,1433 x$
(HT)			0,1046 ns	$r^2 = 0,6450^{**}$
Geral	x	1,000	0,1715	$y = 9,595 + 0,0611 x$
(HS + HT)			0,4454 ns	$r^2 = 0,1680 ns$

\* Significativo a 5% de probabilidade, \*\* significativo a 1%.



#### Equações estimadas

$$(R1) = 7,681 + 0,5632 x \quad r^2 = 0,4750$$

$$(R2) = 1,904 + 0,1433 x \quad r^2 = 0,6450$$

$$(R3) = 9,595 + 0,0611 x \quad r^2 = 0,1680 \text{ ns.}$$

**FIGURA 2** -Pontos da dispersão entre as variáveis: indução de calos x regeneração de plântulas, e as retas representativas de cada grupo de dados separados e em conjuntos.

Quanto à produção de plântulas albinas, os índices não foram diferentes dos encontrados em outras pesquisas correlatas. Observa-se, pelo Quadro 2, que os híbridos triplos foram inferiores aos duplos na indução de calos, mas foram superiores na regeneração de plântulas e produção de albinos. Segundo Beauville (1976), a produção de albinos parece ser de origem genética quando são cultivados ovários ou óvulos "in vitro".

Chen (1978), Karim et al. (1985) e Courtois (1987) citam que a produção de plântulas albinas é devido à desorganização na função dos cloroplastos e outras organelas, levando à ausência de clorofila.

Torrizo e Zapata (1986) e Mantell, Matthews e McKee (1994) concluíram que a produção de plântulas albinas tanto pode ser de origem genética quanto fisiológica, quando não são adequadas as condições para a síntese de clorofila nos tecidos formados na cultura "in vitro".

#### CONCLUSÕES

a) Constatou-se alta variabilidade genotípica, tanto para a indução de calos quanto para a regeneração de plântulas.

b) A frequência de genótipos, tanto para a indução quanto na regeneração de plântulas, foi maior na classe A

(genótipos em que até 2% das anteras incubadas sofreram diferenciação).

c) Os híbridos simples e triplos apresentaram comportamentos diferentes quanto à indução e regeneração de plântulas.

d) A correlação entre a indução de calos e a regeneração de plântulas foi significativa para híbridos simples e triplos.

e) A frequência média de albinos, tanto para os híbridos simples como para os triplos, ficou em torno de 3%, percentual que está dentro dos níveis comumente encontrados para o arroz.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a dedicação e os serviços prestados por José Lino dos Reis, Reginaldo A. Bastos, Marlene Silva Freire e Marluce Pereira Costa.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEAUVILLE, M.A. de. Androgênese "in vitro" Chez *Oryza sativa* (Variété cigalon). *L'Agronomie Tropicale*, Paris, v.31, n.1, p.50-57, Jan./Mar. 1976.

- BECKERT, M.; POLLACSEK, M.; CAENEN, M. Etude de la variabilité génétique obtenue chez le maïs après callogenèse et régénération de plantes "in vitro". **Agronomie**, Paris, v.3, n.1, p.9-18, July/Aug. 1983.
- CHALEFF, R.S. Anther culture in rice breeding technique. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, v.3, n.6, p.2-3, Dec. 1978.
- CHEN, C. C. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. **Crop Science**, Madison, v.18, n.5, p.905-906, Sept./Oct. 1978.
- CHEN, C.C., LIN, M.H. Induction of rice plantlets from anther culture. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v.17, n.1, p.18-24, Jan. 1976.
- CHEN, C.C.; LIN, M.H. "In vitro" development of plants from microspores of rice. **"In Vitro"**, Ardmore, v.13, n.8, p.484-488, Aug. 1987.
- CHU, C.C. Anther culture of rice and its significance in distant hybridization. In: POLLARD, L.R. (ed.). **Rice tissue culture planning conference**. Los Baños: IRRI, 1982. p.47-53.
- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; CHEN, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y.; BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Science Sinica**, Peking, v.18, n.5, p.659-668, Sept./Oct. 1975.
- COURTOIS, B. **Androgenèse du riz Bilan de la campagne test 1986**. Guadeloupe: Rapport de Mission IRAT, 1987. 12p. (Autres).
- GRANDO, M.F.; EICHLER, L.; TANABE, C.R.; SANTOS, J.F. dos; SANTOS, C.M. dos. Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.5, n.2, p.139-144, Dec. 1993.
- KARIM, N.H.; SHAJAHAN, A.K.M.; MIAH, M.A.A.; MIAH, S. A. Response of rice anthers to callus induction and plant regeneration. **International Rice Research Newsletter**, Los Baños, v.10, n.3, p.2122, June 1985.
- KO, S.W.; WONG, C.K.; WOO, S.C. A simplified method of embryo culture in rice of *Oryza sativa* L. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v.24, n.1, p.97-101, Jan. 1983.
- KONAR, R.N.; THOMAS, E.; STREET, H.E. Origin and structure of embryoids arising from epidermal cells of the stem of *Ranunculus scleratus* L. **Journal Cell Science**, Cambridge, v.11, n.2, p.77-93, Sept. 1972.
- LENTINI, Z.; MARTINEZ, C.P.; SANINT, L.R. Se cultivan anteras para mejorar el arroz. **Arroz em las Americas**, Cali, v.17, n.1, p.2, jul. 1996.
- MANDAL, A.B.; PRASHANTH MOHANRAJ; BANDYOPADHYAY, A.K. Fertile revertants from a male sterile stock in somaclones through inflorescence culture in rice. **Rice Biotechnology Quarterly**, Rock Hill, v.20, p.6-7, Oct. 1994.
- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 333p.
- NAKANO, H.; MAEDA, E. Shoot differentiation in callus of *Oryza sativa* L. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie Bd**, Stuttgart, v.93, n.5, p.449-458, Oct. 1979.
- NIIZEKI, H.; OONO, K. Induction of haploid rice plant from anther culture. **Proceedings of the Japan Academic**, Tokyo, v.44, n.6, p.554-557, June 1968.
- NISHI, T.; YAMADA, Y.; TAKAHASHI, E. Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. **Nature**, London, v.219, n.5153, p.508-509, Aug. 1968.
- QUIMIO, C.A.; ZAPATA, F.J. Cell biology & molecular genetics. **Crop Science**, Madison, v.30, n.1, p.188-192, Jan./Feb. 1990.
- REDDY, V.S.; LEEVALATHIS, S.; SEN, S.K. Influence of genotype and culture medium on microspore callus induction and green plantlet regeneration in anther of *Oryza sativa*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.63, n.3, p.309-314, Mar. 1985.



- REIFFERS, I.; FREIRE, A.B. Production of doubled haploid rice plants *Oryza sativa* L. by anthers culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.21, n.2, p.165-170, May 1990.
- SKIRVIN, R.M. Natural and induced variation in tissue culture. **Euphytica**, Wageningen, v.27, n.1, p.241-266, Feb. 1978.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. Analysis of variance I: the one-way classification. In: \_\_\_\_\_. **Principles and procedures of statistics**. New York: Mc Graw-Hill, 1960. p.99-131.
- STREET, H.E.; WITHERS, L.A. The anatomy of embryogenesis in culture. In: STREET, H.E. (ed.). **Tissue culture and plant science**. New York: Academic, 1974. p.71-100.
- TAMURA, S. Shoot formation in calli originated from rice embryo. **Proceedings of the Japan Academy**, Tokyo, v.44, n.6, p.544-548, June 1968.
- TORRIZO, L.B.; ZAPATA, F.J. Anther culture in rice: the effect of abscisic acid on plant regeneration. **Plant Cell Reports**, New York, v.5, n.2, p.136-139, Apr. 1986.
- TSAI, S.C.; LIN, M.H. Production of rice plantlets by anther culture. **Journal of Agricultural Research of China**, Taiwan, v.26, n.2, p.100-112, June 1977.
- WU, L.; LI, H.W. Induction of callus tissues initiation from different somatic organs of rice plant by various concentration of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid. **Cytologia**, Tokyo, v.36, n.3, p.411-416, Sept. 1971.
- YAN, C.J.; ZHAO, Q.H. Callus induction and plantlet regeneration from leaf blade of *Oryza sativa* L. subsp. (Indica). **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.25, n.2, p.187-192, May 1982.
- YIN, K.C.; HSU, C.; CHU, C.Y.; PI, F.Y.; WANG, S.T.; LIU, T.Y.; CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S. A study of the new cultivar of rice raised by haploid breeding method. **Science Sinica**, Peking, v.19, n.2, p.227-242, Mar./Apr. 1976.
- ZAPATA, F.J.; HEU, M.H.; KHUSH, G.S. Anther culture research for rice breeding at IRRI. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH CONFERENCE, 1982, Los Baños. **Proceedings...** Los Baños: IRRI, 1982. p.19-23.
- ZAPATA, F.J.; TORRIZO, L.B.; ROMERO, R.O.; ALEJAR, M.S. Androgenesis in *Oryza sativa*. In: INTERNATIONAL CONGRESS PLANT TISSUE & CELL CULTURE, 1982, Los Baños. **Proceedings...** Los Baños: IRRI, 1982. v.1. p.531-553.