

SIRLEI APARECIDA JULIÃO

MULTIPLOIDIA EM CALOS PROVENIENTES DE ANTERAS DE TOMATE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

J94m
2012

Julião, Sirlei Aparecida, 1988-
Multiploidia em calos provenientes de anteras de tomate /
Sirlei Aparecida Julião. – Viçosa, MG, 2012.
xi, 48f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Carlos Roberto de Carvalho
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 37-48

1. Tomate. 2. *Solanum lycopersicum*. 3. Tecidos vegetais -
Cultura e meios de cultura. 4. Citometria de fluxo.
5. Citogenética. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 635.642

SIRLEI APARECIDA JULIÃO


MULTIPLOIDIA EM CALOS PROVENIENTES DE ANTERAS DE TOMATE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 16 julho de 2012



Sérgio Yoshimitsu Motoike



Wellington Ronildo Clarindo



Carlos Roberto de Carvalho
(Orientador)

Aos meus pais, Caetano Julião e Maria de Lourdes.

Aos meus irmãos Juarez, Vânia, Maria das Graças, Joel e Janaina.

Ao Guilherme.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao professor Carlos Roberto de Carvalho, pela dedicada orientação, por entender minhas dificuldades nesta jornada, pela compreensão durante minhas crises de toxoplasmose, por me ajudar a superar minhas limitações, pela paciência, confiança e amizade, pelos ensinamentos e pelo incentivo,

Aos professores do Programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento pela contribuição para minha formação.

Aos professores Sérgio Yoshimitsu Motoike e Wellington Ronildo Clarindo, pela colaboração e participação na banca de defesa.

Ao mestrando, Víctor Almeida, do Departamento de Fitotecnia pela ajuda com a coleta dos botões florais.

Ao doutorando, Marcos Vinícius M. Pinheiro, do Departamento de Biologia Vegetal pela ajuda com as análises estatísticas.

À funcionária do Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, Ana Paula, pelo auxílio profissional e pela amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal Andréa, Christiane, Evandro, Fernanda, Guilherme, Isabella, Maíra, Maria Andréia, Paulo e Thaís, que me ajudaram na adaptação à nova cidade, pelos bons conselhos, pela ajuda com os trabalhos técnicos e com as disciplinas, pela amizade, pelos momentos de descontração, pelo apoio.

Em especial, meus agradecimentos à Andréa e Thaís que estiveram diretamente relacionadas à execução deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos, razão desta conquista, agradeço pelo amor, carinho, compreensão, respeito, apoio, pela torcida e pelas orações. Especialmente à minha irmã Maria das Graças pelo suporte e encorajamento na busca pelos meus ideais.

Ao Guilherme, pelo amor e incentivo, pela dedicação, compreensão e paciência nos momentos mais difíceis, pelo apoio, pelos conselhos, por

ajudar-me a alcançar meus objetivos, e á sua família pelo carinho e incentivo.

Aos meus amigos de Cipotânea pela torcida constante e a todos aqueles que de alguma forma contribuíra para a realização deste trabalho.

À Deus pelo dom da vida, por ter me permitido executar este trabalho e por ter me dado forças para vencer os obstáculos.

BIOGRAFIA

SIRLEI APARECIDA JULIÃO, filha de Caetano Julião e Maria de Lourdes Julião, nasceu em Cipotânea, Minas Gerais em 16 de Janeiro de 1988.

Em 2006, iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC), em Juiz de Fora (MG), graduando-se em licenciatura em agosto de 2009.

Em agosto de 2010 ingressou no curso de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Genética e Melhoramento da UFV, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais do gênero <i>Solanum lycopersicum</i>	1
1.2. Plantas haplóides e duplo-haplóides no melhoramento de plantas.....	3
1.3. Cultura de anteras.....	5
1.4. Androgênese em <i>S. lycopersicum</i>	8
1.5. Aspectos gerais da citometria de fluxo.....	10
1.6. Aspectos citogenéticos em <i>S. lycopersicum</i>	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Material.....	15
3.2. Métodos.....	15
3.2.1. Monitoramento da maturação de anteras.....	15
3.2.1.1. Citometria de fluxo.....	15
3.2.1.2. Citogenética.....	16
3.2.2. Cultura de anteras.....	17
3.2.2.1. Coleta do material e pré-tratamento.....	17
3.2.2.2. Desinfestação dos botões florais.....	17
3.2.2.3. Inoculação das anteras em meio de cultura.....	17
3.2.3. Determinação do nível de ploidia de DNA dos calos por citometria de fluxo.....	18
3.2.4. Análise citológica.....	19
3.2.5. Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Monitoramento da maturação de anteras por citometria de fluxo e citogenética.....	20
4.2. Cultura de anteras.....	22

4.3. Determinação do nível de ploidia de DNA dos calos por citometria de fluxo.....	24
5. DISCUSSÃO.....	30
5.1. Monitoramento da maturação de anteras por citometria de fluxo e citogenética.....	30
5.2. Cultura de anteras.....	31
5.3. Determinação do nível de ploidia de DNA dos calos por citometria de fluxo.....	33
6. CONCLUSÕES.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

JULIÃO, Sirlei Aparecida, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Multiploidia em calos provenientes de anteras de tomate.** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Coorientadores: Andréa Dias Koehler e Cosme Damião Cruz.

A cultura de anteras tem sido aplicada em tomate como tentativa à indução de calogênese seguida da regeneração de plantas haplóides e duplo-haplóides. Por meio desta técnica, linhas homozigóticas podem ser obtidas, o que tem sido considerado relevante para programas de melhoramento e técnicas moleculares. A resposta androgenética pode ser influenciada por diversos fatores, destacando-se, dentre eles, o estágio de desenvolvimento da microsporogênese. Nesta perspectiva, este estudo adaptou um protocolo associando técnicas de citometria de fluxo e citogenética para relacionar as fases de desenvolvimento da microsporogênese em anteras de tomate com o tamanho das mesmas. O objetivo desta associação foi selecionar perfis de anteras a serem inoculadas em meio de cultura. Posteriormente, adaptou-se um protocolo de citometria de fluxo para os calos obtidos *in vitro*, a fim de monitorar o nível de ploidia de DNA. As suspensões nucleares analisadas pela citometria de fluxo foram obtidas com digestão das anteras e posterior homogeneização das células usando um mini mixer. Os histogramas obtidos mostraram baixos CV's, sendo considerados adequados para a análise citométrica. Dessa forma, anteras pequenas (0,5 – 0,7 mm), na fase de intérfase/prófase I, apresentaram um perfil de histograma semelhante ao observado em folha diplóide, e anteras grandes (1,6 – 1,9 mm) na fase de tétrades e micrósporos apresentaram um pico haplóide e um aumento em G₂ em função da presença de tétrades. A partir destas análises, as anteras de botões florais de 1 – 5 mm, com tamanho correspondente aos daquelas analisadas por citometria de fluxo e citogenética (0,5 – 1,9 mm) foram inoculadas em meio de indução de calogênese, visando identificar as fases mais responsivas a esta condição *in vitro*. O meio MS basal, suplementado com 2 mg L⁻¹ de AIA e 1 mg L⁻¹ de 2 ip, induziu 21,7% de calogênese, e o maior percentual de calos foi obtido a partir de anteras de botões florais com

2,0 – 3,9 mm, correspondendo às fases prófase I a anáfase II. Os calos foram analisados pela citometria de fluxo a fim de identificar a ploidia de DNA. O *chopping* realizado nos calos proporcionou o isolamento dos núcleos, e histogramas com CV's considerados adequados foram obtidos. A análise citométrica evidenciou que todos os calos eram multiplóides, sendo que cada um apresentou uma das cinco classes de níveis de ploidia de DNA, a saber: 2C-4C-8C-16C; 2C-4C-8C-16C-32C; 4C-8C; 4C-8C-16C; 8C-16C-32C. Um total de 44,4% dos calos analisados apresentaram cinco níveis de ploidia de DNA. Um teste estatístico de interação mostrou que o tamanho dos botões florais não influenciou na poliploidização ocorrida nos calos. Estes dados evidenciam a ocorrência de variação somaclonal que, provavelmente, é resultado da interação do genótipo com os reguladores de crescimento acrescentados ao meio de indução.

ABSTRACT

JULIÃO, Sirlei Aparecida, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Multiploidy in calli from tomato anther**. Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Co-advisers: Andréa Dias Koehler and Cosme Damião Cruz.

The anther culture has been applied in tomato as an attempt to induce callogenesis followed by regeneration of haploid and doubled haploid plants. By this technique, homozygous lines can be obtained, which has been considered relevant to breeding programs and molecular techniques. The androgenetic response can be influenced by several factors, especially the development stage of microsporogenesis. In this perspective, this study adapted a protocol by associating of flow cytometry and cytogenetic techniques in order to relate the development stages of microsporogenesis in tomato anthers to their size, aiming to select anthers profiles to be inoculated into culture medium. After a flow cytometry protocol was adapted for calli obtained *in vitro*, in order to monitor the DNA ploidy level. The nuclear suspensions analyzed by flow cytometry were obtained from digestion of anther cells and further homogenization using a mini mixer. The histograms showed low CV's, being considered suitable for cytometric analysis. Thus, anthers small (0.5 – 0.7 mm), showing cells in interphase/prophase I, exhibited a histogram profile similar to that observed in diploid leaf, and anthers large (1.6 – 1.9 mm), containing tetrad and microspores, showed an haploid peak and a G₂ peak enlarged due to the presence of tetrads. From these analyzes, anthers of flower buds 1 – 5 mm, with size corresponding to those analyzed by flow cytometry and cytogenetics (0.5 – 1.9 mm), were inoculated in the callogenesis induction medium, to identify the phases more responsive to the condition *in vitro*. The basal MS medium supplemented with 2 mg L⁻¹ AIA and 1 mg L⁻¹ 2 ip, induced 21.7% of callogenesis, and the highest percentage of calli was obtained from anthers of flower buds 2.0 – 3.9 mm, corresponding to the phases prophase I to anaphase II. The calli were analyzed by flow cytometry to identify the DNA ploidy. The chopping performed on calli afforded the nuclei isolation, and histograms with CV's

considered suitable were obtained. The cytometric analysis revealed that the all calli were multiploids, each of which presented one of five classes of DNA ploidy levels, namely: 2C-4C-8C-16C; 2C-4C-8C-16C-32C; 4C-8C; 4C-8C-16C; 8C-16C-32C. A total of 44.4% of calli analyzed showed five levels of DNA ploidy. A statistical test of interaction showed that the size of flower buds had no effect on polyploidization occurred in the calli. These data evidence the somaclonal variation occurrence, which, probably, results from the interaction of genotype with growth regulators added to the induction medium.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais do gênero *Solanum lycopersicum*

O tomate é um membro da família Solanaceae e do gênero *Solanum*. A família Solanaceae contém aproximadamente 3.000 espécies distribuídas em 90 gêneros (KNAPP et al., 2004). Esta família é uma das mais importantes em termos de agricultura e abrange cinco espécies de interesse econômico, a saber: batata (*Solanum tuberosum*), pimenta (*Capsicum annum*), berinjela (*Solanum melongena*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e tomate (*Solanum lycopersicum*) (SEGUÍ-SIMARRO et al., 2011). *Solanum* constitui o gênero de maior importância econômica (WEESE e BOHS, 2007), e o mais representativo da família com aproximadamente 2.000 espécies (DARWIN et al., 2003; FRODIN, 2004).

As espécies silvestres de tomate são nativas da região Andina da América do Sul na sua parte ocidental e se distribuem do Equador ao norte do Chile, Peru e nas Ilhas Galápagos (DARWIN et al., 2003; SPOONER et al., 2005). O tomate cereja, identificado como *Solanum lycopersicum* variedade cesariforme, provavelmente é o ancestral do tomate cultivado (BAI e LINDHOUT, 2007). O tempo e o local da domesticação do tomate não são bem esclarecidos. Evidências botânicas, linguísticas e históricas apontam o México e o Peru como os possíveis locais de domesticação (BAUCHET e CAUSSE, 2012).

Lineaus (1753) foi o primeiro a adotar um nome científico para o tomate cultivado, denominando-o *Solanum lycopersicum*. Em 1768, Miller reclassificou o tomate cultivado, nomeando-o cientificamente como *Lycopersicon esculentum*. A classificação filogenética da família Solanaceae foi revisada, e o gênero *Lycopersicon* foi novamente integrado ao gênero *Solanum* com sua nova nomenclatura. *Solanum* seção *Lycopersicon* inclui o tomate cultivado (*S. lycopersicum*) e mais 12 espécies selvagens. *Solanum lycopersicum* refere-se somente à espécie domesticada (PERALTA et al., 2006).

O tomate está intimamente relacionado com outras espécies comercialmente importantes da mesma família, tais como batata, berinjela,

pimentão, tabaco e petúnia. O conhecimento obtido a partir de estudos realizados com tomate pode ser aplicado a estas plantas, o que o torna um material de pesquisa importante, servindo como o principal organismo modelo da família Solanaceae (HAY et al., 2004; KIMURA e SINHA, 2008). Esta espécie tem o genoma relativamente pequeno e apresenta uma forte base de estudos genéticos, genômicos e citogenéticos, por isso é considerada adequada para representar Solanaceae (KOO et al., 2008). Esta planta também representa um excelente modelo para o desenvolvimento floral e frutífero e é amplamente utilizada em estudos comparativos dentro da família Solanaceae (XIAO et al., 2009).

O tomate é reconhecido como um alimento altamente valioso e nutritivo. O seu fruto é um alimento funcional em virtude dos altos teores de vitaminas A e C e fibras, além de ser rico em licopeno, um dos mais potentes antioxidantes, sendo sugerido na prevenção de alguns tipos de câncer (CARVALHO e PAGLIUCA, 2007).

A diversidade na forma e tamanho do fruto de tomate é consequência da domesticação e seleção para as características do fruto (XIAO et al., 2009). O tomateiro é a hortaliça mais importante em termos de produção e área plantada do mundo (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2007), sendo a China seu maior produtor. O Brasil encontra-se na nona colocação, segundo dados da FAO (FAOSTAT, 2010). No Brasil, a cultura do tomateiro ocupa lugar de destaque na horticultura, com uma área plantada de aproximadamente 64 mil hectares. O cultivo de tomates na safra 2011/2012 foi dimensionado pelo IBGE em 4 milhões de toneladas (IBGE, 2012).

No melhoramento de plantas é de suma importância a exploração da variabilidade genética presente em espécies selvagens. Esta estratégia foi implementada com sucesso em tomate, no qual a maior parte da diversidade alélica encontra-se nos parentes selvagens, enquanto o tomate cultivado apresenta apenas 5% do total da variabilidade genética que pode ser encontrada em todas as espécies. Muitas características de interesse, como resistência a pragas e doenças, produção e qualidade dos frutos, foram identificadas em parentes selvagens e posteriormente introduzidas no tomate cultivado (MILLER e TANKSLEY, 1990).

1.2. Plantas haplóides e duplo-haplóides no melhoramento de plantas

Em virtude da importância do tomateiro na agricultura mundial, técnicas de cultura de tecidos têm sido aplicadas a esta espécie. Uma destas técnicas refere-se à indução de plantas haplóides e duplo-haplóides. No entanto, esta metodologia ainda não é rotineiramente aplicada em programas de melhoramento genético de tomate, principalmente por causa da falta de conhecimento sobre a indução da androgênese nesta espécie (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2007).

Plantas haplóides apresentam esporófitos com número gametófito de cromossomos. Quando ocorre a duplicação do número cromossômico de um haplóide de maneira espontânea ou induzida por agente despolimerizante de microtúbulo, a planta resultante é denominada duplo-haplóide (KASHA e MALUSZYNSKI, 2003; GERMANÁ, 2010; 2011). Plantas com esta característica são desejáveis nos estudos genéticos em plantas e para o melhoramento genético, dado a ausência dos efeitos de dominância e segregação (MAHESHWARI et al., 1982).

Plantas haplóides podem ocorrer espontaneamente em uma baixa frequência, ou podem ser induzidas artificialmente por meio da cultura de ovários, óvulos, anteras, micrósporos, hibridização sexual, polinização com pólen irradiado e eliminação cromossômica (ASSANI et al., 2003; BAL e ABAK, 2007; DUNWELL, 2010).

A cultura *in vitro* de anteras ou micrósporos tem sido considerada o método mais eficiente para indução de haplóides e duplo-haplóides (De BUYSER e HENRY, 1980; PETERS et al., 1999). A ginogênese é uma técnica menos usada atualmente por causa de sua baixa eficiência, mas tem sido aplicada àquelas espécies que não respondem eficientemente à androgênese (FORSTER et al., 2007).

Embriogênese gamética é uma das diferentes rotas de embriogênese presente no reino vegetal e consiste na capacidade do gametófito masculino (androgênese) e gametófito feminino (ginogênese) desviarem irreversivelmente de sua rota gametofítica para uma rota esporofítica. Diferentemente da embriogênese somática que proporciona a propagação clonal dos genótipos (a menos que ocorra variação somaclonal), a

embriogênese gamética resulta em plantas haplóides e/ou duplo-haplóides, uma vez que tais plantas são regeneradas a partir de células reprodutivas (GERMANÁ, 2010).

Esporófito com número cromossômico haplóide foi primeiramente desenvolvido em uma Solanaceae, *Datura innoxia*, usando a técnica de regeneração *in vitro* a partir da cultura de anteras (GUHA e MAHESHWARI, 1964). Desde então, a regeneração de esporófitos *in vitro* tem sido aplicada em aproximadamente 250 espécies de plantas (MALUSZYNSKI et al., 2003; FORSTER et al., 2007).

As plantas haplóides regeneradas tendem a ser menores, menos vigorosas, mais susceptíveis a estresses bióticos e abióticos, e são estéreis (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2008a). Estas plantas são consideradas de alta aplicabilidade biotecnológica sendo utilizadas em estudos de mutagênese induzida e transformação genética, mapeamento genético, na identificação de genes deletérios presentes em espécies diplóides e principalmente no desenvolvimento de linhas puras duplo-haplóides (SEGUÍ-SIMARRO, 2010).

No melhoramento genético de plantas, a produção de linhas puras duplo-haplóides, por meio da androgênese, é de extrema utilidade para superar as limitações das técnicas do melhoramento clássico para a geração de linha pura (BURBULIS et al., 2004; DUNWELL, 2010; GERMANÀ, 2011; ISLAM e TUTEJA, 2012). A principal vantagem do uso de duplo-haplóides é a rápida produção destas linhas homozigotas, em contraste aos numerosos ciclos endogâmicos ou de retrocruzamentos utilizados no melhoramento convencional (ROY e MANDAL, 2005; LANTOS et al., 2006). Isso possibilita explorar melhor a variabilidade genética e aumentar a eficiência da seleção, pois, com a utilização de plantas homozigotas, a variância aditiva será máxima e os efeitos da dominância e epistasia serão neutralizados (SNAPE, 1989). Portanto, a produção de plantas haplóides é um excelente método de produção e seleção de novos genótipos (ASOLIMAN et al., 2007).

Este sistema representa para os programas de melhoramento uma economia não só em relação ao tempo, como também quanto aos custos de produção de novas linhagens (SNAPE, 1989; SRIVASTAVA e CHATURVEDI, 2008; CORRAL-MARTÍNEZ et al., 2011). Sendo muito usado em algumas espécies, tais como cereais e *Brassica ssp.*, em que a

tecnologia da androgênese está bem estabelecida, já que é possível obter linhas puras em apenas uma única geração *in vitro* (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2007).

Apesar das vantagens, a tecnologia duplo-haplóide não está bem implementada em um número satisfatório de plantas de importância econômica (SALAS et al., 2011). Este é o caso do tomate, uma Solanaceae em que plantas duplo-haplóides têm sido obtidas somente em poucos casos (SHTEREVA et al., 1998; ZAGORSKA et al., 1998; 2004; SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005; 2007; CORRAL-MARTÍNEZ et al., 2011). No entanto, existem espécies que são altamente responsivas e consideradas modelo de estudo da androgênese, tais como tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), colza (*Brassica napus*), cevada (*Hordeum vulgare* L.) e trigo (*Triticum aestivum*) (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2008b; WEDZONY et al., 2009).

Variedades comerciais desenvolvidas pelos métodos de produção de duplo-haplóides têm sido relatadas para algumas culturas tais como trigo (*Triticum aestivum* L.), aveia (*Hordeum vulgare* L.), triticale (*x Triticosecale* Wittm.), arroz (*Oryza sativa* L.), *Brassica* spp., beringela (*Solanum melongena* L.), pimenta (*Capsicum annuum* L.), aspargus (*Asparagus officinalis* L.) e tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (THOMAS et al., 2003, DUNWELL, 2010).

1.3. Cultura de anteras

Anteras constituem um dos principais explantes utilizados na indução *in vitro* de haplóides e duplo-haplóides. A cultura de anteras consiste, basicamente, em estimular o micrósporo ou grão de pólen jovem a dividir-se continuamente, formando calos embriogênicos ou embriões, em meio de cultura (MAZZOCATO, 2005).

Androgênese, também chamada embriogênese do micrósporo ou do pólen, é um dos exemplos mais notáveis da totipotência celular em plantas (REYNOLDS, 1997; GÓRALSKI et al., 2005). Este mecanismo é definido como um conjunto de processos biológicos que induzem células gaméticas masculinas a desviar de sua rota gametofítica para a esporofítica, resultando no desenvolvimento de plantas haplóides e/ou duplo-haplóides (GÓRALSK

et al., 1999; McKONE e HALPERN, 2003; BÁRÁNY et al., 2005; SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005; 2008b; SEGUÍ-SIMARRO, 2010).

A rota de desenvolvimento esporofítico pode ser acionada no gametófito tanto por meio do cultivo *in vitro* de anteras quanto do cultivo de micrósporos isolados (RODRIGUES et al., 2004). De acordo com Seguí-Simarro (2010) a androgênese *in vitro* pode ser obtida pela embriogênese do micrósporo e calogênese derivada de meiócitos.

A embriogênese do micrósporo é o método mais usado pra produzir plantas haplóides (TOURAEV, 2001). Este método é baseado na totipotência celular, em que uma única célula haplóide tem capacidade de desdiferenciação e regeneração em uma planta após a exposição a algum tipo de estresse (SHARIATPANAHI et al., 2006).

A indução da embriogênese do micrósporo implica não só na expressão de um programa embriogênico, mas também nas respostas relacionadas com o estresse celular e uma repressão do programa gametofítico para reverter o micrósporo para um estado totipotente (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2008b).

A calogênese derivada de meiócitos é uma rota menos frequente e documentada em relação à embriogênese do micrósporo. Sob condições *in vitro* adequadas, meiócitos em estágio pós-recombinação são induzidos a proliferar e formar calos. Plantas haplóides e/ou duplo-haplóides podem ser obtidas pela embriogênese ou organogênese indireta (SEGUÍ-SIMARRO, 2010).

Diferentes fatores interagem determinando a eficiência da androgênese em cultura de anteras como a fisiologia da planta doadora, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos, os pré-tratamentos, a composição do meio de cultura, fatores físicos, as condições de cultura e o genótipo da planta doadora (SMÝKAL, 2000; DATTA, 2005).

A indução da androgênese é facilitada pela aplicação de diferentes pré-tratamentos (SHARIATPANAHI et al., 2006; SHIRDELMOGHANLOO et al., 2009). Os fatores de estresse podem desencadear a reprogramação dos micrósporos para embriões e finalmente plantas haplóides (ISLAM e TUTEJA, 2012). O choque térmico é considerado o pré-tratamento mais eficaz para induzir a androgênese (GERMANÁ, 2010), sendo que a

temperatura ótima e a duração do pré-tratamento varia de acordo com a espécie (DUNWELL, 2010).

Após experimentos iniciais sobre a influência do genótipo na resposta androgenética em arroz (*Oryza sativa*), constatou-se que a resposta de anteras em cultura é determinada em grande parte pelo genótipo das plantas doadoras (LUZ et al., 1996; DUMWELL, 2010). Tem sido relatado que diferentes cultivares de uma mesma espécie apresentam respostas diversas em cultura de anteras (ZAGORSKA et al., 1998; SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005; GERMANÁ, 2011). Salas et al. (2011) analisaram 12 genótipos de beringela quanto à resposta androgenética, 11 genótipos produziram calos e somente 5 formaram embriões originados dos micrósporos. Seguí-Simarro et al. (2011), consideram o genótipo e o estágio de desenvolvimento como os fatores mais críticos na indução da androgênese.

Quanto ao estágio de desenvolvimento dos micrósporos, na maioria das espécies responsivas, essas células respondem apenas em uma determinada etapa do seu desenvolvimento sendo o estágio antes da primeira mitose haplóide o mais susceptível a adquirir competência e entrar numa rota alternativa de diferenciação (REYNOLDS, 1997). Cada espécie pode responder a um determinado estágio e tipo de tratamento (FAROOQ et al., 2010).

Dependendo do sistema de regeneração, pode ocorrer a formação de plantas haplóides, diplóides e poliplóides, a partir da cultura de anteras, via embriogênese direta ou indireta e pela organogênese indireta (PETERS et al., 1999). A obtenção de calos ou plantas poliplóides/aneuplóides evidencia a ocorrência de variação somaclonal (VS), que é definida como a variação decorrente do cultivo *in vitro* de células e tecidos (LARKIN e SCOWCROFT, 1981).

De acordo com Clarindo et al. (2008), técnicas de cultura de tecidos estão frequentemente associadas com a ocorrência de VS. O próprio sistema de cultivo representa condições de estresse em razão do isolamento de explantes e a reprogramação celular proporcionando tal evento. O genótipo da espécie, o tipo de explante, a composição física e/ou química do meio de cultivo, a idade da planta doadora e o número de subcultivos, também influenciam essa instabilidade genética (JAIN, 2001). Em relação às

técnicas de cultura de tecidos, os sistemas indiretos apresentam maior susceptibilidade à ocorrência de VS (SMÝKAL et al., 2007).

1.4. Androgênese em *S. lycopersicum*

Apesar do sucesso na obtenção de plantas haplóides em algumas espécies, em tomate tem sido difícil alcançar resultados satisfatórios em decorrência da recalcitrância desta espécie (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005). Sharp et al. (1971, 1972) foram os primeiros a relatar a obtenção de calos e raízes em cultura de anteras de tomate. No entanto, 40 anos após o relato dos autores, ainda não há um método padronizado para se obter duplo-haplóides em tomate (SEGUÍ-SIMARRO et al., 2011).

Estudos têm mostrado que a resposta androgenética desta planta pode ser aumentada pela manipulação das condições de crescimento da planta doadora, pelo controle do estágio de desenvolvimento dos micrósporos nas anteras inoculadas, pela otimização do meio de indução, especialmente quanto aos reguladores de crescimento e às condições da cultura e aplicação de pré-tratamentos aos botões florais.

O genótipo é um dos fatores mais importantes que determina a resposta da antera ao meio de cultura e às condições aplicadas. Zagorska et al. (1998) constataram que de 80 cultivares de tomate testadas, um total de 53 foram responsivas e produziram calos, mas apenas uma pequena porcentagem originou regenerantes. Em contraste, todas as cultivares que apresentavam o gene *ms 10³⁵* para macho-esterilidade produziram calo seguido por organogênese e regeneração.

Estudos anteriores reportaram a eficiência dos mutantes portadores do gene *ms 10³⁵* para capacidade de produzir calos (ZAMIR et al., 1980). Este mutante é caracterizado pela interrupção do desenvolvimento dos meiócitos na fase de tétrade e pela meiose retardatória. Plantas haplóides de tomate têm sido obtidas usando-se este mutante (ZIV et al., 1984; ZAGORSKA et al., 2004; SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005).

Outro aspecto importante para a indução da androgênese é o estágio de desenvolvimento da microsporogênese quando as anteras são excisadas do botão floral e inoculadas em meio de indução (REYNOLDS, 1997). Em

tomate, alguns trabalhos têm focado na análise do estágio de desenvolvimento em que as anteras são mais responsivas à cultura, e os resultados apontam os estádios antes do micrósporo vacuolado como os mais responsivos. No entanto, existe discrepância em relação à fase concisa em que os primeiros sinais de alteração no programa de desenvolvimento dos meiócitos podem ser observados (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005).

Os meiócitos são considerados como estágio ótimo para a obtenção de calos. Shtereva et al. (1998), descreveram as fases de prófase I a metáfase II como ponto em que o desenvolvimento da antera pode ser interferido para induzir a calogênese. Alguns pesquisadores observaram maior formação de calos nos estádios iniciais da meiose (SUMMERS et al., 1992; BRASILEIRO et al., 1999). Seguí-Simarro e Nuez (2005) obtiveram melhor resultado na formação de calos em anteras nas fases de metáfase I até telófase II. Outros autores relataram a fase de tétrade como a mais responsiva à calogênese (ZAMIR et al., 1980). Além dos meiócitos, os micrósporos mononucleados também podem ser desviados de sua rota gametofítica para calogênese e/ou embriogênese (SHARP et al., 1972; CAPPADOCIA e RAMULU, 1980; BAL e ABAK, 2005; SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2007).

A indução da androgênese pode ser facilitada pela aplicação de um fator de estresse aos micrósporos antes ou durante a cultura. Pré-tratamentos de estresse induzem os micrósporos a desviarem de sua rota gametofítica padrão para se desenvolverem esporofiticamente (BAL e ABAK, 2007).

Em tomate há relatos da condução da cultura de anteras sem uso de pré-tratamentos (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005; 2007). Shtereva et al. (1998) testaram alguns tipos de estresse e concluíram que o pré-tratamento das anteras a 4 °C por 48 h foi o mais eficaz na indução de calogênese, organogênese e regeneração de plantas em tomate. Farooq et al. (2010) observaram que o número de calos reduziu quando os botões foram expostos a 4 °C por mais que dois dias e também em temperaturas acima de 4 °C. Bal e Abak (2005) incubaram botões florais contendo micrósporos mononucleados, associando pré-tratamento com manitol e baixa temperatura, durante sete dias para induzir divisões nucleares assimétricas nos micrósporos e a formação de estruturas multicelulares a partir de

micrósporos isolados. Além disso, a manutenção dos explantes no escuro na fase inicial da cultura aumenta a produção de calos (JARAMILLO e SUMMERS, 1990; 1991).

Na literatura, encontra-se diversos meios de indução para cultura de anteras de tomate. Shtereva et al. (1998) analisaram 20 meios de indução, com o intuito de selecionar um meio de cultura para produção de calos em anteras de tomate, e concluíram que o meio MS basal suplementado com 2 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA) e 1 mg L⁻¹ de isopenteniladenina (2 ip) foi mais eficiente. Este meio de indução foi usado em outros trabalhos apresentando resultados significativos (ZAGORSKA et al., 2004; SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005; 2007; CORRAL-MARTÍNEZ et al., 2011). De acordo com Shtereva et al. (1998), a influência dos reguladores de crescimento sobre a androgênese é dependente do genótipo da planta doadora.

As condições de cultivo da planta doadora são de particular importância para a indução da androgênese. Anteras provenientes de plantas cultivadas em casa de vegetação são mais responsivas que as oriundas de plantas cultivadas no campo. O tempo de floração da planta também influencia na resposta. Anteras coletadas no início da floração produzem alto percentual de calos e organogênese. A resposta das anteras coletadas em um estágio mais avançado da floração apresenta baixa habilidade androgenética (SHTEREVA et al., 1998).

Apesar da importância agronômica do tomate, pouco se sabe sobre a metodologia de indução de duplo-haplóides e ainda não existe um método padronizado para esta planta (SEGUÍ-SIMARRO et al., 2011). Nos últimos 40 anos as condições de cultura têm sido avaliadas, porém poucos estudos relataram plantas regeneradas de anteras com clara origem haplóide ou duplo-haplóide (SHTEREVA et al., 1998; ZAGORSKA et al., 1998; 2004; SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005; 2007; CORRAL-MARTÍNEZ et al., 2011).

1.5. Aspectos gerais da citometria de fluxo

Além de um sistema *in vitro* para a indução de haplóides e duplo-haplóides, há a necessidade de ferramentas para verificação do nível de

ploidia de DNA dos regenerantes e seleção dos materiais de interesse. Nesse sentido, a citometria de fluxo mostra vantagens por ser um método rápido, eficiente e confiável (YANPAISAN et al., 1999). Por isso, é apropriado para analisar a ploidia de DNA de materiais originados da cultura de tecidos. De acordo com Ochatt et al. (2011), atualmente a citometria de fluxo é amplamente usada em análises de ploidia de DNA de plantas regeneradas da cultura de tecidos e tem ajudado a acelerar a exploração industrial de genótipos originados da manipulação da ploidia de DNA *in vitro*.

A citometria de fluxo é uma ferramenta que analisa parâmetros ópticos de partículas coradas em suspensão. Portanto, determina indiretamente o conteúdo de DNA nuclear pelo mensuramento da emissão de fluorescência. Suspensões de núcleos e/ou células são coradas com fluorocromos DNA-específicos e a quantidade de luz emitida é quantificada (DOLEŽEL e BARTOŠ, 2005; OCHATT, 2006).

A citometria de fluxo tem inúmeras aplicações tanto industriais quanto científicas. Sendo aplicada para estimar o conteúdo de DNA, mensurar níveis de ploidia de DNA, caracterizar híbridos somáticos, analisar o ciclo celular, identificar aneuploidias, mensurar o tamanho e estimar o conteúdo G/C do genoma (MARRIE e BROWN, 1993; YANPAISAN et al., 1999; DOLEŽEL e BARTOŠ, 2005).

Em estudos de propagação de plantas *in vitro*, as diferentes fases do ciclo celular (G_0/G_1 , S, G_2/M) têm sido utilizadas para selecionar as células potencialmente mais adequadas para o cultivo. Dessa forma, o monitoramento do ciclo celular tem papel fundamental para avaliação das fases que envolvem o início, a desdiferenciação e a rediferenciação ao longo da cultura. A citometria de fluxo possibilita uma rápida observação do efeito de tratamentos testados e é uma ferramenta útil para um acompanhamento mais eficaz do potencial de regeneração de tecidos cultivados *in vitro* (YANPAISAN et al., 1999).

A determinação da ploidia de DNA de materiais originados da cultura de anteras é de grande importância, e plântulas haplóides devem ser tratadas com agentes poliploidizantes para gerar plantas homozigóticas duplo-haplóides. Nesse contexto, a citometria de fluxo é a única metodologia

capaz de analisar um número elevado de plântulas em poucas horas, o que permite a rentabilização do processo (GEMES-JUHASZ et al., 2002).

Rudolf et al. (1999), Rizza et al. (2002), Assani et al. (2003), Lotfi et al. (2003), Bárány et al. (2005), Seguí-Simarro e Nuez (2005, 2007), Corral-Martínez et al. (2011) são alguns exemplos de pesquisadores que utilizaram a citometria de fluxo para determinar o nível de ploidia de plantas regeneradas em trabalhos cujo objetivo foi a produção de haplóides e/ou duplo-haplóides.

1.6. Aspectos citogenéticos em *S. lycopersicum*

Enquanto as análises de citometria de fluxo fornecem informações sobre o nível de ploidia de DNA de forma confiável, eficiente e rápida, as técnicas citogenéticas possibilitam uma análise morfológica acurada dos aspectos cromossômicos, contribuindo para a identificação de possíveis alterações funcionais, numéricas e estruturais (SINGH, 1993). A citogenética de plantas continua em desenvolvimento e faz contribuições essenciais a projetos genômicos possibilitando delinear a ordem de marcadores moleculares e revelar rearranjos cromossômicos (FIGUEROA e BASS, 2010).

Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma espécie diplóide que apresenta $2n=2x=24$ cromossomos (BANKS, 1984). Morfologicamente, os cromossomos apresentam-se como acrocêntricos e metacêntricos, tendo a heterocromatina concentrada na região do centrômero (PETERSON et al., 1996). Segundo Chang et al. (2008), em tomate, o rDNA 45S está localizado no braço curto do cromossomo 2, enquanto rDNA 5S está localizado no braço curto do cromossomo 1. A morfologia característica do cromossomo 2, com a sua região organizadora do nucléolo (RON) e sua estrutura acrocêntrica, o torna distinguível dos outros cromossomos (KOO et al., 2008).

Análise citogenética tem sido aplicada na identificação das fases da microsporogênese mais responsivas à indução da androgênese em tomate (ZAMIR et al., 1980; SUMMERS et al., 1992; BRASILEIRO et al., 1999; SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005) e também para confirmar o número

cromossômico em calos originados de anteras (ZAMIR et al., 1980) e em plantas regeneradas (ZAGORSKA et al., 2004). Farooq et al. (2010), analisaram o número de cromossomos em plantas haplóides regeneradas *in vitro* e observaram núcleos com 12 cromossomos e também núcleos com alterações numéricas como 11, 13 e 15 cromossomos.

A citogenética tem contribuído por gerar informações acerca de aspectos cariológicos da espécie, possibilitando o estabelecimento de mapas físicos (CHANG et al., 2008), auxiliando a identificação e estudo de plantas poliplóides (PRAÇA et al., 2009), identificando híbridos interespecíficos (GAVRILENKO et al., 2001) e possíveis mutações cromossômicas (KARSBURG et al., 2009).

Considerando a importância da seleção das fases da microsporogênese adequadas à indução de calogênese e tendo em vista que a técnica de caracterização celular é laboriosa; além do baixo percentual de haplóides produzidos; e as dificuldades para identificar previamente, entre o material responsivo os indivíduos haplóides, este trabalho propõe, elaborar protocolos visando o estabelecimento da relação entre as fases da microsporogênese e o tamanho do botão floral/antera, bem como a identificação da ploidia de DNA dos calos produzidos, utilizando citometria de fluxo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

O presente trabalho teve como objetivo geral induzir a calogênese a partir do cultivo *in vitro* de anteras de tomate e averiguar por citometria de fluxo a eventual produção de material haplóide bem como o comportamento proliferativo quanto ao nível da ploidia de DNA dos calos.

2.2. Objetivos específicos:

- Adaptar protocolos para obter suspensões nucleares de anteras a serem analisadas por citometria de fluxo;
- Monitorar a maturação das anteras por citometria de fluxo e, paralelamente, por citogenética;
- Analisar a relação existente entre o tamanho de botão floral e antera, e o estágio de desenvolvimento da microsporogênese;
- Adaptar protocolos para cultura *in vitro* de anteras de tomate e identificar as fases de desenvolvimento da microsporogênese mais responsivas à condição *in vitro*;
- Adaptar protocolos para obter suspensões nucleares de calos resultantes da cultura de anteras;
- Monitorar a ploidia de DNA dos calos por citometria de fluxo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Os botões florais de *S. lycopersicum* 'Débora' foram cedidos pelo professor Derly José Henrique da Silva, curador do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG. Os botões florais foram coletados pela manhã no campo experimental da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG. Alguns foram imediatamente fixados em metanol ácido acético (3:1) para análise citogenética e citometria de fluxo. Os outros botões foram usados na cultura de anteras. As análises de citogenética, citometria e a cultura de anteras foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

3.2. Métodos

3.2.1. Monitoramento da maturação de anteras

3.2.1.1. Citometria de fluxo

A suspensão nuclear analisada por citometria de fluxo foi obtida de anteras de *S. lycopersicum* 'Débora'. As anteras foram classificadas em pequenas (0,5 – 0,7 mm), médias (0,8 – 1,5 mm) e grandes (1,6 – 1,9 mm). Uma antera de cada botão foi reservada para análise citogenética e quatro foram submetidas a tratamento de digestão enzimática a 36 °C.

As anteras foram colocadas em um filtro de nylon com poro de aproximadamente 70 µm. Este foi mergulhado em um microtubo de 2 mL contendo solução enzimática, de modo que as anteras ficassem em contato com a solução. A solução enzimática consistiu em 2% de celulase Onozuka Yakult Honsha Co[®] (origem: *Trichoderma viride*), 1% de celulase Sigma[®] (origem: *Aspergillus niger*), 2,5% de macerozyme Yakult Honsha Co[®], 2,5% de pectinase (pó) Sigma[®], 1% de hemicelulase Sigma[®].

O processo de digestão ocorreu em duas etapas. Na primeira, as anteras permaneceram na solução enzimática por duas horas. Em seguida estas foram maceradas com a cabeça de um alfinete na própria solução enzimática para liberação das células, que ficaram incubadas na mesma por mais 30 minutos.

Ao final, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 100 g, e a solução enzimática descartada com uma seringa. Após o descarte adicionou-se 1 mL de tampão de extração OTTO-I (OTTO, 1990) ao *pellet*. Um mini mixer foi usado para isolar os núcleos, fazendo-se 12 pulsos de homogeneização em cada tubo de solução e esta ficou incubada por 5 minutos. Cada pulso durou aproximadamente 1 segundo (SILVA et al., 2010). Depois, a solução foi filtrada em tela de nylon com poro de 30 µm e centrifugada por 5 minutos a 100 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 100 µL de OTTO-I e ficou incubado por 10 minutos em temperatura ambiente.

A suspensão nuclear foi corada com 1,5 mL de solução tampão OTTO-II (OTTO, 1990) suplementada com 1,5 mM de 4'6'-diamino-2-fenilindol (DAPI). A coloração dos núcleos ocorreu no escuro por 30 minutos, e após, a suspensão foi filtrada em uma tela com poro de 20 µm e transferida para tubos de leitura.

As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo Partec® PAS II/III (Partec® GmbH, Munster, Germany), equipado com uma lâmpada UV e um filtro TK 420.

3.2.1.2. Citogenética

Uma antera de cada botão floral foi reservada para análise citogenética. A digestão foi feita em uma solução enzimática contendo 2% de celulase Onozuka Yakult Honsha Co® (origem: *Trichoderma viride*), 1% de celulase Sigma® (origem: *Aspergillus niger*), 2,5% de macerozyme Yakult Honsha Co®, 2,5% de pectinase (pó) Sigma®, 1% de hemicelulase Sigma®. Após a digestão, cada antera foi levemente fragmentada, com a ponta de uma lâmina de bisturi, em aproximadamente 50 µL de solução ácido acético (45%). Retirou-se o excesso de material e a gota de solução contida sobre a

lâmina foi espalhada com a ajuda de um secador de cabelo sobre uma placa aquecedora. As lâminas foram coradas com 4,0 μM de 4'6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) e analisadas em microscópio Olympus TM BX-60.

3.2.2. Cultura de anteras

3.2.2.1. Coleta do material e pré-tratamento

Botões florais de *S. lycopersicum* 'Débora' coletados pela manhã, foram separados de acordo com o tamanho, de 1,0 a 5,9 mm em intervalos de 1,0 mm. Após a classificação quanto ao tamanho, os botões foram armazenados em geladeira a 4 °C durante 48 horas. Usou-se uma solução de polyvinyl-pyrrolidone (PVP) 1% para minimizar a oxidação das anteras.

3.2.2.2. Desinfestação dos botões florais

Após o choque térmico, os botões passaram pelo processo de desinfestação em capela de fluxo laminar. Os botões foram desinfestados em etanol 70% (v/v) por 20 segundos e em solução de hipoclorito de sódio 1,0 % (v/v) por 5 minutos. Em seguida, os botões foram lavados 3 vezes em água destilada estéril com duração de 3 minutos cada lavagem (modificado de ZAGORSKA et al., 1998).

3.2.2.3. Inoculação das anteras no meio de cultura

Após a desinfestação dos botões florais, as anteras foram removidas assepticamente. Quatro anteras foram inoculadas em placas de Petri com meio de indução e uma foi reservada para análise citogenética. O meio básico de indução consistiu de sais e vitamina MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 2,8 g L⁻¹ de phytigel (Sigma®), 20 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de myo-inostol, 0,04 g L⁻¹ de cisteína, 1 mg L⁻¹ de isopenteniladenina (2 ip) e 2 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA), o pH foi ajustado para 5,7. Os reguladores de crescimento, previamente filtro esterilizados, foram adicionados após a esterilização do meio em autoclave

(modificado de SHTEREVA et al., 1998). Aproximadamente 24 anteras de cada tamanho de botão floral foram inoculadas totalizando 6 repetições para cada tratamento.

As placas foram vedadas e mantidas a 26 °C no escuro durante um mês em câmara de crescimento (BOD) (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005). Após 30 dias, as placas foram expostas a fotoperíodo 16/8h com uma irradiância de 36 $\mu\text{mol.m}^{-2}$. O material foi transferido para meio fresco em intervalos de 30 dias (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005). A frequência de anteras produzindo calos foi avaliada após 60 dias de inoculação. As anteras que não responderam à cultura foram descartadas após análise.

3.2.3. Determinação do nível de ploidia de DNA dos calos por citometria de fluxo

Inicialmente os calos foram divididos em 3 grupos de acordo com o tamanho do botão floral do qual originaram: 1,0 – 1,9 mm; 2,0 – 3,9 mm; 4,0 – 4,9 mm. Em cada análise citométrica usou-se aproximadamente 50 mg de calo. Os núcleos foram extraídos pelo procedimento de *chopping* (GALBRAITH et al., 1983), realizado em 100 μL de tampão de extração OTTO-I (OTTO, 1990), depois adicionou-se 400 μL do mesmo. O material ficou incubado por 3 minutos e então foi filtrado em uma tela de nylon com poro de 30 μm . O volume foi completado para 1 mL com tampão OTTO-I. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 100 g e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspendido em 100 μL de tampão OTTO-I e permaneceu incubado por 10 minutos. Após, a suspensão nuclear foi corada com 1,5 mL de solução tampão OTTO-II (OTTO, 1990) suplementada com 1.5 mM de 4'6'-diamino-2-fenilindol (DAPI). A coloração dos núcleos ocorreu no escuro por 30 minutos, e após, a suspensão foi filtrada em uma tela de nylon com poro de 20 μm e transferida para tubos de leitura.

As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo Partec[®] PAS II/III (Partec[®] GmbH, Munster, Germany), equipado com uma lâmpada UV e um filtro TK 420. O nível da ploidia de DNA nuclear das amostras foi determinado pela correspondência com os valores dos canais da planta

padrão diplóide. Os histogramas foram obtidos em escala semi-logarítmica (log no eixo x).

3.2.4. Análise citológica

Com a finalidade de confirmar a eficiência do isolamento dos núcleos e descartar a possibilidade de agregados nucleares e núcleos fragmentados, lâminas foram preparadas com amostras do material corado após a análise citométrica. As suspensões nucleares foram transferidas para tubos de 2 mL e centrifugadas a 100 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 30 μ L do *pellet* foi ressuspenso e colocado sobre uma lâmina e coberto com uma lamínula. As imagens foram capturadas por uma vídeo-câmera DP71 acoplada a um microscópio de fluorescência Olympus TM BX-60.

3.2.5. Análise estatística

O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os tratamentos corresponderam a cinco classes de comprimento de botões florais em milímetros. A unidade experimental consistiu de uma placa de Petri com quatro anteras inoculadas com seis repetições cada. Os explantes foram avaliados 60 dias após a inoculação, adotando-se como variável resposta a presença ou ausência de calo. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 0,05 de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Monitoramento da maturação de anteras por citometria de fluxo e citogenética

Anteras de tomate de diferentes tamanhos foram avaliadas quanto à progressão meiótica pela técnica de citometria de fluxo. O procedimento de digestão enzimática e posterior homogeneização das células usando um mini mixer, possibilitou a obtenção de suspensões nucleares, sendo então processadas em um citômetro. Por esta análise, foram obtidos histogramas com coeficientes de variação inferiores a 5%, demonstrando que as suspensões nucleares apresentaram núcleos intactos, isolados e estequiometricamente corados. Dois padrões de histogramas foram identificados, evidenciando a diferença entre anteras pequenas (0,5 – 0,7 mm) e anteras grandes (1,6 – 1,9 mm) (Figura 1 a – b).

Paralelamente à análise citométrica, análises citogenéticas foram realizadas para identificar as fases meióticas correspondentes aos tamanhos de anteras analisados. A identificação citogenética dos estádios de desenvolvimento da microsporogênese demonstrou que anteras medindo 0,5 – 0,7 mm apresentaram células em intérfase e prófase I. Os meiócitos em metáfase I, anáfase I, telófase I e os meiócitos II estavam presentes em anteras com comprimento 0,8 – 1,5 mm. Anteras com comprimento acima de 1,6 mm apresentaram tétrades e micrósporos.

A partir da análise comparativa de ambas as técnicas, foi possível diferenciar as anteras em intérfase/prófase I daquelas que apresentaram a fase de tétrade e micrósporos. Anteras em fase de intérfase/prófase I resultaram em um perfil de histograma semelhante ao observado em folha diplóide, e as anteras em estágio de tétrade e micrósporo mostraram pico correspondente aos núcleos haplóides e um aumento em G_2 representado pela presença de tétrades. A partir destes resultados, anteras apresentando tamanhos similares aos analisados por citometria de fluxo e citogenética foram inoculadas em meio de indução visando à calogênese.

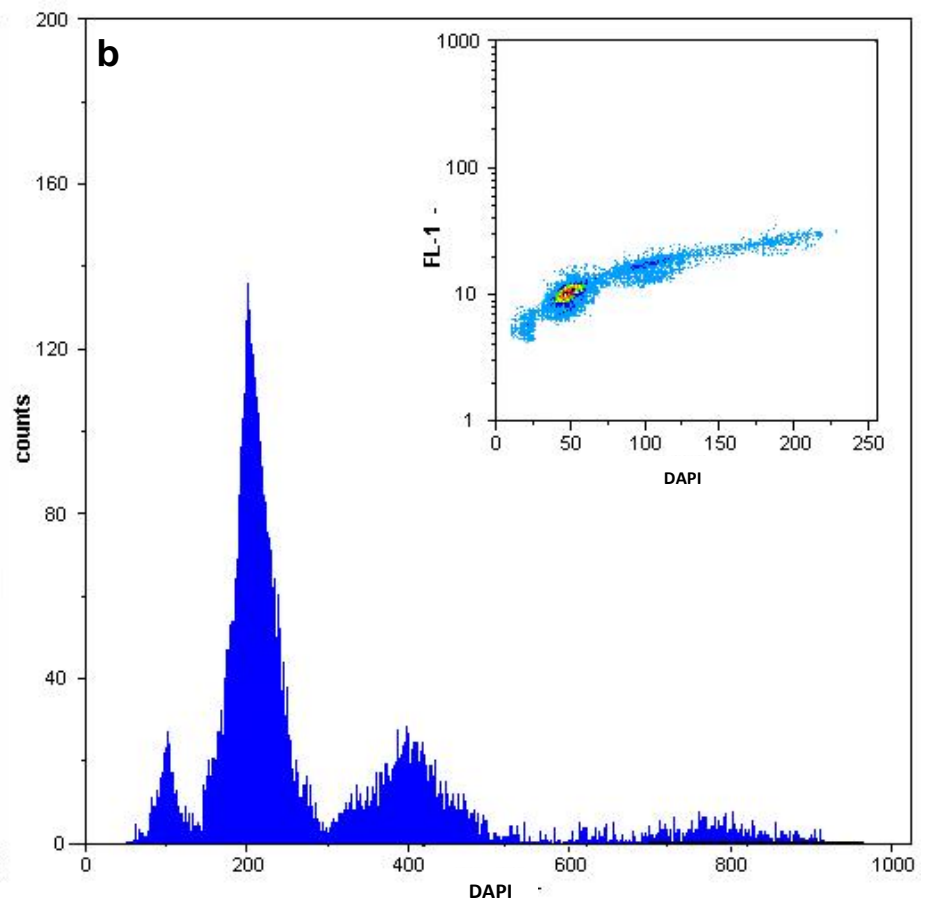
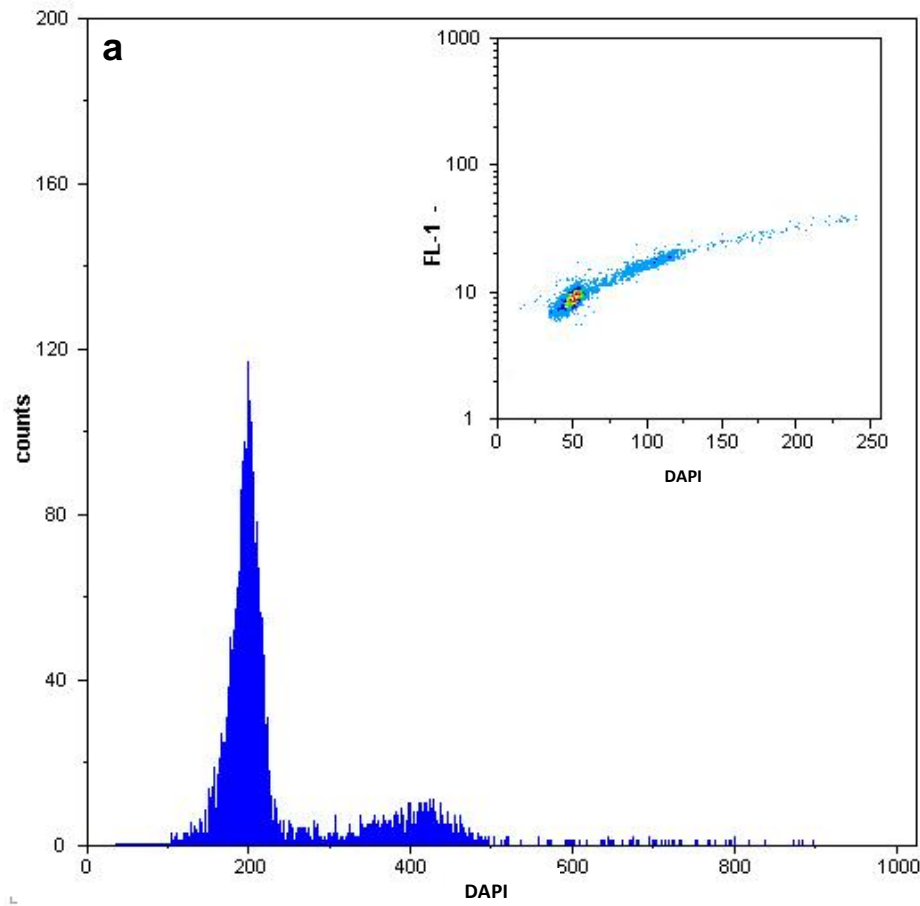


Figura 1 – Histogramas representativos de núcleos de anteras de tomate ‘Débora’, corados com DAPI. a) Anteras pequenas (0,5 – 0,8 mm), o pico G_0/G_1 das células do tapete e células mães dos micrósporos foi ajustado para o canal 200. O pico G_2/M das células do tapete, G_2 das células mães dos micrósporos e meiócitos em prófase I está representado no canal 400. b) Anteras grandes (1,6 – 1,9 mm), o pico G_0/G_1 das células do tapete e dos meiócitos II foi ajustado para o canal 200. O pico G_2/M das células do tapete e meiócitos I está representado no canal 400. Notar o aumento do pico G_2/M , referente ao maior número de tétrades. O pico no canal 100 corresponde ao de núcleos liberados das tétrades, e o pico no canal 800 corresponde ao de núcleos de células do tapete endoreduplicadas em G_2/M . Na extremidade superior direita de ambos, *dotplots* de densidade (citogramas) apresentam a distribuição de frequências correspondentes, baseadas em dois parâmetros de fluorescência.

4.2. Cultura de anteras

As anteras de botões florais medindo 1,0 – 5,9 mm de comprimento foram inoculadas em meio de indução visando a obtenção de material haplóide. O desenvolvimento das anteras *in vitro* ocorreu via formação de calos. Após 2 – 3 semanas de inoculação, algumas anteras tornaram-se intumescidas. A calogênese variou ao longo do tempo, sendo que, com aproximadamente 30 dias de cultura, ocorreu o início da formação calogênica em algumas anteras. A partir do 30º dia de cultura até, aproximadamente, o 50º dia, houve um aumento no número de calos formados, e após este período, uma clara tendência à estabilização.

Inicialmente, sob condições de escuro, os calos apresentaram uma cor esbranquiçada e tornaram-se esverdeados quando foram transferidos para o fotoperíodo 16/8 h (Figura 2). Porém, alguns calos permaneceram com uma fina camada branca (aspecto de pó) na parte superior do calo esverdeado (dado não mostrado). Os calos eram geralmente compactos, dos quais alguns brotos foram formados (Figura 2).



Figura 2 – Calos originados da cultura de anteras de tomate ‘Débora’. Calo inicial mantido no escuro (esquerda). Calo transferido para luz, apresentando coloração esverdeada e início de brotação (centro). Brotação com desenvolvimento mais avançado (direita). As partes amarronzadas dos calos correspondem a resquícios das anteras em processo de oxidação. Barra = 5 mm.

As anteras foram analisadas quanto à produção de calos após 60 dias de cultivo *in vitro*. A tabela 1 mostra a média de anteras que produziram calos em cada placa e a porcentagem de calos obtidos para cada tamanho de botão. Os botões florais correspondem aos tratamentos testados e foram classificados com base no seu comprimento, em intervalos de 1,0 mm, a fim de relacionar o estágio de desenvolvimento dos micrósporos de acordo com esta característica morfológica.

A formação de calos foi obtida nas anteras de botões florais com comprimento de 1,0 – 4,9 mm, apresentando diferentes percentuais de produção a cada intervalo de tamanho (Tabela 1). Estes tamanhos correspondem desde a fase de intérfase até os meiócitos. A porcentagem total de produção de calos foi de 21,7%, no entanto nem todos os calos produzidos se desenvolveram eficientemente.

Os calos originados a partir de anteras de botões florais com 2,0 – 2,9 mm foram os que mais se multiplicaram, seguidos pelos calos originados de botões com 3,0 – 3,9 mm. Além disso, ambos os tamanhos correspondem aos das anteras que produziram maior percentual de calos. Pela análise citogenética, observou-se que o estágio de desenvolvimento meiótico das anteras com estes tamanhos encontravam-se entre as fases prófase I e anáfase II.

Tabela 1 – Número médio de anteras, por placa, que apresentaram calogênese, e porcentagem de calos produzidos de acordo com o tamanho do botão floral, 60 dias após a inoculação.

Tamanho de botão	\bar{x} *	%
1,0 – 1,9 mm	0,67 ab	16,7
2,0 – 2,9 mm	1,67 a	41,6
3,0 – 3,9 mm	1,33 a	33,3
4,0 – 4,9 mm	0,67 ab	16,7
5,0 – 5,9 mm	0,00 b	0,0

* Médias seguidas de mesma letra são semelhantes si, pelo teste de Tukey, ao nível de 0,05 de probabilidade.

4.3. Determinação do nível de ploidia de DNA dos calos por citometria de fluxo

O procedimento adotado para extração dos núcleos a partir dos calos, originados de anteras de tomate cultivadas *in vitro*, foi eficiente em isolar os núcleos. Os histogramas gerados apresentaram coeficientes de variação considerados apropriados para análises citométricas. As lâminas analisadas a partir do material preparado para citometria de fluxo evidenciaram que os núcleos estavam isolados e que não havia número significativo de agregados ou fragmentos nucleares.

Para caracterizar o nível de ploidia de DNA dos calos, folhas da planta doadora foram usadas para determinar o pico G_0/G_1 que foi definido como padrão para o valor 2C das células diplóides. Os histogramas foram obtidos em escala semi-logarítmica (log no eixo x). Neste caso, o número do canal é proporcional ao log da intensidade de emissão de fluorescência. Porém, as ploidias seguem um padrão linear. Um teste estatístico (qui-quadrado) comprovou a linearidade das ploidias de DNA (dado não mostrado).

As análises citométricas evidenciaram que todos os 18 calos eram multiplóides. Para a caracterização deste resultado, foi adotado o termo multiploidia neste trabalho. Surpreendentemente, sem nenhum tipo de pré-tratamento com agentes despolimerizantes de microtúbulo, 44,4% dos calos analisados apresentaram até cinco níveis de ploidia de DNA (2C-4C-8C-16C-32C). Cinco classes de níveis de ploidia de DNA foram observadas, a saber: 2C-4C-8C-16C; 2C-4C-8C-16C-32C; 4C-8C; 4C-8C-16C; 8C-16C-32C. A figura 3 mostra os histogramas representando as cinco classes de ploidia de DNA identificadas.

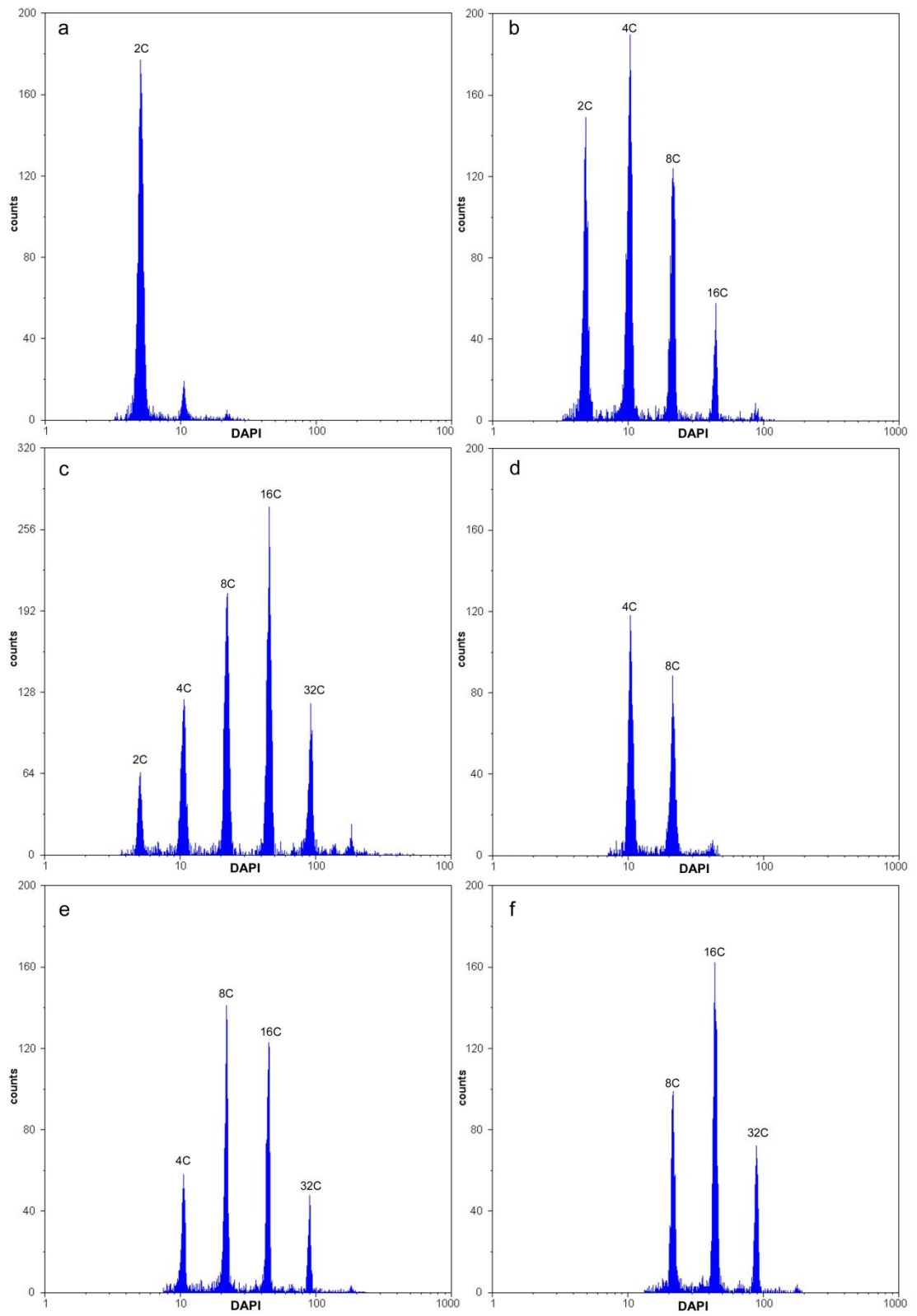


Figura 3 – Histogramas em escala semi-logarítmica (log no eixo x), representando núcleos de tomate 'Débora', corados com DAPI. O eixo x representa o conteúdo de DNA e o eixo y o número de partículas analisadas. Os números dos canais são proporcionais aos logs das intensidades de fluorescência. a) Folha da planta doadora usada como padrão para o conteúdo de DNA diplóide. b, c, d, e, f) Calos multiplóides originados de anteras. Notar que os últimos picos, com ploidia não identificada, correspondem à fase G_2 . Os picos representam o conteúdo de DNA nuclear e foram analisados por comparação com o conteúdo de DNA nuclear da folha diplóide.

A análise citológica possibilitou a identificação do tamanho dos núcleos poliplóides, referentes aos materiais que apresentaram cinco níveis de ploidia de DNA. As imagens capturadas nas lâminas evidenciaram os diferentes tamanhos de núcleos analisados pelo citômetro de fluxo (Figura 4).

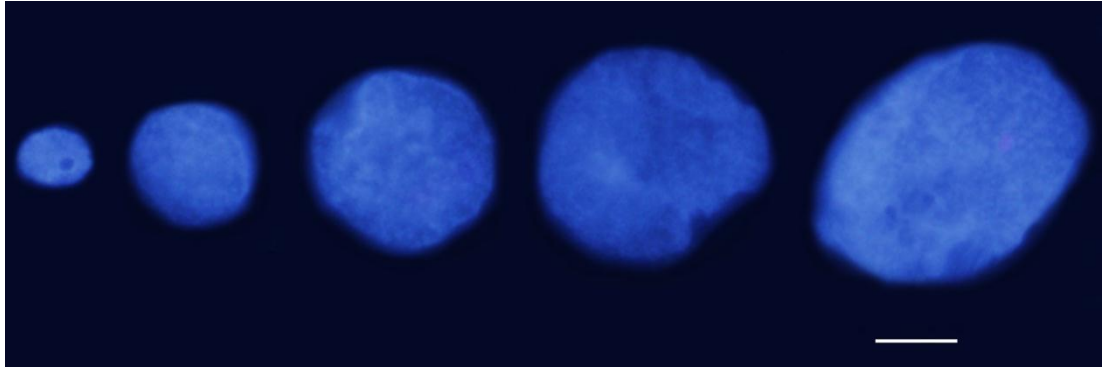


Figura 4 – Núcleos de diferentes tamanhos observados em lâminas preparadas com o material analisado por citometria de fluxo. A ploidia de DNA dos núcleos observados na figura corresponde a 2C, 4C, 8C, 16C e 32C, respectivamente. Barra = 10 μ m.

Para a análise citométrica os calos foram divididos em 3 grupos de acordo com o tamanho dos botões florais dos quais originaram. Os percentuais de núcleos identificados em cada nível de ploidia de DNA foram quantificados (Tabela 2). Observa-se que calos diferentes originados de um mesmo tamanho de botão floral apresentaram distintos percentuais de núcleos em cada nível de ploidia de DNA, havendo também diferença nos percentuais de ploidia de DNA entre os mesmos tamanhos de botões. O teste estatístico de interação mostrou que não houve influência dos tamanhos dos botões sobre os ciclos de endoreduplicação ocorridos nos calos (dados não mostrados). Os calos apresentaram poliploidização independente do tamanho do botão floral do qual originaram.

Tabela 2 – Análise da ploidia de DNA de calos originados da cultura de anteras de tomate ‘Débora’. O tamanho refere-se aos botões florais que tiveram suas anteras inoculadas, com subsequente produção de calos.

Tamanho dos botões florais em mm	Repetições	Ploidia de DNA (% de núcleos)					Nº de partículas analisadas	CV (%)*
		2C	4C	8C	16C	32C		
1,0 – 1,9	R1	0,0	13,1	29,7	30,0	7,8	5.183	2,7 – 5,0
	R2	0,0	12,0	30,9	28,4	8,5	7.036	3,5 – 5,4
	R3	24,8	32,8	21,9	5,3	1,3	8.979	4,1 – 4,7
	R4	0,0	18,4	37,6	20,7	7,0	5.834	2,8 – 4,5
	R5	8,0	14,7	24,9	23,6	7,4	5.006	2,9 – 4,3
	R6	0,0	22,2	35,5	19,9	5,3	9.038	4,8 – 5,7
2,0 – 3,9	R1	0,0	0,0	42,3	41,7	5,5	5.030	3,7 – 4,7
	R2	21,1	50,7	12,2	2,1	0,0	6.316	4,1 – 5,2
	R3	0,0	52,7	34,3	0,0	0,0	5.075	4,7 – 5,2
	R4	0,0	13,4	38,7	28,0	8,2	5.055	2,5 – 4,5
	R5	0,0	21,5	37,9	22,7	3,2	5.763	4,8 – 5,3
	R6	39,7	40,3	10,0	1,8	0,0	8.759	4,4 – 4,9
4,0 – 4,9	R1	23,4	20,4	11,5	13,3	10,0	5.028	2,2 – 5,5
	R2	14,9	16,6	15,4	17,1	9,2	5.860	3,5 – 5,2
	R3	4,6	9,5	23,0	23,3	9,9	8.429	3,6 – 5,0
	R4	12,8	15,6	20,5	17,0	8,4	10.847	3,5 – 4,8
	R5	0,0	20,0	37,9	20,0	3,8	6.022	4,1 – 5,1
	R6	7,1	14,5	27,7	24,1	5,1	8.732	4,2 – 4,8

*CV = Coeficiente de variação em porcentagem, referente aos picos obtidos, do menor para o maior CV. Picos com porcentagem de núcleos inferior a 1% foram considerados como G₂.

Na tabela 3, estão sumarizados os dados quanto ao número de calos que apresentaram o perfil de ploidia de DNA identificado. Os calos que apresentaram cinco níveis de ploidia de DNA (2C, 4C, 8C, 16C e 32C) corresponderam a 44,4% do total. Outros perfis de distribuição do nível de ploidia também foram observados, entretanto nenhum calo apresentou populações com conteúdo de DNA haplóide.

Botões florais medindo 2,0 – 3,9 mm de comprimento apresentaram a maior variação quanto ao nível de ploidia de DNA, contendo todas as cinco classes de ploidia identificadas. Todos os três grupos de tamanho de botão apresentaram a classe de ploidia 2C-4C-8C-16C-32C. Porém, botões florais com 4,0 – 4,9 mm de comprimento originaram maior número de calos com estes níveis de ploidia de DNA, representando 27,8% dos calos analisados.

Tabela 3 – Número de calos obtidos em cada classe de ploidia de DNA, de acordo com o tamanho do botão floral do qual originaram.

Ploidia de DNA	Tamanho dos botões florais (mm)*		
	1,0 – 1,9	2,0 – 3,9	4,0 – 4,9
2C-4C-8C-16C	4	1	
2C-4C-8C-16C-32C	2	1	5
4C-8C		1	
4C-8C-16C-32C		2	1
8C-16C-32C		1	
Total	6	6	6

*Tamanho de botões florais que tiveram suas anteras inoculadas e produziram calos.

As médias dos núcleos identificados em cada nível de ploidia de DNA, de acordo com a classe de tamanho de botão floral são apresentadas na figura 5. Verifica-se que as maiores porcentagens dos níveis de ploidia de DNA identificadas concentram-se em 4C, 8C e 16C, sendo que o nível de ploidia 8C apresentou maior média nos 3 grupos de tamanho de botão.

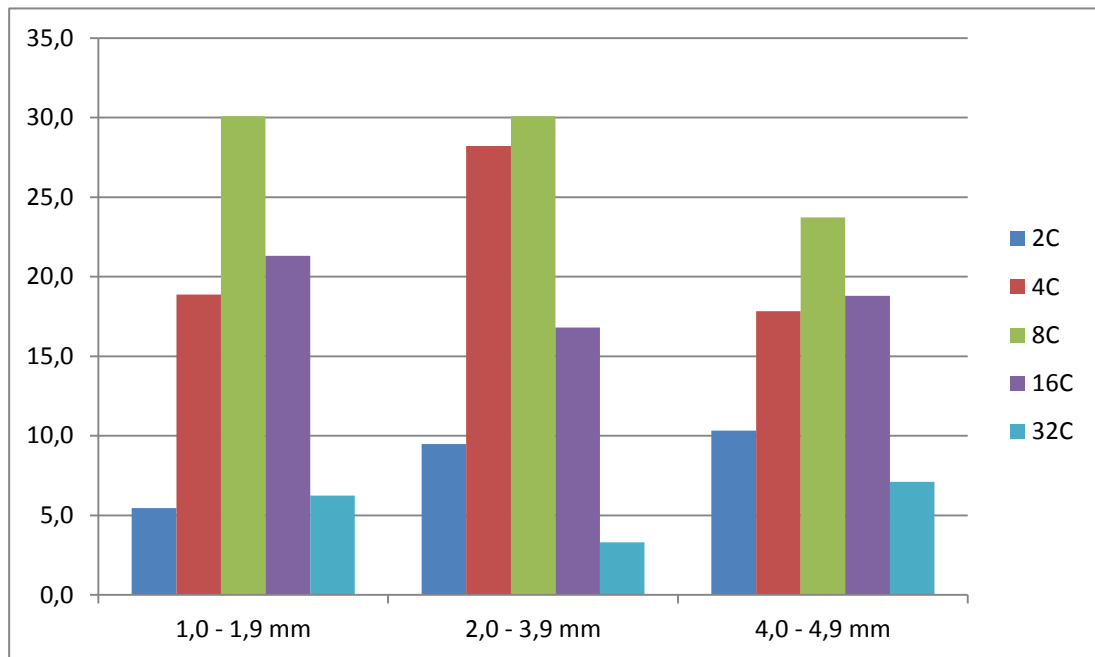


Figura 5 – Gráfico representando as médias dos níveis de ploidia observadas nos calos de acordo com o tamanho dos botões florais. No eixo x observa-se as 3 classes de tamanho de botões florais. O eixo y mostra a porcentagem média de cada nível de ploidia de DNA de acordo com o tamanho do botão floral.

5. DISCUSSÃO

5.1. Monitoramento da maturação de anteras por citometria de fluxo e citogenética

A citometria de fluxo foi aplicada para analisar a progressão da meiose em anteras de tomate. A suspensão nuclear foi obtida com digestão enzimática das anteras e 12 pulsos de homogeneização usando um mini mixer. A digestão promoveu a eliminação da parede celular, tornando as células mais acessíveis ao processo usado para isolar os núcleos. Este procedimento possibilitou a obtenção de histogramas com CV's abaixo de 5%, o que, segundo Doležel e Bartoš (2005), são considerados aceitáveis em estudos de citometria de fluxo vegetal.

Silva et al. (2010) usaram um procedimento de extração de núcleos semelhante ao empregado neste trabalho. Raízes de cebola foram digeridas e os núcleos foram isolados com 6 pulsos de homogeneização usando mini mixer. Os autores também obtiveram histogramas com baixos CV's.

Análise citogenética foi realizada para averiguar a relação do estágio de desenvolvimento da microsporogênese com o tamanho dos botões florais e anteras. Esta análise evidenciou que a meiose estava presente nos botões com comprimento de 1,0 – 4,9 mm, os quais apresentaram anteras de 0,5 – 1,6 mm de comprimento. Brasileiro et al. (1999), analisaram a correlação entre o comprimento da antera e do botão floral de tomate. Esses autores relataram que botões florais com 5,0 – 6,0 mm e suas anteras com 2,0 – 2,3 mm apresentaram células em meiose. Por sua vez, Seguí-Simarro e Nuez (2005) observaram que os meiócitos estavam concentrados nos botões florais com comprimento de 4,0 – 5,9 mm. Esta diferença provavelmente ocorre por causa dos diferentes genótipos analisados em cada experimento e das condições ambientais nas quais as plantas foram cultivadas.

As análises citogenéticas realizadas em anteras de tomate 'Débora' demonstraram uma variação de fases da meiose, sendo que mais de uma fase era comumente encontrada em uma única antera. Entretanto, houve predominância de uma determinada fase. Portanto, neste trabalho

considerou-se que a fase predominante em uma antera representava o estágio de desenvolvimento da mesma.

De acordo com Zamir et al. (1980), o tamanho das anteras e dos botões florais não possui uma relação exata com a fase da microsporogênese. Variação nos estádios de desenvolvimento também foi observada para tamanhos de botões florais similares na mesma planta, anteras da mesma flor, e até mesmo dentro de uma única antera.

5.2. Cultura de anteras

O cultivo *in vitro* de anteras de tomate 'Débora' resultou em calos e, esporadicamente, alguns brotos. A maioria dos estudos sobre a cultura de anteras de tomate relatou a ocorrência de calogênese (ZAMIR et al., 1980; SHTEREVA et al., 1998; BRASILEIRO et al., 1999; SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005; 2007; CORRAL-MARTÍNEZ et al., 2011). Considerando a dificuldade em regenerar plantas a partir dos calos e que esta espécie apresenta alta recalcitrância à cultura de anteras (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2005; CORRAL-MARTÍNEZ et al., 2011), poucos progressos nesta área foram alcançados e, conseqüentemente, ainda não há um método padronizado para obtenção de plantas haplóides e duplo-haplóides em tomate (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2007).

O meio de indução sugerido por Shtereva et al. (1998) foi eficiente em produzir calos e brotos em anteras de tomate 'Débora', o qual induziu 21,7% de calogênese. Já Asoliman et al. (2007) obtiveram altas frequências de embriões somáticos a partir da cultura de anteras de tomate utilizando o mesmo meio de indução. Houve diferença nos percentuais de embriões somáticos produzidos pelos cultivares quando inoculados em um mesmo meio de indução. Isto evidencia que a calogênese, organogênese e embriogênese dependem da interação entre a concentração dos reguladores de crescimento e os genótipos usados na cultura de anteras de tomate (JARAMILLO e SUMMERS et al., 1990; SHTEREVA et al., 1998; ASOLIMAN et al., 2007).

A identificação da fase da microsporogênese é considerada uma etapa importante para obter sucesso na cultura de anteras. Neste trabalho, as

anteras na fase de microsporogênese foram selecionadas de acordo com o tamanho dos botões florais correspondentes àqueles previamente analisados por citometria de fluxo e citogenética. Como estratégia para selecionar as anteras na fase desejada, Seguí-Simarro e Nuez (2005) e Góralski et al. (2005) identificaram o estágio responsivo à androgênese em tomate e milho, respectivamente, a partir da relação do desenvolvimento *in vitro* das anteras com a caracterização celular do micrósporo/pólen nas diferentes fases de seu desenvolvimento.

Os resultados mostraram que as anteras na fase de intérfase e meiose foram mais responsivas à indução de calos. As anteras que apresentaram micrósporos, em botões florais com comprimento de 5,0 – 5,9 mm, não responderam à indução *in vitro*. Vários trabalhos apontam os meiócitos como a fase mais responsiva para cultura de anteras de tomate (BRASILEIRO et al., 1999; SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ et al., 2005, CORRAL-MARTÍNEZ et al., 2011). Na maioria das espécies, incluindo sistemas-modelo, o período de sensibilidade aos tratamentos indutivos gira em torno da primeira mitose haplóide, isto é, a partir do estágio de micrósporo vacuolado até o pólen bicelular (TOURAEV et al., 2001).

A maior porcentagem de formação de calos ocorreu em anteras contendo meiócitos. De acordo com Bal e Abak (2007), os tecidos somáticos das anteras que estão na fase de meiócitos são altamente responsivos à cultura de tecidos em comparação às anteras que estão em estádios de desenvolvimento mais avançado.

Os calos obtidos eram inicialmente esbranquiçados, tornando-se esverdeados após exposição ao fotoperíodo. Este resultado foi semelhante ao obtido por Seguí-Simarro e Nuez (2007). Além disso, os calos geralmente eram do tipo compacto e alguns apresentaram brotos. Zagorska et al. (1998) obtiveram dois tipos de calos com a cultura de anteras de tomate: calos amarelos e friáveis; e calos verdes e compactos, sendo este último tipo semelhante ao obtido neste trabalho. Calos brancos e friáveis foram obtidos por Brasileiro et al. (1999) e Seguí-Simarro e Nuez (2007). Em sua maioria, pesquisas relacionadas à indução de haplóide a partir da cultura de anteras de tomate obtiveram apenas calo ou, raramente, brotos que morreram em

um estágio muito inicial de desenvolvimento (JARAMILLO e SUMMERS, 1990; 1991; SUMMERS et al., 1992).

As anteras de tomate 'Débora' produziram uma porcentagem significativa de calos, 21,7%. Porém, estes provavelmente são de origem somática. Segundo Salas et al. (2011), na maioria das espécies, os calos produzidos a partir da cultura de anteras têm uma origem somática. Os resultados de Corral-Martínez et al. (2011) mostraram que até 83% dos calos produzidos a partir de anteras de tomate foram derivados de tecidos da parede da antera. O genótipo tem grande influência na resposta das anteras à cultura para produzir calos. Cultivares diferentes de uma mesma espécie e indivíduos de uma mesma cultivar apresentam diferenças relevantes na resposta à indução de calogênese (SEGUÍ-SIMARRO e NUEZ, 2008b).

5.3. Determinação do nível de ploidia de DNA dos calos por citometria de fluxo

Análises citométricas foram realizadas para a identificação do nível de ploidia de DNA dos calos obtidos com a cultura de anteras de tomate. Os histogramas foram gerados em escala semi-logarítmica, em que os picos apresentaram CV's entre 2,2 e 5,7, considerados adequados para análise de citometria de fluxo vegetal. A citometria de fluxo mostra vantagens neste tipo de estudo por ser um método rápido, eficiente e confiável (YANPAISAN et al., 1999). Por outro lado, a contagem cromossômica, demanda tempo e avalia relativamente poucos números de células (CLARINDO et al., 2008).

Os calos apresentaram populações de células poliplóides. Os altos níveis de ploidia de DNA encontrados nos calos são decorrentes de variação somaclonal, podendo ter sido originados de vários ciclos de endoreduplicação. Segundo Phillips et al. (1994), as alterações na ploidia de DNA são as mais comuns em culturas de tecidos. Além da poliploidização como resultado de ciclos de endoreduplicação, outras fontes de variação têm sido observadas. Como exemplo, tem-se a fusão nuclear entre núcleos meióticos que, segundo Corral-Martínez et al. (2011), ocorre em cultura de anteras de tomate.

Calos multiplóides foram obtidos na cultura de anteras de tomate 'Débora', sendo que alguns apresentaram conteúdo de DNA com até cinco ploidias (2C-4C-8C-16C-32C). Uma vez que nenhuma população de células haplóides foi obtida na análise citométrica, considerou-se que, possivelmente, os calos obtidos tiveram origem somática. Segundo Levenko et al. (1977), as células da parede da antera contribuem para a formação de calos mixoplóides nesta espécie. Seguí-Simarro e Nuez (2007) obtiveram a maioria dos calos com conteúdo de DNA 1C e 2C, e alguns com 1C, 2C e 4C; enquanto Corral-Martínez et al. (2011) obtiveram calos com níveis de ploidia 1C e 2C, e outros com 2C e 4C.

De acordo com Corral-Martínez et al. (2011), calos derivados de meiócitos e de tecidos somáticos podem coexistir nas anteras cultivadas *in vitro*. Ambos os tipos de calos competem pelos limitados recursos disponíveis no lóculo da antera. Porém, os calos de origem somática predominam por serem geneticamente mais estáveis, além de serem mais proliferativos e estarem conectados com o resto da antera. Portanto, os calos derivados dos meiócitos são mais suscetíveis à degeneração em estádios iniciais de desenvolvimento.

Pela análise citométrica realizada, observou-se a ausência de qualquer material haplóide, conforme relatado anteriormente. Contudo, calos com conteúdo de DNA duplo-haplóide possivelmente podem ter sido obtidos, visto que sua análise é contabilizada juntamente com a ploidia 2C de origem somática. Corral-Martínez et al. (2011) verificaram a presença de populações celulares duplo-haplóides em calos originados de anteras de tomate, por meio de análise com marcadores moleculares.

As lâminas preparadas a partir do material analisado por citometria de fluxo não mostraram um número significativo de agregados nucleares. Isto evidencia que os calos não apresentaram células com mais de um núcleo e, portanto, o citômetro analisou núcleos individuais poliplóides. Já Zamir et al. (1980) observaram células binucleadas em calos originados da cultura de anteras de tomate.

Alguns brotos foram obtidos, porém não regeneraram plantas, provavelmente por causa dos altos níveis de ploidia de DNA. De acordo com Ochatt et al. (2000), altos níveis de ploidia de DNA nos calos dificulta a

regeneração de plantas. E a baixa eficiência de regeneração de calos poliplóides está relacionada com a perda da totipotência em consequência da poliploidização (COLIJN-HOOYMANS et al., 1994).

O tempo de cultura não influenciou na poliploidização observada, visto que tanto calos com aproximadamente um mês de inoculação quanto com oito meses apresentaram populações de células poliplóides. Salas et al. (2011) observaram que a ploidia de DNA de embriões originados da cultura de anteras de berinjela aumentou quando os embriões permaneceram no meio de indução por mais que 80 dias.

Uma interação entre os reguladores de crescimento acrescentados ao meio MS basal e o genótipo da planta doadora podem ter induzido os ciclos de endoreduplicação, originando altos níveis de ploidias de DNA nos calos de anteras de tomate 'Débora'. De acordo com Seguí-Simarro e Nuez (2008b), reguladores de crescimento proporcionam o aumento dos níveis da ploidia de DNA nos micrósporos em divisão. A influência dos reguladores de crescimento sobre a indução de calos é dependente do genótipo da planta doadora (SHTEREVA et al., 1998), sendo este um dos principais fatores que determinam o tipo e frequência das alterações genéticas (JAIN, 2001).

Calos mixoplóides têm sido obtidos a partir de outras fontes de explantes, como hipocótilos. Thiem e Śliwińska (2003) analisaram citometricamente calos originados de hipocótilos de *Rubus chamaemorus*, que apresentaram variação nos níveis de ploidia de DNA (2C, 4C e 8C). Calos obtidos na cultura de hipocótilos de beterraba também apresentaram altos níveis de ploidia, com conteúdo de DNA 2C, 4C, 8C e 16C (JACQ et al., 1992). Calos com conteúdo de DNA 2C, 4C, 8C, 16C e 32C foram obtidos por Kubaláková et al. (1996), a partir da cultura de embriões imaturos de pepino (*Cucumis sativus* L.). Park et al. (2010) analisaram o nível de endoreduplicação em folhas, raízes e embriões somáticos originados a partir do cultivo *in vitro* de pedúnculos florais de orquídea. Esses autores constataram que ocorreu maior número de ciclos de endoreduplicação nos embriões somáticos, que apresentaram conteúdo de DNA 2C a 64C, do que em raízes (2C a 16C) e folhas (2C a 8C).

6. CONCLUSÕES

O procedimento adotado para a extração de núcleos de anteras resultou em histogramas com CV's abaixo de 5% e evidenciou a diferença quanto às fases de desenvolvimento da microsporogênese entre anteras pequenas e anteras grandes. A associação entre as técnicas citogenética e citometria de fluxo possibilitou relacionar o tamanho das anteras com a fase de desenvolvimento meiótico das mesmas e foi considerada adequada para a identificação da fase de desenvolvimento da microsporogênese mais responsiva à indução de calos.

O meio de indução empregado foi eficiente na produção de calos em anteras de tomate 'Débora', resultando em 21,7% de calogênese. Anteras contendo meiócitos nos estádios de prófase I a anáfase II (2,0 – 3,9 mm de comprimento) apresentaram maior percentual de formação de calos.

O protocolo adaptado para a análise citométrica dos calos possibilitou a identificação de populações de células com nível de ploidia de DNA poliplóide. Os calos apresentaram cinco classes de ploidia de DNA: 2C-4C-8C-16C; 2C-4C-8C-16C-32C; 4C-8C; 4C-8C-16C-32C; 8C-16C-32C. Estes resultados podem ser considerados relevantes em estudos de cultura de anteras de tomate, tendo em vista a escassez de produção de haplóides e a obtenção de populações mixoplóides na cultura de anteras em tomate relatados na literatura.

Outra questão importante trata-se da obtenção de calos, a partir da cultura de anteras, com altos níveis de ploidia de DNA sem o uso de qualquer agente indutor, podendo ser considerado como um possível método de obtenção de poliplóides. A interação entre o genótipo e os reguladores de crescimento adicionados ao meio de indução e as condições de cultura, possivelmente, promoveu a indução de calos com altos níveis de ploidia de DNA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASOLIMAN, S. S.; ISMAIL, T. A.; ZAKI, M. A.; AMER, E. S. Genetic studies on tomato anther culture: Factores affecting induction of androgenesis in tomato anther culture. **African Crop Science Conference Preceedings**, v. 18, p. 759-768, 2007.
- ASSANI, A.; BAKRY, F.; KERBELLEC, F.; HAÏCOUR, R.; WENZEL, G.; FOROUGH-WER, B. Production of haploids from anther culture of banana [*Musa balbisiana* (BB)]. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 511-516, 2003.
- BAI, Y.; LINDHOUT, P. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we Gain in the future? **Annals of Botany**, v. 100, p. 1085-1094, 2007.
- BAL, U.; ABAK, K. Haploidy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): a critical review. **Euphytica**, v. 158, p. 1-9, 2007.
- BAL, U.; ABAK, K. Induction of symmetrical nucleus division and multicellular structures from the isolated microspores of *Lycopersicon esculentum* Mill. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 19, p. 35-42, 2005.
- BANKS, P. A new diploid chromosome number for tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 26, p. 636-639, 1984.
- BÁRÁNY, I.; GONZÁLEZ-MELENDI, P.; FADON, B.; MITYKÓ, J.; RISUEÑO, M. C.; TESTILLANO, P. S. Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. **Biology of the Cell**, v. 97, p. 709-722, 2005.
- BAUCHET, G.; CAUSSE, M. **Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives**. In: Genetic diversity in plants, ÇALIŞKAN, M. (ed), Ed. InTech, Croácia, p. 133-163, 2012.
- BRASILEIRO, A. C. R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M.; COLAÇO, W.; MEUNIER, I.; CAMARA, T. R. Efeitos do estágio de desenvolvimento da

- antera e da radiação gama na formação de calos derivados de anteras de tomate. **Scientia Agricola**, v. 56, 1999, doi: 10.1590/S0103-90161999000400010.
- BURBULIS, N.; KUPRIENE, R.; ZILENAITE, L. Embryogenesis, callogenesis and plant regeneration from anther cultures of spring rape (*Brassica napus* L.). **Acta Universitatis Latviensis Biology**, v. 676, p. 153-158, 2004.
- CAPPADOCIA, M.; RAMULU, K. S. Plant regeneration from in vitro cultures of anthers and stem internodes in an interspecific hybrid, *Lycopersicon esculentum* L. x *L. peruvianum* Mill. and cytogenetic analysis of the regenerated plants. **Plant Science Letters**, v. 20, p. 157-166, 1980.
- CARVALHO, J. C.; PAGLIUCA, L. G. Tomate: um mercado que não pára de crescer globalmente. **Revista Hortifruti Brasil**, v. 6, p. 6-14, 2007.
- CHANG, S. B.; YANG, T. J.; DATEMA, E.; VAN VUGT, J.; VOSMAN, B.; KUIPERS, A.; MEZNIKOVA, M.; SZINAY, D.; LANKHORST, R. K.; JACOBSEN, E.; De JONG, H. FISH mapping and molecular organization of the major repetitive sequences of tomato. **Chromosome Research**, v. 16, p. 919-933, 2008.
- CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; ARAÚJO, F. S.; ABREU, I. S.; OTONI, W. C. Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 207-214, 2008.
- COLIJN-HOOYMANS, C. M.; HAKKERT, J. C.; JANSEN, J.; CUSTERS, J. B. M. Competence for regeneration of cucumber cotyledons is restrict to specific developmental stages. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 39, p. 211-217, 1994.
- CORRAL-MARTÍNEZ, P.; NUEZ, F.; SEGUÍ-SIMARRO, J. M. Genetic, quantitative and microscopic evidence for fusion of haploid nuclei and growth of somatic calli in cultured *ms10³⁵* tomato anthers. **Euphytica**, v. 178, p. 215-228, 2011.

- DARWIN, S. C.; KNAPP, S.; PERALTA, I. E. Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). **Systematics and Biodiversity**, v. 1, p. 29-53, 2003.
- DATTA, S. K. Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. **Current Science**, v. 89, p. 1870-1878, 2005.
- De BUYSER, J.; HENRY, Y. Induction of haploid and diploid plants through in vitro anther culture of haploid wheat ($n=3x=21$). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 57, p. 57-58, 1980.
- DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, p. 99-110, 2005.
- DUMWELL, J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 377-424, 2010.
- FAOSTAT. 2010. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Statistics. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 23 mai. 2012.
- FAROOQ, A. M.; TABASSUM, B.; NASIR, I. A.; HUSNAIN, T. Androgenesis induction, callogenesis, regeneration and cytogenetic studies of tomato haploid. **Journal of Agricultural Research**, v. 48, p. 457-471, 2010.
- FIGUEROA, D. M.; BASS, H. W. A historical and modern perspective on plant cytogenetics. **Briefings in Functional Genomics**, v. 9, p. 95-102, 2010.
- FORSTER, B. P.; HEBERLE-BORS, E.; KASHA, K. J.; TOURAEV, A. The resurgence of haploids in higher plants. **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 368-375, 2007.
- FRODIN, D. G. History and concepts of big plant genera. **Taxon**, v. 53, p. 753-776, 2004.

- GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, v. 220, p. 1049-1051, 1983.
- GAVRILENKO, T.; THIEME, R. V.; ROKKA, V. M. Cytogenetic analysis of *Lycopersicon esculentum* (+) *Solanum tuberosum* somatic hybrids and their androgenetic regenerants. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 231-239, 2001.
- GEMES-JUHASZ, A.; BALOGH, P.; FERENCZY, A.; KRISTOF, Z. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 105-111, 2002.
- GERMANÀ, M. A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. **Plant Cell Reports**, v. 30, p. 839-857, 2011.
- GERMANÀ, M. A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 104, p. 283-300, 2010.
- GÓRALSKI, G.; MATTHYS-ROCHON, E.; VERGNE, P.; PRZYWARA, L. Androgenic development : a fascinating embryo formation process. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 41, p. 51-65, 1999.
- GÓRALSKI, G.; ROZIER, F.; MATTHYS-ROCHON, E.; PRZYWARA, L. Cytological features of various microspore derivatives appearing during culture of isolated maize microspores. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 47, p. 75-83, 2005.
- GUHA, S.; MAHESHWARI, S. C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. **Nature**, v. 204, p. 497, 1964.
- HAY, A.; CRAFT, J.; TSIANTIS, M. Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap? **Bio Essays**, v. 26, p. 395-404, 2004.
- IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA). IBGE: Rio de Janeiro, v. 25, n. 02, p. 1-88, 2012.

- ISLAM, S. M. S.; TUTEJA, N. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. **Plant Science**, v. 182, p. 134-144, 2012.
- JACQ, B.; TÉTU, T.; SANGWAN, R. S.; De LAAT, A.; SANGWAN-NORREL, B. S. Plant regeneration from sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) hypocotyls cultured in vitro and flow cytometric nuclear DNA analysis of regenerants, **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 329-333, 1992.
- JAIN, S. M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v. 118, p.153-166, 2001.
- JARAMILLO, J.; SUMMERS, W. L. Dark-light treatments influence induction of tomato anther callus. **Hortscience**, v. 26, p. 915-916, 1991.
- JARAMILLO, J.; SUMMERS, W. L. Tomato anther callus production: solidifying agent and concentration influence induction of callus. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, p. 1047-1050, 1990.
- KARSBURG, I. V.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Identification of chromosomal deficiency by flow cytometry and cytogenetics in mutant tomato (*Solanum lycopersicum*, Solanaceae) plants. **Australian Journal of Botany**, v. 57, p. 444-449, 2009.
- KASHA, K. J.; MALUSZYNSKI, M. **Production of doubled haploids in crop plant. An introduction**. In: Doubled haploid production in crop plants: a manual, MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K. J.; FORSTER, B. P.; SZAREJKO, I. (eds), Ed. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, p. 1-4, 2003.
- KIMURA, S.; SINHA, N. Tomato (*Solanum lycopersicum*): a model fruit-bearing crop. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2008, doi:10.1101/pdb.emo105.
- KNAPP, S.; BOHS, L.; NEE, M.; SPOONER, D. M. Solanaceae – a model for linking genomics with biodiversity. **Comparative and Functional Genomics**, v. 5, p. 285-291, 2004.

- KOO, D-H.; JO, S-H.; BANG, J-W.; PARK, H-M.; LEE, S.; CHOI, D. Integration of cytogenetic and genetic linkage maps unveils the physical architecture of tomato chromosome 2. **Genetics**, v. 179, p. 1211-1220, 2008.
- KUBALÁKOVÁ, M.; DOLEŽEL, J.; LEBEDA, A. Ploidy instability of embryogenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus culture. **Biologia Plantarum**, v. 38, p. 475-480, 1996.
- LANTOS, C.; PÁRICSI, S.; ZOFAJOVA, A.; WEYEN, J.; PAUK, J. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with Hungarian cultivars. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 50, p. 31-35, 2006.
- LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, S. C. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 197-214, 1981.
- LEVENKO, B. A.; KUNAKH, V. A.; YURKOVA, G. N. Studies on callus tissue from anthers: I. Tomato. **Phytomorfology**, v. 27, p. 377-383, 1977.
- LOTFI, M.; ALAN, A. R.; HENNING, M. J.; JAHN, M. M.; EARLE, E. D. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 1121-1128, 2003.
- LUZ, J. M. Q.; PINTO, J. E. B. P.; EHLERT, P. A. D.; CERQUEIRA, E. S. Influência da idade e genótipo da planta doadora na indução de embriões em anteras de pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Ciência agrônômica**, v. 27, p. 81-86, 1996.
- MAHESHWARI, S. C.; RASHID, A.; TYAGI, A. K. Haploids from pollen grains – Retrospect and prospect. **American Journal of Botany**, v. 69, p. 865-879, 1982.
- MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K. J.; SZAREJKO, I. **Published doubled haploid protocols in plant species**. In: Doubled haploid production in crop plants a manual, MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K. J.; FORSTER, B.

- P.; SZAREJKO, I. (eds), Ed. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, p. 309-335, 2003.
- MARRIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, v. 78, p. 41-51, 1993.
- MAZZOCATO, A. C. **Cultura de anteras e embriogênese de genótipos selecionados de cevada (*Hordeum vulgare* L. spp. *vulgare*)**. 2005. 156f. Tese (Doutorado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- McKONE, M. J.; HALPERN, S. L. The evolution of androgenesis. **The American Naturalist**, v. 61, n. 4, 2003.
- MILLER, J. C.; TANKSLEY, S. D. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, p. 437-448, 1990.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479, 1962.
- OCHATT, S. J. Flow cytometry (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus). **Flow Cytometry**, p. 1-13, 2006.
- OCHATT, S. J.; MOUSSET-DECLAS, C.; RANCILLAC, M. Fertile pea plants regenerate from protoplasts when calluses have not undergone endoreduplication. **Plant Science**, v. 156, p. 177-183, 2000.
- OCHATT, S. J.; PATAT-OCHATT, E. M.; MOESSNER, A. Ploidy level determination within the context of in vitro breeding. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 104, p. 329-341, 2011.
- OTTO, F. J. **DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA**. In: Methods in Cell Biology, DARZYNKIEWIEZ, Z.; CRISSMAN, H. A.; ROBINSON, J. P. (eds.), Ed. Academic Press, San Diego, v. 33, p. 105-110, 1990.

- PARK, S-Y.; YEUNG, E. C.; PAEK, K-Y. Endoreduplication in *Phalaenopsis* is affected by light quality from light-emitting diodes during somatic embryogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v. 4, p. 303-309, 2010.
- PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D. M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, v. 56, p. 5-12, 2006.
- PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. **Produção de haplóides e duplo haplóides**. In: Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas, TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds), Ed. Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, Brasília, p. 569-611, 1999.
- PETERSON, D. G.; PRICE, H. J.; JOHNSTON, J. S.; STACK, S. M. DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (*Lycopersicon esculentum*) pachytene chromosomes. **Genome**, v. 39, p. 77-82, 1996.
- PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S. M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue culture: breakdown if normal controls. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, p. 5222-5226, 1994.
- PRAÇA, M. M.; CARVALHO, R. C.; CLARINDO, W. R. A practical and reliable procedure for in vitro induction of tetraploid tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 122, p. 501-505, 2009.
- REYNOLDS, T. L. Pollen embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 1-10, 1997.
- RIZZA, F.; MENNELLA, G.; COLLONNIER, C.; SIHACHAKR, D.; KASHYAP, V.; RAJAM, M. V.; PRESTERÀ, M.; ROTINO, G. L. Androgenic dihaploids from somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. aethiopicum* group gilo as a source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. melongenae. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1022-1032, 2002.
- RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. R. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos in vitro. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 2, p. 159-167, 2004.

- ROY, B.; MANDAL, A. B. Anther culture response in indica rice and variations in major agronomic characters among the androclones of a scented cultivar, Karnal local. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 235-240, 2005.
- RUDOLF, K.; BOHANEK, B.; HANSEN, M. Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea var. capitata* L.: Genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. **Plant breeding**, v. 118, p. 237-241, 1999.
- SALAS, P.; PROHENS, J.; SEGUÍ-SIMARRO, J. M. Evaluation of androgenic competence through anther culture in common eggplant and related species. **Euphytica**, v. 182, p. 261-274, 2011.
- SEGUÍ-SIMARRO, J. M. Androgenesis revisited. **Botanical Review**, v. 76, p.377-404, 2010.
- SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; CORRAL-MARTÍNEZ, P.; PARRA-VEGA, V.; GONZÁLEZ-GARCÍA, B. Androgenesis in recalcitrante solanaceous crops. **Plant Cell Reports**, v. 30, p. 765-778, 2011.
- SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p.1119-1132, 2007.
- SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microsporederived embryogenesis. **Physiologia Plantarum**, v. 134, p. 1-12, 2008b.
- SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. Meiotic metaphase I to telophase II as the most responsive stage during microspore development for callus induction in tomato (*Solanum lycopersicum*) anther cultures. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, p. 675-685, 2005.

- SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, p. 358-369, 2008a.
- SHARIATPANAH, M. E.; BAL, U.; HEBERLE-BORS, E.; TOURAEV, A. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. **Physiologia Plantarum**, v. 127, p. 519-534, 2006.
- SHARP, W. R.; DOUGALL, D. K. Haploid plantlets and callus from immature pollen grains of *Nicotiana* and *Lycopersicon*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 98, p. 219-222, 1971.
- SHARP, W. R.; RASKIN, R. S.; SOMMER, H. E. The use of nurse culture in the development of haploid clones of tomato. **Planta**, v. 104, p. 357-361, 1972.
- SHIRDELMOGHANLOO, H.; MOIENI, A.; MOUSAVI, A. Effects of embryo induction media and pretreatments in isolated microspore culture of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Falat). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 6134-6140, 2009.
- SHTEREVA, L. A.; ZAGORSKA, N. A.; DIMITROV, B. D.; KRULEVA, M. M.; OANH, H. K. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 312-317, 1998.
- SILVA, T. C. R.; ABREU, I. A.; CARVALHO, C. R. Improved and reproducible flow cytometry methodology for nuclei Isolation from single root meristem. **Journal of Botany**, 2010, doi:10.1155/2010/320609.
- SINGH, R. J. **Plants cytogenetics**. Urbana, Illinois: University of Illinois, 391p, 1993.
- SMÝKAL, P. Pollen embryogenesis: the stress mediated switch from gamatophytic to sporophytic development; current status and future prospects. **Biologia Plantarum**, v. 43, p. 481-489, 2000.

- SMÝKAL, P.; VALLEDOR, L.; RODRÍGUEZ, R.; GRIGA, M. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 1985-1998, 2007.
- SNAPE, J. W. **Doubled haploid breeding: theoretical basis and practical applications**. In: Review of Advances in Plant Biotechnology, MUJEEB-KAZI, A., SITCH, L. A. (eds), Ed. CIMMYT and IRRI, Mexico, p. 19-30, 1989.
- SPOONER, D. M.; PERALTA, I. E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. **Taxon**, v. 54, p. 43-61, 2005.
- SRIVASTAVA, P.; CHATURVEDI, R. In vitro androgenesis in tree species: an update and prospect for further research. **Biotechnol Advances**, v. 26, p. 482-491, 2008.
- SUMMERS, W. L.; JARAMILLO, J.; BAILEY, T. Microspore developmental stage and anther length Influence the induction of tomato anther callus. **HortScience**, v. 27, p. 838-840, 1992.
- THIEM, B.; ŚLIWIŃKA, E. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) in vitro cultures. **Plant Science**, v. 164, p. 129-134, 2003.
- THOMAS, W. T. B.; FORSTER, B. P.; GERTSSON, B. **Doubled haploids in breeding**. In: Doubled haploid production in crop plants: a manual, MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K. J.; FORSTER, B. P.; SZAREJKO, I. (eds), Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 337-349, 2003.
- TOURAEV, A.; PFOSSER, M.; HEBERLE-BORS, E. The microspore: a haploid multipurpose cell. **Advances in Botanical Research**, v. 35, p. 53-109, 2001.
- WEDZONY, M.; FORSTER, B. P.; ZUR. I.; GOLEMIEC, E.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; DUBAS, E.; GOTEBIOWSKA, G. **Progress in doubled haploid technology in higher plants**. In: Advances in haploid production

- in higher plants, TORAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (eds), Ed. Springer, Austria, p. 1-33, 2009.
- WEESE, T. L.; BOHS, L. A three-gene phylogeny of the genus *Solanum* (Solanaceae). **Systematic Botany**, v. 32, p. 445-463, 2007.
- XIAO, H.; RADOVICH, C.; WELTY, N.; HSU, J.; LI, D.; MEULIA, T.; KNAAP, F. Integration of tomato reproductive developmental landmarks and expression profiles, and the effect of SUN on fruit shape. **BMC Plant Biology**, v. 9, p.1-21, 2009.
- YANPAISAN, W.; KING, N. J. C.; DORAN, P. M. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 3-27, 1999.
- ZAGORSKA, N. A.; SHTEREVA, L. A.; DIMITROV, B. D.; KRULEVA, M. M. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) - I. Influence of genotype on androgenetic ability. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 968-973, 1998.
- ZAGORSKA, N. A.; SHTEREVA, L. A.; KRULEVA, M. M.; SOTIROVA, V. G.; BARALIEVA, D. L.; DIMITROV, B. D. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). III. Characterization of the regenerants. **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 449-456, 2004.
- ZAMIR, D.; JONES, R. A.; KEDAR, N. Anther culture of male-sterile tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants. **Plant Science Letters**, v. 17, p. 353-361, 1980.
- ZIV, M.; HEDARY, D.; KEDAR, N. *Lycopersicon esculentum*: trifoliate plants recovered from anther cultures of heterozygous *tfff* plants. **Plant Cell Reports**, v. 3, p. 10-13, 1984.