

*Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Departamento de Genética*

*Cultura in vitro de anteras de soja:
o processo androgenético e
os fatores de estresse*

Ana Paula de Moraes

Orientadora: Eliane Kaltchuk dos Santos

Co-Orientadora: Maria Helena B. Zanettini

*Trabalho de conclusão apresentado
para obtenção do título de Bacharel
na área Molecular, Celular e
Funcional do Curso de Ciências
Biológicas.*

Dedicatoria

Ao meu pai.

Agradecimentos

"A todas as pessoas que colaboraram na realização deste trabalho durante esses dois anos, deixo aqui o meu **MUITO OBRIGADA** pelo apoio!"

À Eliane pelos ensinamentos, orientação e amizade!

À Maria Helena Zanettini;

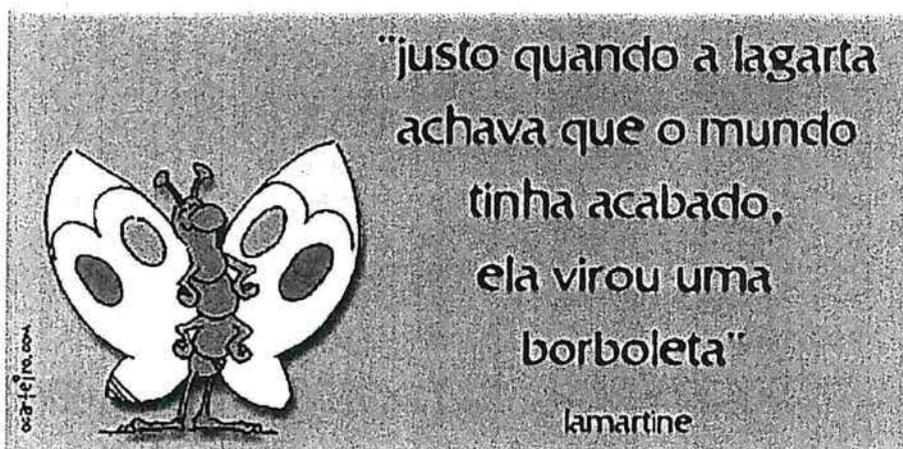
Ao Mozart;

À Sílvia;

À Milena Cardoso;

As amigas do LCTV Adri, Mi H., Lê, Clá, Tati, Sílvia, Raquel, Mi C., Jú, Ana Cristina e ao amigo Ricardo (vou sentir saudades dos nossos cafezinhos, bate-papos e futebol...);

Às amigas Dani, Cris, Ana, Ema, Mel e Aninha.



"justo quando a lagarta
achava que o mundo
tinha acabado,
ela virou uma
borboleta"

lamartine

Resumo

Neste trabalho são apresentados dados citológicos e de cultura *in vitro* relativos ao processo androgenético em soja. Análises citológicas de anteras *in situ* confirmaram o dimorfismo dos grãos de pólen em alguns cultivares de soja. Diferentes tratamentos de estresse (colchicina, choque térmico e carência de açúcar) foram investigados como possíveis promotores da androgênese. As análises das anteras cultivadas *in vitro* evidenciaram que a maior parte dos micrósporos sofre uma mitose assimétrica e segue a via gametofítica normal, porém alguns deles dividem simetricamente originando duas células idênticas, tomando uma rota androgenética. Foi observada também, a ocorrência micrósporos que passam por sucessivas mitoses formando estruturas multinucleadas ou multicelulares.

Os tratamentos de estresse testados não mostraram nenhuma clara evidência como promotores da embriogênese do micrósporo. A droga antimitótica colchicina não afetou a frequência de grãos de pólen multinucleados, porém, foi notada diferença significativa na presença de divisões simétricas em grãos de pólen incubados por dez dias em meio com esta droga. Os tratamentos de frio e calor não mostraram efeitos positivos na promoção de estruturas embriogênicas, sendo que nos diferentes tratamentos a frequência destas estruturas foi semelhante. O segundo experimento de choque térmico, que testou o efeito benéfico da incubação a 38°C por 3 ou 7 dias, mostrou que a temperatura de 25°C é a melhor para a indução androgenética. No tratamento de estresse por carência de carboidrato a indução de estruturas embriogênicas foi significativamente menor do que nos meios com carboidrato. Em todos os experimentos realizados foi possível verificar diferenças entre os cultivares utilizados, caracterizando a resposta genótipo-dependente da soja.

Índice

Capítulo I: Introdução.....	07
1.1 Considerações gerais.....	07
1.2 Importância e uso da haploidia.....	07
1.3 A cultura de anteras na produção de haplóides.....	09
1.4 Estratégias de desenvolvimento do micrósporo.....	11
1.4.1 A rota normal.....	11
1.4.2 A rota alternativa: androgênese.....	12
1.5 Divisão simétrica.....	15
1.6 Pólen P.....	15
1.7 Tratamentos de estresses.....	16
1.8 Cultura de anteras em soja.....	17
Capítulo II: Objetivos.....	19
Capítulo III: Polimorfismo de pólen em quatro cultivares de soja.....	20
Capítulo IV: Efeito da colchicina no desenvolvimento de micrósporos de soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill).....	24
Capítulo V: Estudos dos efeitos do choque térmico no processo androgenético.....	29
5.1 Effect of Temperature shock on soybean microspore embryogenesis.....	30
5.2 Efeito do choque de calor (38°C) na cultura de anteras em soja.....	49
Capítulo VI: Efeito do estresse por ausência de sacarose e diferentes concentrações de sacarose na indução da androgênese em <i>Glycine max</i> (L.) Merrill.....	55
Capítulo VII: Conclusões e Discussão Geral.....	58
Capítulo VIII: Referências Bibliográficas.....	61
Anexo I.....	67

Capítulo I: Introdução

1.1 Considerações gerais

A soja cultivada, *Glycine max* (L.) Merrill ($2n=40$), pertence ao subgênero *Soja*, da família das Leguminosas, subfamília Papilionoideae.

A partir da semente da soja são extraídos dois produtos primários: o óleo e a farinha. Ambos os produtos são extensivamente utilizados para consumo humano e, o último, também na alimentação animal (Christou *et al.*, 1990).

Segundo os dados referentes à safra de 1999/2000, o Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, produzindo 20,3% da soja mundial, o que representa 32,7 milhões de toneladas de grãos (FAO,2001). O estado do Rio Grande do Sul é responsável por 5,36 milhões de toneladas de grãos, sendo o terceiro estado produtor de soja do país (SECEX/MDIC; CONAB/MA, 2001).

1.2 Importância e uso da Haploidia

A haploidia refere-se à condição de uma célula ou organismo que possui um único conjunto de cromossomos, apresentando, portanto, a mesma constituição cromossômica dos gametas normais da espécie envolvida. A ocorrência de haplóides espontâneos já foi verificada na natureza, embora em frequências bastante baixas (Keller e Armstrong, 1979).

A produção de plantas haplóides é interessante para estudos básicos e aplicados em genética, melhoramento, evolução e biologia floral. Também no melhoramento genético de plantas cultivadas, a haploidia auxilia diminuindo o tempo e os gastos na obtenção de linhagens homozigotas.

No sistema convencional são necessários de 7 a 8 ciclos de autofecundação para estabilizar o genótipo pela fixação de genes em homozigose, com o uso de haplóides reduz-se o tempo para apenas uma geração. A planta haplóide é estéril, já que possui apenas metade do patrimônio genético da espécie; logo, é necessária a duplicação do seu número cromossômico, espontaneamente (por endomitose, fusão nuclear ou somática) ou, de forma induzida, pela aplicação de agentes antimitóticos como a colchicina. A planta originada, chamada de duplo-haplóide, é totalmente homozigota.

Ao eliminar o mascaramento causado pela heterozigose, a produção do duplo-haplóide traz outra vantagem: amplia a eficiência de seleção, tanto para caracteres qualitativos como quantitativos, facilitando a identificação de genótipos superiores. A geração de haplóides pode auxiliar na detecção de genes ligados a caracteres de herança quantitativa, selecionar traços recessivos e dominantes e possibilitar a construção de mapas gênicos baseados em marcadores moleculares e análise por RFLP (Fig. 1) (Atanassov *et al.*, 1995).

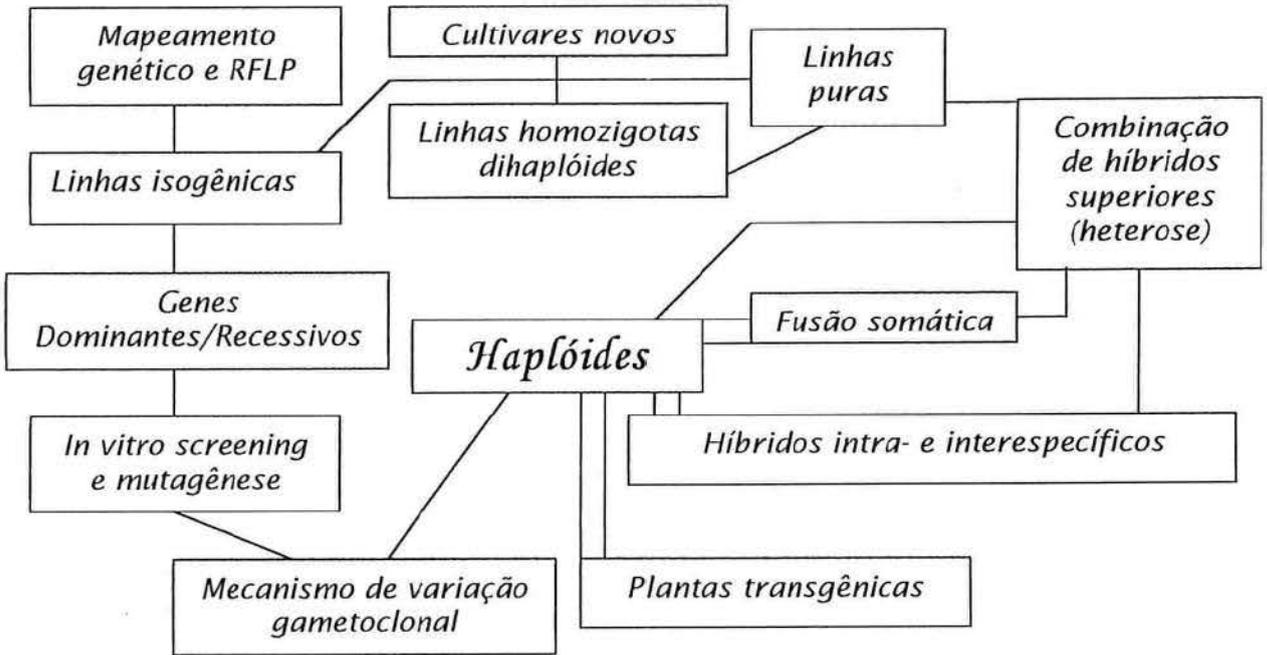


Fig.1: Aplicações de haplóides e duplo-haplóides (Atanassov *et al.*, 1995).

Entre os métodos utilizados para a produção de haplóides estão:

- @ gimnogênese – fenômeno na qual, após cruzamento interespecífico, há eliminação de todo o conjunto cromossômico de uma das espécies envolvidas. Resultados relevantes estão descritos para trigo, cevada e tabaco (Atanassov *et al.*, 1995);
- @ cultura de oosferas ou rudimentos seminiais - já realizada em arroz, milho, cana-de-açúcar, girassol, petúnia e batata doce (Peters *et al.*, 1999);
- @ cultura de anteras ou micrósporos – bem mais eficiente do que o método anterior, uma vez que o número de oosferas em um rudimento seminal é muito menor do que o número de micrósporos em uma antera. A obtenção de haplóides a partir de micrósporos se deve à possibilidade de alterar o seu desenvolvimento normal.

1.3 A cultura de anteras na produção de haplóides

A cultura de anteras foi descoberta ocasionalmente por Guha e Maheshwari em 1964 durante estudos de fisiologia da meiose em *Datura innoxia*. Desde então vêm sendo extensivamente utilizada, com sucesso, em programas de melhoramento de tabaco, cevada, trigo, triticale, arroz, milho, colza, couve e batata. A cultura de anteras é empregada para a obtenção de plantas haplóides em 247 espécies, 88 gêneros e 34 famílias (Peters *et al.*, 1999).

A metodologia da cultura de anteras compreende basicamente os seguintes passos:

- ⓐ coleta e esterilização de botões florais em estágio ideal para a produção de haplóides, o que varia de uma espécie para outra;
- ⓑ remoção cuidadosa das anteras e inoculação em meio de cultura contendo os nutrientes e os reguladores de crescimento necessários para a espécie em estudo;
- ⓒ incubação das anteras em câmara de crescimento com temperatura e luminosidade controladas.

A eficiência da cultura de anteras depende de fatores físicos, químicos e genéticos determinando, muitas vezes, falta de reprodutibilidade dos resultados. Os fatores mais importantes na cultura de anteras podem ser resumidos em:

☞ *Fisiologia da planta doadora*: a interação de fatores ambientais, como temperatura, luminosidade, fotoperíodo e nutrição, influencia na resposta androgenética do material. Algumas espécies apresentam uma melhor resposta quando a planta doadora é cultivada em baixa temperatura; em outras espécies, em alta temperatura. O desenvolvimento da planta doadora sob condições adversas tem também mostrado, em algumas espécies, um incremento na eficiência androgenética dos micrósporos. O suprimento de nitrogênio e a quantidade de etileno também parecem ser importantes (Peters *et al.*, 1999).

☞ *Estádio de desenvolvimento do micrósporo*: numerosos estudos têm mostrado que os micrósporos uninucleados são os mais responsivos para a maioria das espécies (Peters *et al.*, 1999). A eliminação de determinantes esporofíticos, necessária para o desvio da rota gametofítica, ocorre em duas fases: no início da meiose e antes da

primeira mitose do micrósporo (Grando *et al.*, 1997). Uma vez determinado o estágio ideal de desenvolvimento do micrósporo para indução da androgênese, a coleta adequada de botões florais pode ser auxiliada pelo uso de marcadores morfológicos, como por exemplo, o tamanho do botão.

☐ *Pré-tratamentos*: o pré-tratamento da planta doadora ou das inflorescências, donde serão excisadas as anteras, pode levar a acréscimos substanciais nas taxas de indução androgenética. Incubações a baixas e altas temperaturas são utilizadas em diferentes plantas aumentando a capacidade embriogênica dos micrósporos, embora seja afetada pelos hormônios endógenos nos tecidos da planta doadora (Atanassov *et al.*, 1995). O pré-tratamento aumenta a capacidade de sobrevivência dos grãos de pólen ao estresse, além de sincronizar a divisão celular, permitindo a formação de grãos de pólen binucleados simétricos com potencial embriogênico (Bobrowski e Peters, 2000).

☐ *Composição nutricional e hormonal do meio de cultura*: as concentrações de sais minerais, fonte de carbono, vitaminas, substâncias reguladoras de crescimento e o tipo e concentração do agente gelificante são espécie-específicas. Portanto, o melhor meio de cultura deve ser definido para cada espécie testada.

☐ *Genótipo*: o genótipo da planta doadora é um fator determinante na resposta androgenética *in vitro* (Atanassov *et al.*, 1995). Cultivares de uma mesma espécie podem possuir capacidades de indução e regeneração diferentes. Os requerimentos quanto ao pré-tratamento, à composição do meio de cultura e às condições físicas de crescimento, podem também variar enormemente de um cultivar para outro, sendo, portanto, necessário adequar os protocolos para cada caso.

☐ *Condições de cultura*: fatores como luz, fotoperíodo, temperatura, meio sólido/líquido e quantidade de anteras/micrósporos por placa, entre outros, influenciam na resposta *in vitro*.

Dados os efeitos que cada um dos fatores acima listados pode exercer na resposta androgenética, se faz necessário o estabelecimento das condições ideais para cada espécie a ser estudada e, até mesmo, para cada cultivar de uma mesma espécie.

1.4 Estratégias de desenvolvimento do micrósporo

O desenvolvimento do micrósporo segue uma seqüência regulada de eventos que pode ser dividida em dois distintos processos: a microsporogênese e a microgametogênese. A microsporogênese inicia com a meiose da célula-mãe-de-micrósporo (CMM) e termina com a formação do micrósporo uninucleado. A microgametogênese inicia com quando o micrósporo sofre a primeira divisão mitótica, dando origem a duas células (vegetativa e generativa) dentro da parede celular original (Raven, 1999).

O micrósporo possui um conjunto completo de informações genéticas que, sob determinados microambientes, pode ser estimulado a expressar-se de diferentes maneiras, seguindo ou uma via gametofítica (caminho normal) ou a via esporofítica (caminho não usual).

1.4.1 A rota normal:

A primeira fase do desenvolvimento, conhecida como microsporogênese, consiste na formação do micrósporo (o microgametófito) dentro do saco polínico da antera (o microsporângio); inicia com a meiose da CMM dando origem a quatro micrósporos que se liberam da tétrade, após a dissolução da calose que a envolve. Esta fase termina com a formação do microgametófito haplóide polarizado.

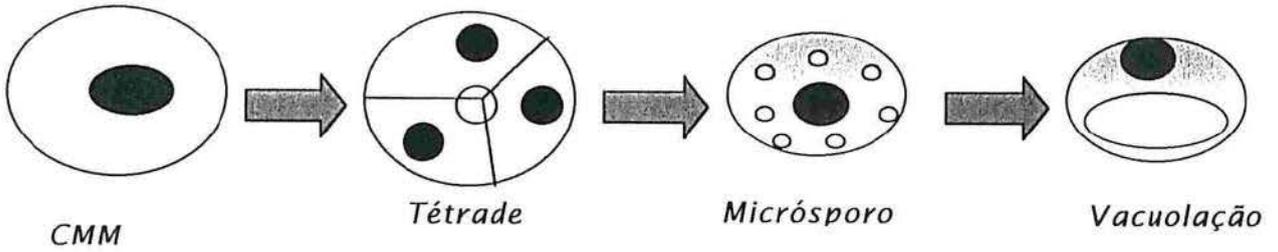
Os micrósporos desenvolvem uma parede interna conhecida como intina e uma parede externa resistente chamada de exina. Esta é composta por esporopolenina, que aparentemente é derivada do tapete (Raven, 1999).

O micrósporo liberado da tétrade possui núcleo grande, citoplasma denso, rico em ribossomos e com vários pequenos vacúolos. Os pequenos vacúolos fusionam-se formando um único grande vacúolo, que desloca o núcleo do micrósporo para a periferia. Fazendo, assim, com que a primeira divisão mitótica seja assimétrica (Fig. 2). Segundo Sax (1935), a diferenciação celular é inteiramente dependente da orientação do fuso mitótico e da posição do núcleo em relação à massa citoplasmática, estando indiretamente relacionada com a formação do vacúolo.

A divisão assimétrica faz com que a distribuição citoplasmática seja desigual entre as células-filhas fazendo com que tais células sejam estrutural e funcionalmente diferentes, apesar de possuírem o mesmo genótipo.

Microsporogênese

Eliminação parcial de determinantes esporofíticos - (Ponto1)



Microgametogênese

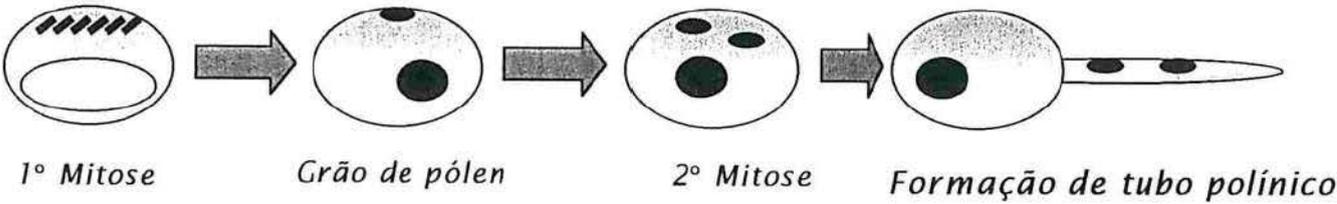


Fig. 2: Rota normal do desenvolvimento do micrósporo. A partir da meiose de uma célula-mãe-de-micrósporo (CMM) forma-se a tétrade, que libera quatro micrósporos. A fusão dos vacúolos de um micrósporo direciona o núcleo deste para a periferia, ocorrendo então, a primeira mitose do tipo assimétrica.

As células originadas apresentam, também, tamanhos diferentes, uma maior e outra menor (célula vegetativa e generativa, respectivamente). Em uma segunda mitose, a célula generativa divide-se, dando origem aos dois gametas masculinos (células espermáticas).

1.4.2 Rota Alternativa: androgênese

A capacidade androgênica refere-se à capacidade do micrósporo em alterar sua via de desenvolvimento em direção a uma rota esporofítica, na qual o micrósporo passa por sucessivas divisões mitóticas formando uma estrutura multicelular que resultará num embrióide.

Normalmente, o programa genético gametofítico é estabelecido pela célula vegetativa, resultando em uma intensa síntese de RNA e proteínas (Moraes-Fernandes *et al*, 1999). Para que ocorra o estabelecimento do programa esporofítico é necessário que os determinantes esporofíticos (RNA e ribossomos) não sejam eliminados. Durante o

desenvolvimento do micrósporo há dois pontos possíveis para a eliminação destes determinantes, na prófase da meiose I e na vacuolação do micrósporo inicial (Grando *et al.*, 1997).

Análises citológicas da segmentação inicial do micrósporo em diferentes espécies mostram a existência de cinco possíveis rotas para o desenvolvimento esporofítico-(Góralski *et al.*, 1999). A primeira divisão mitótica pode ser simétrica ou assimétrica, sendo que das cinco rotas descritas a seguir, as quatro primeiras iniciam com divisão assimétrica (Fig. 3):

Rota I: a célula vegetativa sofre divisões mitóticas dando origem ao embrióide, enquanto que a célula generativa degenera. Esta rota é, provavelmente, a mais comum em *D. innoxia*, cevada, trigo, soja e milho.

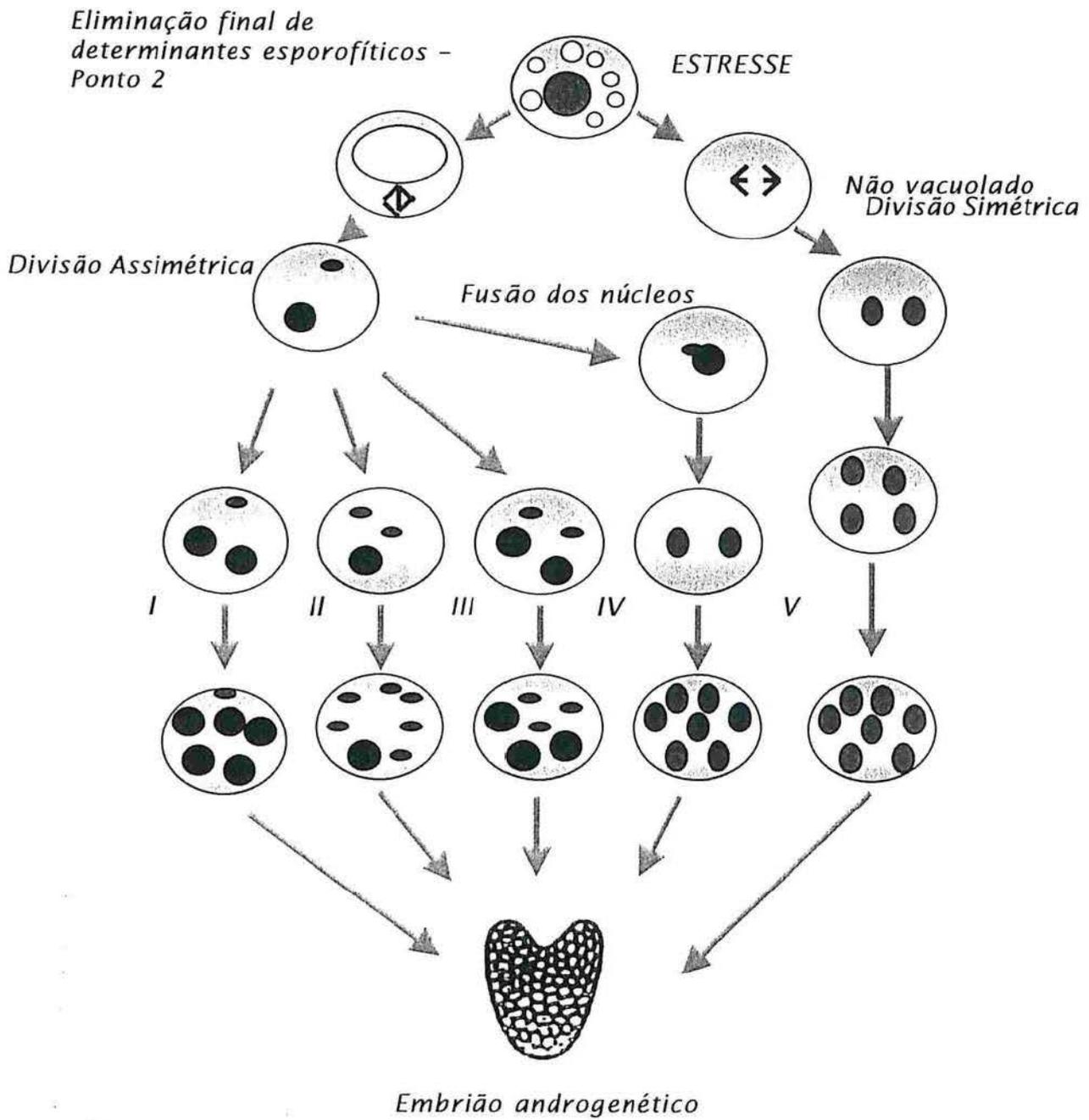
Rota II: apenas a célula generativa sofre sucessivas divisões mitóticas. Foi observada em *Hyoscyamus niger*, milho, arroz, cevada, tabaco, soja e trigo.

Rota III: tanto a célula vegetativa quanto a generativa sofrem divisões mitóticas contribuindo para a formação do embrióide. Foi verificada em *H. niger*, soja, tabaco e vários cereais.

Rota IV: ocorre fusão das células vegetativa e generativa e o núcleo formado divide formando o embrióide. Foi descrita para *Datura* e cevada.

Rota V: no lugar da divisão assimétrica, o micrósporo sofre uma divisão simétrica originando duas células iguais. Ambas as células (ou núcleos, caso não ocorra citocinese) passam por vários ciclos mitóticos e formam o embrióide. Foi observada em *Datura*, *Nicotiana sylvestris*, tabaco, arroz, soja, trigo e cevada.

Independentemente do padrão inicial de segmentação, o pólen sofre divisões tornando-se multicelular, o que leva ao rompimento de sua parede. Este tecido de forma irregular pode tomar duas possíveis direções: (1) formar um embrião globular que passa pelos estádios normais da embriogênese pós-globular; (2) proliferar e formar um calo que mais tarde se diferencia em plântula, via embriogênese ou organogênese (Bhojwani & Razdan, 1983).



Tipos de núcleos e o produto de suas divisões:

- Núcleo do micrósporo
 - Núcleo da célula vegetativa
 - Núcleo da célula generativa
 - Núcleo formado a partir da fusão dos núcleos das células vegetativa e generativa
 - Núcleo formado após divisão simétrica do micrósporo
-

Fig. 3: Possíveis rotas androgenéticas. Tratamentos de estresses no ponto 2 podem atuar na mudança de rota de desenvolvimento. Modificado a partir de Atanassov, 1995.

1.5 Divisão simétrica

As primeiras investigações quanto à origem dos embriões haplóides mostravam que o pólen que passa por mitose simétrica apresenta potencial androgenético, sendo ele, muitas vezes, responsável pela produção de embriões (Norrel, 1970). Estudos posteriores (para revisão ver Grando e Moraes-Fernandes, 1997) evidenciaram uma correlação entre divisões simétricas e produção de embriões haplóides.

Este pólen tem sua origem a partir da não formação do vacúolo ou da modificação no eixo de divisão da célula. Nesta mudança da ontogenia normal para uma via esporofítica os microtúbulos possuem papel fundamental, sendo que a reorganização destes é considerada necessária para que ocorra a alteração do desenvolvimento do micrósporo.

1.6 Pólen P

A partir de análises citológicas de anteras tem sido observada a existência de duas classes distintas de micrósporos quando corados com carmim. Os micrósporos normais que coram fortemente e um segundo tipo que é fracamente corado, menor (aproximadamente $\frac{3}{4}$ do tamanho normal), possui um ou dois núcleos sendo considerado embriogênico. Esta segunda classe especial de micrósporos é conhecida como “pólen E” (Sunderland & Wicks, 1969), “pólen S” (Horner & Street, 1978), ou ainda, “pólen P” (Heberle-Bors & Reinert, 1979).

A presença deste pólen P (pólen pré-mitótico) foi verificada em várias espécies como tabaco e trigo (Moraes-Fernandes *et al.*, 1999), além da soja (Kaltchuk-Santos *et al.*, 1993). O pólen P tem sido considerado um gametófito não funcional, caracterizando um tipo de macho esterilidade (Heberle-Bors, 1982).

A formação deste pólen P se dá durante a meiose da CMM quando não são eliminados os determinantes esporofíticos (partículas informacionais) que garantem a capacidade embriogênica do micrósporo, bloqueando o programa gametofítico. Essa capacidade seria adquirida somente durante a meiose, ou seja, os micrósporos seriam predeterminados à androgênese quando cultivados *in vitro* (Moraes-Fernandes *et al.*, 1999).

1.7 Tratamentos de estresse

O estresse tem sido considerado um sinal que pode levar à mudança na rota de desenvolvimento do micrósporo (Touraev *et al.*, 1996b), o que é possibilitado a partir de alterações no citoplasma causando uma reorganização estrutural. Alguns agentes de estresse comumente utilizados como promotores da androgênese são a colchicina, choque térmico (calor ou frio), carência de sacarose ou nitrogênio, irradiação e incubação em solução de manitol (Reynolds, 1997; Mardhorst *et al.*, 1997). O aumento na frequência de embriões após tratamentos de estresse já foi verificado em *D. innoxia* (Nitsch & Norreel, 1973), *Brassica napus* (Telmer *et al.*, 1993), tabaco (Touraev, 1996b), trigo (Touraev *et al.*, 1996) e batata (Bobrowski & Peters, 2000).

Durante o desenvolvimento do micrósporo há, pelo menos, dois grupos de genes transcritos: um primeiro grupo, que se expressa logo após a meiose e, um segundo grupo ativado na mitose. A mudança da transcrição do primeiro para o segundo grupo de genes representa uma fase crítica da microgametogênese e pode ser uma importante fase na indução da androgênese (Reynolds, 1997).

O modelo proposto para explicar o papel dos tratamentos de estresse na embriogênese do micrósporo sugere que a união reversível de proteínas de choque térmico com RNA citoplasmático forma agregados de proteína de choque térmico com mRNAs e elementos do citoesqueleto próximo da região do núcleo, protegendo o mRNA da tradução. Desta forma, o RNA mensageiro necessário para a diferenciação do grão de pólen é “seqüestrado”, fazendo com que o desenvolvimento gametofítico seja evitado e possibilitando o desvio para a rota esporofítica (Telmer *et al.*, 1995).

Pré-tratamentos com baixas temperaturas em anteras *in vitro* resultam na desestruturação dos microtúbulos dos micrósporos, o que leva à alteração na organização do fuso gerando grãos de pólen binucleados simétricos. A colchicina também induz divisões simétricas nos micrósporos a partir de alterações nos microtúbulos. Este composto se liga a heterodímeros (α - β -tubulinas) causando a despolimerização dos microtúbulos e impedindo o desenvolvimento do micrósporo.

Tem sido verificada a presença de proteínas de estresse em tratamentos de choque térmico. Micrósporos e grãos de pólen competentes para embriogênese mostram um aumento na síntese de HSP70 (Binavora *et al.*, 1997). Grânulos eletro-densos na interface da membrana plasmática/parede celular também têm sido verificados em

micrósporos potencialmente embriogênicos em *B. napus* submetidos a choque térmico (Telmer *et al.*, 1995). O aparecimento de transcritos de HSPs pode ser usado como um marcador para estimar o nível de estresse necessário para induzir grãos de pólen jovens a alterar sua via de desenvolvimento, uma vez que a indução de androgênese não ocorre sem que haja a transcrição de genes de HSPs (Smýkal & Pechan, 2000).

Todavia, em espécies recalcitrantes na cultura de anteras os tratamentos de estresse, algumas vezes, não conseguem induzir a rota androgenética.

1.8 Cultura de anteras em soja

De acordo com estudos realizados por Matsubayashi e Kuranuki, 1975, a soja tem sido considerada não responsiva à cultura de anteras; todavia, alguns trabalhos registram a obtenção de calos, plântulas e plantas regeneradas (Tang, 1973; Yao *et al.*, 1996; Kaltchuk-Santos, 1997, 1999). Os primeiros calos embriogênicos obtidos pela cultura de anteras foram registrados pelo grupo do Dr. Yin, do Laboratório de Genética do Soybean Reserch Institute, sem, contudo, conseguir plântulas maduras (Yin *et al.*, 1980).

Devido à importante interação genótipo X meio de cultura (Jian *et al.*, 1968), é necessário que se estabeleça o meio mais adequado para cada cultivar. Fatores como pré-tratamento a frio e reguladores de crescimento (2,4-D e BAP) já foram testados mostrando que, para a soja, o pré-tratamento de frio não exerce influência e que é necessária a presença de reguladores de crescimento no meio de indução (2.0 mg/L de 2,4-D e 0.5 mg/L de BAP) (Kaltchuk-Santos *et al.*, 1997).

Diferentes concentrações de sacarose no meio (9% e 12%) foram testadas, mostrando que 9% de sacarose induz uma melhor resposta (E. Kaltchuk-Santos, comunicação pessoal). O tipo de meio de indução também foi testado: anteras foram inoculadas em meio B5 e B5 longo (Carolina Biological Supply Co.), ambos sólidos e suplementados com aminoácidos de Yeung (Yeung & Sussex, 1979), 2.0mg/L de 2,4-D, 0.5mg/L de BAP, 9% de sacarose e 0.25% de Phytigel[®]. Não foi observada nenhuma diferença na taxa de indução de divisões simétricas e formação de estruturas multinucleadas (Cardoso, 2002).

Estudos de citologia realizados em nosso laboratório verificaram a presença de pólen P em anteras de soja (Kaltuchuk-Santos *et al.*, 1993).

A formação de grãos de pólen embriogênicos pode ocorrer a partir de mitose assimétrica ou simétrica. Cortes histológicos das anteras *in vitro* mostraram o desenvolvimento de tecido androgenético a partir do lóculo da antera (Kaltchuk-Santos *et al.*, 1997).

O estágio de desenvolvimento do micrósporo é outra característica importante na cultura de anteras. Em trabalho desenvolvido pelo nosso grupo foi verificado que o tamanho do botão floral está relacionado com a fase de desenvolvimento do micrósporo, sendo que a relação tamanho do botão X estágio de desenvolvimento do micrósporo varia entre os cultivares. Foi observado também que as dez anteras de um mesmo botão floral não estão no mesmo estágio de desenvolvimento (Lauxen *et al.* 1998). Análise citológica de botões de diferentes tamanhos não mostrou diferença significativa quanto à quantidade de grãos de pólen com divisão simétrica e multinucleados (Cardoso, 2002).

Capítulo II: Objetivos

O presente trabalho visa contribuir para o entendimento da androgênese em cultivares de *Glycine max* (L.) Merrill.

Este estudo teve como objetivos:

1. Estudar o polimorfismo na população de micrósporos de alguns cultivares;
2. Analisar o efeito de alguns tratamentos de estresse – colchicina, frio, calor e carência de sacarose – na promoção da embriogênese do micrósporo;
3. Investigar o efeito do genótipo na resposta androgenética mediante o uso de diferentes cultivares de soja.

Capítulo III: Polimorfismo de pólen em quatro cultivares de soja

1. Introdução

Análises citológicas feitas em várias espécies vegetais têm mostrado uma diversidade de classes de grãos de pólen formados pela microsporogênese. Destaca-se a presença de pólen P, importante para o processo androgenético, e de micropólen. O pólen P é pequeno, fracamente corado e com desenvolvimento atrasado em relação aos normais, sendo que já foi descrito em soja (Kaltchuk-Santos *et al.*, 1993). Este pólen é considerado uma das possíveis rotas da embriogênese do micrósporo, assim como uma das principais rotas na formação de embriões haplóides. O micropólen é bem menor que o pólen P e resulta, provavelmente, de erro na meiose, sendo portanto, inviável. Acredita-se que algum cromossomo ou pedaço de cromossomo que não migre corretamente para nenhum dos pólos forme um micropólen. Eles podem ser observados dentro das tétrades junto aos quatro micrósporos, sendo conhecidos, neste estágio, com micronúcleo.

2. Material e Métodos

Neste trabalho foram analisados quatro cultivares de *Glycine max* (L.) Merrill (IAS 5, BRS 133, Bragg, MG\BR-46) quanto aos produtos da microsporogênese. Os botões florais foram coletados de plantas crescidas a campo e fixados em 3:1 (etanol absoluto:ácido acético glacial).

As anteras retiradas dos botões florais foram esmagadas em carmim propriônico, cobertas com lamínulas e seladas com cera de abelha e breu (1:4). Foram analisados oito botões de cada cultivar em fotomicroscópio Zeiss Axioplan Universal com lente objetiva de 40X, sendo que as medições foram realizadas com lente objetiva de 100X.

A análise estatística dos dados referentes a quantidades de grãos de pólen utilizou teste de Chi-quadrado e para tamanho, ANOVA. As médias foram diferenciadas pelo teste de Duncan.

3. Resultados & Discussão

A análise citológica das anteras *in situ* detectou a presença de duas classes de grãos de pólen:

- (a) Grãos de pólen normais: representam a maior parte dos grãos de pólen encontrados. Possuem coloração intensa e duas células de tamanhos diferentes.
- (b) Grãos de pólen anormais: nesta classe encontra-se o pólen P (Fig.1) e o micropólen (Fig. 2 e 3).

A análise da quantidade de grãos de pólen mostrou que os cultivares diferem entre si ($X^2=153.654$, $p<0.001$), estando distribuídos em três grupos (Tabela 1):

Grupo 1: cultivares BRS 133 e IAS 5. Estes cultivares apresentaram mais grãos de pólen normais e menos anormais do que o esperado.

Grupo 2: cultivar Bragg. Este cultivar apresentou quantidade de grãos de pólen normais e anormais de acordo com o esperado.

Grupo 3: cultivar Conquista. Este cultivar apresentou menos grãos de pólen normais e mais anormais do que o esperado.

Tabela 1: Análise dos desvios ajustados (desvios dos valores esperados) da quantidade de grãos de pólen nos quatro cultivares analisados.

<i>CULTIVAR</i>	<i>PÓLEN NORMAL</i>	<i>PÓLEN P</i>	<i>MICROPÓLEN</i>
<i>Bragg</i>	0.87	0.64	0.37
<i>Conquista</i>	-11.6	4.40	5.78
<i>BRS 133</i>	4.06	-2.09	-3.20
<i>IAS 5</i>	5.52	-2.47	-2.49

$p<0.05$ se o resíduo >1.96 ou <-1.96 ; $p<0.01$ se o resíduo >2.58 ou <-2.58 .

A análise do tamanho dos grãos de pólen foi feita tomando-se como medidas o diâmetro do pólen -Ø- e a distância entre poros -DEP- (Fig.4). Os cultivares IAS 5 e Conquista não diferiram em nenhuma das medidas e apresentaram grãos de pólen binucleados maiores que os demais cultivares (Tabela 2). Os grãos de pólen do cultivar BRS 133 foram intermediários em tamanho e os do cultivar Bragg foram os menores.

A análise do tamanho dos grãos de pólen anormais mostrou que, para pólen P, apenas o diâmetro do cultivar BRS 133 diferiu e, para micropólens, apenas a medida de DEP do cultivar Bragg diferiu das demais. A cultivar BRS 133 não apresentou esta classe de pólen.

Tabela 2: Tamanho, em micrômetros, de grãos de pólen normais e anormais (tipo P e micropólen) de quatro cultivares de soja.

	PÓLEN NORMAL		PÓLEN P		MICROPÓLEN	
	DEP (μm)	\emptyset (μm)	DEP (μm)	\emptyset (μm)	DEP (μm)	\emptyset (μm)
<i>Bragg</i>	20.85 C	23.34 C	19.30 A	20.50 A	13.83 A	13.33 A
<i>BRS 133</i>	21.53 B	24.23 B	17.50 A	13.00 B	--	--
<i>Conquista</i>	22.21 A	24.75 A	19.48 A	21.10 A	11.47 B	13.29 A
<i>IAS 5</i>	22.32 A	25.08 A	19.14 A	21.00 A	11.33 B	12.56 A

As médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p=5\%$).

A teoria do “pólen P” foi desenvolvida por Herbele-Bors e Reinert (1979) em tabaco, e desde então, este tipo de pólen já foi descrito para uma série de espécies, entre elas a soja (Kaltchuk, 1993). Os resultados encontrados neste trabalho reforçam a presença do pólen P em soja e verificando a sua presença nos quatro cultivares analisados. Os micropólens observados representam um tipo de macho-esterilidade resultante de erros na meiose. O cultivar BRS 133 não apresenta micropólen indicando que este cultivar apresenta uma maior estabilidade meiótica que os demais cultivares e, provavelmente, uma fertilidade mais alta.

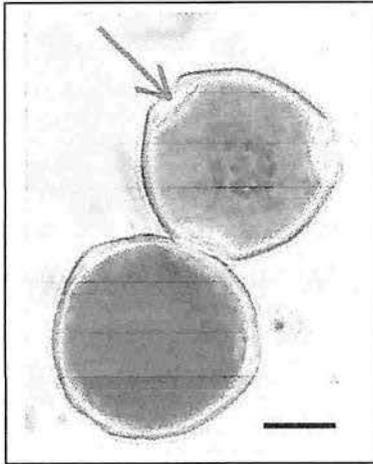


Fig. 1: Pólen P (seta).
Barra = 10 μ m.

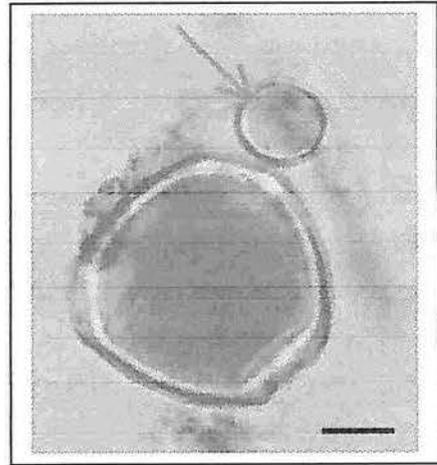


Fig. 2: Micropólen (seta).
Barra = 10 μ m.

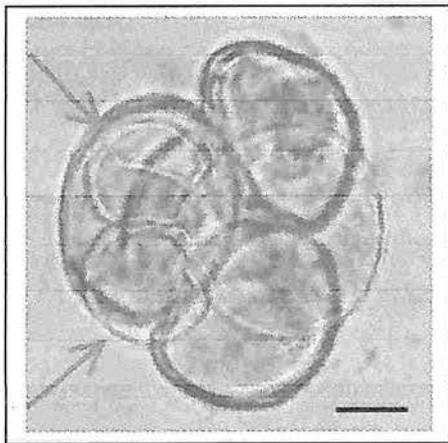


Fig. 3: Dois micrócitos dentro de uma tétrede (setas). Barra = 10 μ m.

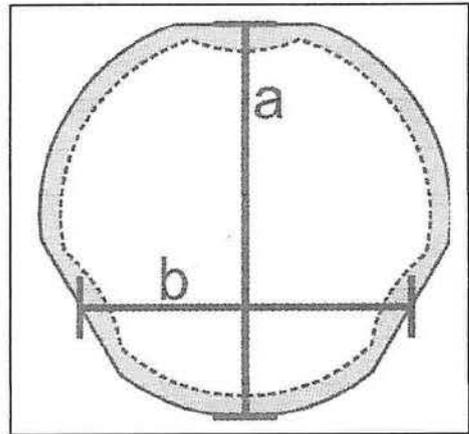


Fig. 4: Medidas do grão de pólen a- diâmetro, b: distância entre poros (DEP).

Capítulo IV: Efeito da colchicina no desenvolvimento de micrósporos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

1. Introdução

A ontogenia normal do micrósporo depende da manutenção da morfogênese celular. Alterações na estrutura dos microtúbulos da célula comprometem a localização das organelas e resultam em mudanças morfológicas. O agente antimitótico colchicina age diretamente na estrutura dos microtúbulos impedindo a adição de dímeros aos microtúbulos resultando na sua despolimerização, acarretando, assim, o desenvolvimento anormal do micrósporo (Zhao *et al.*, 1996; Kaltchuk-Santos *et al.*, 2002). Desta forma, a colchicina é considerada promotora da embriogênese dos micrósporos através da reorganização do citoesqueleto e aumentando o número de divisões simétricas, assim como a formação de embriões. Alguns autores já comprovaram o efeito benéfico da colchicina na androgênese (Tanaka & Ito, 1981; Wan *et al.*, 1989; Barnabás *et al.*, 1991; Zaki & Dickinson, 1991, 1995; Iqbal *et al.*, 1994; Szackács & Barnabás *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1996).

O objetivo deste estudo foi observar possíveis mudanças no desenvolvimento dos micrósporos de anteras incubadas com colchicina.

2. Material e Métodos

A cultura *in vitro* das anteras com tratamento de colchicina foi realizada durante o doutorado da Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos, conforme descrito abaixo:

• Botões florais do cultivar IAS 5 crescido em campo, foram coletados e submetidos ao pré-tratamento de frio (4°C) durante cinco dias;

• Os botões com 3.0-3.5 mm de comprimento foram desinfestados (de acordo com Kaltchuk-Santos *et al.*, 1997) sendo as dez anteras dos botões excisadas e inoculadas em meio de indução;

• Foram inoculadas 100 anteras por placa de petri em meio de indução (Kaltchuk-Santos *et al.*, 1997). Ao meio foi adicionada colchicina nas seguintes concentrações: 0, 100, 200 e 400 mg/L. As anteras permaneceram em contato com este meio durante 24 ou 72 horas. Foram preparadas quatro placas por tratamento. Após o período do tratamento, as anteras foram transferidas para meio fresco sem colchicina;

Nos dias 0, 5, 10 e 15 foram coletadas seis anteras de cada placa e fixadas em etanol absoluto:ac. acético glacial (3:1) para análises citológicas.

Para a realização do presente estudo foram usadas as anteras coletadas, conforme descrito acima, a partir das quais foram confeccionadas as lâminas para análise citológica.

As anteras fixadas foram esmagadas em carmim propriônico, cobertas com lamínula e seladas com luto (breu e cera de abelha). As lâminas foram analisadas e os micrósporos classificados em fotomicroscópio Zeiss Axioplan Universal.

A análise estatística dos dados foi realizada ao término do experimento. Para a variável grãos de pólen binucleados simétricos foi realizada análise de variância, sendo necessário transformar os dados ($\log(y+0.01)$). As médias foram comparadas através do teste de Tukey ($\alpha=0.05$). Para a variável grãos de pólen multinucleados não foi possível realizar análise de variância, sendo então realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

3. Resultados & Discussão

As análises citológicas mostraram que grãos de pólen binucleados simétricos - PII_{sym}- (Fig. 1) podem ser observados no momento da inoculação. A ocorrência deste tipo de pólen em soja foi descrita em estudo anterior em nosso laboratório (Kaltchuk-Santos *et al.*, 1993). A quantidade de grãos de pólen binucleados simétricos aumentou durante o período de cultura, sendo verificada diferença entre o décimo dia de coleta e os demais ($F= 8.92$, $p>0.0001$). Todavia, grãos de pólen multinucleados/multicelulares (Fig. 2) não foram observados no momento da inoculação, sendo detectados a partir da coleta do quinto dia. Para esta variável não foi detectada nenhuma diferença, seja entre datas de coletas, seja quanto à concentração de colchicina no meio (Tabela 1).

A partir destes resultados não foi possível detectar nenhuma evidência quanto ao papel promotor da colchicina na androgênese.

Dados obtidos em *Brassica* (Zaki & Dickinson, 1991, 1995; Iqbal *et al.*, 1994) também não mostraram efeito promotor da colchicina, assim como em trigo (Ghaemi *et al.*, 1994). Os autores Zaki & Dickinson (1995) verificaram a dependência do genótipo na resposta ao tratamento com colchicina. Em cultivares recalcitrantes, o aumento na

proporção de estruturas derivado do micrósporo foi muito baixo. No presente estudo foi testado um único cultivar, IAS 5, que talvez não seja sensível ao efeito da colchicina. Além do cultivar, a resposta à colchicina também é dependente do estágio de desenvolvimento do micrósporo. No nosso trabalho, o tamanho do botão foi utilizado como indicador da fase de desenvolvimento, mas as diferentes anteras de um mesmo botão diferem no estágio de desenvolvimento de seus micrósporos. Assim, a baixa resposta embriogênica do cultivar IAS 5 pode ser parcialmente atribuída à heterogeneidade da população de micrósporos de seus botões florais.

Considerando que muitos dos trabalhos que empregaram a colchicina utilizaram a cultura de micrósporos, é possível que o uso da metodologia de cultura de anteras tenha dificultado o contato dos micrósporos com o referido agente antimitótico, dificultando, portanto, a avaliação de seu efeito.

Obs.: Este capítulo faz parte do artigo **Microspore embryogenesis in soybean: the effects of colchicine treatment**. Kaltchuk-Santos, E., Moraes, A.P., Mundstock, E., Bodanese-Zanettini, M.H., enviado para a revista *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, com cópia ao final deste relatório (anexo 1).

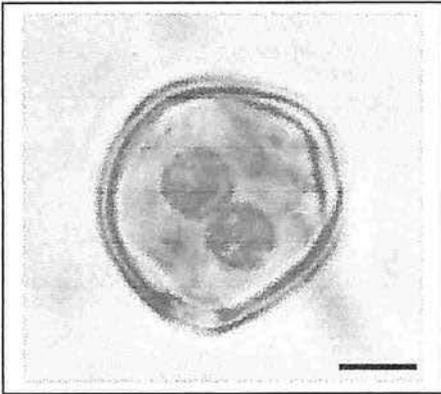


Fig. 4.1: Pólen bi-nucleado simétrico.
Barra= 10 μ m.

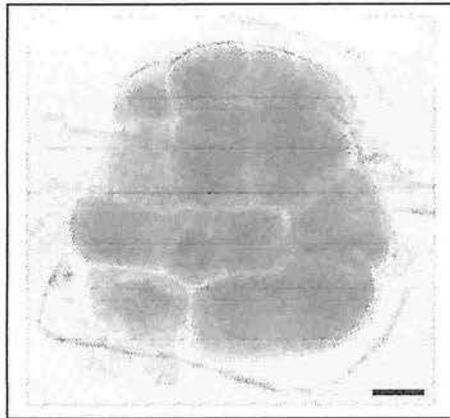


Fig. 4.2: Pólen multinucleado. Barra= 10 μ m.

Tabela 1: Efeito da colchicina na cultura de anteras em soja.

Tratamentos		Controle			5 dias			10 dias			15 dias		
A	B	N ^º	Pllsym ^º	Pmult. ^º	N ^º	Pllsym ^º	Pmult. ^º	N ^º	Pllsym ^º	Pmult. ^º	N ^º	Pllsym ^º	Pmult. ^º
0	24	7395	0.3	0	7980	0.65	0.18	10333	0.82	0.05	9805	0.14	0.04
100	24	9570	0.7	0	8711	0.26	0.02	8470	0.18	0.02	7188	0.32	0.08
200	24	9329	0.45	0	8030	0.55	0.16	8974	0.38	0.04	8865	0.54	0.08
400	24	9940	0.13	0	8829	0.22	0.01	8694	0.87	0.21	8917	0.09	0.02
0	72	3341	0.06	0	7417	0.59	0.01	9292	0.88	0.36	7660	0.14	0.07
100	72	5574	0.02	0	9363	0.14	0	10012	0.55	0.51	7551	0.26	0.05
200	72	4659	0.82	0	7409	0.07	0.01	7562	0.71	0.19	8413	0.36	0.08
400	72	5572	0.02	0	5896	0.31	0.02	5697	1.21	0.53	5881	0.1	0

Tratamentos: A-concentração de colchicina (mg/L), B-duração da exposição (hrs.); ①=total de micrósporos; ②= porcentagem de Pllsym; ③= porcentagem de grão de pólen multinucleado

Capítulo V: Estudos dos efeitos do choque térmico no processo androgenético

V.1 - Trabalho a ser submetido para a revista *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*

V.2 - Efeito do choque térmico (38°C) na cultura de anteras em soja

Effect of temperature shock on soybean microspore embryogenesis

Effect of temperature shock on soybean

Ana Paula de Moraes¹, Maria Helena Bonadese-Zanettini¹, Sídia Callegari-Jacques²,
Eliane Kaltchuk-Santos^{1*}

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
RS, Brasil

²Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto
Alegre, RS, Brasil

* Correspondence and reprints: Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, C.P. 15053, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil.

eliane.kaltchuk@ufrgs.br

Telephone: 00 55 51 3316 6742; Fax number: 00 55 51 3316 7311

3.2 Citological analysis

This experiment investigated whether a heat or a cold shock treatment, would be effective to induce the formation of bi-nucleated symmetrical and multinucleate pollen grains (Fig. 4a,b,c,d,e) in soybean, both of them with androgenetic potential. Indeed, the statistical analysis showed that is not possible differ the treatments without consider cultivars and days of culture (Table 1).

The differences were detected at 15 days of culture for symmetrical bi-nucleated and multinucleate pollen. Cultivar RS 7 incubated at 25 and 33°C showed more symmetrical bi-nucleate pollen than Década incubated at 4°C. For multinucleated pollen, RS 7 incubated at 25°C showed higher frequencies than Bragg/Década incubated at 4°C and IAS 5/Década/BR 4 incubated at 25°C.

Our results did not provide any evidence to conclude what is the best temperature to induce symmetrical divisions and/or multinucleate pollen formation in soybean. In the present analysis it was observed that multicellular structures can be formed not only by symmetrical division of microspore, but also from vegetative cell after assymetric mitosis (Fig. 4f).

Discussion

Data obtained in the present study shows that treatments at 4 and 33°C for four days had decrease embryo yield. Keller & Armstrong (1979) tested treatment at 30 and 35°C to *Brassica campestris*. The first treatment decrease embryo yield, but the second stimulated the frequency of embryogenesis.

Smykal (2000) showed that, in *B. napus*, two conditions are important to trigger embryogenesis: a) *in vitro* temperature must be near to the physiological limit of the plant and, b) temperature of microspores *in vitro* should be 10 - 12°C higher than the temperature of donor plant growth. In the present study it was tested only one high temperature, 33°C, which might not be sufficiently elevated and, probably a higher temperature would increase the frequency of embryogenesis.

According to some authors, induction of cell division is an independent process from the determination of embryogenesis. In *Tulipa* microspores exposed to colchicina treatment the asymmetry of the first mitosis was lost and division continued but embryos were not formed (Telmer *et al.*, 1995). Touraev (1996A) showed that multicellular structures could be formed after assymetric mitosis indicating that symmetry of microspore *in vitro* is not essential for embryogenic induction.

Acknowledgment

This study was supported in part by CNPq, FAPERGS and PROPESQ.

References

- Binavora, P.; Hause, G.; Cenklová; Cordewener, J.H.G.; Van Lookeren Campagne, M. M. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sex Plant Reprod.* 10: 200-208; 1997.
- Buchheim, J.A.; Colburn, S.M.; Ranch, J.P. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol.* 89: 768-775; 1989.
- Custer, J.B.M.; Cordewener, J.H.G.; Nöllen, Y.; Dons, H.J.M.; van Lookeren Campagne, M. M. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore culture of *Brassica napus*. *Plant Cell Reports.* 13: 267-271; 1994.
- Fan, Z.; Armstrong, K.C.; Keller, W.A. Development of microspores *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* L. *Protoplasma.* 147: 191-199; 1988.
- Finer, J.J.; McMuller. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissues. *In Vitro Cell. and Development Biology.* 27P., p.175-182, 1991.
- Góralski, G.; Matthys-Rochon, E.; Vergne, P.; Przywara, L. Androgenic development: a fascinating embryo formation process. *Acta Biologica Cracoviensia Serie Botanica* 41: 51-65; 1999.
- Guha, S.; Maheshwari, S.C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497; 1964.
- Indrianto, A; Herbele-Bors, E.; Touraev, A. Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. *Plant Science* 143 (1):71-79; 1999.

Kaltchuk-Santos, E.; Mariath, J.E.; Mundstock, E.; Zanettini, M.H.B. Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.* 49:107-115;1997.

Pechan, P.M.; Keller, W.A. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol Plant* 74: 377-384; 1988.

Santos, K.G.B. Embriogênese somática em soja (*Glycine max* (L.) Merrill); efeito do genótipo, do etileno e ontogenia dos embriões. Porto Alegre, RS, 1996. 98p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.

Smýkal, P.; Pechan, P.M. Stress, as assessed by the appearance of sHsp transcripts, is required but not sufficient to initiate androgenesis. *Physiologia Plantarum*. Copenhagen, 110:135-143, 2000.

Telmer, C.A., Newcomb, W.; Simmonds, D.H. Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas. *Protoplasma* 185: 106-112; 1995.

Touraev, A.; Ilham, A.; Vicente, O.; Heberle-Bors, E. Stress as the major signal controlling the developmental of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embriogenesis. *Planta* 200: 144-152; 1996A.

Touraev, A.; Ilham, A.; Vicente, O.; Heberle-Bors, E. Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: na optimized system for molecular studies. *Plant cell reports* 15: 561-565; 1996B.

Touraev, A.; Indrianto, A.; Wratschko, I.; Ilham, A.; Vicente, O.; Heberle-Bors, E. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sex Plant Reprod* 9: 209-215; 1996.

Zaki, M.A.M.; Dickinson, H.G. Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus*. *Protoplasma* 156: 149-162; 1990.

Zaki, M.A.M.; Dickinson, H.G. Microspore-derived embryos in *Brassica*: the significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. *Sex. Plant Reprod.* 4: 48-55; 1991.

Zaki, M.A.M.; Dickinson, H.G. Modification of cell development *in vitro*: the effect of colchicine on anther and isolated microspore culture in *Brassica napus*. *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.* 40: 255-270; 1995.

Tables

Table 1: Statistical analysis of symmetrical and multinucleate pollen.

	<i>DF</i>	<i>F value</i>	<i>Pr > F</i>
<i>Pollen symmetrical</i>	45.00 ^a /78.7298 ^b	4.91	<0.0001
<i>Pollen multinucleate</i>	34.00 ^a /60.4207 ^b	1.91	<0.0139

DF- degrees of freedom (a-model, b-error), F value- value of Welch's ANOVA test. Both test was for cultivars*temperature*collection.

Figure legends

Fig. 1: Mean of total calli produced per cultivar, independent of the treatment, at 60th day in culture. Cultivar with same letter do not differ to $\alpha=0,05$.

Fig. 2: Structures formed in culture after 60 days. a - trumpet-like appearance, b, c, and f- fused cotyledonous, e- many forms in one calli (trumpet-like appearance and cotyledonous). Barr = 1 mm.

Fig. 3: Plantlet with leaves formed in culture. Cultivar IAS 5. Barr = 1 mm.

Fig. 4: Symmetrical and multinucleated pollen. a- symmetrical pollen; b, c, d and e-

Figures

Fig. 1:

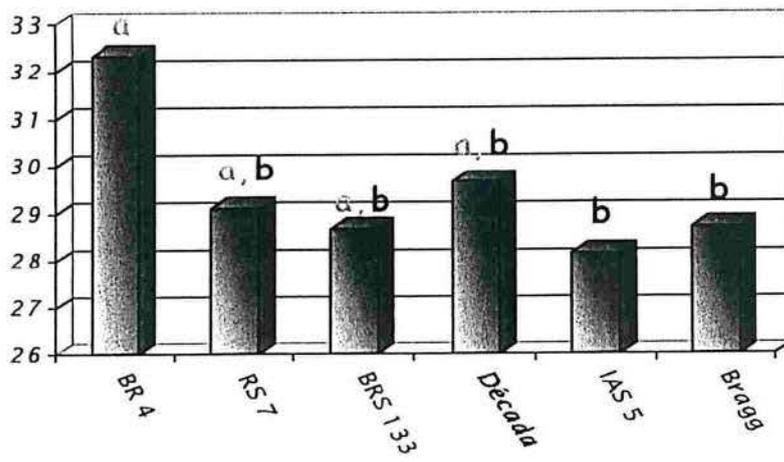


Fig. 2:

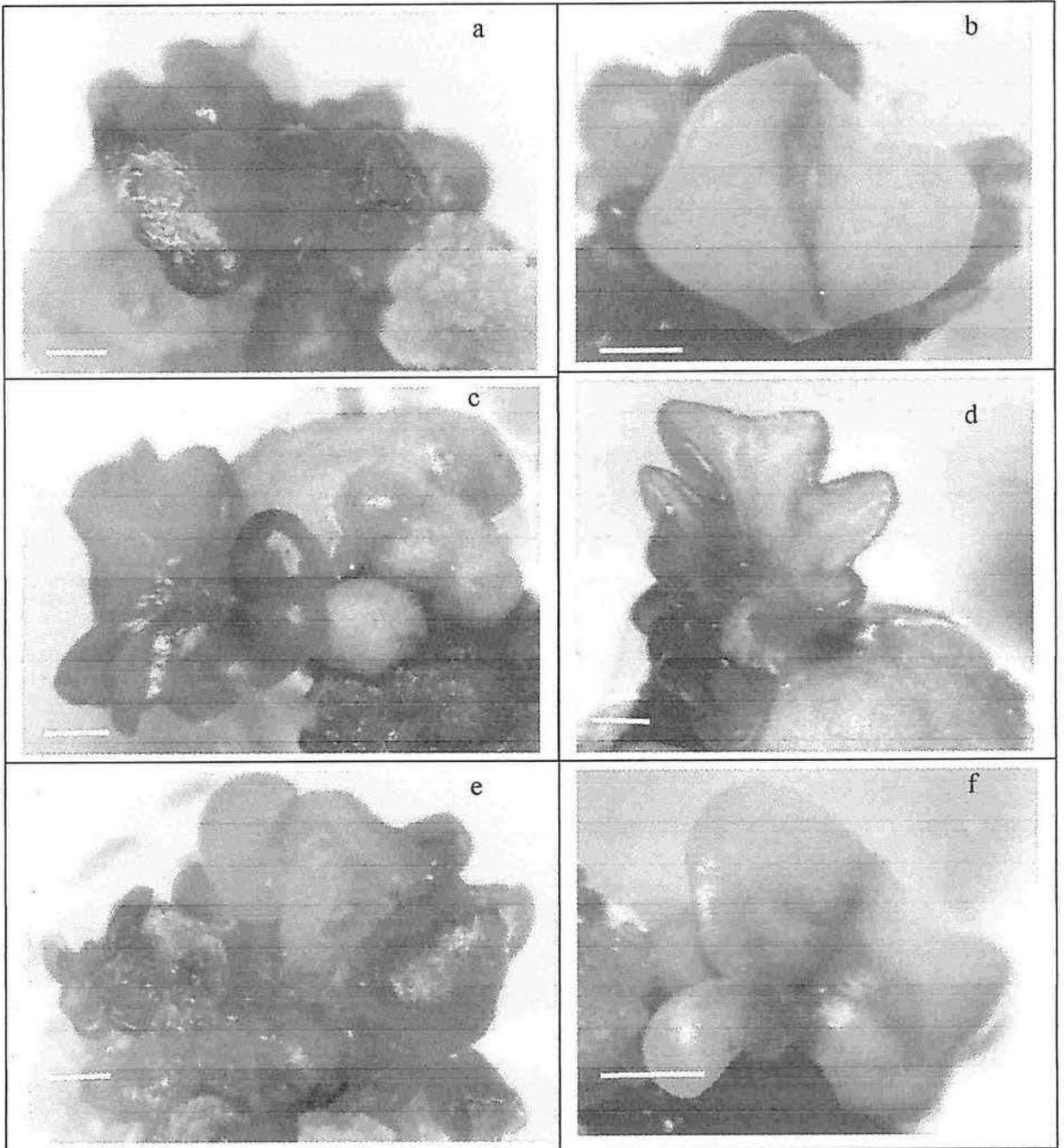


Fig. 3:

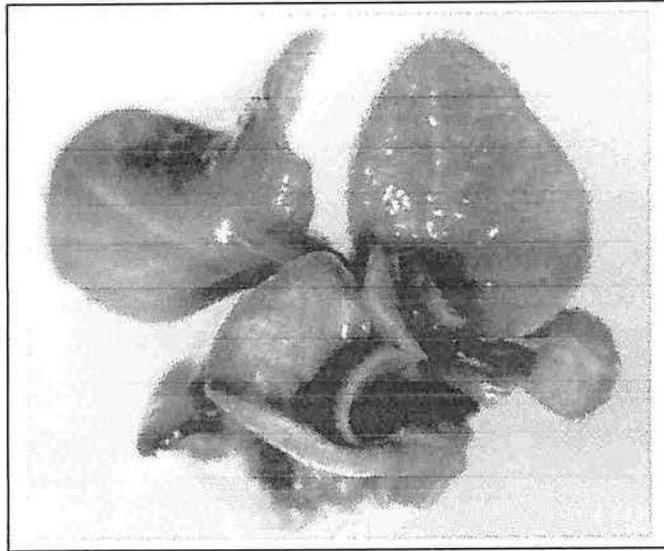
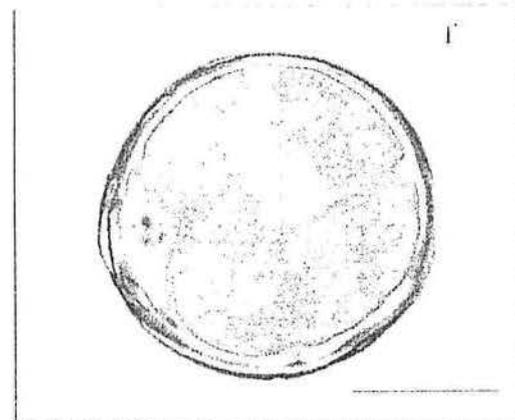
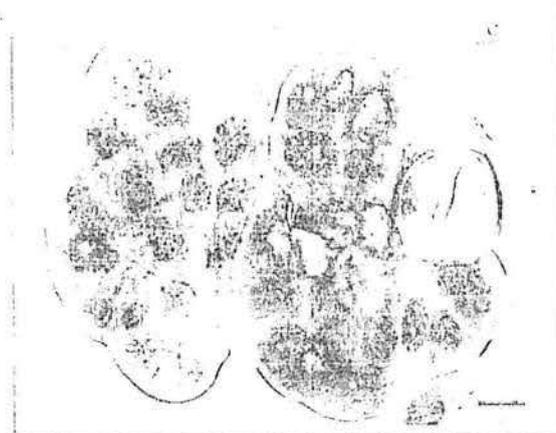
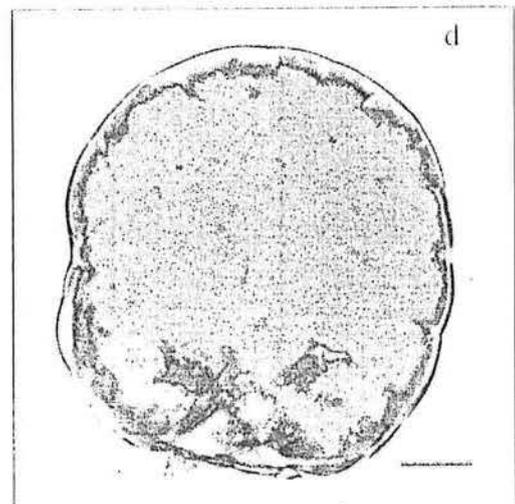
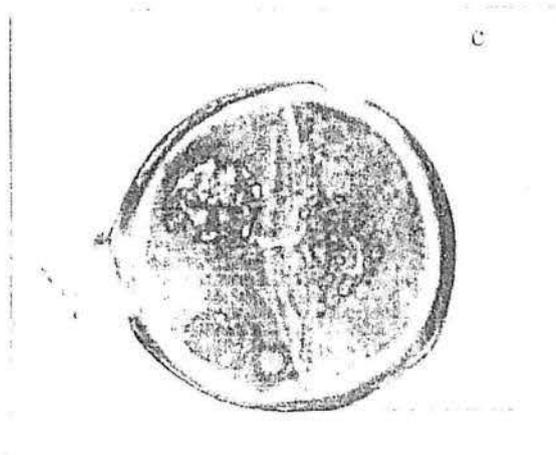
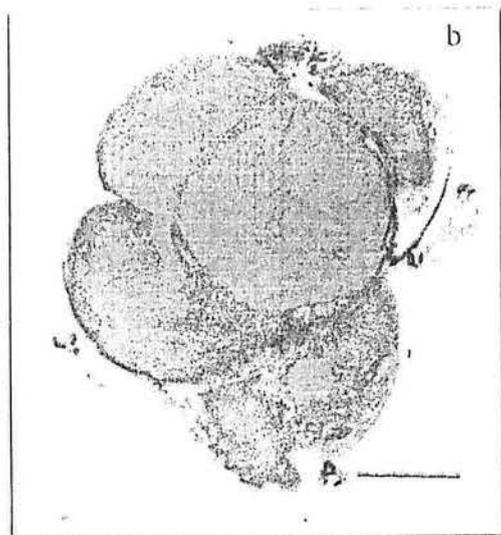
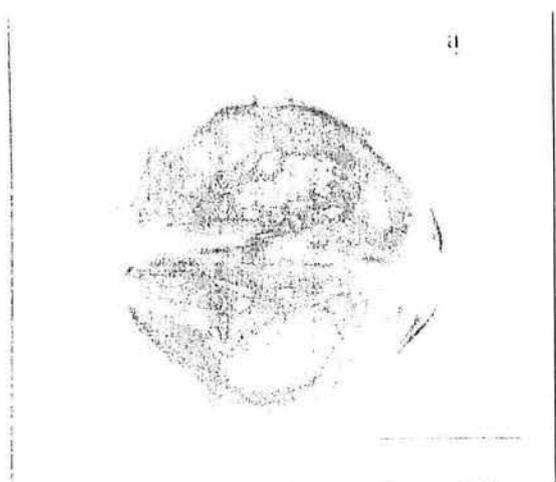


Fig. 1



V.2 Efeito do choque térmico (38°C) na cultura de anteras em soja

1. Introdução

Conforme descrito anteriormente, o tratamento de estresse por choque térmico é comumente utilizado para favorecer o desvio da rota normal de desenvolvimento do micrósporo no sentido da rota androgenética. Todavia, o tratamento de estresse térmico pode não resultar em incrementos na produção de estruturas embriogênicas *in vitro* se este não for severo o suficiente para desviar o desenvolvimento do micrósporo. Considerando que os tratamentos com 4 e 33°C, acima relatados, não foram capazes de induzir a rota esporofítica nos micrósporos de soja, foi realizado um novo teste de choque térmico. Neste estudo, o objetivo foi investigado o efeito de uma temperatura mais elevada do que a utilizada no experimento anterior. As plantas cultivadas no campo, crescem sob temperaturas que oscilam ao longo do dia e do período de cultivo. Em câmara de crescimento, as plantas de soja normalmente são cultivadas à temperatura constante de 28°C, por esta razão, foi utilizada no presente estudo a temperatura de 38°C por 3 e 7 dias em seis cultivares de soja.

2. Material & Métodos

I. Material

Os cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill, 2n=40) IAS 5, RS 7, Bragg, Conquista, BR 4 e BRS-MT Uirapuru foram crescidos a campo na estação experimental da Faculdade de Agronomia, Departamento de Plantas de Lavoura.

II. Cultura de anteras

Os botões com 2,5mm foram selecionados e desinfestados dos de acordo com Kaltchuk-Santos *et al.* (1997) e as anteras excisadas foram inoculadas em meio de indução (B5 suplementado com aminoácidos de Yeung (Yeung & Sussex, 1979), 9% de sacarose, 0.25% de Phytigel[®], 2.0mg/L de 2,4-D, 0.5mg/L de BAP, pH 6.4). Foram inoculadas 12 placas de Petri pequenas com 55 anteras para cada cultivar, sendo incubadas quatro placas por tratamento - 25°C, 38°C por 3 dias e 38°C por 7 dias. Ao sétimo dia todas as placas foram transferidas para 25°C com fotoperíodo de 16 horas sob 22,5 $\mu\text{E mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes.

A cada quatro semanas o material foi subcultivado em meio fresco e as estruturas formadas foram classificadas. Na 8ª semana o material foi transferido para meio de indução com 1.0mg/L de 2,4-D e 1.0mg/L de BAP.

III. Análise citológica

Aos 0, 15 e 30 dias de cultivo *in vitro*, cinco anteras por placa foram fixadas em 3:1 (etanol absoluto: ácido acético glacial) para análise citológica do material. Foram quantificados os grãos de pólen binucleados simétricos e multinucleados.

IV. Análise Estatística

Os dados de cultura *in vitro* foram analisados aos 30 e 60 dias de cultivo. Foi realizada análise de variância (ANOVA) para estruturas embriogênicas e quantidade total de calos aos 60 dias de cultivo. Para as variáveis calos embriogênicos aos 30 dias e, quantidade total de calos aos 60 dias, os dados foram transformados por $(\sqrt{x+0,5})$; para a variável calos embriogênicos aos 60 dias, os dados foram transformados por $\log(x+1)$. As médias foram diferenciadas pelo teste Student-Newman-Keuls, com $\alpha=0.05$.

A análise citológica das anteras em cultura incluiu os grãos de pólen binucleados simétricos e multinucleados quanto ao tratamento e ao tempo de cultivo. Foi realizada análise de variância com uma entrada (ANOVA Oneway) e os dados foram transformados por $\log(x+1)$. As médias foram diferenciadas pelo teste Student-Newman-Keuls, com $\alpha=0.05$.

3. Resultados

I. Análise da cultura *in vitro*

O material analisado aos 30 dias de cultivo apresentou diferenças entre os tratamentos ($F=19,245$, $p<0,00$) e os cultivares ($F=12,818$, $p<0,00$) testados. Os cultivares estudados dividiram-se em três grupos de acordo com a taxa de indução de calos. O cultivar IAS 5 foi o que apresentou o menor número de calos, seguido pelo cultivar RS 7. Os demais cultivares não diferiram entre si (Fig. 1).

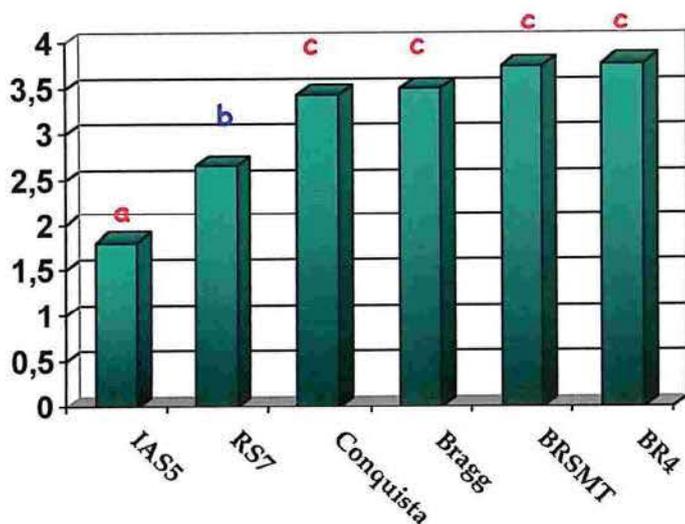


Fig.1: Média de calos por cultivar aos 30 dias de cultura *in vitro*.
Os cultivares indicados com a mesma letra não diferem pelo teste de SNK, $\alpha=0,05$.

Os tratamentos estudados dividiram-se em dois grupos. As anteras incubadas a 25°C (controle) não diferiram das anteras incubadas a 38°C por 3 dias, produzindo mais calos em relação às anteras incubadas a 38°C por 7 dias (Tabela 1).

Tabela 1: Média de calos por tratamento estudado.

Tratamento	N	Grupo	
		1	2
25°C	24		3,6456 ^a
38°C por 3 dias	24		3,4106 ^a
38°C por 7 dias	24	2,3850 ^b	
Sig.		1,000	0,282

As médias de um mesmo grupo não diferem entre si. Diferenciação de médias por SNK, $\alpha=0,05$.

As análises realizadas aos 60 dias *in vitro* normalmente indicam melhor a resposta do material aos tratamentos. Quanto à quantidade total de calo (calos rugosos e embriogênicos – mistos ou não) a resposta foi idêntica à encontrada para calos aos 30 dias de cultivo, tanto para cultivares quanto para tratamentos. Todavia, quando se considera apenas os calos embriogênicos formados aos 60 dias, o resultado é um pouco

diferente. Foram observadas diferenças entre os cultivares estudados e quanto aos tratamentos.

Entre os cultivares a análise mostrou que o cultivar RS 7 apresentou a menor indução de calos embriogênicos, diferindo dos cultivares BRSMT e BR 4. O cultivar IAS 5 também teve baixa indução de estruturas embriogênicas, porém produziu mais calos do que o cultivar RS 7, diferenciando-se apenas do cultivar BR 4 (Fig. 2).

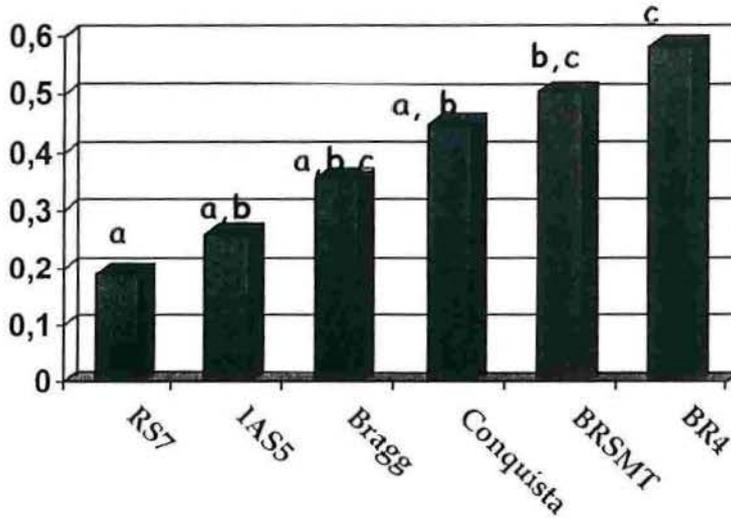


Figura 2: Média de calos embriogênicos por cultivar.

Cultivares indicados com as mesmas letras não diferem entre si. Diferenciação de médias por SNK com $\alpha=0,05$.

A análise mostrou diferenças entre os tratamentos realizados, sendo que a temperatura de 25°C foi a que mais induziu calos embriogênicos, seguida pela temperatura de 38°C por 3 dias e o tratamento de 38°C por 7 dias foi o que menos induziu a formação de calos embriogênicos (Tabela 2).

Tabela 2: Médias de calos embriogênicos por tratamento.

<i>Temperatura</i>	<i>N</i>	<i>Grupo</i>		
		<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
25°C	24	0,5717 ^a		
38°C por 3 dias	24		0,3856 ^b	
38°C por 7 dias	24			0,2129 ^c
<i>Sig.</i>		1,000	1,000	1,000

As médias separadas por grupos diferem entre si. Diferenciação de médias por SNK, $\alpha=0,05$.

II. Análise citológica

Nas análises citológicas procurou-se verificar a presença de grãos de pólen binucleados simétricos (PIIsym) e multinucleados (Pmulti) dentre os diferentes tratamentos. Os dados aqui apresentados referem-se apenas ao cultivar IAS 5, sendo que os demais cultivares estão sendo analisados. A análise estatística mostrou que a data de coleta das anteras das placas e a temperatura em que a placa foi incubada não influenciaram na frequência destes grãos de pólen (Tabela 3).

Tabela 3: Resultado da ANOVA Oneway para PIIsym e Pmulti.

<i>Categoria</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Coleta</i>
<i>PIIsym</i>	F=1.679, p<0.202	F=0.384, p<0.684
<i>Pmulti</i>	F=0.534, p<0.591	F=0.534, p<0.591

4. Discussão

Os dados obtidos neste experimento reforçam os resultados encontrados no experimento de choque térmico anterior, tanto para cultivares, quanto para os tratamentos.

O cultivar BR 4 foi o que produziu a maior quantidade de calos nos dois experimentos e, neste segundo experimento, produziu também a maior quantidade de calos embriogênicos aos 60 dias. O cultivar que teve a menor indução de calos embriogênicos no estudo anterior já foi descartado para este segundo experimento. O

cultivar IAS 5, nos dois experimentos, apresentou a menor quantidade de calos formados aos 60 dias.

Quanto à resposta aos tratamentos realizados, a análise estatística mostrou, para os dois experimentos, que o tratamento de choque térmico, seja com frio ou calor (tanto 33 e 38°C – 3 e 7 dias) induziu menos, ou no máximo, igual quantidade de calos embriogênicos que o controle (25°C). Os resultados de ambos os estudos, indicam que a soja não é sensível aos tratamentos de choque térmico reforçando a característica recalcitrante desta espécie.

Capítulo VI: Efeito da sacarose na indução da androgênese em soja

1. Introdução

A sacarose é importante componente do meio de cultura vegetal servindo como fonte de carbono e regulador da pressão osmótica do meio. A sacarose em altas concentrações (6% a 12%) é crucial na indução da androgênese (Atanassov *et al.*, 1995) e alguns estudos têm mostrado que há uma concentração ótima de sacarose para cada espécie (Peters *et al.*, 1999). Contudo, o estresse por carência de açúcar no meio de cultura, pode exercer efeito benéfico na promoção da androgênese de algumas espécies, como por exemplo, em tabaco (Touraev *et al.*, 1996). Nesta planta, a carência de sacarose foi mais eficiente do que o tratamento de choque térmico (Touraev *et al.*, 1996B), sendo que após a transferência para meio rico foi observada a formação de células embriogênicas.

A célula sobrevive ao período de carência convertendo nutrientes estocados em energia. A síntese protéica, que necessita de altos níveis de sacarose, faz com que durante a ausência de sacarose no meio, o micrósporo ative mecanismos inibidores da tradução de mRNAs desnecessários para a sobrevivência imediata, inclusive os mRNAs específicos para o desenvolvimento gametofítico normal. A diminuição geral no nível e na síntese total de RNAs e proteínas levam a mudanças citológicas e à alteração da rota de desenvolvimento do micrósporo (Garrido *et al.*, 1993).

A carência de sacarose por três dias em arroz, no início da cultura, afeta consideravelmente a indução da divisão celular em micrósporos isolados sem nenhum pré-tratamento (Ogawa *et al.*, 1994). No ciclo celular, a carência de sacarose faz com que o núcleo vegetativo saia de G0 e entre em G1 havendo a replicação do DNA apenas quando o material é transferido para meio rico em sacarose. O núcleo vegetativo entra em mitose e segue dividindo para formar um embrião haplóide (Zárský *et al.*, 1992).

2. Material & Métodos

I. Material

Os cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill, 2n=40) IAS 5, RS 7, Bragg e Ft-Abiara foram crescidos em casa de vegetação.

II. Cultura de anteras

Os botões com tamanho entre 3.0-3.5mm foram selecionados e desinfestados de acordo com Kaltchuk-Santos *et al.*, 1997. As anteras excisadas foram inoculadas em meio de indução (B5 longo suplementado com aminoácidos de Yeung (Yeung & Sussex, 1979), 0.25% de Phytigel[®], 2.0mg/L de 2,4-D, 0.5mg/L de BAP, pH 6.4) com quatro diferentes concentrações de sacarose: 0, 6, 9 e 12%. Foram inoculadas quatro placas de Petri pequenas com 55 anteras para cada tratamento. As anteras inoculadas em meio com 0% de sacarose foram transferidas para meio rico (9% de sacarose) após 8 dias. As placas foram incubadas a 25°C com fotoperíodo de 16 horas sob 22,5 $\mu\text{Emol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes.

A cada quatro semanas o material foi subcultivado em meio fresco e as estruturas formadas foram classificadas. Na 12ª semana o material foi transferido para meio de indução com 1.0mg/L de 2,4-D e 1.0mg/L de BAP e na 14ª semana as estruturas embriogênicas foram transferidas para meio de maturação de embriões – MSM6 (Finer e McMuller, 1991).

III. Análise Estatística

Foi realizada análise de variância (ANOVA) para estruturas embriogênicas formadas aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Os dados foram transformados por arcoseno ($\sqrt{\text{prop.X}}$) e as médias foram diferenciadas pelo teste Student-Newman-Keuls, com $\alpha=0.05$.

3. Resultados & Discussão

A análise do material *in vitro* aos 60 dias de cultura mostrou que há diferenças entre os cultivares ($F= 19,529$, $p<0,000$) e os tratamentos realizados ($F= 18,536$, $p<0,000$). Os cultivares dividiram-se em três grupos (Tabela 1), sendo que Bragg produziu mais estruturas embriogênicas do que os demais cultivares e IAS 5 foi aquela que produziu menos.

Tabela 1: Média de calos embriogênicos produzidos por cultivares.

Cultivar	N	Grupos		
		1	2	3
IAS 5	16	0,1547 ^a		
RS 7	16	0,2280 ^{a,b}	0,0228 ^{a,b}	
Ft-Abiara	16		0,28810 ^b	
Bragg	16			0,4949 ^c
Sig.		0,124	0,205	1,000

Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente pelo teste Student-Newman-Keuls (p= 5%).

O estresse por carência de sacarose mostrou não ter efeito promotor da androgênese em soja, tendo produzido menos estruturas embriogênicas em relação ao controle (Fig. 1). Os demais tratamentos não diferiram.

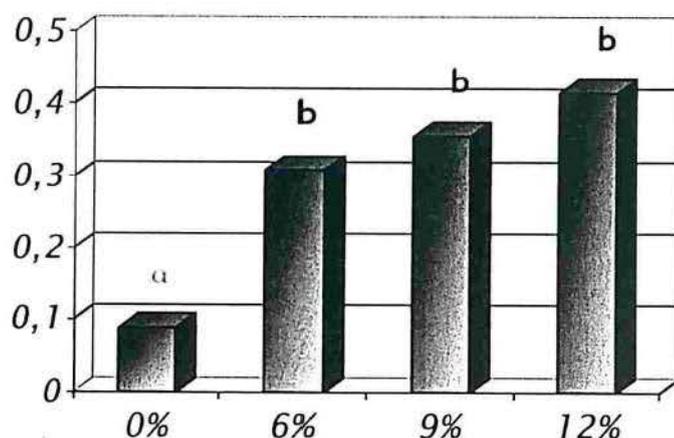


Fig. 1: Média de estruturas embriogênicas formadas em cada tratamentos os 60 dias de cultura *in vitro*. Tratamentos com a mesma letra não diferem pelo teste SNK (p=5%).

Este experimento mostrou que a resposta androgenética em meio com 9% de sacarose, regularmente utilizada no nosso laboratório, não difere das respostas obtidas com 6 e 12% de sacarose no meio. A presença de sacarose no meio é melhor do que a ausência, mesmo que durante um curto espaço de tempo. As respostas dos cultivares se mantiveram dentro do mesmo padrão dos experimentos anteriores, sendo que o cultivar IAS 5 apresentou baixa taxa de indução e o cultivar Bragg uma alta taxa.

Capítulo VII: Conclusão e discussão geral

A possibilidade de alterar a rota de desenvolvimento dos micrósporos chegando a produzir plantas haplóides é fascinante e possibilita uma série de estudos genéticos, além de ser uma ferramenta no melhoramento de plantas de lavoura. Todavia, esse processo depende de vários fatores como estágio de desenvolvimento, meio e condições de cultura e, principalmente, do genótipo.

Apesar de, em algumas espécies, o processo androgenético ser facilmente induzido, em outras, como as leguminosas, o desvio da rota de desenvolvimento é mais raro, sendo difícil regenerar plantas a partir de micrósporos.

O desvio da rota pode ser facilitado pelo uso de tratamentos de estresse. Esses tratamentos agem a partir de alterações estruturais do citoplasma, ação das HSPs que se associam ao mRNA, evitando a tradução dos mesmos e ativando genes específicos. Estudos moleculares em *Arabidopsis* mostraram que genes como *STUD* e *TETRASPORE* ativam a rota androgenética, sendo estimulados por tratamentos de estresses (Twell *et al.*, 1998).

Com base nos nossos experimentos na cultura de anteras em soja, temos confirmado a resposta recalcitrante desta planta, já verificada por outros pesquisadores (Matsubayashi e Kuranuki, 1975). Nossos testes com colchicina, ausência de sacarose e choque térmico mostram que esses tratamentos não resultam no aumento do índice de indução da rota esporofítica em soja e demonstram o forte efeito do genótipo nesta espécie. Todavia, a presença de pólen p, bem como, a resposta dos cultivares ao processo androgenético parecem manter um padrão ao longo dos experimentos.

O cultivar Conquista apresentou alta quantidade de pólen p e alta taxa de indução de estruturas embriogênicas no experimento de choque térmico/38°C. O cultivar Bragg apresentou uma quantidade intermediária de pólen p e sempre esteve entre os cultivares com maior taxa de indução de calos embriogênicos em todos os experimentos realizados. Os cultivares BRS 133 e IAS 5 apresentaram a menor quantidade de pólen p. O cultivar BRS 133 teve a menor taxa de indução embriogênica no experimento de choque térmico/4 e 33°C. O cultivar IAS 5, empregado em todos os experimentos, apresentou sempre frequências baixas de calos embriogênicos.

Ao longo de todos os estudos foram realizadas análises no número cromossômico das estruturas obtidas na cultura *in vitro*. A metodologia empregada foi a mesma utilizada por Kaltchuk, 1999. Foram analisadas por volta de 40 lâminas de ponta de raiz de calo, sendo que na maioria dos casos foram contados 40 cromossomos. Todavia, somente em um caso foram observados 20 cromossomos em uma célula menor que o normal, indicando que realmente não poderia haver 40 cromossomos nesta célula (Fig. 7.1). O fato das células terem, na sua maioria, 40 cromossomos deixa dúvidas sobre a origem destas estruturas, uma vez que já foi determinado que estruturas podem ser formadas a partir da parede da antera (Kaltchuk-Santos *et al.*, 1997). Todavia, o processo de duplicação de cromossomos em plantas haplóides pode ser feito com o uso da droga colchicina ou, também, pode ocorrer espontaneamente por endomitose gerando mosaicos. Em alguns casos a duplicação pode ter origem no processo de divisão mitótica do micrósporo, já que no nosso grupo já foram observados micrósporos com número duplicado de cromossomos (Kaltchuk-Santos, 1999, Cardoso, 2002).

A androgênese é considerada, por alguns pesquisadores, um exemplo de totipotência vegetal; todavia, segundo Bonet *et al.*, 1998, a androgênese é um exemplo de atavismo, ou seja, o reaparecimento de uma característica (morfológica ou comportamental) de um ancestral remoto. Algas primitivas, das quais derivaram as plantas terrestres, apresentavam meiosporos com uma alta capacidade de proliferação, o que resultava na formação de uma estrutura multicelular a partir de uma única célula haplóide. Esta característica é observada, ainda hoje no ciclo de vida das pteridófitas. Bonet *et al.* (1998) sugerem que as angiospermas teriam herdado estes genes arcaicos responsáveis pelo desenvolvimento organogênico dos meiosporos os quais poderiam ser ativados em condições de estresse, tais como, choque térmico e privação nutricional. Portanto, a manutenção e expressão destes genes ancestrais facilitariam a indução da rota androgenética, explicando porque algumas espécies, e até alguns genótipos da mesma espécie, conseguiriam induzir o processo androgenético e regenerar plantas verdes mais facilmente do que outras. É possível que a soja, ao longo da sua evolução, tenha perdido tais genes e, conseqüentemente, a capacidade de regenerar plantas a partir de um micrósporo, sendo, então, classificada como uma espécie recalcitrante.

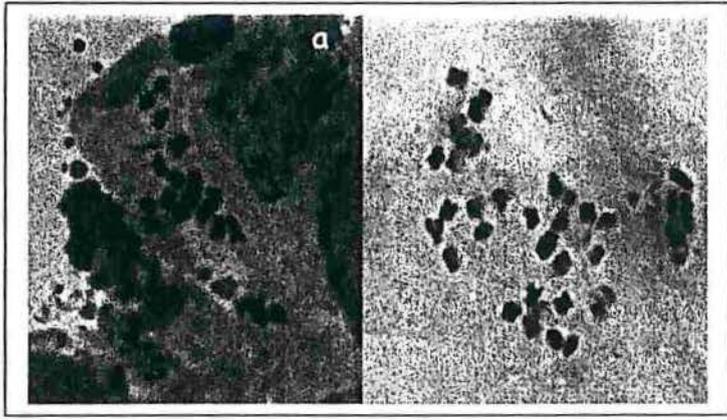


Fig. 1: Células de ponta de raiz de calos de soja. a) célula com 20 cromossomos, b) célula 40 cromossomos. Aumento 100X.

Capítulo VIII: Referências Bibliográficas

- ATANASSOV, A.; ZAGORSKA, N.; BOYADJIEV, P.; DJILIANOV, D. In vitro production of haploid plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.11, p. 400-408, 1995.
- BARNABÁS, B.; PFAHLER, P.L.; KOVÁCKS, G. Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L). **Theor. Appl. Genet.** v.81, p.675-678, 1991.
- BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam: Elsevier, p.502, 1983.
- BINAVORA, P.; HAUSE, G.; CENKLOVÁ, V.; CORDEWENER, J. H. G.; CAMPAGNE, M. M. L. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L.. **Sexual Plant Reproduction**. v.10, p.200-208, 1997.
- BOBROWSKI, V.; PETERS, J.A. Fatores afetando a formação de embriões/calos de células gametofíticas. **ABCTP Notícias**, 2000.
- BONET, F. J.; AZBAID, L.; OLMEDILLA, A. New ideas in cell biology – Pollen embryogenesis: atavism or totipotency? **Protoplasma**. Wien, v.202, p.115-121, 1998.
- CARDOSO, B. M.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI **Estudos Citológicos em anteras de *Glycine max* (L.) Merrill cultivadas in vitro** Porto Alegre, RS, 2002. 99p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.
- CHRISTOU, P.; McMCABE, D. E.; MARTINELL, B. J.; SWAIN, W. F. Soybean Genetic Engineering-Commercial production of transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, v. 8, n.6, p. 145-151, 1990.
- CUSTERS, J.B.M.; CORDEWENER, J.H.G.; NÖLLEN, Y.; DONS, H.J.M.; CAMPAGNE, M.M.VanL. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. **Plant Cell Reports**. v.13, p.267-271, 1994.
- FAN, Z.; ARMSTRONG, K.C.; KELLER, W.A. Development of microspores invitro in *Brassica napus* L. **Protoplasma**. Wien, v.147, p.191-199, 1988.

FAO – Food and Agriculture Organization – www.fao.org

GARRIDO, D.; ELLER, N.; HEBERLE-BORS, E. De novo transcription of specific mRNA during the induction of tobacco pollen embryogenesis. **Sexual Plant Reproduction**. Heidelberg, v.60, p.40-45, 1993.

GHAEMI, M.; SARRAFI, A.; ALIBERT, G. The effects of silver nitrate, colchicine, cupric sulfate and genotype on the production of embryoids from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.198, p.433-439, 1994.

GÓRALSKI, G.; MATTHYS-ROCHON, E.; VERGNE, P.; PRZYWARA, L. Androgenic Development: A Fascinating Embryo Formation Process. **Acta Biologica Cracoviensia series botanica**. v.41, p.51-65, 1999.

GRANDO, M. F.; MORAES-FERNANDES, M. I. Two point deterministic model for acquisition of in vitro pollen grain androgenetic capacity based on wheat studies. **Brasil. J. Genet.** v.20, n.3, p.467-476, 1997.

GUHA, S.; MAHESHWARI, S. C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. **Nature**. v.204, n.4957, p.497, 1964.

HERBELE-BORS, E. In vitro pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. And its relation to pollen sterility, sex balance and floral induction of pollen donor plants. **Planta**. v.156, p.396-401, 1982.

HERBELE-BORS, E.; REINERT, J. Androgenesis in isolated pollen cultures of *Nicotiana tabacum*: dependence upon pollen development. **Protoplasma**. v.99, p.237-245, 1979.

HORNER, M.; STREET, H. E.; Pollen dimorphism-origin and significance in pollen plant formation by anther culture. **Ann. Bot.**, v.42, p.771-773, 1978.

INDRIANTO A, HERBELE-BORS E, TOURAEV A Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. **Plant Science**. v.143, p.71-79, 1999.

IQBAL, M.C.M.; MÖLLERS, C.; RÖBBELEN, G. Increased embryogenesis after colchicine treatment of microspore cultures of *Brassica napus* L. **Journal of Plant Physiology**. Stuttgart, v.143, p.222-226, 1994.

JIAN, Y.; LIO, D.; LUO, X.; ZHAO, G. Studies on induction of pollen plants in *Glycine max* (L.) Merr. **Chiang-sunung-yeh-hseuh-pao-J-Agri-Sci-Nanjing, China: Chian-su shengning yeh K'O hseuh yuan.** v.2, (suppl), p.26-30, 1968.

KALTCHUK-SANTOS, E. **Androgênese em cultivares brasileiras de *Glycine max* (L.) Merrill.** Porto Alegre, RS, 1999. 96p. Tese (Doutorado em Genética) – Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999:

KALTCHUK-SANTOS, E. e BODANESE-ZANETTINI, M.H. Androgênese: Uma Rota Alternativa no Desenvolvimento do Pólen. **Ciência Rural.** Santa Maria, v. 32, n.1, p. 165-173, 2002.

KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; MUNDSTOCK, E. Pollen dimorphism in soybean. **Protoplasma.** Wien, v.174, p.74-78, 1993.

KALTCHUK-SANTOS, E.; MARIATH, J.E.A.; MUNDSTOCK, E. Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. **Protoplasma.** Wien, v.49, p.107-115, 1997.

KELLER, W.A. and ARMSTRONG, K.C. Stimulation of Embryogenesis and Haploid Production in *Brassica campestris* Anther Cultures by Elevated Temperature Treatments. **Theor. Appl. Genet.**, v.55, p. 65-67, 1979.

LAUXEN, M.S.; KALTCHUK-SANTOS, E; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Desenvolvimento dos micrósporos em cultivares brasileiras de soja (*Glycine max* (L.) Merr.). **Genetics and Molecular Biology.** v.21, p.234, 1998.

MARDHORST, A P.; TOONEN, M. A J.; DE VRIES, S. C. Plant embryogenesis. **Critical Reviews in Plant Sciences.** v.16, n.6, p.535-576, 1997.

MARDHORST, A.P.; TOONEN, M.A.J.; DE VRIES, S.C. **Critical reviews in plants sciences.** v.16, n.6, p.535-576, 1997.

MATSUBAYASHI, M.; KURANUKI, K. Embryogenic responses of the pollen to varied sucrose concentrations in anther culture. **Sci. Rep. Fae. Agri.** v.11, n.2, p.215-230, 1975.

MORAES-FERNANDES, M. I. B.; STIVAL, A L.; BRAMMER, S. P.; GRANDO, M. F. Haploidização: Genética e Melhoramento. In: TORRES, A C.; CALDAS, L. S.;

BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SP/EMBRAPA-CNPB, p. 613-650, 1999.

NITSCH, C.; NORREL, B. Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthere ou isole de l'anthere. **Comptes Rendus L'Acad. Sci. Série D**, v.276, p.303-306, 1973.

NORREL, B. Étude cytologique de l'androgénèse expérimentale chez *Nicotiana tabacum* e *Datura innoxia*. **Bull. Soc. Bot. Fr.** v.177, p.461-478, 1970.

OGAWA, T.; FUKUOKA, H.; OHKAWA, Y. Induction of cell division of isolated pollen grains by sugar starvation in rice. **Breeding Science**. v.44, n.1, p.75-77, 1994.

PECHAN P.M., KELLER W.A. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. **Physiologia Plantarum**. v.74, p.377-384, 1988.

PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplo-haplóides. In: TORRES, A C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A (Eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SP/EMBRAPA-CNPB, p. 569-611, 1999.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of Plants**. New York: W.H. Freedman and Company, 6th ed, p.504, 1999.

REYNOLDS, T. L. Pollen Embryogenesis. **Plant Molecular Biology**. v.33, p.1-10, 1997.

SAX, K. The effect of temperature on nuclear differentiation in microspore development. **J. Arnold Arber**. v.19, p.301-310, 1935.

SECEX/MDIC; CONAB/MA – Ministério da Agricultura – www.agricultura.gov.br

SMÝKAL, P. Pollen embryogenesis – the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. **Biologia Plantarum**. v.43, n.4, p.481-489, 2000.

SUNDERLAND, N.; WICKS, F. M. Cultivation of haploid plants from tobacco pollen. **Nature**. v.224, p.1227-1229, 1969.

SZAKÁCS, E.; BARNABÁS, B. The effect of colchicine treatment on microspore-derived embryo differentiation in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. **Euphytica**. Wageningen, v.83, p.209-213, 1995.

TANG, W. T.; LING, T.S.; CHANG, C. S. Effects of kinetin and auxin on callus formation in anther tissue cultures of soya bean. **J. Agri. Assoc. China.** v.83, p.1-7, 1973.

TELMER, C. A; NEWCOMB, W.; SIMMONDS, D. H. Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas. **Protoplasma.** Wien, v.185, p.106-112, 1995.

TELMER, C. A; NEWCOMB, W.; SIMMONDS, D. H. Microspore development in *Brassica napus* and the effect of high temperature on division in vivo and in vitro. **Protoplasma.** v.172, p.154-165, 1993.

TOURAEV, A; INDRIANTO, A; WRATSCHKO, I.; VICENTE, O.; HERBELE-BORS, E. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. **Sexual Plant Reproduction.** v.9, p.209-215, 1996a.

TOURAEV, A; PFOSSER, M.; VICENT., O.; HERBELE-BORS, E. Stress as a major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. **Planta.** Heidelberg, v.200, p.144 – 152, 1996b.

TWELL, D.; PARK, S. K.; LALANNE, E. Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. **Trends in plant science.** Review. v.3, n.8, p.305-310, 1998.

YAO, S.; CROUGHAN, S. S.; ZHAO, G. Pollen and anther culture on soybean. Abstracts, 6th Biennial Conference of Molecular and Cellular Biology of the Soybean. Columbia, MO, EUA. August 12-14, 1996, p.37.

YEUNG, E.C.; SUSSEX, I.M. Embryogeny of *Phaseolus coccineus*: The suspensor and the growth of the embryo-proper in vitro. **Z. Pflanzenphysiol.** v.91, p.423-433, 1979.

YIN, G. C.; LI, X. Z.; XU, Z.; CHEN, L.; ZHU, Z. Y.; BI, F. Y. Anther culture of *Glycine max.* **Kexue Tongboa.** v.25, n.11, p.976, 1980.

ZAKI, M.A.M.; DICKINSON, H.G. Microspore derived embryos in Brassica: the significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. **Sexual Plant Reproduction.** Heidelberg, v.4, p.48-55, 1991.

ZAKI, M.A.M.; DICKINSON, H.G. Modification of cell development in vitro: the effect of colchicine on anther and isolated microspore culture in *Brassica napus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. New York, v.40, n.3, p.255-270, 1995.

ZÁRSKÝ, V.; GARRIDO, D.; RÍHOVÁ, I.; TUPÝ, J.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E. Derepression of the cell cycle by starvation is involved in the induction of tobacco pollen embryogenesis. **Sexual Plant Reproduction**. v.5, p.189-194, 1992.

ZHAO, J.P.; SIMMONDS, D.H.; NEWCOMB, W. Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas. **Planta**. Heidelberg, v.198, p.433-439, 1996.

Anexo 1:

Colchicine treatments in anther culture of soybean



Full Title: Colchicine treatments in anther culture of soybean

Running Title: Colchicine in soybean anther culture

Eliane Kaltchuk-Santos^{1*}, Ana Paula de Moraes¹, Elsa Mundstock² & Maria Helena Bodanese-Zanettini¹

^{1*} Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS Brasil.

* Correspondence and reprints: Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, C.P. 15053, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil.

eliane.kaltchuk@ufrgs.br

Telephone: 00 55 51 3316 6742; Fax number: 00 55 51 3316 7311

Summary. The effect of colchicine on the symmetrical division and embryo induction in cultured anthers of soybean was investigated. The anthers were incubated in various concentrations of colchicine for 24 or 72 h. Cytological analysis of *in vitro*-incubated anthers was conducted through the first 15 days of culture. The study showed that colchicine did not have a significant effect on symmetrical division or multinucleated pollen formation. Embryo induction was also not affected by colchicine. Embryos showed histodifferentiation and were classified into various morphological classes that resembled somatic embryos obtained from immature cotyledons.

Keywords: androgenesis, androgenetic embryos, *Glycine max*; multinucleated pollen, symmetrical division.

Introduction

The phenomenon of pollen embryogenesis was first demonstrated in *Datura innoxia* by Guha and Maheshwari (1964). Since then the production of pollen derived plants from anther culture has been documented in more than 170 species of angiosperms (Reynolds, 1997). Androgenesis has been studied intensively in model plants such as rapeseed, tobacco, and barley (Mardhorst et al., 1997). However, in important crops, like soybean, induction of androgenetic embryos remains difficult. The recalcitrant nature of this species makes the progress in haploid plant induction sluggish and limited published information is available (Hu et al., 1996).

The ability of cultured anthers to develop haploid embryos is provided by a change of the gametophytic program of microspores towards a sporophytic pattern. In sporophytic development the first embryogenic division may be asymmetric or symmetric (Sunderland and Dunwell, 1974). Studies on initial segmentation of microspores in culture have shown that in several species androgenetic embryos are derived from symmetrical mitosis (Fan et al., 1988; Zaki and Dickinson, 1990,1991, 1995). These authors consider the symmetry of mitosis a key step to subsequent pollen embryogenesis. According to Telmer et al. (1993) the symmetric division blocks further pollen development. The occurrence of symmetrical binucleated pollen has been observed in soybean and is possible route for callus formation (Yin et al., 1980; Kaltchuk-Santos et al. 1993, 1997).

Different stress pretreatments of anthers or microspores, such as heat shock (Keller and Armstrong, 1979; Telmer et al, 1993), cold treatment (Nitch and Norreel, 1973), and starvation (Kyo and Harada, 1986), has been reported to induce the androgenetic pathway. There are several chemical treatments as well, that enhance the embryogenic ability of microspores. The effect of the antimicrotubule drug colchicine

on microspore embryogenesis has been investigated by several authors (Tanaka and Ito, 1981; Wan et al., 1989; Barnabás et al, 1991; Zaki and Dickinson 1991, 1995; Iqbal et al., 1994; Szackács& Barnabás 1995; Zhao et al., 1996). These researchers found that colchicine promotes the androgenesis process by increasing of symmetrical mitosis and induction of somatic embryos. Colchicine disrupts pollen development by depolymerizing microspore microtubules (Zhao et al., 1996).

The aim of the present work was to determine the effect of colchicine on androgenetic pathway of soybean and, to improve the efficiency of embryo induction and differentiation.

Materials and Methods

Plant material

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr., $2n=40$) cultivar IAS 5 was used in this study. Young inflorescences of field-grown plants were harvested and pretreated for 5 days at 4° C. Floral buds 3.0 - 3.5 mm in length, containing uninucleate microspores were selected and surface sterilized with 70% ethanol for 1 min, followed by 1% sodium hypochlorite solution with a trace of detergent for 20 min.

Colchicine treatments

Anthers were excised and exposed to various concentrations of colchicine added to the induction medium (Kaltchuk-Santos et al., 1997) by ultrafiltration. The concentrations tested were: 0, 5, 10 and 20 mg/l in experiment I; 0, 25, 50 and 100 mg/l in experiment II, and 0, 100, 200 and 400 mg/l in experiment III. One hundred anthers, dissected from 10 floral buds, were placed in each culture petri dish, with four replications per treatment. The duration of treatments was either 24 or 72h. After these periods the anthers were transferred to fresh induction medium without colchicine. Petri dishes were incubated at 25° C under 16 h photoperiod of $22.5 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ provided by fluorescent light.

Callus and embryo formation was determined at 60 days of culture. The embryos formed after 60 days were transferred to a solid MSM6AC medium (Bailey et al., 1993) for histodifferentiation. After 35 days, embryos were counted, separated and transferred to MSM6 medium (Finer and McMullen, 1991) for maturation. Seven days later the histodifferentiated embryos were transferred to MSO (MS salts, B5 vitamins, 35 sucrose, 0,35 PhytigelTM, pH 5.8) medium for germination. These androgenetic embryos were classified into morphological classes according to Buchheim et al. (1989).

Cytological analysis

Twenty four anthers per treatment were fixed in ethanol:acetic acid (3:1) at 0, 5, 10 and 15 days following culture for cytological analysis. After squashing in propionic-carminc the microspores were staged and classified under a Zeiss Axioplan Universal microscope.

Statistical Analysis

A split-plot analysis of variance was conducted on number of symmetrical binucleate and multinucleate pollen. A preliminary analysis of data indicated that transformation was needed for both variables. A $\log(y+0.001)$ proved to be the most adequate for experiment I data, $\log(y+0.0001)$ for experiment II, and a $\log(y+0.01)$ for experiment III (for symmetrical binucleate pollen). Means were compared using Tukey's test at $\alpha=0.05$. Relating on multinucleate pollen in experiment III, no transformation of data fitted analysis of variance assumptions. Kruskal-Wallis non parametrical analysis was used. Frequencies of calli were analyzed through a two factor factorial design.

Colchicine Test

It has been proposed that microtubule reorganization is the key event in changing microspore developmental pathway, where altered division symmetry and cell dynamics define the induced embryogenic structure (Zhao et al., 1996). By taking advantage of these events, efforts have been made to induce symmetric division. The microtubule inhibitor colchicine has been considered as an androgenesis promoting compound. According to Zhao et al. (1996), colchicine induces microspore embryogenesis through cytoskeleton reorganization, which leads to the loss of the original cell asymmetry that blocks gametophytic development. In the present study, the effect of colchicine on the pattern of microspore division, multinucleate pollen formation, and embryo induction from anther culture of soybean was investigated in three experiments. Data are summarized in Table 1.

Cytological analysis of anthers showed that symmetrical binucleated pollen can be found at the moment of incubation. The *in situ* occurrence of this type of pollen in soybean was reported in a previous study (Kaltchuk-Santos et al., 1993). As a general tendency, the frequency of symmetrical pollens increased during the culture period.

No multinucleated pollen grains were found at inoculation but they were detected after 10 days of culture in experiment I, and after 5 days in experiments II and III (data not shown). In experiment I, after 15 days of culture multinucleated pollens were detected only in two treatments (10 mg/l colchicine, 24 h and 20 mg/l colchicine, 72 h). In experiments II and III, the frequencies of such grains were higher. The statistical analysis of experiment II data confirmed significant increase in frequencies of multinucleated grains after 10 days of culture (data not shown).

Our results did not provide any evidence to conclude that colchicine was able to induce symmetrical divisions and/or multinucleate pollen formation in soybean cultured anthers. Differences among colchicine concentrations on percentages of these types of pollen grains were not statistically significant in all experiments.

Embryos were formed from treated and non-treated anthers (Table 1). Although in all experiments some colchicine treatments had higher percentages of embryo formation, the differences among treatments were not statistically significant.

Data obtained in the present study did not show a androgenic promoter potential of colchicine as demonstrated in *Brassica* (Zaki and Dickinson, 1991, 1995; Iqbal et al., 1994). In wheat, both positive (Szakács and Barnabás, 1995) and negative (Ghaemi et al., 1994) results were obtained on the effects of colchicine on androgenesis. In diploid potato, androgenic response did not differ significantly among five colchicine treatments (Teparkum and Veilleux, 1998).

Zaki and Dickinson (1991) tested five colchicine levels and different periods of exposure in microspores culture of *Brassica napus*. They verified that colchicine promoted both symmetrical mitosis and embryogenesis most actively when microspores were exposed to the higher levels of 25 mg/l for 12 h. According to the authors, the compound exerts a dramatic effect on the number of cells differentiating into embryos, and this effect is strikingly cultivar specific. The same authors (Zaki and Dickinson, 1995) investigated the effect of colchicine treatments on anther and isolated microspore culture using five cultivars of *Brassica*. In both, a promotional effect of the drug was observed, although the embryogenic response varied among cultivars. In poor responding cultivars, only small increases were observed.

More recently, Zamani et al (2000) found significant differences in the induction frequency of microspore-derived structures among three genotypes of wheat.

In the winter genotype 'Mv. Szigma' colchicine caused a significant reduction in such structures. In contrast, in the spring variety 'Acheloos' colchicine treatment increased the frequency of the induced structures.

In the present study only one cultivar was tested, IAS5, which might be a poor responding genotype. Assuming that colchicine action is cultivar-dependent, it is possible that clearer results might be obtained testing other cultivars.

Some results obtained by Iqbal et al (1994) in *Brassica* differ from those found by Zaki and Dickinson (1991). The last authors believe that the positive effect of colchicine might be associated with a particular developmental stage. Also in rapeseed, Zhao et al. (1996) verified that the microspores responsiveness to colchicine was developmental stage specific. According to them, low embryogenesis is usually the result of either culturing microspores at an unresponsive stage of development or a highly heterogeneous population of microspores in which the responsive cells are in few number.

In our study, bud size was used as an indicator of microspore developmental stage. Buds that presented mostly uninucleate pollens were selected. However, we observed (data not shown) that anthers from a given bud differed in the developmental stage of microspores. Thus, the low embryogenic response in cv IAS5 might be partially attributed to heterogeneity of the microspore population within a flower bud.

Most of above reports used microspore culture system to test the effect of colchicine on pollen embryogenesis induction. The use of anther culture procedure in the present study might have hindered the evaluation of colchicine effect on soybean androgenesis.

Androgenetic embryo production and histodifferentiation

After 30 days of culture, some of the anthers inoculated on induction medium began to form calli. Androgenetic embryos in globular stage were produced on the surface of anthers and on calli (Fig.1a) around 6 weeks after inoculation. At 60 days of culture, the embryos were transferred to solid MSM6AC medium for histodifferentiation. The number of histodifferentiated embryos was low for all treatments, with a total of 25 embryo clusters (2 to 8 embryos per cluster).

Several morphological types of embryos were found in this experiment (Fig. 1 b-g): monocotyledonous, dicotyledonous, polycotyledonous, fused cotyledon, long hypocotyl-vestigial cotyledon, moderately fasciated, and grossly fasciated. Many embryos were partially or completely fused. Normal dicotyledonous embryos were rare (8%) and the more frequent type was that of long hypocotyl-vestigial cotyledon (40%). These androgenetic soybean embryos resemble somatic embryos induced from immature cotyledons incubated on a high 2,4-D-containing medium (Buchheim et al., 1989; Santos et al., 1997). Previous study showed that androgenetic embryos were histologically similar to zygotic embryos (Kaltchuk-Santos et al., 1997).

The histodifferentiated embryos were transferred to a maturation medium and then to germination medium, but none converted to plants. Optimization of the conversion protocol is underway.

Acknowledgements

Our gratitude is extended to Dr. Ching Yeh Hu for kind suggestions. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil) and Fundação Universitária para o Desenvolvimento do Ensino e da Pesquisa (FUNDEPE, Brazil).

References

- Bailey, M.A.; Boerma, H.R.; Parrott, W.A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 29P: 102-108; 1993.
- Barnabás, B.; Pfahler, P.L.; Kovács, G. Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L). *Theor. Appl. Genet.* 81: 675-678; 1991.
- Buchheim, J.A.; Colburn, S.M.; Ranch, J.P. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol.* 89: 768-775; 1989.
- Fan, Z.; Armstrong, K.C.; Keller, W.A. Development of microspores *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* L. *Protoplasma* 147: 191-199; 1988.
- Finer, J.J.; McMullen Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissues. *In Vitro Cell. and Dev. Biol.* 27P: 175-182; 1991.
- Ghaemi, M.; Sarrafi, A.; Alibert, G. The effects of silver nitrate, colchicine, cupric sulfate and genotype on the production of embryoids from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.* 198: 433-439; 1994.
- Guha, S.; Maheshwari, S.C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204 (4957): 497; 1964.
- Hu, C.Y.; Yin, G.C.; Zanettini, M.H.B. Haploid of Soybean A Review Article. In: Jain S.M.; Sopory, S.K.; Veilleux, R.E. eds. *In vitro haploid production in higher plants*. Dordrecht: Kluwer Acad. Publish.; 1996: 377-395.
- Iqbal, M.C.M.; Möllers, C.; Röbbelen, G. Increased embryogenesis after colchicine treatment of microspore cultures of *Brassica napus* L. *J. Plant Physiol.* 143: 222-226, 1994.
- Kaltchuk-Santos, E.; Zanettini, M.H.B.; Mundstock, E. Pollen dimorphism in soybean. *Protoplasma* 174: 74-78; 1993.
- Kaltchuk-Santos, E.; Mariath, J.E.; Mundstock, E.; Zanettini, M.H.B. Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.* 49:107-115; 1997.
- Keller, W.A.; Armstrong, K.C. Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. *Theor. Appl. Genet.* 55:65-67; 1979.

- Kyo, M.; Harada, H. Control of developmental pathway of tobacco pollen *in vitro*. *Planta* 168: 427-432; 1986.
- Mardhorst, A.P.; Toonen, M.A.J.; De Vries, S.C. Plant Embryogenesis Critical Reviews in Plant Sciences 16: 535-576; 1997.
- Nitch, C.; Norreel, B. Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthere ou isole de l'anthere. *Comptes Rendus L'Acad. Sci. Série D*, .276:303-306; 1973.
- Reynolds, T.L. Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 33: 1-10; 1997.
- Santos, K.G.B.; Mundstock, E.; Bodanese-Zanettini, M.H. Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. *Plant Cell Reports* 16:859-864; 1997.
- Szakács, E.; Barnabás, B. The effect of colchicine treatment on microspore division and microspore-derived embryo differentiation in wheat (*Triticum aestivum* L) anther culture. *Euphytica* 83: 209- 213; 1995.
- Sunderland, N.; Dunwell, J.M. Pathways in pollen embryogenesis. In: Street, H.E. ed. *Tissue Culture and Plant Science*. London: Acad. Press 1974:141-167.
- Tanaka, I.; Ito, M. Control of division patterns in explanted microspores of *Tulipa gesneriana*. *Protoplasma* 108: 329-340; 1981.
- Telmer, C.A.; Newcomb, W.; Simmonds, D.H. Microspore development in *Brassica napus* and the effect of high temperature on division *in vivo* and *in vitro*. *Protoplasma* 172: 154-165; 1993.
- Teparkum, S.; Veilleux, R.E. Indifference of potato anther culture to colchicine and genetic similarity among anther-derived monoploid regenerants determined by RAPD analysis. *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.* 53:49-58; 1998.
- Wan, Y.; Petolino, J.F.; Wildhom, J.M. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.* 77:889-892; 1989.
- Yin, G.C.; Li, X.Z.; Xu, Z.; Chen, L.; Zhu, Z.Y.; Bi, F.Y. Anther culture of *Glycine max*. *Kexue Tongboa* 25(11): 976; 1980.
- Zaki, M.A.M.; Dickinson, H.G. Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus*. *Protoplasma* 156: 149-162; 1990.

- Zaki, M.A.M.; Dickinson, H.G. Microspore-derived embryos in *Brassica*: the significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. *Sex. Plant Reprod.* 4 : 48-55; 1991.
- Zaki, M.A.M., Dickinson, H.G. Modification of cell development *in vitro*: the effect of colchicine on anther and isolated microspore culture in *Brassica napus*. *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.* 40: 255-270; 1995.
- Zamani, I.; Kovács, G.; Gouli-Vavdinoudi, E.; Roupakias, D.G.; Barnabás, B. Regeneration of fertile doubled haploid plants from colchicine-supplemented media in wheat anther culture. *Plant Breeding* 119: 461-465; 2000.
- Zhao, J.P.; Simmonds, D.H.; Newcomb, W. Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas. *Planta* 198: 433-439; 1996.

Figure 1: a. Globular embryos formed from anther culture of soybean; b-j. Different morphologies of soybean androgenetic embryos: b. monocotyledonous embryo; c. cluster of dicotyledonous (*d*) and fused embryos (*f*); d. fused embryo (*m*=monocotyledonous; *d*=dicotyledonous); e. embryo with fused cotyledons (arrow shows the shoot apex); f. embryo moderately fasciated; g. embryo with long hypocotyl and vestigial cotyledon. Bars=2mm.

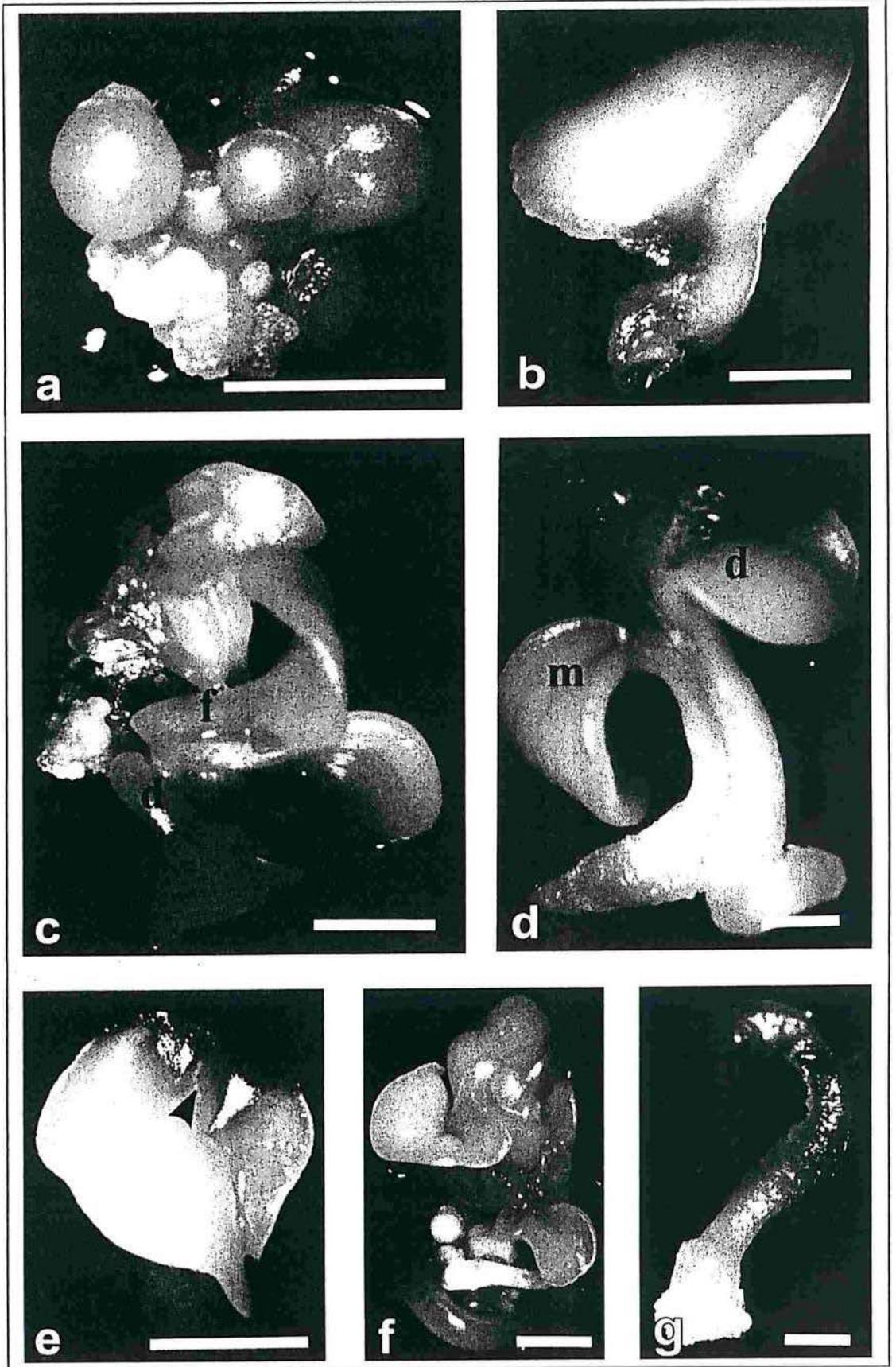


Table 1- Effect of colchicine concentration and duration of treatment on the formation of symmetrical binucleated pollen grains (II_{sym}), multinucleated pollens and embryos in soybean anther culture:

Colchicine treatment		at inoculation			after 15 day culture			after 60 day culture	
Concentration (mg/l)	Duration (hours)	N ^①	II_{sym} ^② (%)	multinucleate d ^③ (%)	N	II_{sym} (%)	multinucleated (%)	N ^①	anthers with embryos (%)
A) Experiment I									
0	24	1193	0.08	0	1615	0.37	0	80	2.50
5	24	717	0	0	1044	0.29	0	69	1.45
10	24	1801	0.11	0	2276	0.79	0.09	58	0
20	24	828	0.12	0	1871	0.21	0	54	5.55
0	72	1198	0	0	660	0.76	0	79	3.80
5	72	956	0.31	0	328	0	0	52	5.77
10	72	2176	0.09	0	1019	0.10	0	58	0
20	72	1359	0	0	957	0.83	0.10	55	3.39
B) Experiment II									
0	24	1659	0.66	0	2428	0.53	0	88	7.95
25	24	2624	0.04	0	3014	0.43	0.23	103	2.91
50	24	3180	0	0	2538	0.16	0.08	85	8.23
100	24	2481	0.08	0	2277	0.31	0	118	3.38
0	72	2340	0.04	0	2700	0.59	0.59	69	4.34
25	72	2988	0.07	0	2411	0.29	0.08	97	2.06
50	72	2561	0.55	0	1988	0.85	0.40	69	2.90
100	72	2540	0.04	0	1742	0.75	0.57	76	0
C) Experiment III									
0	24	7395	0.3	0	9805	0.14	0.04	123	1.62
10	24	9570	0.7	0	7188	0.32	0.08	121	3.30
200	24	9329	0.45	0	8865	0.54	0.08	85	5.88
400	24	9940	0.13	0	8917	0.09	0.02	129	6.20
0	72	3341	0.06	0	7660	0.14	0.07	150	4.0
100	72	5574	0.02	0	7551	0.26	0.05	156	3.20
200	72	4659	0.82	0	8413	0.36	0.08	126	3.17
400	72	5572	0.02	0	5881	0.10	0	118	1.69

① = total of microspores; ② = # of II_{sym} /#total of microspores; ③ = # of multinucleated/# total of microspores; ④ = total of anthers/calli