

Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*

Lia Rosane Rodrigues,* João Marcelo Santos de Oliveira*
e Jorge Ernesto de Araujo Mariath*

Resumo: (Anatomia Vegetal Aplicada ao Estudo de Sistemas Androgênicos *In Vitro*) – Por meio do cultivo *in vitro* de anteras ou de gametófitos isolados de algumas espécies vegetais, é possível interromper o desenvolvimento microgametofítico e acionar divisões celulares atípicas, as quais podem originar esporófitos com a mesma constituição genética do gametófito e com variados níveis de ploidia, caracterizando a ocorrência da androgênese. Estudos histológicos têm contribuído para a compreensão dos eventos morfogênicos nesta transição direta gametófito-esporófito, que, frequentemente, envolve a embriogênese. Além disso, diante da possibilidade de proliferação dos estratos parietais e do conectivo, o estudo histológico de anteras em cultivo tornou-se indispensável para a identificação dos sítios de embriogênese. Neste texto, são apresentadas observações recentes, resultantes de estudos histológicos em ambos os sistemas que visam à androgênese, indicando que, comparativamente a outras técnicas, as técnicas de análise anatômica oferecem inferências de grande confiabilidade.

Palavras-chave: anatomia vegetal, histologia, androgênese, embriogênese, embriologia.

Abstract: (Applied Plant Anatomy to Study *In Vitro* Androgenic Systems) – By means of anther culture or isolated gametophyte culture, it is possible to control the microgametophytic development and to trigger atypical cell divisions that could originate sporophytes. These new sporophytes have the same genetic constitution of the gametophyte, with different ploidy levels, characterizing the occurrence of androgenesis. In this direct gametophyte-sporophyte transition, histological studies contribute to understanding morphogenic events, which frequently occur by embryogenesis. Moreover, since anther walls and connective tissue could proliferate *in vitro*, cultured anthers must always undergo histological studies for a precise description of embryogenic sites. In this text, recent histological observations in both androgenic systems are presented and discussed. Observations confirm that compared with techniques, anatomical techniques enable highly reliable inferences.

Keywords: plant anatomy, histology, androgenesis, embryogenesis, embriology.

* Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43423, Sala 201, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Apoio financeiro: CNPQ, CAPES e FAPERGS. liarr@ufrgs.br

Introdução

A Anatomia Vegetal é o ramo da Botânica que estuda a estrutura interna dos organismos vegetais, permitindo a descrição de células, tecidos e órgãos quanto a sua ontogênese, constituição e função (Apezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro 2003). A Anatomia pode auxiliar na compreensão de vários fenômenos relacionados ao corpo vegetal, dentre os quais as respostas ao cultivo *in vitro*.

Nas técnicas de cultivo *in vitro*, o estabelecimento de células, tecidos ou órgãos vegetais sob condições controladas tem como consequência a interrupção do controle hormonal a que estas células estavam submetidas. Sendo expostas a uma nova condição ambiental, as células vegetais podem expressar um potencial morfogênico que não se expressaria *in vivo*. As condições de cultivo podem tanto permitir a continuidade de um padrão de desenvolvimento inviabilizado na planta, quanto promover a desdiferenciação e a neomorfogênese vegetal. As etapas que constituem estes eventos podem ser detalhadas pelo emprego de técnicas de análise anatômica.

Androgênese vegetal *in vitro*

Para o desenvolvimento dos microgametófitos (grãos de pólen), são necessários dois eventos sequenciais que integram a ontogênese da antera: a microsporogênese e a microgametogênese. A microsporogênese transcorre desde a meiose até a liberação do micrósporo haplóide da tétrade. Um dos primeiros eventos que caracterizam o início da microgametogênese é a formação de um grande vacúolo no micrósporo, forçando a polarização do núcleo haplóide: o citoplasma e o núcleo são comprimidos contra a esporoderme. Uma mitose assimétrica origina duas células distintas, a célula vegetativa e a célula generativa (Johri 1984; Mariath *et al.* 2003). O padrão assimétrico desta primeira divisão mitótica é essencial para a funcionalidade do microgametófito.

O desenvolvimento do microgametófito pode ser interrompido por condições de cultivo *in vitro* que acionam divisões celulares atípicas, as quais podem originar um novo esporófito, caracterizando a ocorrência da androgênese (Maheshwari *et al.* 1982; Reynolds 1997; Henry 1998).

A androgênese é um processo reprodutivo uniparental, no qual a progênie possui o material genético apenas do genitor masculino. Este evento ocorre *in vivo* em espécies do gênero *Corbicula* (Corbiculidae) e do gênero *Bacillus* (Bacillidae), do reino animal, e na espécie vegetal *Cupressus dupreziana* (Cupressaceae) (McKone & Halpern 2003).

A androgênese vegetal *in vitro* foi inicialmente registrada no cultivo de anteras de *Datura innoxia* por Guha & Maheshwari (1964, 1966). Neste caso, os gametófitos apresentaram um desvio da rota de desenvolvimento e originaram esporófitos haplóides.

A partir deste registro, foram conduzidos cultivos experimentais para obtenção de esporófitos androgênicos de inúmeras espécies vegetais (Maheshwari *et al.* 1982). Nas condições de cultivo propostas, as espécies mais responsivas tornaram-se modelo para o estudo dos fatores que alteram a rota de desenvolvimento gametofítico, do estágio de desenvolvimento responsivo, dos padrões iniciais das divisões celulares que envolvem esta transição gametófito-esporófito e das condições de cultivo que aceleram a regeneração de plantas.

Em condições de cultivo favoráveis, são regenerados esporófitos haplóides ou duplo-haplóides, nem sempre com histodiferenciação completa. O estudo de mais de duzentas espécies vegetais mostrou que variações no número cromossômico, incluindo diploidia, poliploidia e aneuploidia, são comuns entre indivíduos obtidos de um mesmo sistema androgênico (Henry 1998).

A rota de desenvolvimento esporofítico pode ser acionada no gametófito tanto por meio do cultivo *in vitro* de anteras quanto do cultivo de micrósporos e gametófitos isolados. Ambos os sistemas prestam-se a estudos básicos, como modelo para estudo dos diferentes aspectos (molecular, fisiológico, histológico, etc.) da embriogênese e da embriologia (Johri 1984). Plantas haplóides e duplo-haplóides têm amplo emprego como ferramenta biotecnológica em trabalhos que visam à manipulação de variabilidade genética para o melhoramento das plantas cultivadas, acelerando a obtenção de linhagens e permitindo o mapeamento de genes de interesse agrônomico e a descoberta de mutações (Hoffmann *et al.* 1982; Siebel & Pauls 1989). O cultivo de micrósporos e gametófitos isolados também pode ser um sistema alvo para indução de mutações (Barro *et al.* 2001), fusão de protoplastos

(Sun *et al.* 1999) e transformação genética (Stöger *et al.* 1995; Fukuoka *et al.* 1998).

A partir da observação de Guha & Maheshwari (1964, 1966), o cultivo de anteras consolidou-se a tal ponto que, em inúmeros trabalhos, foi apresentado como sinônimo da embriogênese de origem gametofítica. Entretanto, neste sistema, os micrósporos e gametófitos estabelecidos *in vitro* são envolvidos por tecidos esporofíticos: os estratos parietais, constituídos pelo tapete, pelo endotécio, pela(s) camada(s) média(s) e pela epiderme. Também está presente o tecido conectivo, que une a antera ao filete. Foi demonstrado, em algumas espécies vegetais, que as condições de cultivo não favorecem a proliferação destes tecidos da antera (Wang *et al.* 1999). Em soja (*Glycine max*), foi proposto que, após o ingresso da planta na fase reprodutiva, suas células apresentam pouco ou nenhum potencial morfo-gênico (Hu *et al.* 1996).

Porém, à medida que cultivos de anteras foram conduzidos com diferentes espécies vegetais, foram registrados alguns casos de proliferação *in vitro* de origem esporofítica (Tabela 1). Diante disso, surgiu a necessidade de identificar os sítios de embriogênese, pois o controle do evento morfo-gênico é pré-requisito para a consistência de um protocolo. Por este aspecto, os estudos anatômicos tornaram-se essenciais à compreensão das respostas de anteras ao cultivo *in vitro*.

Anatomia aplicada ao estudo de sistemas androgênicos

A Anatomia apresenta inúmeras vantagens na caracterização das respostas morfogênicas no cultivo de anteras, atendendo a objetivos como os listados a seguir.

1. Identificar divisões celulares características do desvio da rota gametofítica

A análise de seções histológicas de anteras cultivadas *in vitro* permitiu a descrição das divisões celulares que levaram ao desenvolvimento de esporófitos androgênicos em espécies responsivas, como, por exemplo, *Triticum aestivum* (Reynolds 1993), *Hordeum vulgare* (Pulido *et al.* 2001; Mazzocato *et al.* 2004) e *Brassica juncea* (Malik *et al.* 2001). Foi demonstrado que, conforme a espécie e as condições de cultivo, tanto micrósporos quanto gametófitos originam esporófitos androgênicos *in vitro*. Em geral, os micrósporos ingressam na microgametogênese, por meio de uma divisão celular típica (assimétrica) ou atípica (simétrica), como um passo inicial para a embriogênese (Pretova *et al.* 1993; Kim *et al.* 2004).

Porém, respostas celulares indicativas da indução à embriogênese de espécies modelo nem sempre resultam na formação de esporófitos androgênicos em espécies para as quais as condições de indução ainda não foram identificadas. No caso de

Tabela 1. Citações do potencial morfo-gênico dos tecidos esporofíticos no cultivo de anteras *in vitro*, em diferentes espécies vegetais.

Espécie	Evento morfo-gênico	Referência
<i>Cajanus cajan</i>	calogênese	Vasil (1967)
<i>Ranunculus sceleratus</i>	embriogênese	Konar & Nataraja (1965)
<i>Medicago sativa</i>	embriogênese	Saunders & Bingham (1972)
<i>Petunia</i> spp.	não mencionado	Sangwan & Norreel (1975)
<i>Hevea brasiliensis</i>	embriogênese	Michaux-Ferrière <i>et al.</i> (1992)
<i>Cichorium intybus</i>	embriogênese	Guedira <i>et al.</i> (1989)
<i>Vitis</i> spp.	embriogênese e organogênese	Altamura <i>et al.</i> (1992)
<i>Manihot esculenta</i>	embriogênese	Woodward & Puonti-Kaerlas (2001)
<i>Malus</i> spp.	calogênese	Ochatt & Zhang (1996)
<i>Oenothera hookeri</i>	organogênese	Martinez & de Halac (2000)
<i>Pometia pinnata</i>	embriogênese	Sudarmonovati <i>et al.</i> (2000)
<i>Glycine max</i>	embriogênese	Rodrigues <i>et al.</i> (2004, 2005 a)

anteras de soja, através da análise de seções histológicas, associada ao emprego de microscopia em campo claro e fluorocromasia, foi comprovada a formação de gametófitos multinucleados dentro de botões florais armazenados por até 28 dias a 4°C (Rodrigues *et al.* 2005b), resposta até então registrada somente *in vitro* e sempre atribuída ao cultivo.

2. Acompanhar as divisões celulares que originam o esporófito androgênico

A Anatomia tem servido amplamente à identificação dos padrões de formação de embriões derivados de micrósporos e de gametófitos, permitindo, inclusive, a descrição da síntese das novas paredes no gametófito multinucleado (Idzikowska & Mlodzianowski 1979). À medida que o número de células aumenta, ocorre o rompimento da esporoderme e a liberação de uma estrutura embriogênica multicelular com variados graus de organização entre o padrão de desenvolvimento zigótico e calogênico (Reynolds 1993; Reynolds 1997; Maraschin *et al.* 2003; Mazzocato *et al.* 2004).

3. Determinar os sítios de origem das proliferações *in vitro*

Naqueles cultivos em que os tecidos esporofíticos da antera apresentam potencial proliferativo, seções histológicas esclarecem a origem e o destino das divisões celulares. Por exemplo, a análise de seções histológicas de anteras de soja cultivadas mostrou que calos conectivos deram origem a estruturas embriogênicas de origem multicelular (Rodrigues *et al.* 2005a), até então contabilizadas como derivadas do micrósporo e do gametófito, quando analisadas apenas ao estereomicroscópio.

Também foi observado que células epidérmicas da antera, não-reabsorvidas, desdiferenciaram-se e retomaram a capacidade de divisão, originando proliferações embriogênicas (Rodrigues *et al.* 2005a). Quando analisadas em esmagamentos ao microscópio em campo claro, estas proliferações podem ser confundidas com estruturas embriogênicas de origem gametofítica.

Além disso, foi possível registrar que algumas protuberâncias consideradas embriogênicas em função da morfologia externa ao estereomicroscópio, similar a de um embrião globular, eram apenas proliferações calogênicas sem qualquer organização interna (Rodrigues 2004).

4. Identificar a origem de variações no número cromossômico e nos níveis de ploidia

No cultivo de anteras, a haploidia é considerada um indicativo da origem androgênica de calos, estruturas embriogênicas e embriões. Geralmente, para a contagem cromossômica, o explante é submetido a esmagamento (Guha & Maheshwari 1966; Kumar *et al.* 2003), destruindo a organização dos tecidos.

Em seções histológicas de calos conectivos de soja, foram encontradas células com número cromossômico bastante inferior a 40 (2n), aparentemente haplóides. Em uma destas células, foi possível confirmar o nível haplóide (Rodrigues 2004). A mesma observação foi feita anteriormente no cultivo de anteras de *Vitis vinifera* x *V. rupestris* (Altamura *et al.* 1992) e de *Manihot esculenta* (Woodward & Puonti-Kaerlas 2001). Uma vez que as células haplóides podem ter origem esporofítica no cultivo de anteras, a sua presença não deve ser usada como único indicativo de origem androgênica.

Variações do nível de ploidia e do número cromossômico são pouco estudadas em cultivos que visam embriogênese a partir de tecidos esporofíticos (clonal). Em esmagamentos de explantes cotiledonares de soja, Homrich *et al.* (2000) registraram a ocorrência de embriões-mosaico, com linhagens celulares com 40 (2n), 60 (3n) e 80 (4n) cromossomos. Na análise de seções histológicas de calos conectivos de soja foram encontradas falhas na citocinese, que podem explicar estas variações no número cromossômico (Rodrigues 2004).

5. Esclarecer o grau de histodiferenciação do novo esporófito androgênico

Ainda que a indução à embriogênese seja eficiente sobre uma proporção significativa de gametófitos, nem sempre o desenvolvimento do embrião androgênico é completo. Frequentemente, o padrão inicial de formação destes embriões difere daquele expresso pelo embrião zigótico (Reynolds 1993; Maraschin *et al.* 2003).

Por meio da análise de seções histológicas, podem ser detalhados: falhas do desenvolvimento embriogênico, efeito de tratamentos visando à obtenção de embriões completos e ocorrência de embriogênese secundária (XuHan *et al.* 1999; Cegielska-Taras *et al.* 2002).

Pilares da anatomia aplicada ao cultivo *in vitro*

A partir de trabalhos em que a Anatomia foi aplicada ao estudo de sistemas androgênicos, é possível estabelecer critérios básicos para o emprego da Anatomia em quaisquer sistemas *in vitro*:

1. Comparação com um padrão *in vivo*

Um estudo anatômico da resposta ao cultivo requer a identificação prévia dos eventos ontogênicos que originaram o tecido e do estado do tecido no momento do estabelecimento *in vitro*.

Para o estudo de sistemas androgênicos, é preciso considerar que, quando a planta sofre a indução floral, destina recursos para a diferenciação de órgãos reprodutivos e forma as anteras como um sítio extremamente especializado para a microsporigênese e a microgametogênese. A antera constitui-se de vários tecidos destinados à senescência combinada à gametogênese (Schmid 1976). No momento em que é estabelecida *in vitro*, a antera deixa de fazer parte do botão floral e de receber o estímulo nutricional e hormonal específico à conclusão da rota gametofítica (Vasil 1967; Johri 1984). Considerando as funções especializadas e o momento específico da microgametogênese em que inicia a degradação de cada tecido, a antera pode ter diversas respostas às condições de cultivo.

Por esse ponto de vista, é possível explicar a ocorrência simultânea dos eventos morfogênicos distintos, registrados no cultivo de anteras de algumas espécies, como *Vitis* spp. (Altamura *et al.* 1992), *Malus* spp. (Ochatt & Zhang 1996) e soja. Nesta última, foi registrada a formação de calos (Tang *et al.* 1973; Ivers *et al.* 1974), raízes (Ye *et al.* 1994), brotações apicais (Yin *et al.* 1982; Jian *et al.* 1986) ou filóides (Rodrigues *et al.* 2005a) e estruturas embriogênicas derivadas do micrósporo (Zhao *et al.* 1998) ou do conectivo (Rodrigues *et al.* 2004, 2005a).

O cultivo pode exercer um estímulo diferente sobre cada célula e a resposta pode depender de inúmeras condições, além daquelas mencionadas nos textos clássicos, como a constituição do meio e as condições físicas *in vitro* (Maheshwari *et al.* 1982; Reynolds 1997). A resposta morfogênica pode depender, inclusive, da posição da célula em relação às demais e em relação ao meio nutritivo, da resposta dos tecidos adjacentes e da liberação de compostos pelas células adjacentes (Rodrigues *et al.* 2005a).

2. Observações seriais

Na análise de seções histológicas, é sempre necessário fazer uma interpretação tridimensional do material vegetal. Entretanto, para uma determinação abrangente da origem e do destino das proliferações *in vitro*, é essencial registrar etapas do mesmo evento ao longo do tempo de cultivo. Por exemplo, no cultivo de anteras de soja, proliferações invasivas ao espaço locular, anteriormente atribuídas aos gametófitos (Kaltchuk-Santos *et al.* 1997), tiveram sua origem comprovada somente através de observações histológicas seriais: foi registrado, de forma inédita, que uma célula desdiferenciada da camada média, ou várias células conectivas, pode(m) proliferar-se para dentro do lóculo da antera, comprimindo os gametófitos (Rodrigues *et al.* 2005a). Proliferações similares foram registradas no cultivo de anteras de *Prunus armeniaca* (Peixe *et al.* 2004) e também atribuídas pelos autores à embriogênese de origem gametofítica.

3. Tamanho amostral representativo

Observações seguras quanto à resposta ao cultivo devem partir da análise de um número representativo de amostras. É preciso que várias seções histológicas representativas de um mesmo evento estejam disponíveis para a execução de diferentes colorações e reações fluorocromáticas, uma vez que o material pode ser perdido em alguns testes. Também é adequado que amostras do mesmo material sejam fixadas e processadas seguindo diferentes protocolos (cf. O'Brien & McCully 1981 e Kraus & Arduin 1997), prevendo a necessidade de análises adicionais que ampliem as informações.

4. Combinação de diferentes técnicas e complementação com técnicas auxiliares

A capacidade humana de percepção e interpretação dos fenômenos é sempre relativa ao potencial individual e aos recursos empregados na análise. Por isso, as informações quanto aos eventos morfogênicos serão mais completas quanto mais abrangentes as técnicas empregadas para seu estudo. Recentemente, a diversificação de técnicas tem permitido inferências cada vez mais completas sobre os sistemas embriogênicos, principalmente pelo emprego de estudos de imunolocalização e moleculares (Wang *et al.* 1999; Verdeil *et al.* 2001; Maraschin *et al.* 2003).

O acúmulo parietal de calose e de pectinas caracteriza a indução à embriogênese a partir de célu-

las esporofíticas (Chapman *et al.* 2000; Verdeil *et al.* 2001), e foi registrado na esporoderme de alguns gametófitos de soja, nas condições de cultivo que desfavoreceram a proliferação dos estratos parietais e do conectivo (Rodrigues *et al.* 2004). Por isso, estudos de imunolocalização destas substâncias (calose e pectinas) poderão ser úteis à identificação prévia de micrósporos e gametófitos responsivos.

No caso do cultivo de anteras de soja, observações histológicas seriais e a combinação de técnicas, como análises fluorocromáticas e testes histoquímicos, subsidiaram a decisão de troca de sistema *in vitro*. Foi necessário desenvolver uma estratégia de isolamento para estabelecer cultivos de micrósporos e gametófitos em suspensão, eliminando a interferência de tecidos esporofíticos (Rodrigues 2004), alternativa anteriormente apontada para outras espécies, como *Medicago sativa* (Saunders & Bingham 1972), *Petunia* spp. (Sangwan & Norreel 1975) e *Malus* spp. (Ochatt & Zhang 1996).

Anatomia de micrósporos e gametófitos em suspensões

No cultivo de micrósporos e gametófitos isolados, a resposta é acompanhada através de microscopia, principalmente de material fresco ao microscópio invertido e de material fixado sob fluorescência (Sangwan & Norreel 1975; Pretova *et al.* 1993; Binarova *et al.* 1997).

Para o sucesso no desenvolvimento de um protocolo, é essencial o emprego de técnicas confiáveis no acompanhamento dos cultivos. Mesmo na ausência de células esporofíticas, na avaliação ao microscópio, é possível que eventos degradativos sejam confundidos com eventos embriogênicos e que contaminantes, inclusive microorganismos, sejam confundidos com proembriões.

A experiência com soja comprova que várias técnicas podem ser úteis ao estudo de suspensões de micrósporos e gametófitos isolados (Rodrigues 2004). A técnica mais acessível, porém menos informativa, é a microscopia de campo claro de amostras fixadas em Farmer e coradas com carmim. Dentre as técnicas de microscopia de fluorescência, a reação fluorocromática à fluoresceína diacetato (FDA) (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison 1970) oferece a estimativa de viabilidade mais confiável. A reação fluorocromática ao 4'-

6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e à mitramicina, a partir de amostras frescas ou fixadas (Coleman & Goff 1985), são técnicas significativamente mais informativas quanto à morfologia dos núcleos (Rodrigues 2004). Entretanto, estas técnicas impossibilitam a conservação das lâminas e a execução de mais de um teste com o mesmo material.

Contornando as desvantagens destas técnicas, suspensões de micrósporos e gametófitos também podem ser submetidas aos procedimentos para a obtenção de seções histológicas em historesina. Para tanto, uma das estratégias de amostragem é a passagem da suspensão através de um filtro, cujos poros tenham dimensão inferior ao dos gametófitos (Maraschin *et al.* 2003). Um procedimento alternativo foi adaptado de Santos & Mariath (1997) por Rodrigues (2004), no qual micrósporos e gametófitos são amostrados do cultivo e retidos dentro de uma gota de agente gelificante altamente concentrado. Esta amostra gelificada pode ser submetida às preparações histológicas sem perda de material.

Assim, seja qual for o sistema de abordagem à embriogênese de origem gametofítica, enquanto algumas técnicas têm sido abandonadas, o emprego de estudos histológicos é cada vez mais freqüente, permitindo inferências de grande confiabilidade.

Referências

- ALTAMURA, M. M., CERSOSIMO, A., MAJOLI, C. & CRESPIAN, M. 1992. Histological study of embryogenesis and organogenesis from anthers of *Vitis rupestris* du Lot cultured *in vitro*. *Protoplasma*, 171: 134-141.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S. M. 2003. *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Editora UFV. 438p.
- BARRO, F., FERNÁNDEZ-ESCOBAR, J., DE LA VEJA, M. & MARTÍN, A. 2001. Double haploid lines of *Brassica carinata* with modified erucid acid content through mutagenesis by EMS treatment of isolated microspores. *Plant Breed.* 120: 262-264.
- BINAROVA, P., HAUSE, G., CENKLOVÁ, V., CORDEWENER, J. H. G. & CAMPAGNE, M. M. V. L. 1997. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sexual Plant Reprod.*, 10: 200-208.
- CEGIELSKA-TARAS, T., TYKARSKA, T., SZALA, L., KURAS, M. & KRZYMANSKI, J. 2002. Direct plant development from microspore-derived embryos

- of winter oilseed rape *Brassica napus* L. ssp. *Oleifera* (DC.) Metzger. *Euphytica*, 124: 341-347.
- CHAPMAN, A., BLERVACQ, A.-S., HENDRIKS, T., SLOMIANNY, C., VASSEUR, J. & HILBERT J.-L. 2000. Cell wall differentiation during early somatic embryogenesis in plantas. II. Ultrastructural study and pectin immunolocalization on chicory embryos. *Can. J. Bot.*, 78: 824-831.
- COLEMAN, A. W. & GOFF, L. J. 1985. Applications of fluorochromes to pollen biology. I. Mithramycin and 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as vital stains and for quantitation of nuclear DNA. *Stain Technol.*, 60: 145-154.
- FUKUOKA, H., OGAWA, T., MATSUOKA, M., OHKAWA, Y. & YANO, H. 1998. Direct gene delivery into isolated microspores of rapeseed (*Brassica napus* L.) and the production of fertile transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 17: 323-328.
- GUEDIRA, M., DUBOIS-TYLSKI, T., VASSEUR, J. & DUBOIS, J. 1989. Embryogénese somatique directe à partir de cultures d'anthers du *Cichorium* (Asteraceae). *Can. J. Bot.*, 67: 970-976.
- GUHA, S. & MAHESHWARI, S. C. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 4957: 497.
- GUHA, S. & MAHESHWARI, S. C. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature*, 5057: 97-98.
- HENRY, Y. 1998. Origin of microspore-derived dihaploid *in vitro* plants. *Plant Tiss. Cult. Biotech.*, 4 (3-4): 127-135.
- HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: Intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.*, 45: 115-120.
- HOFFMANN, F., THOMAS, E. & WENZEL, G. 1982. Anther culture as a breeding tool in rape. *Theor. Appl. Genet.*, 61: 225-232.
- HOMRICH, M. S., PAGGI, G. M., FOGLIATTO, L. F., KALTCHUK-SANTOS, E. & BODANESE-ZANETTINI, M. H. 2000. Estabilidade cromossômica em culturas embriogênicas de soja. *Genet. Molec. Biol.*, 23 (3, suppl): 377.
- HU, C. Y., YIN, G. C. & BODANESE-ZANETTINI, M. H. 1996. Haploid of Soybean. In: MOHAN, S. J., SOPORY, S. K. & VEILLEUX, R. E. (Eds.) *In vitro Haploid Production in Higher Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. v. 3, 412p.
- IDZIKOWSKA, K. & MLODZIANOWSKI, F. 1979. Cell wall formation in multinucleate pollen grains of *Hordeum vulgare* anthers cultured *in vitro*. *Acta Soc. Bot. Pol.*, XLVIII (3): 377-380.
- JOHRI, B. M. 1984. *Embryology of Angiosperms*. Berlin: Springer-Verlag. 830p.
- KALTCHUK-SANTOS, E., MARIATH, J. E., MUNDSTOCK, E., HU, C. Y. & BODANESE-ZANETTINI, M. H. 1997. Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 49: 107-115.
- KIM, M., KIM, J., YOON, M., CHOI, D-I. & LEE, K-M. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 77(1): 63-72.
- KONAR, R. N. & NATARAJA, K. 1965. Production of embryoids from the anthers of *Ranunculus sceleratus* L. *Phytomorphology*, 15: 245-248.
- KRAUS, J. E. & ARDUIN, M. 1997. *Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal*. Seropédica: EDUR. 198p.
- KUMAR, H.G.A., MURTHY, H.N. & PAEK, Y. 2003. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Sci. Hortic. - Amsterdam*, 98: 213-222.
- MAHESHWARI, S. C., RASHID, A. & TYAGI, A. K. 1982. Haploids from pollen grain - Retrospect and Prospect. *Am. J. Bot.*, 69 (5): 865-879.
- MALIK, M. R., RANGASWAMY, N. S. & SHIVANNA, K. R. 2001. Induction of microspore embryos in a CMS line of *Brassica juncea* and formation of the androgenic plantlets. *Euphytica*, 120: 195-203.
- MARASCHIN, S. de F., LAMERS, G. E. M., PATER, B. S., SPAINK, H. P. & WANG, M. 2003. 14-3-3 isoforms and pattern formation during barley microspore embryogenesis. *J. Exp. Bot.*, 54: 1033-1043.
- MARIATH, J. E. A., SANTOS, R. P. & BITTENCOURT, N. S. 2003. Flor. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELO-GUERREIRO, S. M. (Eds.) *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Editora UFV. 438p.
- MARTINEZ, L. D. & de HALAC, I. N. 2000. Morphogenesis in short-term and long-term anther derived calli of *Oenothera hookeri* de Vries. *Biocell*, 24(3): 239-246.
- MAZZOCATO, A. C., WINGE, H. & MARIATH, J. E. A. 2004. Análises qualitativas da androgênese na cultivar MN-599 de cevada (*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*). *Embrapa - Documentos*, 46: 170-175.
- McKONE, M. J. & HALPERN, S. L. 2003. The evolution of androgenesis. *Am. Nat.*, 161(4): 642-656.
- MICHAUX-FERRIÉRE, N., GROUT, H. & CARRON, M. P. 1992. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *Am. J. Bot.*, 79(2): 174-180.

- O'BRIEN, T. P. & McCULLY, M. E. 1981. *The study of plant structure principles and selected methods*. Melbourne: Termacarphe Pty. Ltd. 354p.
- OCHATT, S. J. & ZHANG, Y. X. 1996. *In Vitro* Haploidization of Fruit Trees. In: MOHAN, S.J., SOPORY, S. K. & VEILLEUX, R. E. (Eds.) *In vitro Haploid Production in Higher Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. v. 3, 412p.
- PEIXE, A., BARROSO, J., POTES, A. & PAIS, M. S. 2004. Induction of haploid morphogenic calluses from *in vitro* cultured anthers of *Prunus armeniaca* cv. Harcot. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 77(1): 35-41.
- PRETOVA, A., RUIJTER, N. C. A., VANLAMMEREN, A. A. M. & SCHEL, J. H. N. 1993. Structural observations during androgenic microspore culture of the 4c1 genotype of *Zea mays* L. *Euphytica* 65: 61-69.
- PULIDO, A., CASTILLO, A., PILAR VALLÉS, M. & OLMEDILLA, A. 2001. Early stages of pollen embryogenesis in barley anther cultures induced by pre-treatment with mannitol. *Int J. Dev. Biol.*, 45(S1): S55-S56.
- REYNOLDS, T. L. 1993. A cytological analysis of microspores of *Triticum aestivum* (Poaceae) during normal ontogeny and induced embryogenic development. *Am. J. Bot.*, 80: 569-576.
- REYNOLDS, T.L. 1997. Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 33: 1-10.
- RODRIGUES, L. R. 2004. *Eventos Embriogênicos em Tecidos Estaminais de Glycine max (L.) Merrill*. 315 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- RODRIGUES, L. R., OLIVEIRA, J. M. S., MARIATH, J. E. A. & BODANESE-ZANETTINI, M. H. 2004. Effects of light conditions and 2,4-D concentration in soybean anther culture. *Plant Growth Regul.*, 44(2): 125-133.
- RODRIGUES, L. R., OLIVEIRA, J. M. S., MARIATH, J. E. A. & BODANESE-ZANETTINI, M. H. 2005a. Histology of embryogenic responses in soybean anther culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 80(2): 129-137.
- RODRIGUES, L. R., OLIVEIRA, J. M. S., MARIATH, J. E. A., IRANÇO, L. B. & BODANESE-ZANETTINI, M. H. 2005b. Anther culture and cold treatment of floral buds increased symmetrical and extra nuclei frequencies in soybean pollen grains. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 81(1): 101-104.
- SANGWAN, R. S. & NOREEL, B. 1975. Induction of plants from pollen grains of *Petunia* cultured *in vitro*. *Nature*, 257: 222-224.
- SANTOS, R. P. dos & MARIATH, J. E. A. 1997. A simple method for fixing, dehydrating and embedding pollen tubes cultivated *in vitro* for optical and transmission electron microscopy. *Biotech. Histochem.* 72: 315-319.
- SAUNDERS, J. W. & BINGHAM, E. T. 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci.*, 12: 804-808.
- SCHMID, R. 1976. Filament histology and anther dehiscence. *Bot. J. Linn. Soc.*, 3: 303-315.
- SIEBEL, J. & PAULS, K. P. 1989. A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 78: 473-479.
- STÖGER, E., FINK, C., PFOSSER, M. & HEBERLEBORS, E. 1995. Plant transformation by particle bombardment of embryogenic pollen. *Plant Cell Rep.* 14: 273-278.
- SUDARMONOWATI, E., ROSMITHAYANI, RAHAYU, W. 2000. Regeneration of embryoids derived from anther culture and the production of artificial seeds in *Pometia pinnata*. *Asia-Pacific J. Molec. Biol. Technol.*, 8(1): 37-45.
- SUN, M., KIEFT, H., ZHOU, C. & VANLAMMEREN, A. 1999. A co-culture system leads to the formation of microcalli derived from microspore protoplasts of *Brassica napus* L. cv. Topas. *Protoplasma* 208: 265-274.
- VASIL, I. K. 1967. Physiology and cytology of anther development. *Biol. Rev.*, 42: 327-373.
- VERDEIL, J. L., HOCHER, V., HUET, C., GROSDEMANGE, F., ESCOUTE, J., FERRIÈRE, N. & NICOLE, M. 2001. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Ann. Bot.*, 88: 9-18.
- WANG, M., HOEKSTRA, S., VAN BERGEN, S., LAMMERS, G. E. M., OPPENDIJK, B. W., VAN DER HEIJDEN, M. W., PRIESTER, W. & SCHILPEROORT, R. A. 1999. Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Molec. Biol.*, 39: 489-501.
- WOODWARD, B. & PUONTI-KAERLAS, J. 2001. Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica*, 120: 1-6.
- XUHAN, X., JING, H. C., CHENG, X. F., IWANOSWSKA, A., KIEFT, H., BERGERVOET, J. H. W., GROOT, S. P. C., BINO, R. J. & VANLAMMEREN, A. A. M. 1999. Polyploidization in embryogenic microspore cultures of *Brassica napus* L. cv Topas enables the generation of double-haploid clones by somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 208: 240-247.