

PROTOCOLO PARA PRODUÇÃO DE PLANTAS DUPLO-HAPLÓIDES DE GENÓTIPOS DE ARROZ DA SUBESPÉCIE *Indica* PELA CULTURA DE ANTERAS

PROTOCOL FOR DOUBLE HAPLOID RICE PRODUCTION OF *Indica* SUBESPECIE BY ANTHHER CULTURE

GILMAR ROBERTO ZAFFARI¹, KLAUS KONRAD SCHEUERMANN²,
RUBENS MARSCHALEK³, DILNEI SOUZA MEDEIROS⁴, ALEXANDER DE ANDRADE⁵

¹Eng. Agrônomo, Dr. Fisiologia Vegetal, EPAGRI/Estação Experimental de Itajaí, n. 6800, CP 277, CEP 88.318-112, Itajaí, SC, gzaffari@epagri.sc.gov.br.

²Eng. Agrônomo, Dr. Fitopatologia, EPAGRI/Estação Experimental de Itajaí, n. 6800, CP 277, CEP 88.318-112, Itajaí, SC, klaus@epagri.sc.gov.br.

³Eng. Agrônomo, Dr. Melhoramento, EPAGRI/Estação Experimental de Itajaí, n. 6800, CP 277, CEP 88.318-112, Itajaí, SC, rubensm@epagri.sc.gov.br

⁴Téc. Química, EPAGRI/Estação Experimental de Itajaí, n. 6800, CP 277, CEP 88.318-112, Itajaí, SC E-mail: dilneimedeiros@epagri.sc.gov.br.

⁵Eng. Agrônomo, Dr. Genética, EPAGRI/Estação Experimental de Itajaí, n. 6800, CP 277, CEP 88.318-112, Itajaí, SC, alexanderandrade@epagri.sc.gov.br.

RESUMO

A cultura de anteras pode ser utilizada no desenvolvimento de plantas duplo-haplóides em laboratório com a vantagem de obter plantas homocigotas em apenas uma geração. O trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo eficiente de cultura de anteras para a produção de plantas duplo-haplóides a partir de híbridos F₁ de arroz da subespécie *indica*. Panículas de arroz no estágio R₂, da cultivar Epagri 109 e dos genótipos SCH-09-1926, SCH-09-1930, SCH-09-2035, SCH-09-1949, SCH-09-1953, SCH-09-1954, SCH-09-1960, SCH-09-12000 e SCH-09-2013, foram utilizadas para avaliar o efeito do horário de coleta da panícula, a maturidade dos micrósporos da antera e a composição do meio de cultura sobre a formação de calos e regeneração de plantas. A maior resposta de formação de calos foi obtida quando a coleta das panículas ocorreu às 8 horas da manhã e a distância entre o colar da folha bandeira e a lígula da última folha era de 8 cm. A frequência de formação de calo variou de 1,33 a 6,67% para a cultivar epagri 109 e de 4 a 18% para os genótipos híbridos F₁ e a de regeneração de plantas variou de 1 a 100%, porém ambas as respostas foram dependentes do genótipo e da composição do meio de cultura. O protocolo estabelecido, coleta da panícula às 8 horas no estágio de emborrachamento, com 8 cm entre a última folha e a folha bandeira, anteras cultivadas em meio de cultura N6 adicionado de 4 mg L⁻¹ ANA e 1 mg L⁻¹ CIN para indução de calo e no MS adicionado de 1 mg L⁻¹ ANA e 1 mg L⁻¹ CIN e 1 mg L⁻¹ para regeneração de plantas férteis foi eficiente para obtenção de plantas duplo-haplóide de arroz da subespécie *indica*.

Termos para indexação: *Oryza sativa*, melhoramento genético, micropropagação.

ABSTRACT

Anther culture is a useful tool in the development of homozygous doubled haploid plants in just one generation

using lab techniques. This study had the objective to establish an efficient protocol to raise double haploid rice plants from F₁ *indica* hybrids using anther culture. Rice panicles at booting stage (R₂) were taken from the rice cultivar Epagri 109 and the F₁ genotypes SCH-09-1926, SCH-09-1930, SCH-09-2035, SCH-09-1949, SCH-09-1953, SCH-09-1954, SCH-09-1960, SCH-09-12000 e SCH-09-2013. These genotypes were used to evaluate the effect of timing for panicle selection, anther microspores maturity and culture medium composition on the calli formation and plant regeneration. The best response on calli formation was achieved when panicles were selected at 8 am and the distance between the flag leaf collar and ligule of the last leaf was 8 cm. The frequency of calli ranged from 1.33% to 6.67% for the cultivar Epagri 109, and between 4 to 18% for the F₁ hybrids, while the plant regeneration ranged from 1 to 100%. Both results were genotype dependent and dependent of the composition of the culture medium. The established protocol collecting the booting stage panicle at 8 am, with 8 cm between the last leaf collar and the ligule of the flag leaf, which anthers were cultured in N6 medium added by 4 mg L⁻¹ NAA and 1 mg L⁻¹ KIN for calli induction and MS medium added by 1 mg L⁻¹ NAA and 1 mg L⁻¹ KIN e 1 mg L⁻¹ BAP for regeneration of normal fertile plants, was efficient to raise double haploid rice plants of *indica* subspecies.

Index terms: Rice, breeding, micropropagation.

INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos *in vitro* tem sido usada como uma tecnologia de apoio ao melhoramento genético convencional, podendo ser empregada em uma ou em diferentes etapas do desenvolvimento de novas cultivares.

(Recebido em 2 de setembro de 2014 e aprovado em 15 de novembro de 2014)

Dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, a cultura de anteras é uma importante ferramenta biotecnológica, utilizada principalmente na obtenção de plantas duplo-haplóides (GERMANA, 2011). A vantagem mais evidente no sistema de duplo-haplóides é a diminuição do tempo necessário para obtenção de linhagens homozigotas em culturas anuais (MORAES-FERNANDES et al., 1999; TORRES et al., 1999). O interesse em trabalhar com a cultura de anteras de arroz é devido à necessidade de aumentar a eficiência da seleção nas primeiras gerações de autofecundação, que é muito baixa, devido principalmente, à ocorrência de alelos dominantes em heterozigose (BORÉM, 2009; BECKER, 2011). Ao eliminar o mascaramento causado pela heterozigose na planta duplo-haplóide, tem-se a vantagem de ampliar a eficiência de seleção, facilitando a identificação de genótipos fenotipicamente uniformes (KALTCHUK-SANTOS & BODANESE-ZANETTINI, 2002).

As plantas duplo-haplóides podem ser obtidas por via ginogênica ou androgênica. A androgênese consiste na regeneração *in vitro* de uma planta a partir de micrósporos imaturos – grãos de pólen presentes na antera. A cultura de micrósporos pode reverter o programa de desenvolvimento gametofítico para esporofítico, permitindo a geração de plantas duplo-haplóides (SILVA, 2010). Muitas das respostas morfo genéticas da formação de calos (massas celulares indiferenciadas) e regeneração *in vitro* de plantas duplo-haplóides a partir de anteras são dependentes do genótipo, sendo que normalmente genótipos da subespécie *japônica* respondem melhor do que os da subespécie *indica* (RAINHA, 1997; TALEBI et al, 2007). A baixa resposta androgênica da subespécie *indica* de arroz na produção de plantas duplo-haploides (SENADHIRA et al, 2002) tem limitado a utilização desta técnica como uma ferramenta auxiliar no melhoramento genético, principalmente em ecotipos cultivados em regiões tropicais e subtropicais.

Ajustes das condições pré e pós-cultura das anteras são necessários para a obtenção de maiores porcentagens de indução de calo e de regeneração de plantas, uma vez

que, a interação de fatores bióticos e abióticos como o genótipo, o estágio de desenvolvimento do pólen, o tratamento de frio das anteras, a composição do meio de cultura e o momento em que é realizada a coleta de pólen, influenciam diretamente na resposta morfo genética *in vitro* (SILVA, 2010). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de cultura de anteras para ecotipos de arroz da subespécie *indica*, cultivados em região subtropical, que possibilite a obtenção rotineira de plantas duplo-haplóides a partir genótipos F_1 .

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Epagri na Estação Experimental de Itajaí em Santa Catarina. Panículas de arroz da cultivar Epagri 109, safra 2009/2010, foram coletadas de plantas no estádio R2 (emborrachamento) quando apresentavam micrósporos no estádio uninucleado tardio ou binucleado precoce. Coletou-se panículas em dois horários do dia (8 e 12 horas) e em duas fases de desenvolvimento de planta (6 e 8 cm de distância entre a aurícula da folha bandeira e a última folha). As panículas foram mantidas com a base imersa em água a 10°C por 7 dias, em frasco coberto com saco plástico. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as panículas foram lavadas em água destilada, posteriormente imersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, e então mantidas por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 4% (v/v). Após essa desinfestação, o material foi lavado três vezes em água destilada esterilizada, permanecendo 60 minutos imerso até a manipulação. As panículas foram divididas em três regiões: apical, mediana e basal. A extração das anteras de cada região foi realizada em câmara de fluxo laminar. As anteras foram mantidas em placas de petri contendo água estéril até a transferência para o meio de cultivo.

Para a formação de calos, 75 anteras foram inoculadas em placas de petri contendo dois meios de cultura semi-sólidos $N6 + 2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ CIN (MC8) e $N6 + 4,0 \text{ mg L}^{-1}$

ANA + 1,0 mg L⁻¹ CIN (MC9). Esses meios de cultura foram constituídos pelos sais de CHU et al. (1978) (N6), adicionados de sacarose 50 g L⁻¹, ágar-agar 0,7% e pH 5,8; além da adição de reguladores de crescimento (Tabela 1). Após o plaqueamento das anteras inteiras, as culturas foram mantidas em sala escura por 120 dias a 25 ± 1°C. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 75 repetições.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultura N6 (Chu et al, 1978) utilizados para o cultivo das anteras de arroz durante a formação de calos (MC). 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético); ANA (ácido naftaleno acético); CIN (cinetina).

Tratamento	Meio de cultura	Regulador de crescimento (mg L ⁻¹)		
		2,4-D	ANA	CIN
MC1	N6	-	-	-
MC2	N6	0,5	2	-
MC3	N6	1	2	-
MC4	N6	2	2	-
MC5	N6	4	2	-
MC6	N6	0,5	2	0,5
MC7	N6	1	2	0,5
MC8	N6	2	2	0,5
MC9	N6	-	4	1

Para a regeneração de plantas, os calos com tamanho ≥ 2 mm de diâmetro foram transferidos para os meios semi-sólido MS + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 1,0 mg L⁻¹ CIN, sacarose 30 g L⁻¹, ágar-agar (0,7%) e pH 5,8 (MR1) e MS 50% + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ CIN, sacarose 20 g L⁻¹, ágar-agar (0,7%) e pH 5,8 (MR2), constituídos pelos sais de Murashige & Skoog (1962) (MS) e mantidos em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 16 horas, com luz branca fria fluorescente, de intensidade de 30 μmol.m⁻².s⁻¹. As plantas regeneradas foram transferidas para meio semi-sólido MS, permanecendo 30 dias, para o desenvolvimento do sistema radicular. Em seguida foram transplantadas

para vasos plásticos contendo casca de arroz calcinada, irrigadas uma vez por semana com solução nutritiva MS diluída 1:10, permanecendo por 15 dias na sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 16 horas, cobertas com plástico. Posteriormente, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, permanecendo até o final do ciclo da cultura.

Em um segundo experimento, 50 anteras da panícula inteira, coletadas em nove híbridos F1 da subespécie indica, SCH-09-1926, SCH-09-1930, SCH-09-2035, SCH-09-1949, SCH-09-1953, SCH-09-1954, SCH-09-1960, SCH-09-12000 e SCH-09-2013, foram cultivadas em nove meios de cultura para a formação de calos (Tabela 1), com o objetivo de avaliar a melhor resposta dos genótipos. A coleta das panículas foi realizada às 8 e às 10 horas da manhã, quando a distância entre a aurícula da folha bandeira e a última folha era de 8 cm. Os procedimentos para a desinfestação, extração e cultivo das anteras foram os mesmos descritos anteriormente. Após sete dias do cultivo, os calos foram transferidos para os meios semi-sólidos de regeneração de planta MR1 e MR2. As culturas foram incubadas durante 90 dias, e as plantas regeneradas foram enraizadas e aclimatizadas nas mesmas condições descritas anteriormente. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 50 repetições. Como fomação de calo foi considerada toda massa celular diferenciada na antera, independente do número de massas por anteras, visualizada em estereomicroscópio.

A frequência de formação de calos, de calos viáveis e de regeneração de plantas foi calculada da seguinte maneira: Frequência de formação de calos (%) = número de anteras que formaram calos/número de anteras inoculadas x 100; Frequência de formação de calos viáveis (%) = número de calos viáveis/número de calos formados x 100; Frequência de regeneração de plantas verdes ou albinas (%) = número de plantas verdes ou albinas regeneradas/número de calos viáveis x 100. Para efeito de análise estatística, os dados de percentagem dos parâmetros avaliados foram transformados em arco seno

raiz (x). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A transformação dos dados percentuais e a comparação das médias pelo teste de Tukey não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, para as variáveis analisadas. Entretanto, foi observado que anteras coletadas a 8 cm em relação ao colar da folha bandeira apresentavam o melhor estágio fisiológico, com anteras mais responsivas a formação de calos e o tempo em dias para a formação foi muito variável (Tabela 2). Em relação ao horário de coleta, os melhores resultados de formação de calo foram obtidos às 8 horas da manhã e principalmente nas regiões apical e mediana

da panícula de arroz, 6,67 e 5,33%, respectivamente. Entretanto, a região basal também apresentou formação de calo, porém em menor índice, 2,67 % (Tabela 3). Segundo Silva (2010) o estágio de desenvolvimento do micrósporo é crítico para a eficiência da indução haplóide ou duplo-haplóide. Possivelmente, a coleta as 8 horas da manhã, de paniculas a 8 cm entre o colar da folha bandeira e a lígula da última folha representa a melhor condição fisiológica dos micrósporos entre o estágio uninucleado tardio e o binucleado precoce (JAHNE & LORZ, 1995). Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com Reynolds (1997) que afirma que fatores abióticos tornam o micrósporo competente para a androgênese. A condição fisiológica da planta doadora das anteras parece ser determinante na resposta morfogenética *in vitro* do processo esporofítico.

TABELA 2 – Frequência da formação de calos em anteras de *Oryza sativa* L., cultivar Epagri 109, safra 2009-2010, no cultivo *in vitro*, em meio N6 (Chu et al., 1978).

Fase do desenvolvimento*	Horário da coleta (hora)	Região da panícula	Frequência da formação de calo (%)		Tempo de formação do calo (dias)	
			Meio de cultura		Meio de cultura	
			MC9	MC8	MC9	MC8
6 cm	08:00	Apical	-	-	-	-
		Mediana	-	1,33	-	107
		Basal	1,33	1,33	107	84
	12:00	Apical	-	-	-	-
		Mediana	-	-	-	-
		Basal	-	-	-	-
8 cm	08:00	Apical	6,67	-	99	-
		Mediana	5,33	-	108	-
		Basal	2,67	-	112	-
	12:00	Apical	-	-	-	-
		Mediana	-	-	-	-
		Basal	1,33	1,33	92	106

* Distância da aurícula da folha bandeira à penúltima folha no estágio R2 (emborrachado); MC9= N6 + 4,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ CIN; MC8= N6 + 2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ CIN + 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D; 2,4-D (ácido 2,4 diclofenoxiacético); ANA (ácido naftaleno acético); CIN (cinetina).

A resposta das anteras favorável a formação de calo, possivelmente pode ter sido influenciada pela nutrição, pela hora do dia, pelo comprimento do dia, pela radiação solar e pelas temperaturas noturnas que a planta foi submetida (RAINA, 1997).

No presente trabalho, os melhores resultados para a formação de calos foram obtidos com a relação 2,4-D:ANA de 1:4, porém adicionada de 0,5 mg L⁻¹ CIN e com 1:1:1 e 1:2:2 entre CIN:BAP:ANA para a regeneração de plantas. Estes resultados corroboram com Rukmini et al. (2013) que obtiveram formação de calo com 1:4 entre os tipos de auxinas 2,4-D e ANA e regeneração de plantas com a proporção 1:3:1 das citocininas CIN, BAP e auxina ANA.

Os calos obtidos a partir das anteras da cultivar Epagri 109 e dos Híbridos F1 apresentaram frequência média de regeneração de plantas de 100 a 1520% (Tabela 4). A maior capacidade morfogenética na regeneração de

plantas foi obtida com o híbrido F1 SCH-09-2013 para plantas verdes e com o SCH-09-1954 para plantas albinas, 1520 e 917, respectivamente. Os resultados da frequência de regeneração de plantas evidenciam que a resposta morfogenética dos calos é do tipo genótipo-dependente. Os mesmos efeitos interativos do genótipo com o meio de cultura sobre a resposta para a indução de calo e a regeneração de plantas, também foram observados nas variedades de arroz da subespécie *indica* por Talebi et al. (2007) e Javed et al. (2007).

Ao final do ciclo da cultura em casa de vegetação e a campo, as plantas duplo-haplóides apresentaram diferentes graus de fertilidade; plantas férteis, plantas parcialmente férteis e plantas completamente estéreis. Entretanto, as plantas férteis cultivadas no campo produziram uma quantidade de sementes dentro do esperado (100 a 150 sementes/panícula) para os genótipos testados (Figura 1).

TABELA 3 – Frequência da formação de calos a partir do cultivo *in vitro* de anteras de nove genótipos híbridos F1 de *Oryza sativa* L, safra 2010-2011, em meio semi-sólido N6 (Chu et al, 1978), acrescido de reguladores de crescimento, após 90 dias de cultivo.

Meio de cultura N6	Regulador de crescimento (mg L ⁻¹)			Genótipo com formação de calo (%)		Frequência de formação de calo (%)		Tempo para formação de calo (dia)	
	2,4-D	ANA	CIN	8 h	10 h	8 h	10 h	8 h	10 h
MC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC2	0,5	2	-	22,22	-	8	-	45	-
MC3	1	2	-	-	-	-	-	-	-
MC4	2	2	-	-	11,11	-	-	-	47
MC5	4	2	-	-	-	-	-	-	-
MC6	0,5	2	0,5	66,66	44,44	18	9	58	50
MC7	1	2	0,5	-	22,22	-	8	-	50
MC8	2	2	0,5	44,44	22,22	18	8	51	50
MC9	-	4	1	22,22	-	4	-	59	-

2,4-D (ácido 2,4 dicloofenoxiacético); ANA (ácido naftaleno acético); CIN (cinetina).

TABELA 4 – Frequência de regeneração de plantas de *Oryza sativa* L., a partir de calos de anteras da cultivar Epagri 109, safra 2009-2010 e de híbridos F1, safra 2010-2011, cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) (MS) acrescido de reguladores de crescimento, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Meio de cultura	Genótipo	Número de calos inoculados	Calo com regeneração de planta (%)	Frequência de regeneração de planta (%)	
				Verde	Albina
MR1	Epagri 109	6	50	0	100
	SCH-09-1960	1	100	200	0
	SCH-09-2013	5	60	1520	500
	SCH-09-2035	7	2	0	214
MR2	Epagri 109	5	40	450	0
	SCH-09-1954	6	1	0	917
	SCH-09-2035	7	50	171	0

MR1 = MS + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 1,0 mg L⁻¹ CIN, sacarose 30 g L⁻¹; MR2 = MS 50% + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ CIN, sacarose 20 g L⁻¹; ANA (ácido naftaleno acético); CIN (cinetina); BAP (benzilaminopurina).

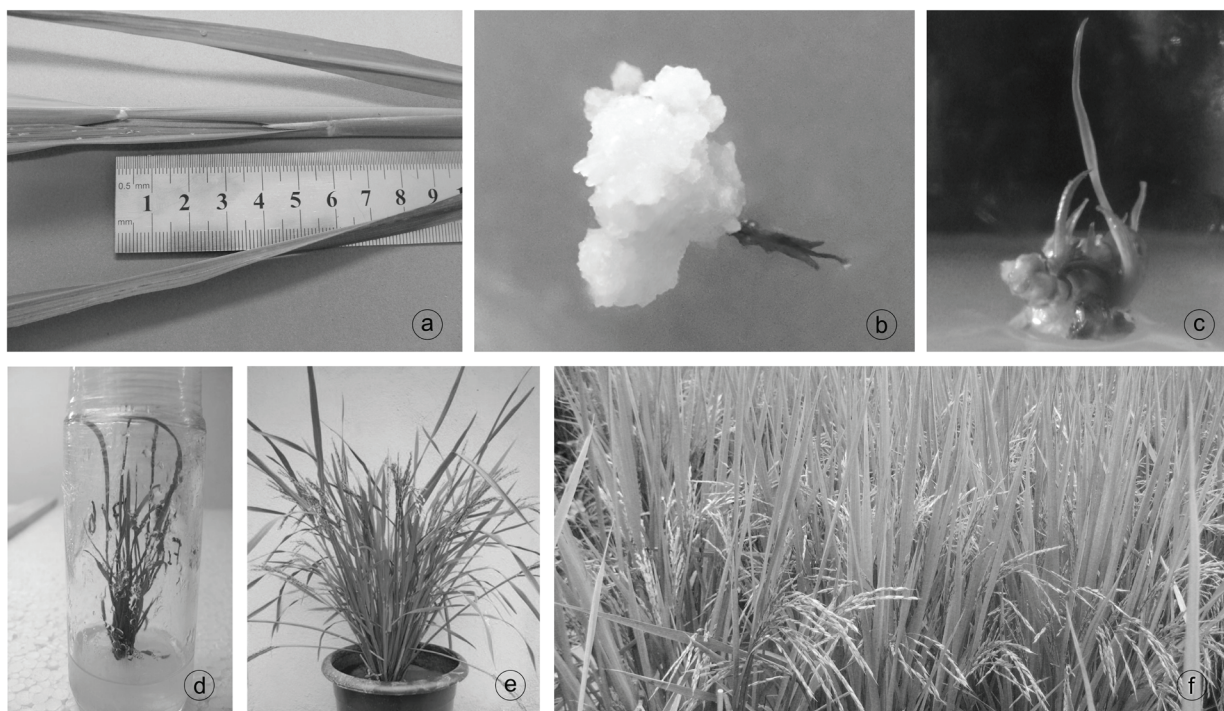


FIGURA 1 – Etapas sequenciais do processo de cultura de anteras de arroz para a produção de plantas duplo-haplóides: (a) - Panícula no estágio R2; (b) - Formação de calo a partir dos micrósporos da antera; (c) - Planta regenerada a partir do calo; (d) - Crescimento da parte aérea e do sistema radicular da planta; (e) - Plantas duplo-haplóides aclimatizadas e cultivadas em vasos na casa de vegetação; (f) - Plantas duplo-haplóides férteis, com sementes, cultivadas a campo.

CONCLUSÕES

A resposta androgênica dos genótipos híbridos F1 de arroz da subespécie *indica* para a formação de calos e a regeneração de plantas duplo-haplóides é influenciada pela hora da coleta da panícula, pelo estágio de maturação dos micrósporos na antera e pela composição do meio de cultura.

As anteras de arroz coletadas às 8 horas da manhã, no estágio R2 com 8 cm de distância entre a aurícula da folha bandeira e a última folha possuem maior capacidade de resposta morfo genética na obtenção de plantas duplo-haplóides.

A maior relação auxina:citocinina no meio de cultura promove a formação de calo e a menor relação a regeneração de plantas duplo-haplóides.

O protocolo de cultura de anteras para a produção de plantas duplo-haplóides de ecotipos de arroz da subespécie *indica*, cultivados em região subtropical, é viável e pode ser utilizado para a obtenção de linhagens homozigotas em programa de melhoramento genético.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESC e o CNPq pelo financiamento da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKER, H. **Pflanzenzüchtung**. Stuttgart, Eugen Ulmer KG, 2011. 368p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**. 5ª ed. ver. rev. e ampl.. Viçosa: Ed UFV, 2009. 529p.
- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: **Proceeding of the Symposium on Plant Tissue Culture**, Beijing, Science Press, 1978. p. 45-50.
- GERMANA, M.A. Anther culture for haploide and doubled haploide production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, Vienna, v.104, p.283-300, 2011.
- JAHNE, A.; LORZ, H. Cereal microspore culture. **Plant Science**, Sofia, v. 109, p. 1-12, 1995.
- JAVED, M.A.; ISHI, T.; KAMIJIMA, O.; et al. The role of alternating culture temperatures and maltose in enhancing anther culture efficiency of salt tolerant indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars, Pokkali and Nona Bokra. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 24, p.283-287, 2007.
- KALTCHUK-SANTOS, E. ; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Androgenesis: An alternative route in the pollen development. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 165-173, 2002.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B.; STIVAL, A.L.; BRAMMER, S.P., et al. Haplodiploidização: genética e melhoramento. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1999. v. 2, p. 569-612.
- MURASHIGE T.; SKOOG. F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen v 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- OTANI, M.; WAKITA, Y.; SHIMADA, T. Doubled haploid plant production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using anther culture. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 141-143. 2005.
- RAINA, S.K. Doubled haploid breeding in cereals. **Plant Breeding Reviews**, Hoboken, New Jersey, v.15, n.1, p.141-186, 1997.
- REYNOLDS, T.L. Pollen Embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v. 33, p.1-10, 1997.
- RUKMINI, M.; RAO, G.J.N.; RAO, R.N. Effect of cold pretreatment and phytohormones on anther culture efficiency of two indica rice (*Oryza sativa* L.) hybrids-Ajay and Rajalaxmi. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, India, v. 1, n. 2, p. 69-76, 2013.
- SENADHIRA, D. et al. Development of the first salt-tolerant rice cultivar through indica/indica anther culture. **Field Crops Research**, nnnn, v. 76, p.103-110. 2002.

-
- SILVA, T. D. indica Rice anther culture: can the impasse be surpassed? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, Vienna, v. 100, p. 1-11, 2010.
- TALEBI, R.; RAHEMI, M.R.; AREFI, H. et al. *In vitro* plant regeneration through anther culture of some Iranian local Rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Pakistan, v. 10, n. 12, p. 2056-2060, 2007.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília : EMBRAPA/CBAB, 1999. v. 2, 354 p.