



**UFG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
MELHORAMENTO DE PLANTAS**

**MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE NOVAS FONTES  
DE RESISTÊNCIA À BRUSONE FOLIAR POR  
MEIO DA CULTURA DE TECIDOS EM ARROZ  
(*ORYZA SATIVA*)**

**LAYS LOHANNE ALVES**

Orientador(a):  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leila Garcês De Araújo

Novembro – 2018

**PRPG**

PRÓ-REITORIA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO



**sibi**  
sistema de bibliotecas ufg

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**        
Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

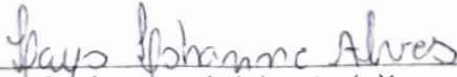
Nome completo do autor: Lays Lohanne Alves

**Título do trabalho:** Métodos de obtenção de novas fontes de resistência à brusone foliar por meio da cultura de tecidos em arroz (*oryza sativa*)

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
\_\_\_\_\_  
(Assinatura do(a) autor(a))

Ciente e de acordo:

  
\_\_\_\_\_  
(Assinatura do(a) autor(a))

<sup>1</sup> A assinatura deve ser escaneada.

**LAYS LOHANNE ALVES**

**MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA  
À BRUSONE FOLIAR POR MEIO DA CULTURA DE TECIDOS EM  
ARROZ (*ORYZA SATIVA*)**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de plantas, da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.  
**Área de Concentração:** Melhoramento de espécies cultivadas.

Orientadora:

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leila Garcês De Araújo**

Co-orientador:

**Prof. Dr. a Valácia Lemes Da Silva Lemes**

**Prof. Dr. Sergio Tadeu Sibov**

Goiânia, GO – Brasil

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

, Lays Lohanne ALves  
MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA À  
BRUSONE FOLIAR POR MEIO DA CULTURA DE TECIDOS EM  
ARROZ (ORYZA SATIVA) [manuscrito] / Lays Lohanne ALves . -  
2018.  
LI, 51 f.

Orientador: Profa. Dra. Leila Garcês de Araújo; co-orientadora  
Dra. Valácia Lemes da Silva Lobo; co-orientador Dr. Sergio Tadeu  
Sibov.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola  
de Agronomia e Engenharia de Alimentos (EAEA), Programa de Pós  
Graduação em Genética & Melhoramentos de Plantas , Cidade de  
Goiás, 2018.

1. Cultura de anteras. 2. Variação somaclonal . 3. Resistência  
genética . 4. Magnaporthe oryzae. I. Garcês de Araújo, Leila, orient.  
II. Título.

CDU 633

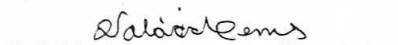


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
MELHORAMENTO DE PLANTAS




**ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE LAYS LOHANNE ALVES.** Aos dez dias do mês de dezembro do ano de dois mil e dezoito (10.12.2018), às 08:00h, no Auditório Roland Vencovsky, da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os membros da Banca Examinadora: Dr<sup>a</sup>. Leila Garçês de Araújo – Orientadora/Presidente, Dr<sup>a</sup>. Valácia Lemes da Silva Lobo, Dr. Adriano Pereira de Castro e Dr. Marcio Lisboa Guedes. Sob a presidência da orientadora, em sessão pública, procedeu-se à avaliação da defesa da dissertação intitulada: “**MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA À BRUSONE FOLIAR POR MEIO DA CULTURA DE TECIDOS EM ARROZ (*oryza sativa*)**”, de autoria de **Lays Lohanne Alves**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, no nível de Mestrado, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora, Dr<sup>a</sup>. Lays Lohanne Alves, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da Dissertação que, em 40 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a mestranda, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Ao final, a banca reunida em separado procedeu à avaliação da defesa. A dissertação foi considerada aprovada pela Banca Examinadora, cumprindo integralmente este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, pela Universidade Federal de Goiás, em conformidade com o estabelecido pela resolução nº 1403/2016, do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura da UFG (CEPEC/UFG), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Para fins de publicação eletrônica, a mestranda poderá efetuar as modificações eventualmente sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar à Secretaria do PGMP, respeitando-se o prazo máximo de 30 dias após a data da Defesa. A conclusão do curso e a emissão do diploma dar-se-ão em conformidade com o estabelecido pela Resolução CEPEC nº 1403/2016. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12:35 a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação e, para constar eu, Jéssica Almeida Silva, Secretária do PGMP, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em duas vias de igual teor.

  
Dr<sup>a</sup>. Leila Garçês de Araújo  
Presidente/Orientadora

  
Dr<sup>a</sup>. Valácia Lemes da Silva Lobo  
Membro Externo

  
Dr. Adriano Pereira de Castro  
Membro Externo

  
Dr. Marcio Lisboa Guedes  
Membro Externo

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo da minha vida, e não somente nestes anos como universitária, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

À Universidade Federal de Goiás, todo o corpo docente, direção e administração do curso de genética e melhoramento de plantas pela oportunidade de concluir mais uma etapa em minha vida.

À CAPES pelo financiamento da bolsa durante a realização do curso;

À Embrapa Arroz e Feijão, especialmente ao laboratório de Microbiologia Agrícola, pelo acolhimento, espaço, material e infraestrutura oferecidos.

Ao laboratório de genética e microorganismos (LGM) e ao laboratório de cultura de tecido vegetais (LCTV), pela infraestrutura, e aprendizado durante esses anos.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Leila Garcês de Araújo pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho, pela orientação, apoio, suporte, confiança e por estar sempre presente.

À minha coorientadora Dr<sup>a</sup>. Valácia Lemes da Silva Lobo, por todo apoio oferecido na elaboração do trabalho, pela atenção desprendida sempre que precisei e pela partilha do saber.

Ao meu coorientador Dr. Sergio Tadeu Sibov por todo o suporte prestado e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, por terem concordado em participar da avaliação deste trabalho

À todas as pessoas com quem convivi ao longo desses anos. A experiência de uma produção compartilhada na comunhão com amigos nesses espaços foram a melhor experiência da minha formação acadêmica. Em especial quero agradecer a Kellen Inácio pela amizade e suporte prestado nesses anos, e ao João Pedro de Almeida pela ajuda e contribuição no trabalho.

Aos meus amigos do curso por todos esses anos compartilhando experiências e pela amizade Ailton Crispim, Cristiane Ferreira, Erica Munique, Rodrigo da Silva, Marcela Lopes, Angelina Ciappina.

Às minhas amigas Kaliny Oliveira e Mariella Moraes pelas longas conversas, por todos os momentos compartilhados, pelo apoio e por acreditarem sempre em mim. Obrigada por me fazer uma pessoa melhor a cada dia

Por fim agradeço à minha família, meu porto seguro, em especial a minha mãe Claudia Rodrigues, meu irmão Lucas e meu pai de criação Jucelmo, por me apoiarem sempre e acreditarem em mim.

À todos que contribuíram diretamente e indiretamente para conclusão deste trabalho

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)*

# SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT.....	10
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1 A CULTURA DO ARROZ .....	13
2.2 BRUSONE NO ARROZ.....	14
2.3 FONTES DE RESISTÊNCIA À BRUSONE OBTIDAS POR CULTURA DE TECIDO 18	
2.3.1 CULTURA DE ANTERAS PARA PRODUÇÃO DE PLANTAS DUPLO HAPLOIDES.....	18
2.3.2 VARIAÇÃO SOMACLONAL.....	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
<b>4 RESULTADO E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>43ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>

## RESUMO

Alves, L.L. **Métodos de obtenção de novas fontes de resistência à brusone foliar por meio da cultura de tecidos em arroz (*Oryza sativa*)**. 2018.52 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018<sup>1</sup>.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o alimento básico de mais da metade da população mundial. A produtividade da cultura em todos sistemas de cultivo é afetada pela brusone (*Magnaporthe oryzae*) que é considerada a principal doença do arroz, podendo ocasionar perdas de até 100%, dependendo das condições climáticas e da virulência do patógeno. A obtenção de fontes de resistência à brusone é muito importante para o manejo desta doença. Populações duplo haploides permitem acelerar a fixação de linhagens, uma vez que permite alcançar a homozigose em apenas uma geração. A variação somaclonal é outra técnica da cultura de tecidos usada com sucesso para a indução de mutações para à brusone. O objetivo do presente trabalho é obter fontes de resistência à brusone foliar em populações de duplo haploides e de somaclones. Para isso, foi realizada a indução de calos e a regeneração de plantas a partir de anteras do cruzamento BRS Primavera x CNA 923 e de panículas imaturas do cruzamento entre as cultivares Metica-1 e Cica-8. Em casa de vegetação, plantas R2 foram submetidas a inoculação com os patótipos IB-1 (BRM16185) e IB-45 (BRM15571) de *Magnaporthe oryzae* provenientes das cultivares Metica-1 e Cica-8, respectivamente e, para cada patótipo foi utilizada uma população de 800 plantas. No sétimo dia após a inoculação foi realizada a avaliação da severidade da brusone foliar, utilizando a escala de notas, variando de 0 a 9 em que nota de 0 a 3, representa reações de resistência e de 4 a 9, reações de suscetibilidade. Avaliou-se também a severidade da brusone em uma população de 50 plantas de somaclones da geração R2 com cada genitor (Metica-1 e Cica-8) e suas respectivas raças de *M. oryzae* (IB-1 e IB-45). Para severidade foram realizadas quatro avaliações em intervalos de 48 horas para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os dados foram submetidos ao teste T no programa SPSS. De um total de 800 plantas inoculadas com a raça IB-45, 644 plantas foram resistentes e 156 apresentaram reações de suscetibilidade. Para a raça IB-1 foram obtidas 664 plantas R2 resistentes e 136 suscetíveis, indicando a indução de variação genética com relação à resistência à brusone foliar nas gerações iniciais. O teste T mostrou diferença significativa na severidade de brusone entre os genitores e os somaclones, com média de 32,96% para a cultivar Metica-1 e 3,36% para os somaclones inoculados com a raça IB-1, e 34,24% para a cultivar Cica-8, em contraste com 7,59% dos somaclones inoculados com a raça IB-45. Houve redução significativa da AACPD, com média de 56,76 para Metica-1 e 6,22 para os somaclones inoculados com a raça IB-1 e 66,83 para Cica-8 e 12,1 para os somaclones inoculados com a raça IB-45. Verificou-se diferença entre os somaclones inoculados com as duas raças, demonstrando que a variação somaclonal produz fontes de resistência ao patógeno. As plantas R2 que apresentaram reação de resistência às duas raças foram selecionadas e transplantadas para avanço de geração visando novas fontes de resistência à brusone, contribuindo assim para o programa de melhoramento do arroz.

**Palavras-chave:** Cultura de anteras; variação somaclonal, resistência genética, *Magnaporthe oryzae*

<sup>1</sup> Orientadora. Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> LeiLa Garcês De Araújo . EA – UFG.

<sup>2</sup> Co-orientadores. Dr. <sup>ª</sup> Valácia Lemes Da Silva Lobo . Embrapa-Arroz e Feijão .  
Dr. Sergio Tadeu Sibov. EA – UFG.

## ABSTRACT

ALVES, L.L. **Methods of obtaining sources of leaf blast resistance by tissue culture in rice (*Oryza sativa*). 2018.52 f. dissertation (Master of Science in Genetics and Plant Breeding)– Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018**

Rice (*Oryza sativa* L.) is the staple food of more than half of world's population. The productivity in all cropping systems is affected by the blast (*Magnaporthe oryzae*), the main rice disease, can cause losses of up to 100% depending on climatic conditions and the virulence of the pathogen. Obtaining new sources of blast resistance is very important for the management of this disease. Double haploid populations allow acceleration of lineage fixation as allows homozygotes to be achieved in just one generation. Somaclonal variation is another tissue culture technique successfully used for the induction of blunt mutations. The objective of the present work is to obtain new sources of resistance to leaf blast in populations of double haploids and somaclones. For this, callus induction and plant regeneration were performed from the anthers of BRS Primavera x CNA 923 and immature panicles of the cross between the cultivars Metica-1 and Cica-8. In a greenhouse, R2 plants were inoculated with the IB-1 and IB-45 pathotypes of *Magnaporthe oryzae*, from the cultivars Metica-1 and Cica-8, respectively. For each pathotype a population of 800 plants was used. On the seventh day after inoculation, leaf blast severity was evaluated using the scale of scores ranging from 0 to 9, with a score of 0 to 3, representing resistance reactions and 4 to 9, susceptibility reactions. The severity of the blast was evaluated in a population of 50 plants on generation R2 somaclones with each parent (Metica-1 and Cica-8) and their respective *M. oryzae* races (IB-1 and IB-45). For severity, four evaluations were performed at 48-hour intervals to calculate the area below the disease progress curve (AACPD). The data were submitted to the T test in the SPSS program. Of a total of 800 plants inoculated with the IB-45 breed, 644 plants were resistant and 156 showed susceptibility reactions. For the IB-1 breed, 664 resistant and 136 susceptible R2 plants were obtained, indicating the induction of genetic variation in relation to leaf blast resistance in the initial generations. The T-test showed a significant difference in the severity of blast between the parents and the somaclones, with a mean of 32.96% for the Metica-1 cultivar and 3.36% for the somaclones inoculated with the IB-1 breed, and 34,24 % for the cultivar Cica-8, in contrast with 7.59% for the somaclones inoculated with the IB-45 breed. There was a significant reduction of the AACPD, with a mean of 56.76% for Metica-1 and 6.22 for the somaclones inoculated with the IB-1 race and 66.83% for the Cica-8 and 12.1 for the somaclones inoculated with the IB -45. There was a significant the somaclones inoculated with the two races, demonstrating that somaclonal variation produces sources of resistance to the pathogen. The R2 plants that presented resistance reaction to the two races were selected and transplanted for generation advance aiming at new sources of blast resistance, thus contributing to the rice breeding program.

*Key words:* Anthers culture; somaclonal variation, genetic resistance, *Magnaporthe oryzae*

---

<sup>1</sup> Advisor. Prof. <sup>ª</sup> Dr. <sup>ª</sup>Leila Garcês De Araújo . ICB – UFG.

<sup>2</sup> Co-adviser. Dr. <sup>ª</sup> Valácia Lemes Da Silva Lobo. Embrapa-Arroz e Feijão .  
Prof. Dr.Sergio Tadeu Sibov EA– UFG.

# 1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo, constituindo a base da alimentação de mais da metade da população mundial (FAO, 2017). A produção mundial do cereal beneficiado, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2017), é de 486,26 milhões de toneladas por ano e o consumo mundial está estimado em 480,5 milhões de toneladas. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2018), o Brasil é o nono maior produtor mundial, com produção de 12.025,2 milhões de toneladas para a safra de 2017/2018.

A brusone causada por *Magnaporthe oryzae* B.Couch (*Pyricularia oryzae* Cavara) é a doença mais prejudicial do arroz no mundo (Fernandez & Wilson, 2012; Fisher et al., 2012). A perda da cultura pode ser de 100 % em cultivares suscetíveis com condições climáticas favoráveis (Prabhu et al., 2009). Para o controle da brusone recomenda-se o uso do manejo integrado que inclui resistência genética, práticas culturais e fungicidas (Filippi et al. 2006), e também do controle biológico (Filippi et al., 2011). Cultivares resistentes à brusone são desenvolvidas, entretanto, a duração da resistência tem sido constantemente suplantada devido à alta variabilidade do patógeno (Wang et al., 2013).

Por isso, a obtenção de novas fontes de resistência é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento, que também pode ser alcançado por meio da cultura de tecidos. Técnicas como a cultura de anteras e a variação somaclonal foram usadas para desenvolver variedades de arroz com resistência à brusone e com caracteres agronômicos desejáveis (Jiang et al. 2004). As técnicas ainda proporcionam a redução de tempo e custo na obtenção de linhagens, e aumentam a eficiência na produção de novas cultivares híbridas.

No Brasil foram obtidos duplo haploides e somaclones com resistência vertical e parcial à partir de cultivares suscetíveis de arroz e de F<sub>1</sub>S de cruzamento entre genitores resistentes e suscetíveis com características agronômicas desejáveis (Araújo et al., 1997, 2000; Araújo & Prabhu, 2001a, Araújo et al. 2001; Araújo & Prabhu, 2002, Araújo & Prabhu, 2004).

Além disso, a eficiência de seleção de plantas resistentes em populações de variantes somaclonais pode ser aumentada utilizando-se isolados frequentes em lavouras comerciais de arroz como os identificados por Filippi et al. (2007), na qual verificaram que

o isolado originário da cultivar Metica-1 não infecta Cica-8 e o isolado proveniente da cultivar Cica-8 é incompatível com Metica-1

Considerando a importância socioeconômica da cultura do arroz para o Brasil, e a elevada perda de produtividade devido à brusone, o presente trabalho visa a obtenção de fontes de resistência por meio da cultura de anteras e panículas imaturas que poderão ser utilizadas no programa de melhoramento de arroz.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA DO ARROZ

O arroz cultivado pertence ao Reino *Plantae*, Filo *Magnoliophyta*, Classe das monocotiledônea, da Ordem Poales, Família Poaceae, e o gênero *Oryza*. (Botelho, 1914). Morfologicamente, a planta é dividida em órgão vegetativo (raíz, colmo e folha) e reprodutor (flor e semente). (Chang & Bardenas, 1965). O gênero *Oryza* apresenta 24 espécies, porém, apenas duas são cultivadas: a *Oryza glaberrima steud* cultivada na Ásia e a *Oryza sativa* L. cultivada em todos os continentes (Vaughan et al., 2003). O sudeste da Ásia é apontado, por diversos historiadores e cientistas, como o local de origem do arroz. A Índia é a região de maior diversidade dessa cultura, sendo as províncias de Bengala, Assam e Mianmar referenciadas como centro de origem dessa espécie. As mais antigas referências ao arroz são encontradas na literatura chinesa a cerca de 5.000 anos (Embrapa, 2013). O arroz constitui a base da alimentação em muitos países em desenvolvimento, principalmente os situados na Ásia (Moumeni et al., 2011). Embora assuma extraordinária importância no continente asiático, concentrando mais de 90% da produção mundial, a cultura se estende aos cinco continentes, em mais de 116 países, ocupando extensas áreas (FAO, 2014).

O Brasil produz em média 12 milhões de toneladas de arroz anualmente, e segundo o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2017), é o nono produtor mundial do grão e o primeiro fora do continente asiático. O País possui aproximadamente 40 mil produtores distribuídos em cerca de 500 municípios, gerando em média 350 mil empregos, desempenhando um importante papel socioeconômico. (IBGE, 2014). O arroz é uma cultura presente em todas as regiões brasileiras e consumida por todas as classes sociais, ocupando uma posição de destaque do ponto de vista econômico e social, sendo considerada a terceira maior cultura de cereais do mundo, perdendo apenas para o trigo e o milho (Dias Neto, 2008). No Brasil existem dois principais sistemas de cultivo irrigado e de terras altas. Na Região Sul, o cultivo do arroz é irrigado em quase sua totalidade e apenas um percentual pequeno no Paraná é cultivado em terras altas. A região norte é a segunda maior produtora de arroz do país com aproximadamente 9,5 % da produção nacional. No Centro-Oeste, terceira maior região produtora, predomina o cultivo em terras altas (CONAB, 2017). A produtividade e qualidade dos grãos são importantes devido aos

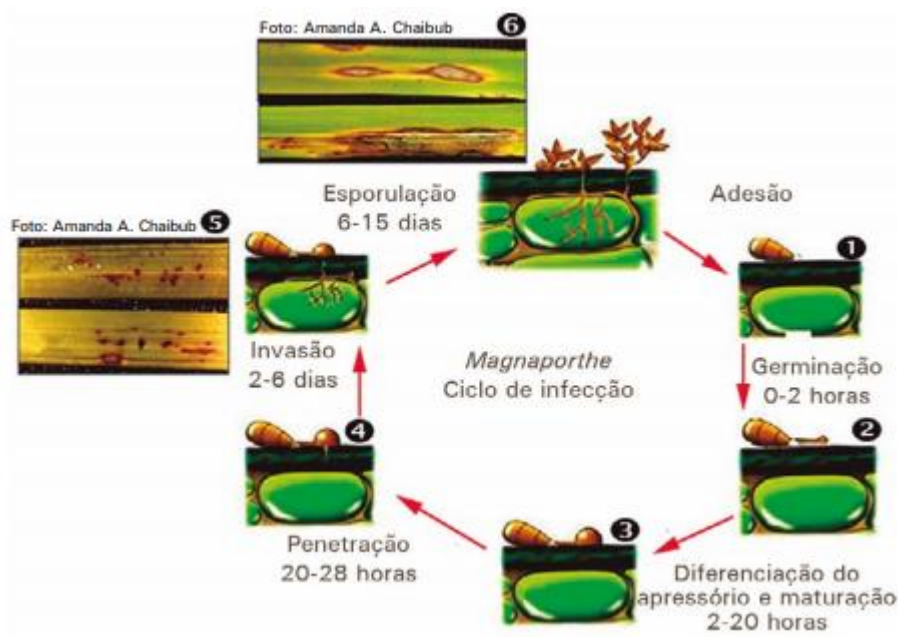
impactos econômicos da cultura do arroz para muitos países que entre os fatores que afetam a produtividade, as doenças fúngicas são responsáveis por prejuízos significantes a cultura do arroz. (BORIN, 2001). Dentre as doenças causadas por fungos destaca-se a brusone (*M. oryzae*), devido aos prejuízos que geram para a produtividade da cultura e para a qualidade do grão (Franco et al., 2012). Em vista disso, o uso de agrotóxicos tem-se intensificado nos últimos tempos, deste modo, é necessário o controle da doença sem prejudicar a produtividade da cultura, o meio ambiente e a saúde humana. Assim, é necessário a adoção de um conjunto de medidas preventivas, como a resistência genética da cultivar que aliada a boas práticas culturais fazem parte do manejo integrado da cultura do arroz (Filippi et al., 2006).

## 2.2 BRUSONE NO ARROZ

A brusone foi descrita na China em 1637, sendo a doença causada por fungo mais disseminada por todos os países em que ocorre a prática da rizicultura (Prabhu & Filippi, 2006; Fernandez & Wilson, 2012; Fisher et al., 2012). Entre todas as doenças que acometem a cultura do arroz, a brusone é a mais expressiva provocando perdas significativas nas lavouras com cultivares suscetíveis e condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (Prabhu et al., 2009). É causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* em sua forma assexuada, e o estado teleomórfico do fungo é denominado *Magnaporthe oryzae*. Ele pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Magnaporthales e família Magnaporthaceae (Maciel, 2011). O fungo apresenta como característica a formação de colônias diversificadas com colorações que variam do branco ao cinza escuro, podendo apresentar variação na quantidade de produção de micélio dependendo do meio de cultivo utilizado para cultivo do patógeno (De Melo, 2013).

O ciclo de vida de *M. oryzae* inicia-se quando os conídios produzidos nas lesões são disseminados entrando em contato com a superfície das folhas de arroz, assim, o fungo adere-se a ela com o auxílio de uma substância adesiva denominada mucilagem. Para que ocorra a colonização do tecido foliar do arroz é necessário que se forme o apressório (estrutura de penetração). A colonização das plantas hospedeiras suscetíveis resulta na formação de lesões típicas. Essas lesões são formadas em até 72 horas da inoculação do

patógeno na epiderme. As lesões formadas coalescem com o tempo, podendo necrosar, diminuindo assim, a área fotossintética da folha. Na superfície da folha de arroz os esporos assexuais são produzidos, iniciando um novo ciclo de infecção. O inóculo primário pode ser disseminado pelo vento, água ou por sementes infectadas (Prabhu & Filippi., 2006).



**Figura 1.** Ciclo de desenvolvimento de *M. oryzae* na planta de arroz. Fonte: Ramos (2009)

Os fatores climáticos e ambientais influenciam significativamente para o sucesso da colonização do fungo, e posterior desenvolvimento das lesões. A deposição de orvalhos e de gotas de chuvas nas folhas são essenciais para a germinação dos conídios e o início da infecção, e a temperatura ideal para a germinação dos esporos é de 25 °C. A esporulação do fungo aumenta quando a umidade relativa é superior a 93%. Em períodos chuvosos, a disseminação dos esporos é menor, visto que as águas da chuva lavam os esporos das plantas, diminuindo a quantidade de inóculo (Prabhu et al., 2006). A luz também influencia o desenvolvimento do fungo no hospedeiro. Embora o crescimento do micélio e a germinação dos conídios sejam processos inibidos pela luz, a alternância desta tem papel importante sobre a produção de esporos (Kimati, 2005).

Os prejuízos causados pela doença são variáveis, dependem principalmente do grau de resistência da cultivar, da virulência do patógeno, do estágio em que a lavoura é

afetada, e das condições ambientais . Geralmente, a doença ocorre após a emergência da plântula na fase vegetativa, e no período de formação e maturação dos grãos na fase reprodutiva. Contudo, se as cultivares são suscetíveis e as condições do ambiente favorecerem o desenvolvimento do fungo, as plantas podem ser afetadas em qualquer estágio fenológico (Prabhu & Filippi, 2006). Esse patógeno pode destruir vastas áreas de plantio de arroz, reduzindo de 50 a 70% de toda uma produção. Calcula-se que a quantidade de arroz destruída anualmente por *M. oryzae* poderia alimentar mais de 60 milhões de pessoas (Krush & Jena, 2009; Zeigler et al., 1994).

Os danos causados pela brusone em arroz podem ser reduzidos significativamente por meio do manejo integrado da doença que tem como objetivo o aumento da quantidade e da qualidade dos grãos, por meio da diminuição da população do patógeno a níveis toleráveis. (Prabhu et al., 2002). O manejo da cultura alia a utilização de cultivares resistentes, ou moderadamente resistentes, às boas práticas culturais, e ao controle químico (Prabhu & Filippi, 1997).

Os agrotóxicos são muito utilizados para controle da doença no arroz, porém o uso exagerado pode trazer desvantagens ao meio ambiente e a saúde humana, além de serem onerosos à cadeia produtiva do arroz (Khan & Anwer,2011). Boas práticas culturais é outra medida que está inserida no manejo da cultura. O preparo do solo, o uso correto de adubação nitrogenada e o uso de sementes saudáveis são medidas que evitam o desenvolvimento e a proliferação do fungo (Kimati, 2005). Uma medida de controle biológico da brusone que vem sendo bastante estudada, e inserida gradativamente no manejo integrado é o controle biológico, em se baseia na utilização de microrganismos não fitopatogênicos. Neste ambiente, a competição pelo substrato, a antibiose, os parasitismos e a indução de resistência proporcionadas por esses fungos, resulta em um controle da brusone (Chaibub et al., 2011).

A resistência genética é outra medida importante para controle da brusone, sendo um método preventivo, constitui um dos principais componentes dentro do manejo integrado da cultura, sendo um dos métodos mais eficaz para controle da doença (Prabhu & Filippi, 2001; Araújo & Prabhu, 2004). Dentro da resistência genética tem-se a utilização da resistência horizontal e a resistência vertical. A resistência horizontal ou parcial também denominada de poligênica atua no sentido de controlar o desenvolvimento da doença durante o ciclo do patógeno, assim, o objetivo é a diminuição da pressão da doença na

lavou, sendo muito utilizada em cultivo de arroz inundado. A resistência vertical ou específica também denominada de monogênica, tem efeito no combate ao inóculo inicial, ou seja, ela evita o que o ciclo se inicie, sendo muito utilizada em arroz de terras altas, contudo, ambas podem ser suplantadas (Prabhu & Filippi, 2006).

*Magnaporthe oryzae* apresenta uma alta variabilidade genética que, além de ser influenciada pelo ambiente e pelas práticas de manejo da cultura que, com frequência determinam o surgimento de novas raças. Este fator, aliado à pressão de seleção causada pela baixa diversidade genética do hospedeiro e pela extensão de áreas uniformes em campos de arroz, característica da agricultura atual, criam condições favoráveis ao crescimento do fungo, o que leva a constante suplantação da resistência, quando novas cultivares são introduzidas e adotadas em larga escala (Prabhu et al., 2006). Alguns mecanismos genéticos envolvidos na variabilidade de *M. oryzae*, é a recombinação sexual e parassexual, heterocariose, anormalidades em cromossomos do tipo deleções, translocações e rearranjos cromossômicos (Giatong & Frederiksen, 1969; Row et al., 1985). A recombinação parassexual representa uma alternativa ao ciclo sexual, visto que este raramente ocorre (Zeigler, 1998). Já mecanismos de transposição são bastante estudados, pois, esses mecanismos ocasionam alterações na estrutura gênica e na função de diversos microrganismos (Nishimura et al., 2000). Diante do exposto, tomando que o arroz é uma planta autógama e *M. oryzae* apresenta muitos mecanismos de variabilidade genética, é necessário o apoio do melhoramento para a aquisição de fontes de resistência à cultura.

### 2.3 FONTES DE RESISTÊNCIA À BRUSONE OBTIDAS POR CULTURA DE TECIDOS

A cultura de tecidos baseia-se em dois princípios: o primeiro é o da totipotência celular, ou seja, qualquer célula somática de um organismo possui toda informação genética deste organismo; o segundo princípio, por sua vez, é o da multiplicação das células por mitose, onde uma célula-mãe produz duas células-filhas idênticas a ela (Ramalho et al., 1996). Assim, a aplicação da cultura de tecidos baseia-se na capacidade de diferenciação dos tecidos celulares (Cocking, 1986), em que células germinais ou somáticas, em condições

adequadas, podem regenerar plantas viáveis e férteis (Kerbaudy, 2004). A cultura de tecidos é bastante utilizada também para a obtenção de fontes de resistência a doenças, como: a obtenção de variantes somaclonais; a obtenção de haploides e duplo haploides, através da cultura de anteras e óvulos, auxiliando assim, na aceleração de programas de melhoramento (Ramalho, 2008; Milani & Carvalho 2005; Ferreira et al., 1999).

A cultura de tecidos em arroz teve início na década de 50, porém a regeneração de plantas a partir de calos induzidos de sementes, raízes e pólen, só foram obtidas na década seguinte (Bonato, 1994). Apesar da existência de muitos estudos relatando o sucesso de protocolos para a cultura de tecidos de arroz (Forkan, 2006; Toki et al., 2006; Araújo et al., 2010; Rafique et al., 2011), nenhum protocolo é totalmente adaptado quando um novo genótipo é usado para a manipulação *in vitro* (Maggioni et al., 1989). Por isso, torna-se difícil o estabelecimento de um sistema de cultivo *in vitro* universal.

### **2.3.1 Cultura de anteras para produção de plantas duplo haploides.**

Em arroz é possível obter linhagens homozigotas por meio do cultivo de anteras imaturas em meio de cultura. O cultivo de anteras é a manipulação *in vitro* de grãos de pólen imaturos contidos dentro das anteras, para inibir o desenvolvimento gametofítico e induzir o desenvolvimento esporofítico (Lentini et al., 1997). No caso da cultura do arroz, este processo tem início mediante a formação de um tecido não diferenciado, que se denomina calo, e termina com a formação de embriões e plantas (Niizeki; Oono, 1968). A produção de plantas haplóides de arroz, por cultura de anteras/micrósporos tem importante aplicação para o melhoramento do arroz. Os haplóides expressam genes recessivos, que se tornam fixados, quando o cromossoma complementar é duplicado. De acordo com Snustad et al. (1997), haplóide são células que possuem um conjunto completo de cromossomos ( $n$ ). Assim, uma planta haplóide que apresenta metade do número de cromossomos é, portanto, estéril. A duplicação do seu número cromossômico reestabelece a fertilidade. Esta planta denominada dupla haploide será homozigota, uma vez que cada cromossomo terá sua cópia exata (Moraes-Fernandes Et al., 1996).

A obtenção de plantas duplo haploides foi uma alternativa proposta inicialmente por Chase em 1952. Com o uso da tecnologia de DH, pode-se obter linhas homozigotas em apenas 8 a 9 meses, contando a partir da semeadura das sementes híbridas F1 ou F2 (Paterniani & Campos, 1999; Germana, 2006). Plantas com o cromossomo duplicado

aumenta a eficiência de seleção, em comparação com as seleções iniciais feitas por métodos convencionais de melhoramento. O aumento da eficiência ocorre tanto para caracteres qualitativos como para caracteres quantitativos, proporcionando uma melhor eficiência na identificação e seleção de genótipos superiores (Snape, 1989; Lentini et al., 1994; Castillo et al. 2009).

A primeira variedade desenvolvida por cultura de anteras ocorreu em 1975 e até hoje muitos estudos vêm sendo realizados nos últimos anos, objetivando a regeneração de plantas haploides por meio da cultura *in vitro* de células gametofíticas (Han, 1985; Fang, 1991; Liang; Huang, 1991; Lynch et al., 1991; Castro et al., 2004). O uso da técnica de cultura de anteras ainda é um desafio para os programas de melhoramento genético e tem ocorrido aos poucos, sobretudo, porque as respostas são inteiramente dependentes do genótipo utilizado. O arroz do tipo japônica irrigado tem uma resposta maior em cultura de anteras do que do tipo japônica de terras altas e índica (Chen et al., 1991). A dificuldade para indução da androgênese vem restringindo sua aplicação em pesquisas e para se obter uma planta duplo haploides é necessário a realização de inúmeras tentativas de regeneração, para que a maioria dos genes tenham alelos favoráveis para características de interesse (Torp & Andersen, 2009).

Alguns fatores são determinantes para indução de calos e regeneração de plantas por meio da técnica de cultura de anteras. O genótipo é o fator que mais merece destaque, quando se trata de regeneração de plantas. A maior discrepância se relaciona aos tipos de subespécies de arroz, japônica e indica (Chen et al., 1991). As condições fisiológicas da planta doadora como o fotoperíodo, a intensidade de luz, a temperatura, a nutrição mineral, a ausência ou presença de reguladores de crescimento podem influenciar a resposta do micrósporo ao cultivo *in vitro* (Mantell et al., 1994; Chen et al., 1991). Panículas coletadas de plantas cultivadas em campos experimentais obtiveram melhor resposta na cultura de anteras em comparação com as anteras coletadas de plantas cultivadas em vaso em casas de vegetação (Veeraraghavan, 2007; Raina, 1997).

As temperaturas ótimas para o crescimento das plantas são então de 24°C e 34°C para a noite e para o dia, respectivamente (Silva, 2010). Contudo, há uma maior porcentagem de plantas albinas a serem regeneradas, quando as anteras estão incubadas a temperaturas superiores a 30°C (Chen et al., 1991). Em relação ao ponto de coleta das panículas de arroz,

recomenda-se que sejam coletadas em dias ensolarados, entre às 8 e 10 horas da manhã (Dorneles, 1990).

O estado de desenvolvimento dos grãos de pólen no momento em que as anteras são cultivadas *in vitro* é um fator determinante na resposta obtida pela técnica de cultura de anteras. Em arroz, o estado ótimo do grão de pólen para a indução de calos é no estágio uninucleado médio e tardio (Jahne & Lorz, 1995; Chen et al., 1991). Usualmente, a distância entre o colar da folha bandeira e a lígula da penúltima folha serve como guia morfológico para verificar a maturidade das anteras (Bishnoi et al., 2000).

O pré-tratamento, em que as plantas doadoras do grão de pólen são acondicionadas durante um período de 07 a 10 dias a baixas temperaturas é utilizado, pois promove a formação de calos e a posterior diferenciação em plantas verdes. Tratamentos com frio por mais de 14 dias reduzem a capacidade de regeneração de plantas e desenvolve a produção de plantas albinas (Tsay; Chen, 1984). O mais utilizado em cultura de anteras é o pré-tratamento das panículas no frio, de 8°C a 10°C, por sete a dez dias no escuro (Zapata-arias, 2003). Os efeitos do tratamento com frio e escuridão diminuem a atividade respiratória das anteras, estendendo a atividade biológica do arquespório que abrigam os grãos de pólen, mantendo a viabilidade dos mesmos, evitando a deiscência prematura das anteras em cultivo e retardando a senescência do pólen (Sunderland, 1978).

As plantas DH desenvolvidas em laboratório fornecem uma gama de possibilidades moleculares ao melhoramento genético, como análises genéticas funcionais e mapeamento genético (Mihaly et al., 2014). Em arroz, populações de DH têm sido usadas para mapeamento de QTL e descritos para identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência a doenças, como a brusone (Hemamalini et al., 2000; Wang et al., 2001).

### **2.3.2 Variação somaclonal**

A regeneração de plantas por meio de cultura de calos permite a identificação de indivíduos que se diferenciam da planta original em uma ou mais caracteres. Essas características geralmente são estáveis e transmissíveis aos descendentes. Esse fenômeno denomina-se variação somaclonal e é induzido por meio de diferentes fatores genéticos,

como: a mutação nuclear ou citoplasmática, poliploidia, recombinação mitótica, entre outros (Larkin e Scowcroft, 1981, Brettell et al., 1986, Illg, 1990, Sant'Ana et al., 2001).

Um fator importante que influencia a variação somaclonal é a composição química do meio de cultura. Reguladores de crescimento como o ácido diclorofenoxiacético (2,4 D) podem provocar alterações no cariótipo, levando a um desequilíbrio no crescimento das estruturas celulares, o que resulta no surgimento de células com anomalias (Bayliss, 1975). As condições físicas do meio de cultura (sólida ou líquida) também influencia o comportamento dos indivíduos desenvolvidos nessas condições (Lentini et al ., 1994).

A variação somaclonal é bastante utilizada e comum em espécies como a cevada (Bregitzer e Poulson, 1995), feijão (Mohamed, Coine e Read, 1993), trigo (Guensi, Mornhinweg e Johnson, 1992), ervilha (Cecchini et al., 1992), aveia (Dahleen, Stuthman e Rines, 1991) entre outras. Na cultura do arroz, o melhoramento genético faz uso de diferentes processos para a introdução de características favoráveis, tanto na produção de grãos, como na resistência a doenças. Os métodos convencionais de melhoramento são bastantes utilizados e, apesar de serem eficazes, são bastantes onerosos e demandam muito tempo para obtenção de resultados concretos (Allard, 1960). Métodos não convencionais como a mutação induzida tem como desvantagem o uso de produtos químicos tóxicos e materiais radioativos. Assim, a variação somaclonal é uma alternativa de melhoramento bastante significativa, devido a segurança, rapidez e ao menor gasto de tempo e recursos (Illg, 1990).

A variação somaclonal em arroz foi bastante utilizada como método para aumentar a variabilidade genética para resistência às doenças e outros caracteres agronômicos no melhoramento de cultivares adaptadas às condições locais (Duval et al., 1998). Plantas de distintas culturas, que são resistentes a diferentes patógenos, foram obtidas por meio de cultivares suscetíveis (Cheng-Zhang et al., 1988; Pachun, 1989; Xie et al., 1990; Bouharmont et†al., 1991). Somaclones com diferentes graus de resistência à brusone foram obtidos a partir de cultivares suscetíveis de arroz (Chauhan et al., 1996). No Brasil, estudos mostraram sucesso na obtenção de somaclones apresentando tanto resistência vertical como parcial à brusone, utilizando cultivares suscetíveis de arroz como IAC 47, Araguaia, Bluebelle e Basmati-370 (Araújo et al., 1997, 1998, 2000, 2001a, 2001b;2002a Araújo & Prabhu, 2001)

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIAL VEGETAL**

O material vegetal foi obtido, em condições controladas de casa de vegetação na Empraba Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás/GO. Foram utilizados dois cruzamentos de arroz. Para o primeiro cruzamento, foram selecionados como genitores duas cultivares de arroz irrigado da subespécie indica, Metica-1 e Cica 8. No segundo cruzamento foram utilizados uma linhagem doadora de resistência CNA923, e a cultivar BRS Primavera. As sementes dos genitores foram semeadas durante dois meses, em intervalos de 1 semana devido ao florescimento específico de cada cultivar, em vasos plásticos contendo 8 kg de solo adubado com 5 g de NPK 5- 30-15, 2 g de sulfato de amônia, 1 g de sulfato de zinco. Realizou-se a adubação de cobertura com 2 g de sulfato de amônia 15 dias após o plantio. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação até o final do ciclo.

Para a obtenção da população  $F_1$ , oitenta dias após o plantio, foram retiradas as anteras das espiguetas das flores paniculares do genitor feminino, com o auxílio de um emasculador a vácuo. Logo depois, as panículas emasculadas foram protegidas com sacos de papel para evitar contaminação por pólen de outras plantas. As panículas do genitor masculino, foram destacadas e imersas em tubos suspensos ao lado dos vasos contendo as plantas femininas para realização da polinização. As panículas polinizadas foram cobertas por saco de papel, de acordo com metodologia descrita por Coffman & Herrera (1980) e, posteriormente adaptada e descrita por Neves & Taillebois (1990).

#### **3.2 OBTENÇÃO DE DUPLOS HAPLOIDES DOS CRUZAMENTOS METICA-1 X CICA-8 e BRS PRIMAVERA X CNA 923**

Para obtenção das plantas *in vitro* os ensaios foram realizados no laboratório de cultura de tecidos vegetais (LCTV) da Universidade Federal de Goiás em condições controladas por um período de 36 meses. Foram obtidas plantas de duplo haploides por

meio da cultura de anteras de plantas F<sub>1</sub> provenientes dos cruzamentos dos cultivares BRS Primavera X CNA 923 e Metica-1 X Cica-8. As sementes dos cruzamentos foram germinadas em papel germinador, mantidas por sete dias em câmara de germinação tipo BOD à 25°C. As plantas foram transplantadas em vasos plásticos contendo 6 kg de solo adubado com 1,4 g de Ureia [(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO] e 7,6 g de Fosfato de sódio (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e 2,66 g de Potássio (K). A adubação de cobertura foi realizada no 15º dia após o plantio, com 2 g de sulfato de amônia ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

As inflorescências foram coletadas das 8:30 às 9:30hs, no estágio do grão de pólen uninucleado, quando a distância entre a aurícula da folha bandeira e da penúltima folha estavam entre 6 a 8 cm e armazenadas em geladeira, a aproximadamente 8°C, por um período de sete a dez dias (ZAPATA et al., 1982).

A desinfestação das flores paniculares foi realizada em câmara de fluxo laminar com uso de soluções de álcool 70% e hipoclorito de sódio 10% por um minuto e 15 minutos respectivamente, lavadas três vezes com água destilada e esterilizada. As anteras foram retiradas das espiguetas e colocadas em placas de Petri contendo meio de indução de calos com pH ajustado para 5,8. Em seguida, as placas foram incubadas no escuro a 26°C por 2 meses. Foram realizados ensaios para identificar a composição do meio de cultivo eficiente para indução de calos de cada cruzamento (Tabela 1) e a sacarose (50 g L<sup>-1</sup>) foi utilizada como fonte de carbono.

**Tabela 1.** Modificações nas concentrações de reguladores de crescimento nos meios N6 (Chu et al., 1970) e N6 modificado (Araújo et al. 2010) utilizadas para a indução de calos nos cruzamentos Metica-1 x Cica-8 e BRS Primavera x CNA 923.

<b>Genótipos</b>	<b>Concentrações de reguladores de crescimento</b>
Metica-1 x Cica-8	N6, 0.25 mg/L picloram, 1 mg/mL ANA
	N6, 4 mg/L de Ana, 1 mg/m L cinetina
	N6, 0.5 mg/L picloram, 1 mg/ml ANA
	**N6 modificado, 0.5 mg/L picloram, 1 mg/mL ANA
	**N6 modificado, 2 mg/mL 2,4 D
	**N6 modificado, 0.25 mg/ml picloram, 1 mg/mL cinetina

---

BRS PrimaveraX CNA 923	<p>**N6 modificado, 1 mg/L 2,4 D, 0.5 mg/mL cinetina</p> <p>N6, 4 mg/L Ana, 1 mg/mL cinetina</p> <p>N6, 0,25 mg/L picloram , 1 mg/l de ANA</p> <p>N6, 2 mg/ml 2,4 D, 0.07 mg/ml picloram</p> <p>NL Líquido 4 mg/ml de Ana, 1mg/ml de cinetina</p> <p>NL líquido 2 mg/ml 2,4 D, 1mg/ml de cinetina, 0.07 mg/ml de picloram</p> <p>NL sólido 4 mg/ml de Ana, 1mg/ml de cinetina</p> <p>NL sólido 2 mg/ml 2,4 D, 1mg/ml de cinetina.</p>
---------------------------	---

---

\*Meios derivados de Lentini et al., 1997, Chu et al., 1970. \*\* dobro de micronutrientes, (Araújo et al., 2010)

Os calos induzidos foram transferidos para o meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenacético) ; 3,0 mg L<sup>-1</sup> de cinetina; 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 8 g/l de ágar e pH ajustado para 6,0. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, a uma temperatura de 26°C com fotoperíodo de 16 horas e uma intensidade luminosa de 75  $\mu\text{E.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . A cada 30 dias foram realizadas transferências para meios de igual composição até a obtenção de plantas. A frequência de indução de calos foi calculada dividindo-se o número de calos formados sobre o número total de anteras e, para a frequência de regeneração de plantas, dividiu-se o número de plantas obtidas pelo número de calos .

As plantas com sistema radicular formado com uma ou duas folhas abertas foram transferidas para vasos de 6 kg contendo solo adubado com 2,5 g de NPK (4-30-16) e 0,25 g de FTE-BR12 por vaso, e estes foram mantidos em casa de vegetação até a maturação da semente. As sementes das plantas individuais de duplo haploides com os cromossomos duplicados espontaneamente foram colhidas.

O meio de cultura que induziu maior porcentagem de indução de calos para o cruzamento (BRS Primavera X CNA 923) foi utilizado para construção da curva de concentração, considerando as concentrações de ANA e picloram. O ensaio foi realizado com cinco tratamentos (T1=1 mg/mL ANA, 0.25 mg/mL picloram; T2 = 1 mg/mL ANA, 0.5 mg/mL picloram; T3 = 1 mg/mL ANA, 0.75 mg/mL picloram; T4 = 1 mg/mL ANA, 1.0

mg/mL picloram e 20 repetições). Cada parcela continha 120 anteras, totalizando 2.400 anteras.

### 3.3 OBTENÇÃO DE SOMACLONES DO CRUZAMENTO DE METICA-1 X CICA-8.

A nomenclatura utilizada para as plantas regeneradas “*in vitro*” de acordo com Araújo et al., (2002) foi R<sub>1</sub> para regenerantes Primários e R<sub>2</sub> para os regenerantes secundários. Assim, foram utilizadas panículas imaturas para obtenção de população R<sub>2</sub> de plantas F<sub>1</sub> do cruzamento Metica-1 x Cica-8. As flores paniculares foram coletadas quando a distância entre a aurícula da folha bandeira e da penúltima folha se encontravam entre um a quatro centímetros com espiguetas de coloração branca ou levemente amarela. As flores paniculares foram desinfestadas com 30% de uma solução, contendo 1% de hipoclorito de sódio (NaOCl) durante 40 a 60 minutos.

As panículas imaturas foram colocadas em placas de Petri contendo meio MS suplementado com 30 g/l de sacarose, 50 mg/l de caseína hidrolisada e 4,0 mg/l de 2,4-D (Araújo et al. 1997) e incubadas em câmara de germinação tipo BOD, no escuro, por um período de 25 a 30 dias. A regeneração de plantas foi realizada no meio MS suplementado com 0,5 mg/l de ANA e 3,0 mg/l de cinetina. Nos dois meios de cultura utilizou-se 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH do meio de indução de calos e regeneração foi 5,8 e 6, respectivamente. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a uma temperatura de 26°C com fotoperíodo de 16 horas e uma intensidade luminosa de 75µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. A cada 30 dias fez-se a repicagem para meios com a mesma composição anterior, até obtenção de plântulas verdes..

As plantas com sistema radicular formado e com uma ou duas folhas abertas, foram transferidas para vasos de 6 kg contendo solo adubado com 2,5 g de NPK (4-30-16) e 0,25 g de FTE-BR12 por vaso, contendo 6 kg de solo, e estes foram mantidos em casa de vegetação até a maturação da semente. As sementes das plantas individuais R<sub>1</sub> foram colhidas. Em cada planta R<sub>1</sub> foram avaliados o número de perfilhos, de panículas e o peso de 100 grãos.

### 3.4 AVALIAÇÕES DA POPULAÇÃO R2 PARA RESISTÊNCIA À BRUSONE NO CRUZAMENTO METICA-1 x CICA-8

A população R2 foi avaliada para a resistência à brusone em condições de casa de vegetação. Foram selecionados dois isolados diferenciadores de raças: Um de Metica-1, BRM16185 (raça IB-1) e outro de Cica 8, BRM15571 (raça IB-45-). A cultivar Metica-1 é resistente e suscetível a raça IB-45 e IB-1 e a cultivar Cica-8 é incompatível e compatível às raças IB-1 e IB-45, respectivamente (Filippi & Prabhu, 1997; Filippi et al., 2007; Pinheiro et al., 2012). As sementes de 46 plantas R1 foram misturadas, totalizando 4000 sementes.

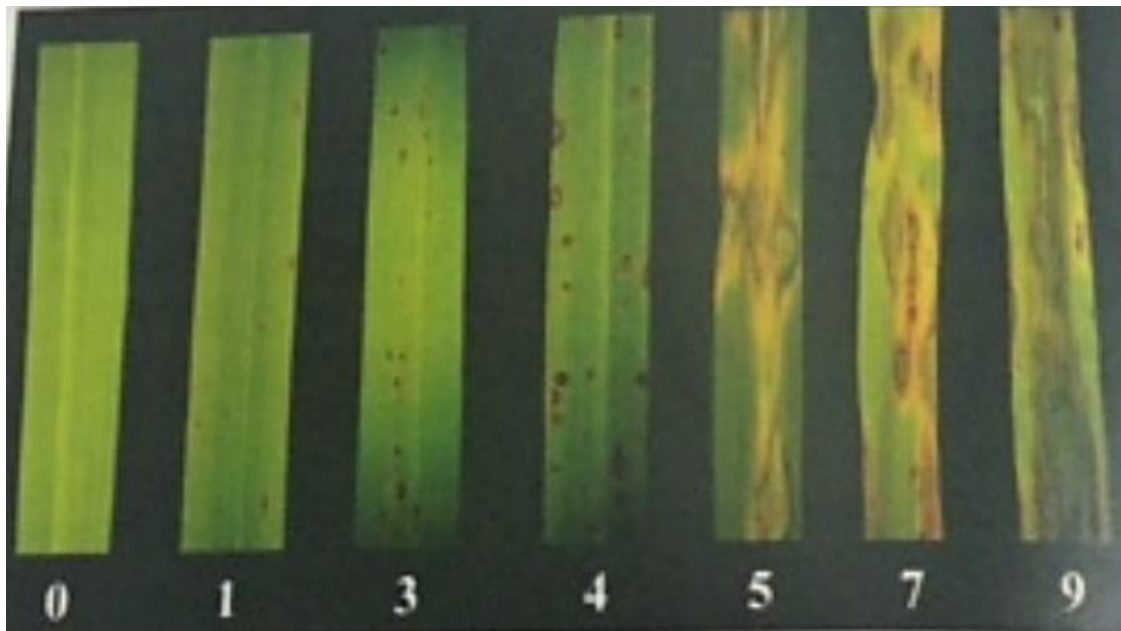
As sementes foram colocadas a uma temperatura de 50°C por 72 horas em estufas em circulação forçada para quebra de dormência. A semeadura foi realizada em bandejas plásticas, medindo 30x15x10 cm, contendo 5 kg de solo adubado com 5 g de NPK 5-30-15, 2 g de sulfato de amônia e 1 g de sulfato de zinco. A densidade de semeadura foi de dez sementes/linha. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação. 800 plantas R2 foram inoculadas com o patótipo IB-45 e outras 800 com patótipo IB-1 totalizando 1600 plantas. Sementes dos genitores Metica-1 e Cica-8 foram semeados em seis bandejas plásticas, totalizando 300 plantas para cada genótipo compondo o grupo controle. Foi realizada uma adubação de cobertura, 18 dias após a semeadura com 2 g de sulfato de amônio por bandeja.

#### **3.4.1 Obtenção da suspensão de conídios de isolados de *M. oryzae***

Os dois isolados utilizados (BRM16185 e BRM15571) foram pré-multiplicados em meio BDA e transferidos por 10 dias sob luz contínua para o crescimento das colônias em placas de Petri, contendo o meio de cultura Aveia Ágar (Aveia 50g - Ágar 15g - Dextrose 20g, para 1L água). A conidiogênese foi estimulada pela remoção do micélio aéreo, com o auxílio de bastão de vidro estéril. As placas de Petri, contendo a colônia sem micélio aéreo, foram mantidas sob luz branca contínua por um período de 48 horas com temperatura variando de 25°C a 27°C e alta umidade. A remoção dos conídios foi realizada com o auxílio de pincel e água destilada estéril. A suspensão contendo conídios de *M. oryzae* foi filtrada em tecido estéril tipo crepe e a concentração ajustada para  $3 \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup> utilizando-se hemacitômetro tipo Neubauer e microscópio óptico (Filippi & Prabhu, 2001).

### 3.4.2 Inoculação de *M. oryzae* e avaliação da brusone nas folhas

Plantas no estágio e emissão da terceira folha (estádio V) foram pulverizadas com as suspensões de conídios individualmente até o ponto de escorrimento aos 21 dias após o plantio, utilizando-se compressor de acordo com a metodologia de Filippi & Prabhu, 2001. Após a inoculação, as plantas foram incubadas em câmara úmida por 24 horas à temperatura de 24°C a 26°C em casa de vegetação. Em seguida, as plantas foram submetidas às temperaturas variando de 27°C a 30°C e alta umidade em casa de vegetação. A avaliação da brusone foliar foi realizada sete dias após a inoculação. Os tipos de reações foram definidos baseados em uma escala de notas de brusone nas folhas, em casa de vegetação, em que reação 0 indica ausência de lesão. Por sua vez, as lesões tipo 1 caracterizam-se por pequenas pontuações marrons. As lesões tipo 3 são pequenas, redondas a ovais, necróticas, de cor marrom. Lesões tipo 5 são elípticas, esporulativas, com margem marrom. As lesões do tipo 7 apresentam forma irregular, sem margens distintas. Lesões tipo 9 apresentam coloração branca a azulada, sem margem distinta, coalescendo rapidamente conforme figura 2 (Leung et al.,1988).



**Figura 2.** Escala de notas brusone foliar ( Leung et al.,1988).

As avaliações de severidade de brusone foliar (SBF %) foram realizadas em uma amostra de 50 plantas R2 para cada isolado e em 50 plantas dos genitores Metica-1 e Cica-8, utilizando-se a escala de notas de dez graus, proposto com Notteghem (1981), aos oito

dias após a inoculação de *M. oryzae*. A SBF foi avaliada em intervalos de dois dias para determinar a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Também foi calculada a redução da severidade de brusone foliar e da AACPD em relação a cada genitor. Os dados de severidade foram transformados utilizando-se  $\sqrt{x+0.5}$ . Os dados foram submetidos ao teste T usando o software SPSS.

#### 4 RESULTADO E DISCUSSÃO

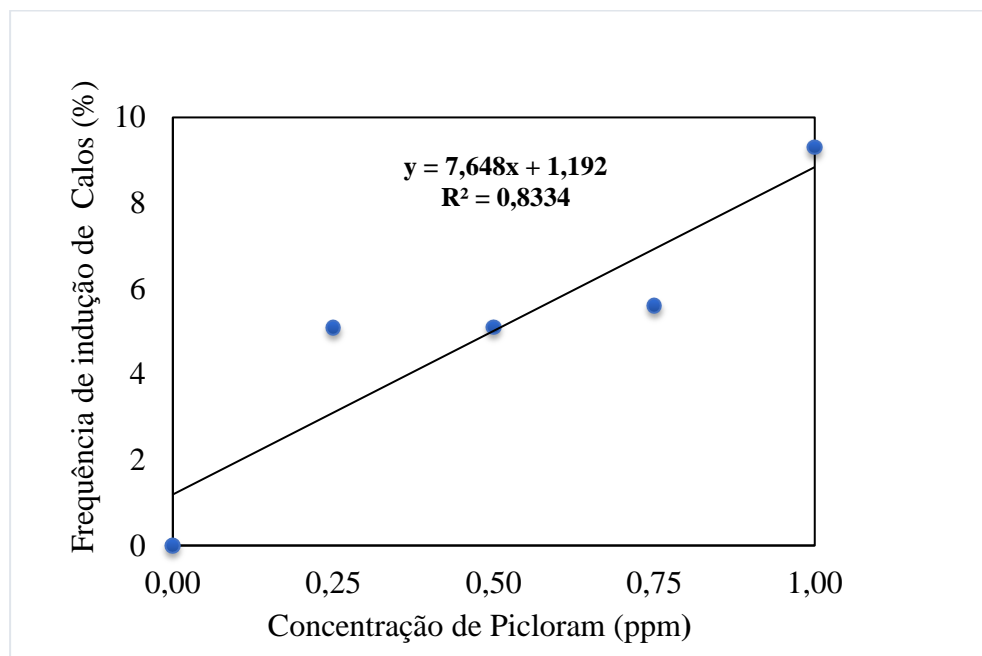
As seis composições dos meios de cultura (Tabela 1) provenientes dos protocolos existentes na literatura e de modificações para indução de calos de anteras do cruzamento de Metica-1 X Cica-8 não foram eficientes, provavelmente, devido ao uso de cultivares índicas, ocasião em que as anteras necrosaram 15 dias após o plaqueamento. Dessa maneira, os resultados destes protocolos envolvendo outros genótipos e cruzamentos da subespécie índica também obtiveram baixa frequência de indução de calos (Khatun et al., 2010; Jelodar, 2008; Javed et al., 2007; Chen et al., 1991). Lentini et al. (1995) reportaram que apenas um genótipo, de 35 genótipos da subespécie índica, respondeu a formação de calos a partir do cultivo de anteras com uma porcentagem de 0,25%. Nesse viés, Souza et al. (2011) relataram a não formação de calos para o cruzamento das cultivares índicas BRS Firmeza x Epagri 107 e, somente 0,06% na cultivar índica BRS Atalanta. Lannes et al. (2004) encontraram 2,27% de calos para a cultivar BRS 7 “Taim” (índica).

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados aqui encontrados foi a temperatura de incubação das anteras de 25°C e fotoperíodo 24 horas no escuro. Javed et al. (2007) utilizaram incubação das anteras de 30°C por 14 horas e de 20°C por 10 horas na cultivar índica Pokkali e a formação de calos aumentou 8,6%.

No cruzamento entre BRS Primavera x CNA 923, das oito composições de meios de cultura, somente duas induziram calos de anteras. Isso porque a BRS Primavera apresenta em sua genealogia genótipos da subespécie japônica e índica, enquanto a linhagem CNA 923 é índica, evidenciando que quando pelo menos um dos genitores do cruzamento apresenta background japônica, será possível induzir calos quando comparado a genitores de subespécies índicas. Esses resultados corroboram com relatos de trabalhos anteriores em que destacaram desempenho superior de genótipos da subespécie japônica em relação a genótipos da subespécie índica (HU, 1985; MIAH et al., 1985; RAINA, 1997). Faruque et al., (1998) em seu trabalho realizaram a indução de calos em uma cultivar índica e em cruzamentos entre subespécies índica e japônica. Toda a progênie F1 dos cruzamentos com Tapei-309 (japônica), mostrou indução de calo significativamente aumentada em comparação com a progenitora índica (IR-43).

O meio de cultura um (N6, 0.25 mg/L picloram, 1 mg/mL ANA) induziu mais calos (0,83%) quando comparado com o três (N6, 0.5 mg/L picloram, 1 mg/ml ANA) que proporcionou 0,2% (total de 2400 anteras) e foi utilizado para um ensaio de variação na concentração de picloram.

A regressão entre as concentrações de picloram e a frequência de calos foi linear e positiva, indicando que a medida que se aumentou a concentração do picloram, a frequência de calos também foi incrementada (Figura 3).



**Figura 3.** Regressão entre a frequência de indução de calos em função da concentração de picloram no meio de cultura (N6 modificado com 1 mg/mL cinetina) do cruzamento entre BRS Primavera e CNA 923. Cada observação foi proveniente de 1200 anteras.

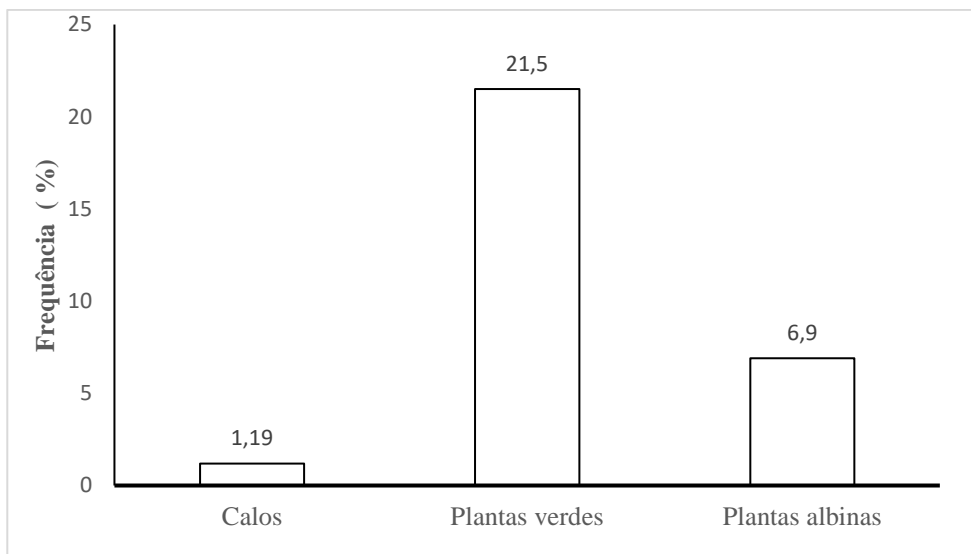
Neste ensaio, a concentração de 1 mg/ml de picloram proporcionou 9,3% de indução de calos (total de 1200 anteras) em um mês e foi utilizada nos demais plaqueamentos. Foram plaqueadas um total de 26.400 anteras em um ano e a frequência de calos foi de 1,19%.

Salienta-se que outros trabalhos utilizaram protocolos com variações no tipo e concentrações de reguladores de crescimentos de anteras da subespécie índica e japônica.

Ambarwati et al. (2009) observaram que entre nove genótipos de arroz das subespécies índica e japônica, a frequência de calos foi maior na japônica (2,88) quando comparado com a índica (0,02%). Souza (2011) encontrou 2,06% de indução de calos na cultivar Nipponbare (japônica) e 0,06% cultivar BRS Atalanta (índica). Por sua vez, Lannes & colaboradores (2004) obtiveram 2,27% e 3,36%, para as cultivares BRS 7 “Taim” (índica) e Taipei 309 (japônica), respectivamente. Já Gueye & Ndir (2010) obtiveram uma frequência de calos de 4,24% para a cultivar japônica IKP, em contraste com 0,03% para a cultivar índica Farox 239 de um total de 660 anteras incubadas. Araújo et al. (2009) utilizaram anteras do cruzamento entre Lijiangxintuanheigu (LTH) x SC09, que são japônicas, e obtiveram frequência de 75,5% de calos.

Importante mencionar que a frequência de regeneração de plantas verdes e albinas foram 21,5% e 6,9%, respectivamente, de um total de 60 plantas obtidas neste estudo (Figura 4). Em outros trabalhos, a taxa de plantas regeneradas do cruzamento entre uma cultivar índica ( Binnatoa) e uma japônica ( Tapei 309) foi de 8,9 % e já o número de plantas regeneradas a partir do cruzamento de duas cultivares índicas (BRS Firmeza x Epagri 07) foi de 0%. (Souza, 2011; Faruque et al., 1998) .

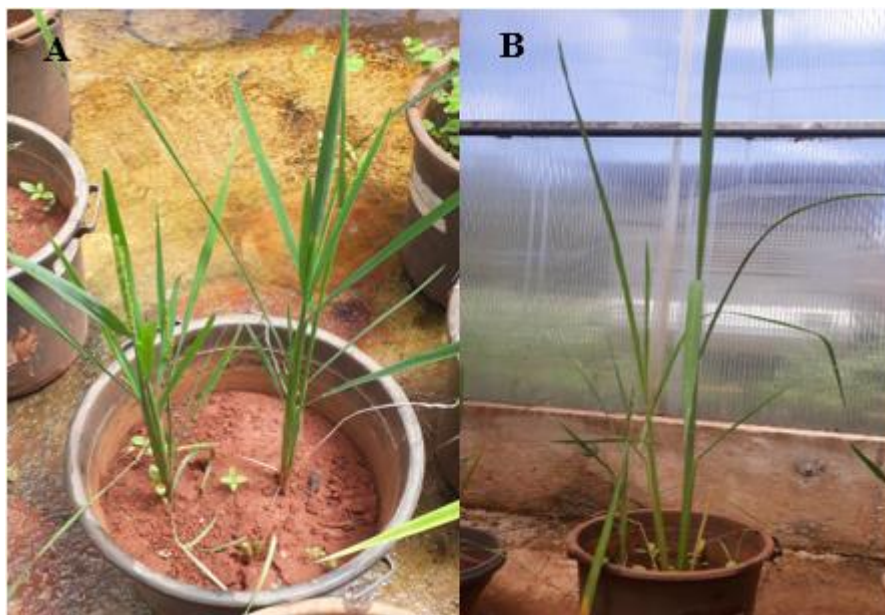
Souza (2011) observou que a frequência de albinismo no cruzamento Nipponbare x BRS Atalanta foi maior no meio N6 (0,13%) do que no NL (0,11%), enquanto que no cruzamento entre genótipos japônicas, a frequência de albinos foi de 7,2%, de um total de 193 plantas regeneradas (Araújo et al. 2010). Outro fator importante no albinismo é a temperatura de incubação das anteras que não pode ser acima de 28°C (Zubco & Day, 2002). As condições relativas ao meio de cultura afetam diretamente a eficiência dos protocolos de indução de calos e de regeneração de plantas *in vitro*. Contudo, sabe-se que as condições ideais de cultivo são quase que específicas para cada genótipo (Perters et al.,1999).



**Figura 4.** Frequência de indução de calos e de regeneração de plantas por meio de cultura de anteras no cruzamento BRS Primavera x CNA 923.

Sessenta plantas R1 foram transplantadas para vasos em casa de vegetação, até a produção de sementes, sem o uso de mutantes para duplicação dos cromossomos. Desse total de plantas, 56 (94,3%) e quatro (5,7%) foram haploides e duplo haploides, respectivamente. Não houve mortalidade no processo de aclimatização. Zaffari et al. (2010) observaram que de 38 genótipos F<sub>1</sub>, quatro regeneraram plantas verdes, e desse total, três genótipos produziram 19 plantas duplo haploides.

Observa-se-se que as plantas haploides visualmente foram menores e inférteis, e perfilharam menos quando comparadas as duplohaploides (Figura 4). Estas características fenotípicas também foram observadas por Araújo et al. (2009) que encontraram uma frequência de 50,2% de duplicação espontânea no cruzamento entre genótipos da subespécie japônica.



**Figura 5.** Plantas do cruzamento BRS Primavera x CNA 923 obtidas por meio de cultura de anteras: (A) Planta haploide; (B) Planta duplo haploide .

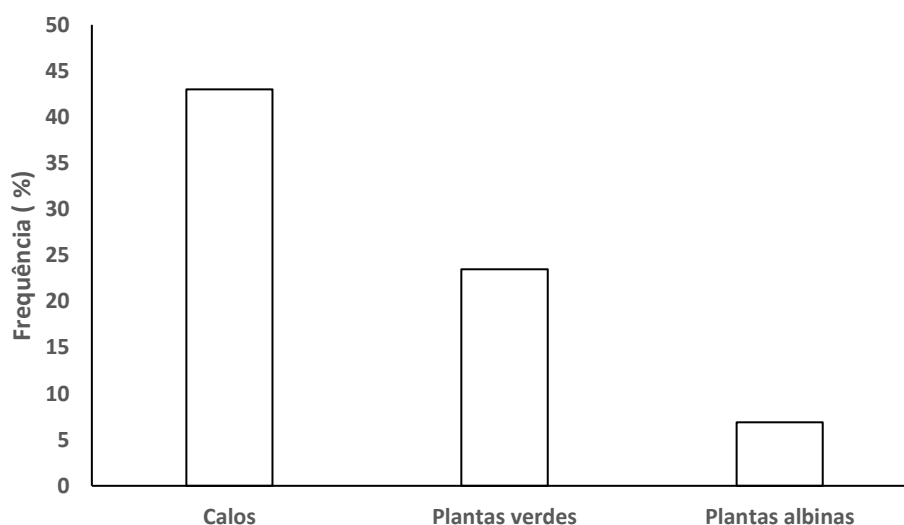
Por outro lado, vinte e cinco sementes das quatro plantas R2 foram semeadas em casa de vegetação em sulcos de plantio com espaçamento de 10 cm, sem adubo químico, no dia 20 de julho de 2018, em sistema de produção orgânica para avanço de geração e poderão ser avaliadas para resistência a brusone em condições controladas de casa de vegetação.

Para aumentar a frequência de calos de anteras em genótipos índicas e, em cruzamentos entre índica x índica e índica x japônica, recomenda-se outros ensaios a partir dos resultados encontrados no presente trabalho. Sugere-se que sejam testados protocolos de composições de meios de cultura, temperatura e fotoperíodo nos genótipos utilizados no programa de melhoramento, onde os melhores protocolos poderão ser utilizados na cultura de anteras de F1 e também em F2.

#### 4.1 OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE POPULAÇÃO R2 DO CRUZAMENTO DE METICA-1 X CICA-8 PARA BRUSONE FOLIAR

As panículas imaturas do cruzamento de Metica-1 x Cica-8 foram utilizadas para produção de variantes somaclonais, pois não foi possível induzir calos por meio de anteras, bem como para gerar fontes de resistência. A frequência de indução de calos por meio da cultura de panículas imaturas foi 43% e iniciada sete dias após o cultivo; já as de regeneração

em plantas verdes e albinas foram 23,5% e 3,6%, respectivamente, em quatro meses (figura 5). Estes resultados mostram o sucesso da cultura de panículas imaturas para obtenção de muitas plantas em pouco tempo. Nesse sentido, vários trabalhos demonstraram a eficiência desta técnica para diferentes cultivares e cruzamentos F1s entre subespécies índicas e japônicas. Por exemplo, para a cultivar Araguaia (Japônica) a produção de calos foi iniciada aos seis dias após cultivo e não foram obtidas plantas albinas. As frequências médias de indução de calos e regeneração de plantas verdes foram de 75% e 11,8%, respectivamente (Araújo et al 2000). Ademais, a frequência de indução de calos e regeneração de plantas da cultivar Bluebelle (irrigada e japônica) foi de 87,5% e 23,9%, respectivamente, sem ocorrência de plantas albinas (Araújo et al., 2001b). Assim, observa-se que a cultura de panículas imaturas gera maior quantidade de plantas diploides em pouco tempo, com variabilidade genética herdável, e independe da subespécie quando comparada a cultura de anteras para o mesmo cruzamento.



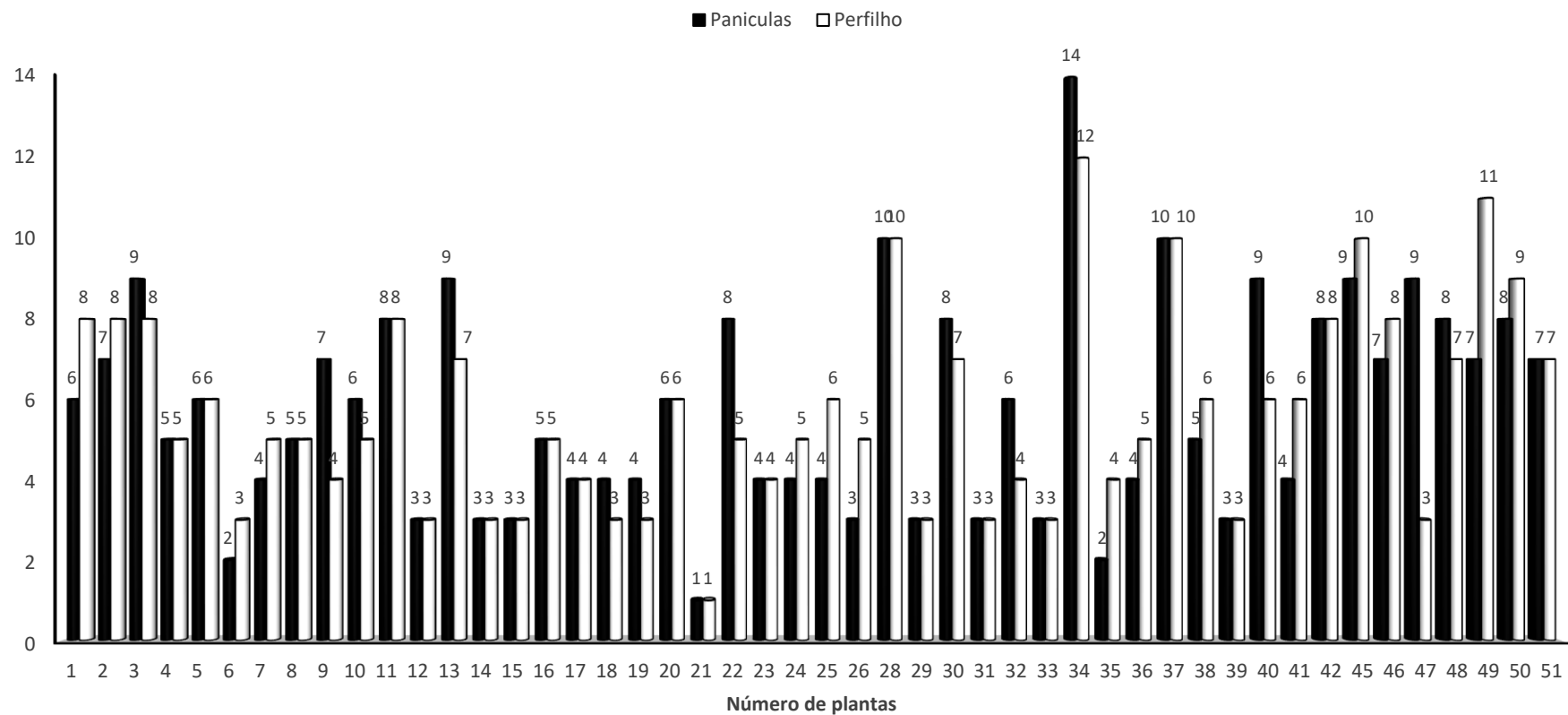
**Figura 6.** Frequência de indução de calos e de regeneração de plantas verdes e albinas de cultura de panículas imaturas do cruzamento de arroz Metica-1 X Cica-8.

Ressalta-se que foram obtidas 51 plantas R1, das quais seis morreram no processo de aclimação e 14 apresentaram menos de 100 grãos. Os regenerantes R1 obtidos foram férteis e apresentaram variação para número de perfilhos e panículas, com peso de 100 grãos (Figuras 8 e 9). Nessa toada, o número de perfilhos foi de 1 a 12 e o

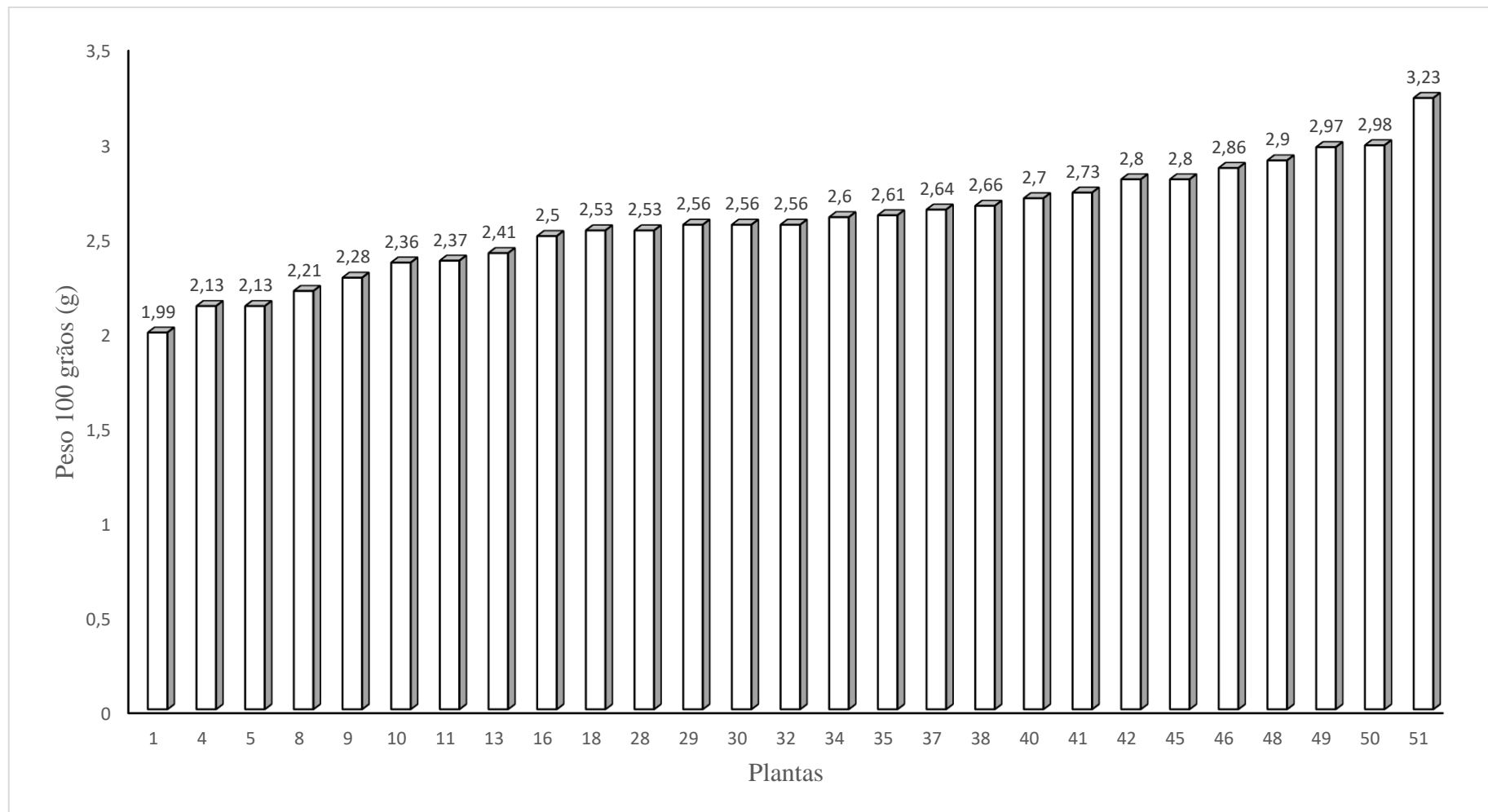
número de panículas variou de 1 a 14 por planta, destacando a plantas R1 (34) para os dois caracteres. O peso de 100 grãos das sementes R2 variou de 1,99g a 3,23g com destaque para a planta 51. As plantas dessa geração também apresentaram variação visual para altura, perfilhamento, tipo de folha (ereta e decumbente) e comprimento do grão (Figura 7) . Trabalhos anteriores também obtiveram variações fenotípicas para estes caracteres e para os relacionados a produção de grãos nas gerações R2 a R5 de arroz (Araújo et al., 2000; Araújo et al., 2001; Araújo et al., 2002; Cai et al., 1990) e tomate (Fukui et al., 1983).



**Figura 7.** Plantas R1 obtidas por panículas imaturas . (A)- Tipo de planta ereta verde escuro; (B) – Planta decubemte amarelo esverdeada; (C) Planta Perfilhada



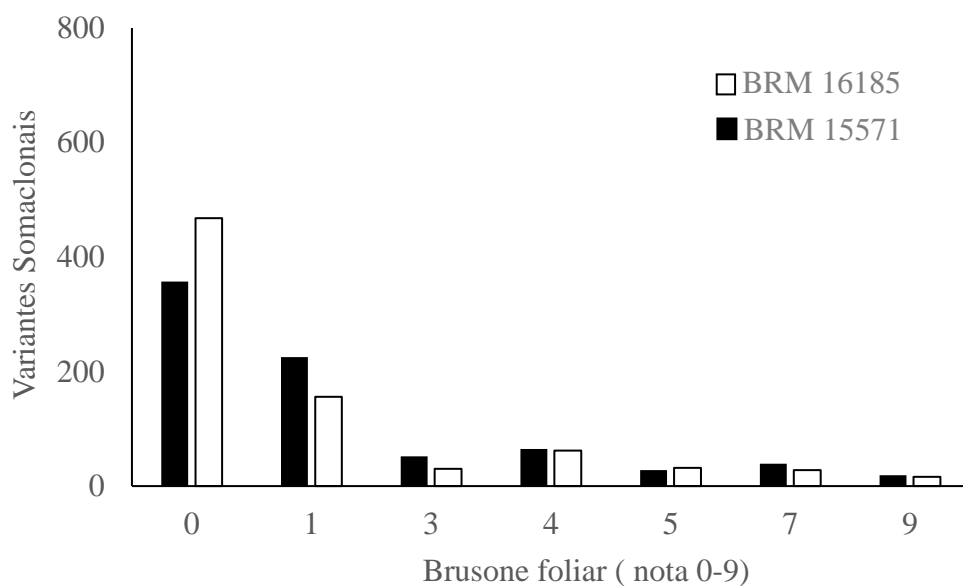
**Figura 8.** Distribuição de frequência do número de perfilhos e de panículas de cada planta R1 de arroz do cruzamento Metica -1 e Cica-8



**Figura 9.** Distribuição de frequência do peso de 100grãos de cada planta R1 do cruzamento de arroz Metica-1 x Cica-8.

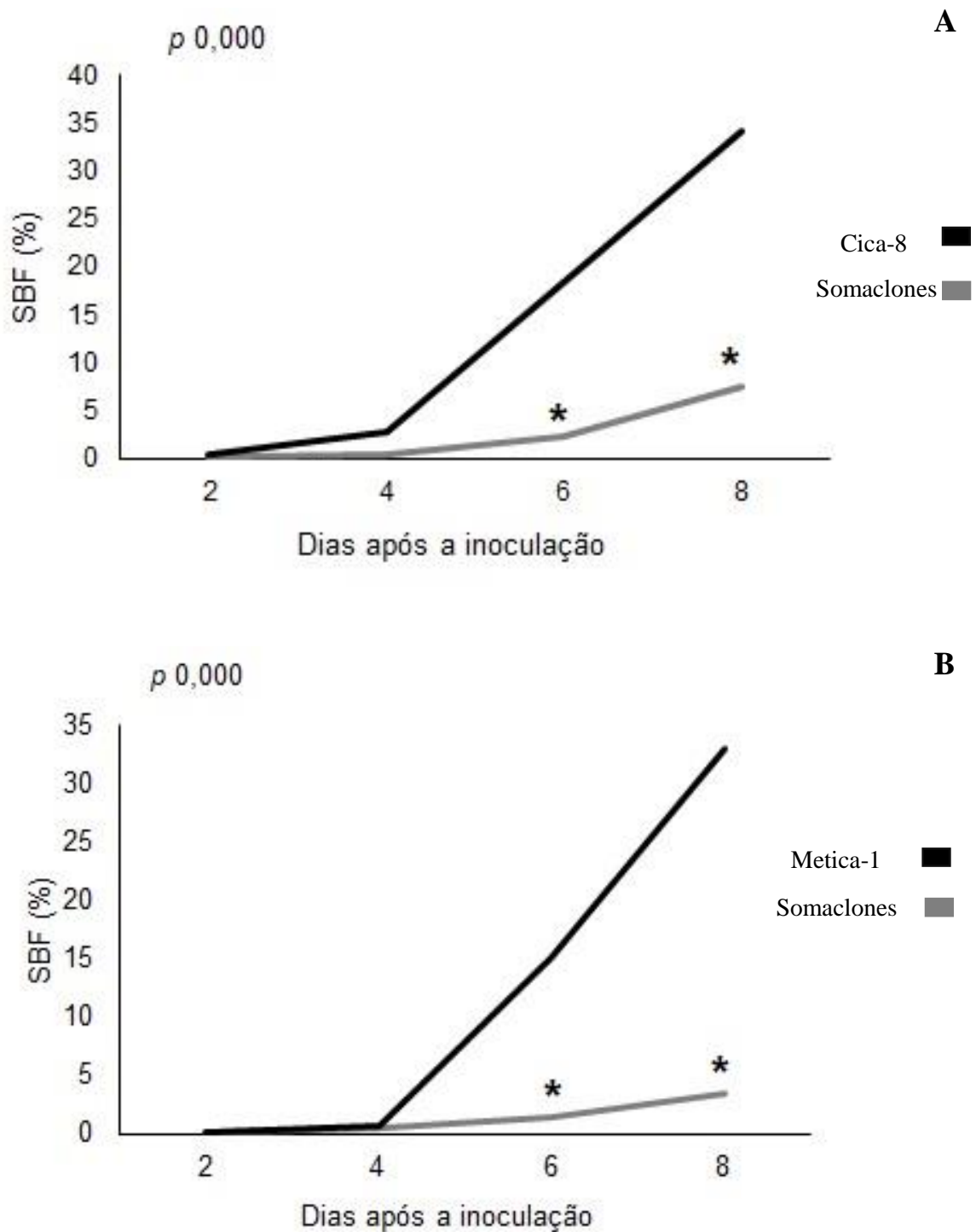
Assim, os genitores e as duas populações R2 foram avaliados para brusone foliar em casa de vegetação para dois isolados de *M. oryzae*. Todas as plantas da cultivar Metica-1 foram compatíveis ao isolado BRM 16185 (raça IB-1) e incompatíveis ao isolado BRM 15571, (raça IB-45). O isolado de Cica-8 (BRM 15571, raça IB-45) não infectou as plantas de Metica-1, contudo, infectou Cica-8, confirmando os dados de Filippi et al. (2002) e Pinheiro et al, (2012).

Cada população R2 foi composta por 800 plantas. A primeira foi avaliada para o isolado de BRM 16185 em que 644 apresentaram reações de resistência (0-3,) e 156 de suscetibilidade (4-9). Apenas 20 plantas R2 apresentaram reação altamente suscetível (9). A outra população foi avaliada para o isolado de BRM 15571 e segregou para 670 e 130 resistentes e suscetíveis, respectivamente, sendo que 12 apresentaram reação tipo nove (figura 10). Em outro estudo, avaliou-se 280 plantas R2, provenientes de 14 plantas R1 da cultivar Metica-1, e as progênes de duas plantas R1, as quais apresentaram reação de resistência tipo 3 que permaneceu em R4. A cultivar Metica-1 mostrou reação altamente suscetível tipo 9 em casa de vegetação e a resistência destes somaclones se manteve no campo por mais duas gerações (Araújo et al., 2002a). Quatro somaclones R5 de Cica-8, de um total de 39, apresentaram resistência específica (tipo 3) para outro isolado de Metica 1 pertencente a raça IB-1 (Araújo et al., 2004). Somaclones de F<sub>1</sub>s entre doadores de resistência e suscetíveis foram resistentes as raças IB-1 e IB-9 nas gerações R2, R3 e R4, sendo que alguns mantiveram a resistência na geração R5, em condições de campo com alta pressão da doença.

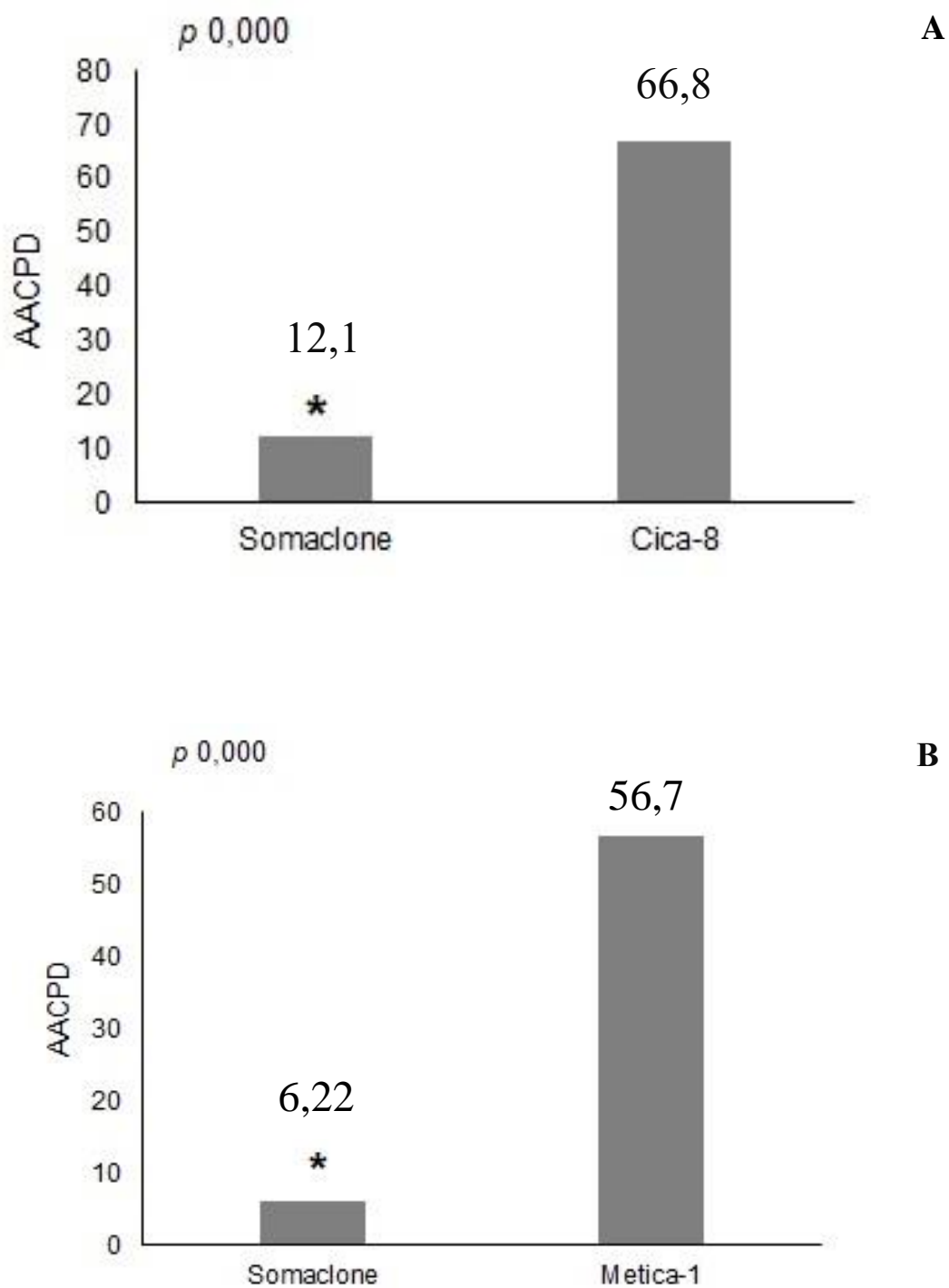


**Figura 10** . Severidade de brusone nas folhas avaliadas por escala de 0-9 . \*Nota de 0-3 reação de resistência, Nota de 4-9 reação suscetível.

As duas populações foram avaliadas para resistência parcial por meio da SBF e AACPD para cada isolado. A SBF das plantas R2 avaliadas para o isolado de BRM 15571 (raça IB-45) foi significativamente menor (7,59%) do que em Cica 8 (34,24%), aos oito dias após a inoculação (Figura 11a); a AACPD das plantas R2 e Cica 8 foram estatisticamente diferentes com 12,1% e 66,8%, respectivamente (Figura 12a); A SBF das plantas R2 foi significativamente menor (3,36%) do que em Metica-1 (32,96%) para o BRM 16185 (raça IB-1), aos oito dias após a inoculação (Figura 11b). A redução da AACPD para o isolado BRM 16185 também foi significativamente menor nas plantas R2 (6,22%) quando comparada com o genitor Metica-1 (56,76%) (figura 12b). As porcentagens de redução da AACPD em relação a Cica 8 e Metica-1 foram 77,8% e 89,8%, respectivamente, comprovando que estas populações poderão ser exploradas para a resistência parcial. Araújo et al. (2002) também mostraram somaclones da cultivar Metica 1 com os dois tipos de resistência.



**Figura 11.** Severidade de brusone foliar em plantas R2 do cruzamento de Metica x Cica-8 e de seu genitor Cica-8 para as raça IB-45, avaliados em intervalos de 48 horas (A); Severidade de brusone foliar em plantas R2 do cruzamento de Metica x Cica-8 e de seu genitor Metica-1 para as raça IB-1 ( B ); \*Significativo pelo teste T,  $p=0,0$ .



**Figura 12.** (A) Comparação das médias dos somaclones (R2) e genitor (Cica-8) inoculados com a raça IB-45, para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD); (B) Comparação das médias dos somaclones (R2) e genitor (Metica-1) inoculados com a raça IB-1, para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) .

Cerca de 60 plantas R2 resistentes e 15 suscetíveis as raças IB 45 e IB 1 foram transplantadas para casa de vegetação em sulcos de plantio com espaçamento de 10 cm sem adubo químico, no dia 20 de maio de 2018, para avanço de geração. Assim, observou-se visualmente que a variação para tipo de planta, perfilhamento e tipo de grãos foram herdáveis (Figura 13). Devido as baixas temperaturas, foram colhidas 38 plantas resistentes e 6 suscetíveis. A progênie de cada planta R2 serão na geração R3 avaliadas em janeiro de 2019, no viveiro nacional de brusone da Embrapa Arroz e Feijão. As sementes das linhas resistentes serão colhidas e podem ser utilizadas como fontes de resistência à brusone foliar.



**Figura 13.** Plantas R2 transplantada para avanço de geração (A); Sementes R2 apresentando grão longo e fino ( B ) .

Os resultados promissores de soma clones foram devidos ao tamanho das populações R1 e R2, e também pelo uso de isolados obtidos de lavouras comerciais, que foram utilizados para seleção de variantes soma clones resistentes à brusone e que poderão ser explorados para outros caracteres agrônômicos.

## 5 CONCLUSÃO

1. A indução de calos e regeneração depende da subespécie utilizada
2. os genótipos da subespécie índica apresentam menor capacidade de resposta morfo genética, tanto para formação de calos, como para regeneração em plantas duplo haploides do que os genótipos da subespécie japônica ;
3. a técnica de cultura de anteras mostrou-se viável para produção de plantas.
4. Foram obtidos duplo haploides do cruzamento BRS Primavera x CNA 923;
5. No cruzamento Metica-1 x Cica-8 não houve regeneração de plantas;
6. O meio de cultura N6 modificado suplementado com 1 mg /ml de picloram, 1 mg/ml de ANA induziu mais calos a partir de anteras para o cruzamento BRS primavera. CNA923;
7. Cinquenta e uma plantas R1 regenerados por panículas imaturas apresentaram variabilidade para número de perfilho, numero panículas por planta e peso de 100 grãos;
8. As inoculações em casa de vegetação demonstraram que os somaclones R2 apresentaram reação de resistência para dois isolados diferenciadores de raças;
9. Os Duplo haploides e as plantas resistentes R2 foram transplantadas para avanço de geração para a seleção de genótipos superiores quanto à resistência à brusone e caracteres agrônômicos que poderão ser explorados no programa de melhoramento do arroz.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. New York: J. Wiley, 1960. 381p.

ARAÚJO, L.G., PRABHU, A.S; FREIRE, A.B. Variação somaclonal no cultivar de arroz IAC-47 para resistência à brusone. **Fitopatologia Brasileira**, v, 22, p.125-130. 1997.

ARAÚJO, L. G.; PRABHU, A. S.; FREIRE, A. B. Variation for rice blast resistance in early somaclonal generations derived from immature panicles. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 8, p. 1349-1359, ago. 1998.

ARAÚJO, L. G.; PRABHU, A. S.; FILLIPI, M. C. Inheritance of resistance to leaf blast in somaclones of rice cultivar Araguaia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 182-184, 1999.

ARAÚJO, L. G.; PRABHU, A. S.; FREIRE, A. B. Development of blast resistant somaclones of the upland rice cultivar Araguaia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 357-367, fev. 2000.

ARAÚJO, L. G.; PRABHU, A. S. Progresso da brusone nas folhas e características agronômicas nas gerações avançadas de somaclones aromáticos da cultivar de arroz IAC 47. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 606-613, 2001.

ARAÚJO, L. G.; PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; CHAVES, L. J. RAPD analysis of blast resistant somaclones from upland rice cultivar IAC 47 for genetic divergence. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 67, n. 2, p. 165-172, 2001a.

ARAÚJO, L. G.; PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; OLIVEIRA, W. F. Variantes somaclonais da cultivar de arroz Bluebelle resistentes à brusone. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 801-808, maio 2001b.

ARAÚJO, L.G.; PRABHU, A.S. Somaclones da cultivar de arroz aromático Basmati-370 resistentes à brusone. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1127-1135. 2002a.

ARAÚJO, L.G; PRABHU, A.S. Indução de variabilidade no cultivar de arroz Metica-1 para resistência a *Pyricularia grisea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Santo Antônio de Goiás, v.37, p. 12-1689, Mar.2002b.

ARAÚJO, L.G; PRABHU, A.S. Comportamento de somaclones de arroz derivados de híbridos da geração F1 para resistência à brusone. **Pesq. agropec. bras.** v.37, .5, 2002c.

ARAÚJO, L.G; PRABHU, A.S. Resistência parcial à brusone em somaclones do cultivar de arroz CICA-8. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília; v. 29, n. 4, jul. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582004000400006> >. Acesso em: 17 nov. 2016.

ARAÚJO, L. G.; PRABHU, A. S.; SILVA, G. B. da. Virulence pattern of *Pyricularia grisea* isolates from farmers' fields on newly released upland rice cultivars. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.30, n.6, p. 623-628, 2005.

ARAÚJO, L.G; PRABHU, A.S; PEREIRA, P.A.A; SILVA, G.B. Marker-assisted selection for the rice blast resistance gene Pi-ar in a backcross population. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, p. 23-21, 2010.

ASUYAMA, H. Morphology, taxonomy, host range, and life cycle of *pyricularia oryzae*. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **The rice blast disease**. Baltimore: Johns Hopkins, p. 9-22, 1965.

BAYLISS, M.W. The effects of growth in vitro on the chromosome complement of *Daucus carota* L. suspension cultures. **Chromosoma**, Heidelberg, v.51, p.401-411, June 1975.

BONATO, A.L.V. **Efeito da radiação gama (60Co) na cultura de anteras de arroz (*Oryza sativa* L.)**. 1994. 63p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BHOJWANI, S.S.; SOH, W.Y.; PANDE, H. Morphogenesis in haploid cell cultures. In: SOH, W.Y.; BHOJWANI, S.S. Morphogenesis in plant tissue cultures. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1999. Cap.3, p.70-104.

BOUHARMONT, J.; DEKEYSER, A.; SINT JAN, V.van; DOGBE, Y.S. Application of somaclonal variation and invitroselection to rice improvement. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE (Los Baños, Filipinas). Rice genetics II. Manila, p.271-277, 1991.

BRETTELL, R.I.S.; DENNIS, E.S.; SCOWCROFT, W.R.; PEACOCK, W.J. Molecular analysis of somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. **Molecular and General Genetics**, New York, v.202, p.235-239, Feb. 1986.

CAI, T., EJETA, G., AXTELL, J.D. & BUTLER, L.G. Somaclonal variation in high tannin sorghums. **Theoretical and Applied Genetics** 79:737-747. 1990.

CARVALHO, N.L.; BARCELLOS, A.L. Adoção do manejo integrado de pragas baseado na percepção e educação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET/UFMS**, v.5 n.5, p. 749 - 766, 2012.

CHAUHAN, R. S.; SINGH, B. M.; CHAHOTA, R. K.; DEVELASH, R. K. Generation of indica rice regenerants for resistance to leaf and neck blast. **Rice Biotechnology Quarterly**, West Lafayette, v. 26, p. 28-29, 1996.

CHEN, C.C.; TSAY, H.S.; HUANG, C.R. Factors affecting androgenesis in rice (*Oryza sativa* L.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v.14, p. 193-215, 1991.

CHENG-ZHANG, Z.; KANGE-LE, Z.; ZONG-XIU, S.; XIU-FANG, Q. Somaclonal variation and rice improvement. In: INTERNATIONAL RESEARCH INSTITUTE (London, Inglaterra). **Genetic manipulation in crops**. London : C. Tycooly, p.115-116, 1988.

CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y.; BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments of the nitrogen source. **Scientia Sinica**, v.18, p.659-668, 1975.

COCKING, E. C. The tissue culture revolution. In: WITHERS, L. A., ALDERSON, P. G. (Eds.). **Plant Tissue Culture and its Agriculture**. London: Butterworths, 1986. p. 3-20.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Boletim de grãos, janeiro de 2016. Acesso em: outubro de 2016.

CONAB, companhia nacional de abastecimento. Boletim do Departamento de pesquisas e estudos econômicos, março de 2017. Disponível em: [https://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset\\_arroz.pdf/](https://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_arroz.pdf/) acessado em > 25 de abril de 2017.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Boletim de grãos, janeiro de 2016. Acesso em: março de 2017.

DE MELO, T. A. Mecanismos de patogenicidade do fungo *Magnaporthe oryzae*, agente causal da brusone em trigo: crescimento e esporulação, pressão de turgor apressorial, enzimas celulolíticas e produção de metabólitos tóxicos. **Tese de Doutorado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2013.

DIAS NETO, J.J.; SANTOS, G.R. dos; CASTRO NETO, M.D. de; CUNHA, A.C.F.;IGNÁCIO, M. Influência do meio de cultura na esporulação de *Magnaporthe grisea* e da concentração de conídios na severidade da brusone do arroz. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 173-179, 2010.

DORNELES, L.T. **Regeneração de plantas através da cultura de anteras e panículas imaturas de arroz**. 1990. 72f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Pelotas.

DUVAL, C. M.; CALDAS, L. S.; RESENDE, R. de O. Aplicações da cultura de tecidos na fitopatologia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, p.4568, 1998.

EMBRAPA, Empresa brasileira de pesquisa agropecuária- **centro nacional de pesquisa de algodão**. Documentos: Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais, 2003.

EMBRAPA, Empresa brasileira de pesquisa agropecuária - embrapa. Boletim Socioeconômico, 2009.

EMBRAPA ARROZ E FEIJAO. **Dados conjunturais do arroz** (area, producao e rendimento). Brasil–1986 a 2010. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/apps/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 30 jul. 2012.

FANG, P.Y. Breeding new rice strains through anther culture. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer, 1991. p.216-229.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/index.html#download>. Acessado em: 27 setembro de 2016.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Situação mundial da alimentação**, 2014. Acessado em 15 Out 2016.

- FARUQUE, M.O. et al. Variations in green plant regeneration response from anthers of indica rice and their hybrids with japonica cv. Taipei 309. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.54, n.3, p.191-195, 1998.
- FERNANDEZ, J.; WILSON, R. Why No Feeding Frenzy? Mechanisms of Nutrient Acquisition and Utilization During Infection by the Rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 25, n. 10, p. 1286-1293, 2012.
- FILIPPI, M. C. C. ; SILVA, G. B. ; Silva-Lobo, VL ; CORTÊS, M. V. C. B. ; MORAES, Alessandra Jackeline Guedes de ; Prabhu, A S . Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control** (Print) , v. 14, p. 160-166, 2011.
- FILIPPI, M. C. C.; SILVA, G. B. ; PRABHU, ANNE SITARAMA . Indução de resistência à brusone em folhas de arroz por isolado avirulento de *Magnaporthe oryzae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 35, p. 387-392, 2007.
- FILIPPI, M. C.; CORTES, C.; BECKERMAN, J.; SWEIGARD, J.; VALENT, B.; GONZALEZ, C.; EBBOLE, D. **Novos aspectos da patogenicidade de *Magnaporthe grisea***. 1 ed. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2006, 36 p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.
- FILIPPI, M. C. C. ; PRABHU, ANNE SITARAMA ; LEVY, M. . Differential compatibility of *Pyricularia grisea* isolates to some Brazilian irrigated rice cultivars.. **Fitopatologia Brasileira** , Brasília, v. 24, n.03, p. 447-450, 1999.
- FILIPPI, M. C. C.; PRABHU, Anne Sitarama . Inheritance of blast resistance in rice to two *Pyricularia grisea* races IB-1 and IB-9.. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n.4, p. 599-644, 1996.
- FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186-194, 2012.
- FUKUI, K. Sequential occurrence of mutation in a growing rice callus. **Theoretical and Applied Genetics** 65:225- 230. 1983
- GERMANA, M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell Tiss Org**, v. 104, p. 283–300, 2011.
- HE, T.; YANG, Y.; TU, S.B.; YU, M.Q.; LI, X.F. Selection of interspecific hybrids for anther culture of indica rice. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.86, p.271–277, 2006.
- HEBERT, TT. The Perfect Estágio de *Pyricularia grisea* . **Fitopatologia**, St. Paul, V.61, p.83-87, 1971.
- HU, H. Use of haploids for crop improvement in China. **Genetic Manipulation Crops Newsletter**, Berlin, v.1, n.1, p.11-23, 1985.
- HUANG, H.S.; LING, T.H.; TSENG, P.L. et al. Studies on medium component in anther culture of *Oryza sativa* subsp. hsien by mathematical methods. **In: Plant Tissue Culture. Proceedings of the Beijing Symposium**. Pitman publishing: London, 1981. p.244-246.

ILLG, R.D. Variação somaclonal. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas/EMBRAPA, 1990. p. 287-295

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da produção Agrícola**: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Março, 2016.

IRRI - **The International Rice Research Institute**. Disponível em <http://irri.org/>. Acesso em: 15 de outubro de 2016.

JAHNE, A.; LORZ, H. Cereal microspore culture. **Plant Science**, n.109, p.1–12, 1995.

JAVED MA, ISHI T, KAMIJIMA O, MISOO S . 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 Biotechnol** 24:283–287., 2007.

JAVED M A, SAMAD A A, HIDAYAT T, WAGIRAN A, BAQR A R W. Studies to investigate the interactions of genotypes, culture media and culture temperatures on androgenesis in recalcitrant indica rice (*Oryza sativa* L.). **J Teknol**, 59(1): 75–79.2012.

KHAN, M. R.; ANWER, M. A. Fungal bioinoculants for plant disease management. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. **Microbes and microbial technology**. New York: Springer, p. 447-488 2011.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 452P, 2004.

KIMATI, H. Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª ed. Vol. 2. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 2005.

LANNES, S.D. **Genética da regeneração *in vitro* de anteras de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.)**. 42f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia - Fitomelhoramento), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2000.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation a novel source of variability from cellculture for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.60, p.197-214, Oct. 1981.

LENTINI, Z., MARTÍNEZ, C., ROCA, W. Cultivos de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. Cali: CIAT, 1997.

LENTINI, Z.; REYES, P.; MARTÍNÉZ, C.P.; ROCA, W.M. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. **Plant Science**, v.110, p. 127-138, 1995.

LENTINI, Z.; REYES, P.; MARTÍNEZ, C.; NÚÑEZ, V.; ROCA, W. Mejoramiento del arroz com cultivo de anteras: aplicaciones en el desarrollo de germoplasma adaptado a ecossistemas latinoamericanos y el Caribe. Cali: **Centro Internacional de Agricultura Tropical** (CIAT), p.79,1994.

LIANG, S.; HUANG, S. Huayu 15, a high-yielding rice variety bred by anther culture. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer, 1991. v.14, p.230-247

LYNCH, P.T.; FINCH, R.P.; DAVE, M.R.; COCKING, E.C. Rice tissue culture and its application. In: KHUSH, G.S.; TOENNIESSEN, G.H. (Eds.). **Rice Biotechnology**. Inglaterra: Commonwealth Agricultural Bureaux International (CABI), 1991. p.135-156..

MACIEL, J.L.N. *Magnaporthe oryzae*, the blast pathogen: current status and options for its control. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, Washington, n. 50, p. 17, 2011

MANTELL, S.H.; MATHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução a engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p.344. 1994.

MIAH, M.A.A.; EARLE, E.D.; KHUSH, G.S. Inheritance of callus formation ability in anther cultures of rice, *Oryza sativa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.70, n.2, p.113-116, 1985.

MILANI, M; CARVALHO, J.M.F.C. Utilização de Cultura de Anteras no Melhoramento de Plantas. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, 2005.

MIHALY, R; FONAD, P; PALAGYI, A; BONA, L; LANTOS, C; PAUK, J. Enhancement of a new method in cereal breeding programmes. **Review on Agriculture and Rural Development**, Hungary, vol. 3 (1) p. 2063-4803,2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Projeções do agronegócio**. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br/arq.../PROJECOES\\_DO\\_AGRONEGOCIO\\_2025\\_WEB.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq.../PROJECOES_DO_AGRONEGOCIO_2025_WEB.pdf)>. Acesso em: 13 out. 2016.

MINISTÉRIO DE SAUDE, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Acesso em: 20 de outubro de 2016.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. Obtenção de plantas haplóides através de cultura de anteras. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**, Brasília: Embrapa/ABCTP, p.311-332, 1999.

NIIZEKI, H.; OONO, K. Induction of haploid rice plant from anther culture.

NISHIMURA, M.; HAYASHI, N.; JWA, N.S. et al. Insertion of the line of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, Austin, v. 132, n. 4, p.374, 2006.

NOTTEGHEM, J. L. Cooperative experiment on horizontal resistance to rice blast. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE (Los Baños, Filipinas). **Blast and upland rice: report and recommendations from the meeting for international collaboration in upland rice improvement**. Los Baños, p. 43-51, 1981.

PETERS, J.A.; BOBROWSKI, V.L.; ROSINHA, G.M.S. Produção de haplóides e duplohaplóides. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, V2, p.569-612, 1999.

- PINHEIRO, T.M; ARAÚJO, L.G; LOBO, V.L.S; PRABHU, A.S; FILIPP, M.C. Tagging microsatellite marker to a blast resistance gene in the irrigated rice. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. Santo Antônio de Goiás; v. 12, n. 12, p. 164-170, mar. 2012.
- PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. C. Brusone em arroz: **controle genético, progresso e perspectivas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 2006.
- PRABHU, A. S; FILIPPI, M. C. Arroz (*Oryza sativa* L.): controle de doenças. In: VALE, F.X. R. do; ZAMBOLIM, L. (Ed.). Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, . v. 1, p. 51-81 1997.
- PRABHU, A.S., FILIPPI, M.C., ARAUJO, L.G. & FARIA, J.C. Caracterização genética e fenotípica de isolados de *Pyricularia grisea* coletados em lavouras das cultivares Epagri 108 e 109 no Estado de Tocantins. **Fitopatologia Brasileira**, V. 27, p. 566-573. 2002.
- PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. Graus de resistência a brusone e produtividade de cultivares melhoradas de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 36, n. 12, p. 1453-1459, 2001.
- RAINA, S.K. Doubled haploid breeding in cereals. **Plant Breeding**, v.16, p.141–186, 1997.
- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. Lavras: Ed. UFLA, 2008. 464 p.
- REZENDE, J.A.M.; MARTINS, M.C. Doenças do mamoeiro. In: KIMATI, H., AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed). **Manual de Fitopatologia**. Doença das plantas cultivadas. São Paulo: v. 2, p. 435-443. 2005.
- ROSA, L.R; SENA, M.R; SHIOMI, H.F. Tecnologia de duplo haploide na determinação da herança da resistência à podridão de colmo (*Fusarium verticillioides*) em linhagens de milho **Summa Phytopathol**. Botucatu, v. 42, n. 1, p. 59-66, 2016.
- SANT'ANA, E.P; FREIRE, A.B; DIAS, M.B. VARIAÇÃO SOMACLONAL EM ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DOGRÃO E DO CICLO DA PLANTA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.25, n.2, p.336-345., 2001
- SANTOS, E.K; ZANETTINI-BODANESE, M.H. androgenesis: na alternative route in the pollen development. **Ciência Rural**, vol.32,n.1, Santa Maria, 2002.
- SILVA, T.D. Indica rice anther culture: can the impasse be surpassed? **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.100, p.1–11, 2010.
- SILVA, M. C. C de F. **Estudo da herança da resistência do arroz (*Oryza sativa*) a *Pyricularia grisea***. 1993. 74 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1993.
- SNAPE, J.W. Doubled haploid breeding: theoretical basis and its practical applications. In. SNAPE, J.W. **Review of advances in plant biotechnology**, 1985-. Manilla: IRRI, 1989. p. 19-30, 1988.
- SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J.; JENKINS, J.B. **Principles of genetics**. New York: John Wiley, 1997. 829 p.1997.

SOUZA CC, OLIVEIRA FA, SILVA IF, NETO, MAS. Avaliação de métodos de determinação de água disponível em solo cultivado com algodão. *Pesquisa agropecuária brasileira*. v.37, p. 337-341, Brasília, 2002.

SUNDERLAND, N. Strategies in the improvement of yields in anther culture. In: **Proceedings of a Symposium on Plant Tissue Culture**. Beijing: Science Press, 1978. p.65-86.

Torp AM, Andersen SB . Albinism in microspore culture. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM (eds) *Advances in haploid production in higher plants*. Springer, The Netherlands, pp 155– 160, 2009.

TSAY, H.S.; CHEN, L.J. The effects of cold shock and liquid medium on callus formation in rice anther culture. **Agricultural Research**, v.33, p.24-29, 1984.

USDA. Departamento de agricultura do Estados Unidos. Acesso em 20 de outubro de 2016.

VEERARAGHAVAN, R. A study on the comparison of anther culture response in different varieties of rice, *Oryza sativa* subspecies indica. MSc thesis, University of Colombo, 2007.

WANG Z, TARAMINO G, YANG D, LIU G, TINGEY SV, MIAO GH AND LG LG. Rice ESTs with either disease resistance gene or the defense-response gene sequences mapped to regions that contain major resistance genes or QTLs. **Mol Genet Genom**, v.265, p. 303-310, 2001.

WANG, G.L.; MACKILL, D.J.; BONMAN, J.M. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. **Genetics, Chapel Hill**, v.136, p.1421-1434, 1994.

XIE, Q.J.; RUSH, M.C.; CAO, J. Somaclonal variation for disease resistance in rice (*Oryza sativa* L.). In: GRAYSON, B.T.; GREEN, M.†B.; COPPING, L.G. (Ed.). *Pest management on rice*. London : Elsevier Applied Science, 1990. p.491-509.

ZAPATA-ARIAS, F.J. **Laboratory protocol for anther culture techniques in rice**. In: MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K.J.; FOSTER, B.P.; SZAREJKO, I. (Eds.). *Doubled haploid production in crop plants, a manual*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. P.109-116

ZHANG, H.; WU, Z.; WANG, C.; LI, Y.; XU, J. Germination and infectivity of microconidia in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Nature communications**, London, v.5, n.4518, p.1-9, 2014.

ZEIGLER, RS; LEONG, SA; TEENG, PS *Rice Blast Disease* ; CAB International: Wallingford, Reino Unido; **Instituto Internacional de Pesquisa do Arroz**: Los Banos, Filipinas, pp. 1-626. 1994.

