

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Dissertação

**Otimização de protocolo para produção de plantas duplo-haploides
através da cultura de micrósporos isolados de trigo**

Francieli Fatima Cima

Pelotas, 2014

Francieli Fatima Cima

**Otimização de protocolo para produção de plantas duplo-haploides
através da cultura de micrósporos isolados de trigo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientador: Ph.D. Antonio Costa de Oliveira – FAEM/UFPel

Coorientadora: Dra. Sandra Maria Mansur Scagliusi – EMBRAPA TRIGO

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C573o Cima, Francieli Fatima

Otimização de protocolo para produção de plantas duplo-haploides através da cultura de micrósporos isolados de trigo / Francieli Fatima Cima ; Antonio Costa de Oliveira, orientador ; Sandra Maria Mansur Scagliusi, coorientadora. — Pelotas, 2014.

81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Trigo. 2. Cultura de micrósporos isolados. 3. Albinismo. 4. Duplo-haploides. I. Oliveira, Antonio Costa de, orient. II. Scagliusi, Sandra Maria Mansur, coorient. III. Título.

CDD : 633.11

Banca Examinadora:

Ph.D. Antonio Costa de Oliveira – FAEM/UFPeI (Presidente)

Dr. José Antonio Peters - Departamento de Botânica/UFPeI

Dr. Paulo Celso de Mello Farias – Departamento de Fitotecnia/UFPeI

Aos meus pais Irimar e Marli, meu irmão Edimar.

Sem vocês este sonho não seria possível.

Obrigada por me apoiarem nesta trajetória.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

A Deus, por abençoar e guiar minha trajetória, efetivando minhas conquistas.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitomelhoramento.

Ao Prof. Antonio Costa de Oliveira pela orientação, ensinamentos concedidos e principalmente pela oportunidade de realizar este mestrado.

À minha coorientadora Dra. Sandra Maria Mansur Scagliusi, pela valiosa coorientação, pela disponibilidade, pelo entusiasmo contagiante e pelas ideias e sugestões sempre oportunas.

Ao pesquisador Ricardo Lima de Castro pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos colegas do Centro de Genômica e Fitomelhoramento/FAEM/UFPel, pela companhia, aprendizado e amizade.

Não poderia esquecer de agradecer à minha amiga e “mãe adotiva”, Tatiane Souza, pelas infinitas conversas tanto por telefone quanto pessoalmente, desabafos, trocas de ideias. Enfim, agradeço pela grande amizade.

A minha amiga Patricia, por toda a amizade e momentos compartilhados.

Aos colegas de laboratório de Cultura de Tecidos (Embrapa Trigo), Marina, Andréa, Liane, Cristian, Willian, Eduardo, Ernandes, Gabriel e Jordalan, pelo companheirismo, ajuda e pelos momentos de descontração e amizade.

Aos meus pais, Irimar e Marli, que não mediram esforços para minha educação, permitindo que eu chegasse até aqui. Ao meu irmão Edimar pelas risadas, carinho e respeito. Muito obrigada por tudo o que fizeram até hoje por mim!

A toda a minha família, obrigada pelo amor, pelas orações, pensamento positivo e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu namorado, José Luis por todo amor, amizade, carinho, companheirismo e apoio incondicionais.

O meu muito obrigada!

Resumo

CIMA, FRANCIELI FATIMA. **Otimização de protocolo para produção de plantas duplo-haploides através da cultura de micrósporos isolados de trigo.** 2014. 81f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

No Brasil, a cultura do trigo ocupa lugar de destaque nos sistemas de produção da Região Sul, representando uma opção muito importante como um cereal de inverno. O melhoramento genético das culturas autógamas tem contado com vários métodos para produzir cultivares mais recentes e superiores com características melhoradas. Um exemplo muito bem sucedido tem sido o método de produção de plantas duplo-haploides usado para acelerar o desenvolvimento de uma nova cultivar. Em trigo, a cultura de micrósporos isolados tem sido usada para a obtenção de plantas duplo-haploides. No entanto, esta técnica tem sido caracterizada como altamente genótipo-dependente e de produzir altas taxas de plantas albinas. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar um protocolo através da cultura *in vitro* de micrósporos isolados utilizando-se genótipo de trigo com alta produção de plantas albinas. Para este estudo, plantas F₁ oriundas do cruzamento de trigo entre Toropi x BRS 194 foram usadas como doadoras de micrósporos. Foram realizados três experimentos. No primeiro experimento, anteras foram removidas das espiguetas e tratadas em três soluções de pré-tratamentos à 4°C: a) manitol (62 g L⁻¹) + 15 µM de sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O); b) manitol (62 g L⁻¹) e c) 15 µM de sulfato de cobre. No segundo experimento, foram testadas as mesmas soluções de pré-tratamento do experimento anterior, com a diferença de que neste experimento, espiguetas inteiras foram usadas para o pré-tratamento. No terceiro experimento, somente o pré-tratamento a frio foi aplicado nas espigas e houve uma modificação no meio de indução, quando foram testados nove tratamentos: controle (meio de indução padrão); sulfato de cobre (2,0 µM); prolina (10 mM); glutatona (2,0 µM); cefotaxima (100 mg L⁻¹); sulfato de cobre (4,0 µM); sulfato de cobre (2,0 µM) + prolina (10 mM); sulfato de cobre (2,0 µM) + glutatona (2,0 µM); sulfato de cobre (2,0 µM) + cefotaxima (100 mg L⁻¹). Os resultados obtidos nos experimentos 1 e 2 mostrou que a solução de pré-tratamento contendo 15 µM de sulfato de cobre foi mais eficiente para desencadear a embriogênese dos micrósporos e regenerar plantas verdes em trigo. No terceiro experimento, o meio de indução suplementado com 100 mg L⁻¹ de cefotaxima mostrou um aumento na formação de embriões e também na regeneração de plantas verdes.

Palavras-chave: trigo, cultura de micrósporos isolados, albinismo, duplo-haploides.

Abstract

CIMA, FRANCIELI FATIMA. **Protocol optimization for production of doubled haploid plants through the isolated microspore culture of wheat.** 2014. 81f. Dissertation – Graduate Program in Agronomy. Federal University of Pelotas, Pelotas.

In Brazil, the wheat crop occupies an outstanding place in the production systems of the Southern Region, representing a very important option as a winter cereal. Genetic improvement of self-fertilizing crops has relied on several methods to produce newer and superior cultivars with enhanced traits. A very successful example has been the use as double haploids as a method to accelerate the development of a new cultivar. In wheat, isolated microspore culture has been used to obtain doubled haploid plants. However, this technique has been characterized as highly genotype dependent and producing high rates of albino plants. Thus, the objective of this work was to optimize a protocol through the *in vitro* culture of isolated microspores utilizing a wheat genotype with high production of albino plants. For this study, F₁ plants originated from the wheat cross between Toropi x BRS 194 were used as microspore donor plants. Three experiments were carried out. In the first experiment, anthers were treated in three pre-treatment solutions, at 4°C: a) mannitol (62 g L⁻¹) + 15 µM copper sulphate (CuSO₄.5H₂O); b) mannitol (62 g L⁻¹) and c) 15 µM copper sulphate. In the second experiment, the same pre-treatment solutions of the previous experiment were tested, with the difference that in this experiment, whole spikelets were used for the pre-treatment. In the third experiment, only cold pre-treatment was applied to the spikes, and there was a modification in the induction medium, when nine treatments were tested: control (standard induction medium); copper sulphate (2,0 µM); proline (10 mM); glutathione (2,0 µM); cefotaxime (100 mg L⁻¹); copper sulphate (4,0 µM); copper sulphate (2,0 µM) + proline (10 mM); copper sulphate (2,0 µM) + glutathione (2,0 µM); copper sulphate (2,0 µM) + cefotaxime (100 mg L⁻¹). Results obtained in experiments 1 and 2 showed that the pre-treatment solution containing 15 µM of copper sulphate was more efficient to trigger the embryogenesis of microspores and regenerate green plants in wheat. In the third experiment, the induction medium, supplemented with 100 mg L⁻¹ of cefotaxime showed an increase in the formation of embryos and also in the regeneration of green plants.

Key words: wheat, isolated microspore culture, albinism, doubled haploid.

Lista de Figuras

- Figura 1 – Representação esquemática da evolução do trigo hexaploide (*Triticum aestivum*).....17
- Figura 2 – Segregação de genótipos e fenótipos em populações F₂ e duplo-haploides de uma planta heterozigota para os genes de recombinação independente.....22
- Figura 3 – Diagrama de uma antera mostrando o desenvolvimento dos grãos de pólen..27
- Figura 4 – Estádios morfológico e citológico da célula de micrósporo de trigo apropriada para o cultivo *in vitro*. A) Estádio morfológico observado quando as células de micrósporos se encontram na fase uninucleada (distância entre a lígula da folha bandeira e folha anterior). B) Estádio citológico ótimo da cultura (estádio uninucleado tardio). Barra representa 20 µm.40
- Figura 5 – Anteras parcialmente trituradas obtidas no experimento 1 (após processo de trituração)42
- Figura 6 – A) Tubo Falcon de 15 mL contendo solução de maltose 20% na parte inferior e na parte superior uma camada de células diluídas em meio NPB-99. B) Banda de micrósporos formada na interface NPB-99/maltose. C) Campo de contagem de micrósporos - hemocitômetro..43
- Figura 7 – A) Visualização dos embriões em microscópio óptico. B) Embriões formados do cruzamento entre Toropi x BRS 194, no meio de indução contendo cefotaxima (100 mg L⁻¹).....45
- Figura 8 – Planta verde regenerada através da cultura de micrósporos isolados de trigo..45

Figura 9 – A) Plantas expostas ao ambiente da câmara de crescimento. B) Plantas oriundas da cultura de micrósporos isolados após antese.....	46
Figura 10 – Micrósporos uninucleados resultantes de um eficiente processo de purificação das células, livres de detritos e restos celulares. Barra equivale a 50 µm.....	52
Figura 11 – Micrósporos embriogênicos incapazes de romper a exina (indicados pela seta)	53
Figura 12 – Regeneração de plantas albinas em trigo	56
Figura 13 – Células sem resposta após 60 dias de cultivo..	57

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Esquema diferenciando os três ensaios.....	38
Tabela 2 – Composição dos meios de cultura utilizados para extração e indução dos embriões - NPB-99 (KONZAK et al., 1999); germinação de embriões em monocotiledôneas – GEM (EUDES et al., 2003) e enraizamento – ROOTING (EUDES et al., 2003).	48
Tabela 3 – Número de células de micrósporos de trigo inoculadas em meio de indução.....	51
Tabela 4 – Efeito de diferentes pré-tratamentos em anteras/espiguetas na resposta da cultura de micrósporos isolados do cruzamento entre Toropi x BRS 194.	53
Tabela 5 – Resumo da análise de variância para as variáveis número de embriões, número de plantas verdes e albinas estudados nos diferentes tratamentos em micrósporos de trigo.	58
Tabela 6 – Resposta da cultura de micrósporos isolados de trigo em resposta aos tratamentos testados no meio de indução.....	59

Lista de Abreviaturas e Siglas

Ácido Fenil Acético – PAA

Ácido 2,4 – diclorofenoxiacético – 2,4-D

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB

Espécies reativas de oxigênio – EROS

Germinação de embriões em monocotiledôneas – GEM

Resistência de planta adulta – RPA

Universidade Federal de Pelotas – UFPel

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Trigo: origem e evolução.....	16
1.1.1. Importância social e econômica.....	18
1.1.2. Melhoramento genético de trigo	19
1.2. Importância de duplo-haploides no melhoramento	20
1.3. A potencialidade da androgênese e ginogênese	23
1.4. Cultura de micrósporos isolados	24
1.4.1. Desenvolvimento do micrósporo e do grão de pólen.....	25
1.4.1.1. Rotas alternativas do micrósporo.....	27
1.4.2. Fatores que influenciam o cultivo de micrósporos.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4. CONCLUSÕES.....	62
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
6. APÊNDICES.....	75
7. ANEXOS.....	81

1. INTRODUÇÃO

A evolução do melhoramento genético vegetal através do aprimoramento dos métodos inicialmente utilizados trouxe grandes benefícios às culturas agrícolas, promovendo um aumento da produtividade e, principalmente, um incremento da qualidade do produto final. Mesmo assim, ainda existem grandes desafios para que excelentes patamares sejam atingidos, sendo que os mesmos são possíveis de serem alcançados. Para que isso ocorra, é necessária a participação das várias áreas de conhecimento que fazem parte do melhoramento genético como um todo. Dentre as diversas áreas, a biotecnologia entra como uma ferramenta fundamental para acelerar e concretizar o sucesso dos programas de melhoramento genético vegetal, contribuindo para um programa efetivamente competitivo.

A cultura de tecidos vegetais, utilizando distintos processos de manipulação *in vitro*, tem sido empregada em diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. A contribuição desta área de estudo se aplica a inúmeras espécies vegetais e utilizando-se de diferentes abordagens, tais como: multiplicação de espécies de difícil propagação, limpeza clonal, microenxertia, produção de plantas haploides, e contribui de forma imprescindível, nos processos de obtenção de plantas geneticamente modificadas. No caso do melhoramento genético de culturas anuais (alógamas ou autógamias), utilizar de técnicas que permitam acelerar o desenvolvimento da formação de uma nova cultivar (tempo em média variando de 10 -12 anos, dependendo da espécie) merece destaque. Neste contexto, a produção de plantas haploides (haploidização), se sobressai como uma importante etapa no estabelecimento de programas de melhoramento genético vegetal, auxiliando na diminuição do tempo de obtenção de uma nova cultivar (TOURAEV et al., 2001). Dentre os diferentes métodos de produção de plantas haploides, a androgênese e a ginogênese se destacam por serem os mais comumente utilizados em cereais. Ambos os métodos se baseiam no fenômeno da totipotência, onde células originalmente gaméticas dão origem a novas plantas sem ocorrer o processo de fecundação. As plantas obtidas, originadas de um gameta haploide (n), possuem a metade do número de cromossomos da espécie. Por possuírem apenas a metade do genoma da espécie, estas plantas são totalmente estéreis, inviabilizando o uso destas nos programas de melhoramento. Para que possam ser utilizadas, o nível de ploidia destas plantas precisa ser restaurado, havendo a necessidade de ocorrer a

duplicação dos cromossomos. Finalizada esta etapa, a planta obtida volta ao seu nível de ploidia original ($2n$), recebendo a designação de “duplo-haploide” (MORAES-FERNANDES, 1990). As plantas obtidas via haploidização terão em seu genoma todos os alelos recebidos dos pais em completa homozigose, facilitando o processo de seleção de genótipos com características superiores. Em cereais, tanto os métodos via ginogênese como a androgênese tem sido aplicados nos programas de melhoramento genético (PALMER; KELLER, 2005). A androgênese se baseia no cultivo de células gaméticas masculinas, utilizando-se das anteras e/ou das próprias células purificadas (grãos de pólen jovens). A ginogênese por sua vez se baseia no cultivo de células gaméticas femininas, e implica, na maioria das vezes, em uma hibridização artificial entre espécies ou gêneros diferentes. Ambos os métodos possuem vantagens e desvantagens, cabendo ao investigador identificar o método que melhor se aplica ao objetivo proposto.

De uma maneira geral, a ginogênese, quando aplicada em cereais, se caracteriza por ser um método de alta aceitação, já que funciona para uma ampla gama de genótipos (não é genótipo-dependente). No entanto, as inúmeras etapas que compreendem a técnica (emasculação, manutenção de plantas doadoras de pólen, polinização, aplicação de reguladores de crescimento para promover a fecundação, resgate *in vitro* do embrião haploide e aplicação de substâncias indutoras da duplicação cromossômica) acabam se tornando impeditivas na execução do método (FORSTER et al., 2007). Já a androgênese se diferencia pela facilidade na sua execução (seja via cultura de anteras ou de micrósporos purificados). No entanto, este método tem-se caracterizado como altamente genótipo-dependente e de apresentar altas taxas de produção de plantas albinas (LI; DEVAUX, 2001). Por essa razão, muitos trabalhos têm sido relatados na tentativa de se minimizar a produção de plantas albinas e que a técnica funcione para um grande grupo de genótipos. Embora a produção de plantas albinas seja largamente determinada por causas genéticas, outros fatores tais como: temperatura de crescimento das plantas doadoras, intensidade luminosa, tipos de pré-tratamento dado às espigas doadoras e composição dos meios de cultura podem também afetar a produção de plantas albinas (FORSTER et al., 2007; TORP; ANDERSEN, 2009; DUNWELL, 2010). Assim, o objetivo do presente trabalho foi otimizar o processo de obtenção de plantas duplo-haploides em trigo, através da cultura *in vitro* de micrósporos isolados, utilizando-se genótipo de trigo com alta taxa de produção de

plantas albinas. Como controle, foi utilizado o genótipo de trigo Pavon 76, reconhecido como altamente responsivo à androgênese (ZHENG et al., 2002).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Trigo: origem e evolução

Os estudos sobre a origem e a evolução dos genomas do trigo cultivado desenvolveram-se desde o início do século XX (MACKEY, 1975; FELDMAN, 1977). No entanto, os registros de sua domesticação datam desde as lavouras primitivas do Sudeste da Ásia entre os anos de 7000 a 9000 a.C, sendo posteriormente introduzido na Índia, na China e na Europa desde 5.000 anos a.C. (BRAMMER, 2000). Originário da região do Oriente Médio, o trigo pertence à família *Poaceae* obtida do cruzamento de outras plantas silvestres que existiam nas proximidades dos rios Tigre e Eufrates e foi uma das primeiras espécies a serem cultivadas (MORAES-FERNANDES et al., 2000).

Nas espécies do gênero *Triticum*, cada genoma contém um número básico de sete cromossomos, incluindo espécies com diferentes níveis de ploidia. Assim, têm-se espécies diploides ($2n=2x=14$, genoma AA), tetraploides ($2n=4x=28$, genomas AABB) e hexaploides ($2n=6x=42$, genomas AABBDD) (MACKEY, 1975).

O trigo cultivado (*Triticum aestivum* L.) é uma espécie autógama, hexaploide, originada de hibridizações interespecíficas naturais que geraram novas combinações de genes e características, permitindo que este se adequasse ao cultivo e ao processamento. A espécie é constituída de três genomas distintos: AA, BB e DD, sendo originado a partir de dois eventos de hibridização seguidos de duplicação cromossômica (Figura 1). Uma primeira hibridização entre *T. urartu* (doador do genoma A) e *Aegilops speltoides* (doador do genoma B), produziu o trigo tetraploide *T. turgidum* (AABB) (FELDMAN et al., 1995; DONG et al., 2012). A segunda hibridização envolveu uma forma cultivada de *T. turgidum* e a espécie silvestre *Ae. tauschii* (DD), para formar o *T. aestivum* (AABBDD) (FELDMAN et al., 1995; NEVO et al., 2003). Esta característica poliploide do trigo cultivado contribuiu diretamente para o tamanho do genoma da espécie, chegando a aproximadamente 17.000 Mbp, tamanho 40 vezes maior que o genoma do arroz (PAUX et al., 2006). Ao longo dos anos, durante sua constante evolução e graças aos consagrados programas de melhoramento genético da cultura, a planta de trigo sofreu inúmeras mudanças, sendo a mais significativa de todas elas, a drástica redução na altura da planta, graças à introdução de um único gene. Com esta característica foi possível produzir

cultivares de trigo de baixa estatura, mais resistentes ao acamamento e com maior potencial de rendimento, sendo a base da revolução verde, ocorrida entre as décadas de 1960 e 1970 (HEDDEN, 2003). Com o passar dos anos, o trigo hexaploide se tornou um dos principais cereais mais plantados em todo mundo, fornecendo cerca de 20% do total de proteínas necessárias à alimentação humana (DONG et al., 2012). Com a completa domesticação da espécie, algumas características herdadas dos seus “ancestrais selvagens” foram perdidas, levando à uma “especialização” do trigo hexaploide, explorando cada vez mais sua capacidade de panificação e de processamento. No entanto, mais recentemente, os programas de melhoramento genético de trigo têm procurado devolver a diversidade genética da espécie introduzindo de maneira mais controlada, genes de seus ancestrais selvagens, objetivando incorporar ao trigo de hoje, mecanismos de resistência e ou tolerância a vários tipos de estresse (bióticos e abióticos) que acometem a cultura.

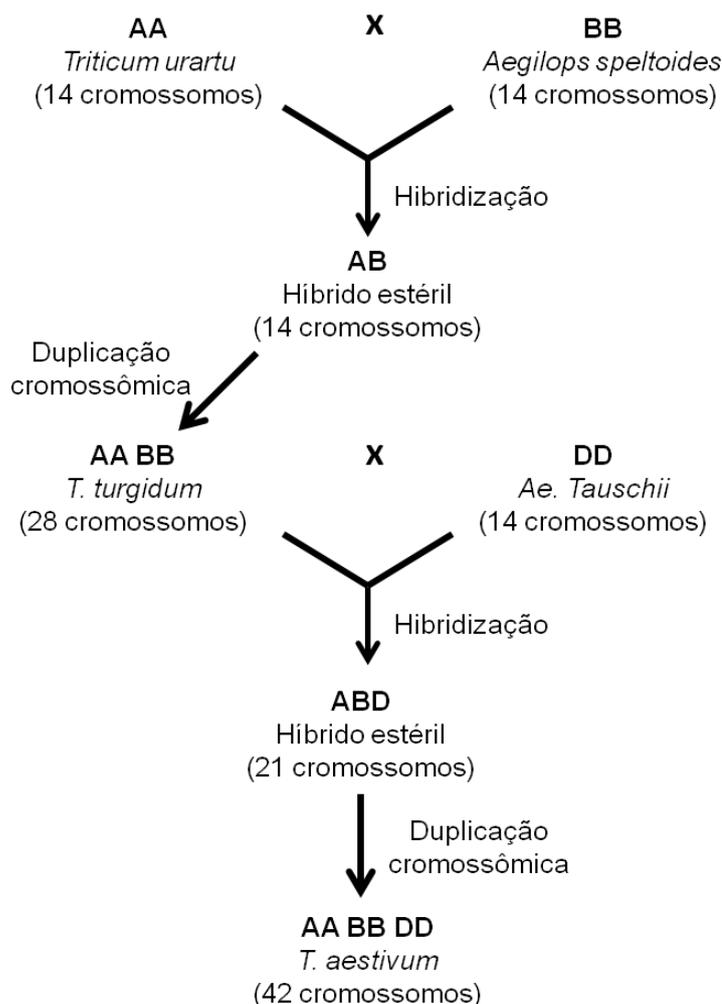


Figura 1 – Representação esquemática da evolução do trigo hexaploide (*Triticum aestivum*).

1.1.1. Importância social e econômica

No Brasil, o trigo ocupa destaque nos sistemas de produção da região Sul, sendo o cereal de inverno de maior importância, cultivado principalmente nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A produção de trigo brasileira oscila entre cinco e seis milhões de toneladas ano⁻¹, enquanto o consumo tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas. A área plantada de trigo na safra 2013/14 apresenta um incremento de 15,7% em relação à ocorrida no exercício anterior atingindo 2.193,9 mil hectares, contra 1.895,4 mil hectares na safra 2012/13, segundo levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Com relação à produção de trigo nacional, houve um incremento de 24,9% em relação à safra passada, alcançando 5.470,9 mil toneladas, fruto do aumento de 15,7% da área plantada e 7,9% da produtividade (CONAB, 2014). A maior concentração da produção está na região Sul, responsável por 5.200,7 mil toneladas da safra nacional, pois é a mais apta para o desenvolvimento desta cultura, devido a condições de solo e clima (CONAB, 2014).

Avanços importantes na genética, como a criação de novas cultivares com maior resistência/tolerância a estresses bióticos e abióticos, qualidade industrial para atender às demandas da indústria e melhor arquitetura de planta auxiliaram no incremento do potencial produtivo deste cereal nas lavouras no Brasil durante as últimas décadas. Apesar dos esforços das instituições brasileiras de pesquisa de trigo visando aumentar a produtividade, grande parte do consumo interno não é suprido pela produção da triticultura brasileira. O balanço entre a oferta e a demanda deste cereal no Brasil é desfavorável, implicando na importação massiva e em um alto grau de dependência do país pelo trigo importado. Para o período 2013/14, prevê-se a importação da ordem de 6,5 milhões de toneladas, 510 mil toneladas a menos que o volume do ano anterior (CONAB, 2014).

A cadeia produtiva do trigo desempenha papel fundamental para a economia e a sociedade brasileira, pois representa parte importante do consumo de alimentos. O motivo do seu prestígio entre os cereais destinados à alimentação humana é o seu extraordinário poder de panificação. Esse poder advém, essencialmente, da presença, na composição do grão, de certas proteínas que formam o glúten, substância que confere ao pão uma estrutura leve e estável (LEÃO et al., 1972), sendo o preferido entre os cereais para panificação.

1.1.2. Melhoramento genético de trigo

A história do trigo no Brasil teve início no século XVI, com a colonização do país. Inicialmente o trigo foi introduzido em 1534 na Capitania de São Vicente, estado de São Paulo por Martim Afonso de Souza, de onde se expandiu por todo o país, com a colonização (LAGOS, 1983).

As atividades relacionadas ao melhoramento genético de trigo no Brasil iniciaram em 1919, com a implantação das primeiras estações experimentais. A primeira foi a estação experimental Alfredo Chaves no Rio Grande do Sul e na mesma época no Paraná foi criada a estação de Ponta Grossa. Em 1974, essas atividades consolidaram-se com a criação do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, da Embrapa, em Passo Fundo (SCHEEREN et al., 2011).

A pesquisa vem exercendo um papel de destaque para o desenvolvimento da triticultura no país, que ao longo dos anos tem passado por inúmeras mudanças e alcançado muitos avanços tecnológicos e científicos importantes, mesmo o trigo não sendo uma espécie nativa do Brasil (LAGOS, 1983).

Nesse contexto, o melhoramento vegetal tem sido uma importante estratégia para o aumento da produtividade de maneira sustentável, visando o aumento dos rendimentos, a expansão do potencial agrícola, a estabilidade da produção e o aumento da resistência a fatores bióticos ou abióticos.

O melhoramento genético vem sendo auxiliado por modernas técnicas de biotecnologia vegetal, compreendendo as áreas de biologia celular da cultura de tecidos e células e da biologia molecular (FERREIRA et al., 1998). Entre as ferramentas biotecnológicas existentes, a cultura de tecidos é umas das que mais tem obtido resultados práticos e de impacto para o melhoramento vegetal. A exemplo de uso da técnica de cultura de tecidos aplicada ao melhoramento genético pode-se citar a obtenção da cultivar de trigo BR-43, a primeira variedade de trigo das Américas e quarta em nível mundial, desenvolvida através da haploidização via cultura de anteras *in vitro* (MORAES-FERNANDES et al., 2002). Contudo, essas técnicas não são empregadas isoladamente nos programas de melhoramento vegetal, mas associadas com os métodos descritos como clássicos, sendo sua contribuição de maior ou menor importância, no qual irá depender do objetivo do pesquisador.

1.2. Importância de duplo-haploides no melhoramento

O desenvolvimento de uma nova cultivar com características superiores envolve o conhecimento de diversas áreas da ciência e se caracteriza por ser uma atividade bastante onerosa, já que envolve inúmeras e sucessivas etapas de avaliação e seleção fenotípica. A eficiência e o sucesso de um programa de melhoramento genético vegetal está associado à inúmeros fatores, mas tem como base principal a variabilidade genética, extremamente necessária para a evolução da espécie. Assim, a partir de um “pool” gênico presente na população de estudo, selecionam-se linhagens específicas que vão ser combinadas e novamente selecionadas. No entanto, a criação e o estabelecimento de uma nova variedade requer estabilidade genômica. Ao se alcançar o perfil agrônômico desejado para a futura cultivar, é necessário, no entanto haver a fixação dos genes presentes neste indivíduo, processo este bastante demorado e oneroso. O número de indivíduos (tamanho da população) e tempo necessários para avaliar e selecionar características tão complexas que irão fazer parte da futura cultivar são muito grandes, envolvendo várias etapas e de alto custo. Assim, reduzir o tempo necessário para produção de uma nova variedade significa diminuição nos custos e antecipação dos lucros. A obtenção de linhagens homozigotas, tão necessárias para estudos genéticos e para geração de novas cultivares alcançadas pelo processo de haploidização, faz deste método uma interessante ferramenta para o melhoramento genético vegetal (SANTOS; ZANETTINI, 2002).

As plantas haploides por terem somente metade do seu genoma, são estéreis e a duplicação do seu número cromossômico de forma espontânea ou induzida pela aplicação de agentes antimitóticos se faz necessária para recuperar a condição diploide e restaurar a fertilidade. A planta submetida ao tratamento com estes produtos será totalmente homozigota, uma vez que cada cromossomo foi fielmente duplicado, sendo então chamada de planta duplo-haploide (MORAES-FERNANDES, 1990).

No sistema convencional de melhoramento de plantas autógamas, são necessários de sete a oito ciclos de autofecundação para estabilizar o genótipo pela fixação de genes em homozigose. Além de ser um processo demorado e trabalhoso, a eficiência da seleção nas primeiras gerações de autofecundação é muito baixa, devida principalmente à ocorrência de alelos dominantes em heterozigose. A técnica

de haploidização pode acelerar este processo, permitindo a obtenção de plantas completamente homozigotas em uma única geração, diminuindo o tempo necessário na obtenção de linhagens homozigotas, o que representa para os programas de melhoramento uma economia não só em relação ao tempo como também quanto aos custos de produção de novas linhagens (MORAES-FERNANDES, 1990).

A seleção de indivíduos em uma população F_2 é mais efetiva quando os alelos desejáveis são dominantes. No entanto, quando se trata de alelos recessivos somente se pode detectar em uma proporção de $(1/4)^n$. Em uma população de duplo-haploides, os genótipos recessivos tem uma frequência maior, isto é, $(1/2)^n$, e isso facilita a seleção de genes recessivos desejáveis, já que não são mascarados por genes dominantes (MORAES-FERNANDES et al., 1999). Por exemplo, em um processo normal de autofecundação, quando as cultivares genitoras diferem, por dois pares de genes (AAbb) e (aaBB), o genótipo recessivo aabb tem a probabilidade de ser encontrado na proporção de $1/16$ na população F_2 . Entretanto, se for usada a haploidia, o mesmo genótipo terá a probabilidade de ocorrência de $1/4$ na população (Figura 2), diminuindo o número de indivíduos necessários para que esta característica seja observada numa população. Isso ocorre devido à ausência dos heterozigotos, prevalecendo apenas quatro genótipos homozigotos (AABB, AAbb, aaBB e aabb) (MORAES-FERNANDES, 1990).

Ao eliminar os indivíduos heterozigotos, a produção de duplo-haploides traz outra vantagem, que é a de ampliar a eficiência de seleção, tanto para caracteres qualitativos como quantitativos, facilitando, portanto, a identificação de genótipos com características superiores (MORAES-FERNANDES, 1990; SANTOS; ZANETTINI, 2002).

Cultivares comerciais desenvolvidas através de protocolos de duplo-haploides foram relatadas para muitas culturas, como o trigo (*Triticum aestivum* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), triticales (x *Triticosecale* Wittm.), arroz (*Oryza sativa* L.), Brassica spp., berinjela (*Solanum melongena* L.), pimenta (*Capsicum annuum* L.), aspargo (*Asparagus officinalis* L.), e fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (THOMAS et al., 2003).

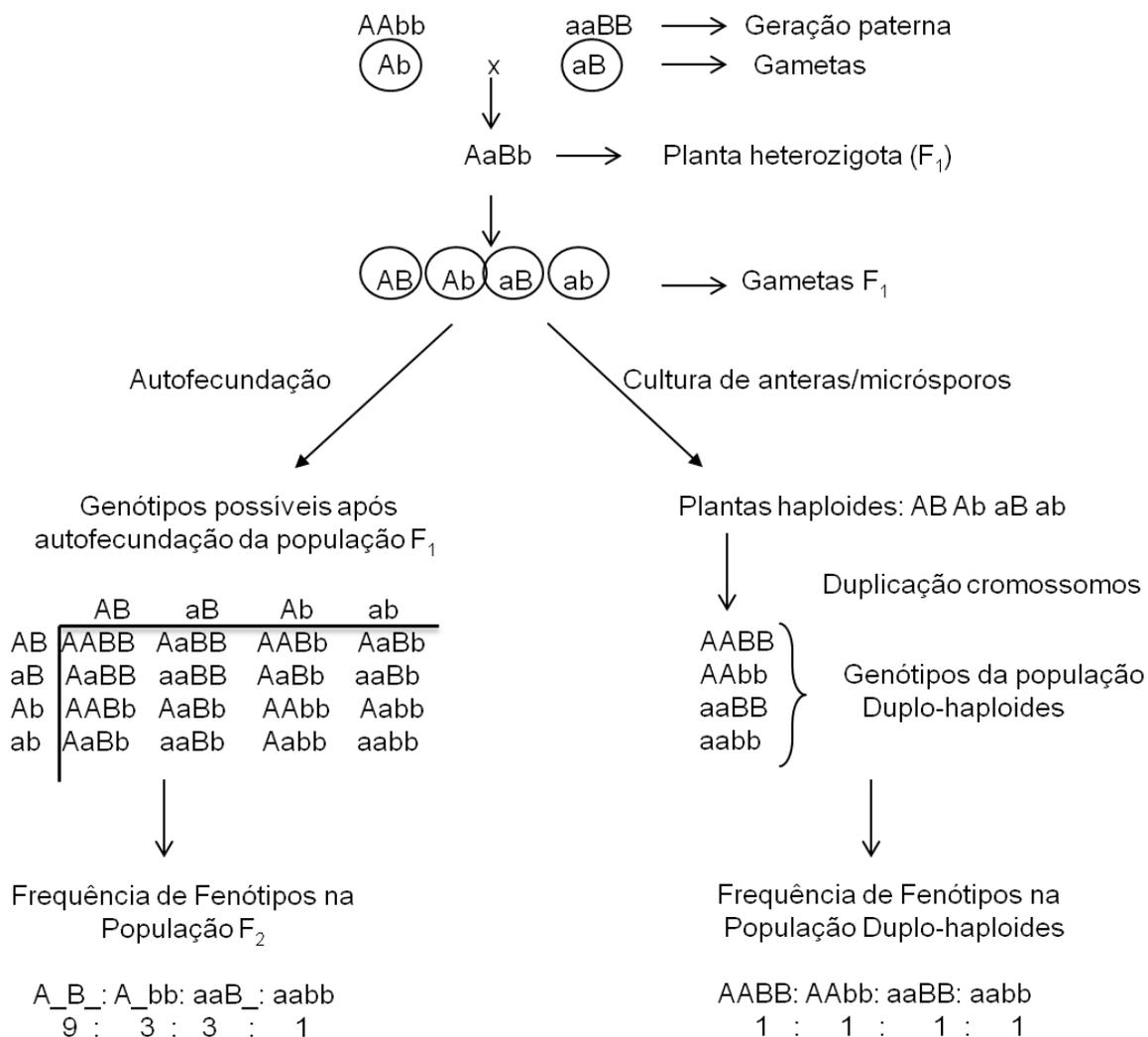


Figura 2 – Segregação de genótipos e fenótipos em populações F_2 e duplo-haploides de uma planta heterozigota para os genes de recombinação independente. Fonte: Adaptado de MORAES-FERNANDES, 1990.

Vários métodos já foram descritos como exemplos para obtenção de plantas haploides, sendo a hibridização interespecífica ou intergenérica (ginogênese) e a androgênese (via cultura de anteras ou micrósporos purificados) os mais usados em cereais (PALMER; KELLER, 2005).

Utilizando-se do gameta masculino temos a vantagem de possuir mil a dois mil grãos de pólen por antera, enquanto em comparação na cultura de ovário obtém-se apenas um saco embrionário por ovário (PETERS et al., 1999).

1.3. A potencialidade da androgênese e ginogênese

A androgênese é o processo pelo qual um grão de pólen jovem ou micrósporo (célula gamética masculina jovem) é capaz de alterar sua rota comum de desenvolvimento, de gametofítica para esporofítica, dando origem a um esporófito haploide, sem que haja a fertilização (SANTOS; ZANETTINI, 2002). Para que este processo ocorra, é necessário que estas células (ainda jovens) sejam submetidas a algum tipo de estresse (físico ou químico), promovendo o desvio da rota original (gametofítica). A cultura de anteras (e/ou micrósporos), por meio desse processo, tem sido largamente empregada para a obtenção de plantas haploides em cereais.

O processo de produção de plantas haploides via ginogênese ao contrário da androgênese utiliza do gameta feminino para desenvolver uma planta *in vitro* a partir de embriões híbridos imaturos, resultantes da eliminação de cromossomos da espécie doadora do pólen. O cruzamento intergenérico trigo x milho (doador de pólen) tem sido usado para produção de plantas haploides em trigo.

Ambos os métodos, tem sido adotados nos programas de melhoramento genético vegetal para formação de populações homocigotas. Entretanto, cada técnica possui limitações que são determinantes para adoção de cada uma delas. Enquanto o método via ginogênese é limitado a uma planta para cada flor da espiguetta, a cultura de anteras tem o potencial de produzir mais de uma centena de plantas originadas de uma única antera (LIU et al., 2002a). Apesar dessa vantagem, a cultura de anteras apresenta um fator bastante limitante que é a característica genótipo-dependente, diminuindo a possibilidade de sua aplicação em uma ampla base genética (KIM; BAEZINGER, 2005). Por sua vez, o método da ginogênese (cruzamento trigo x milho) pode ser aplicado a uma gama maior de genótipos.

Diante dessa limitação, a cultura de anteras em trigo foi aos poucos sendo substituída pelo método da ginogênese, onde embriões imaturos são resgatados e cultivados *in vitro* dando origem a uma planta haploide, resultantes da hibridização com pólen de milho.

Mas, no decorrer dos últimos dez anos, a necessidade de sincronia do florescimento dos genitores (espécies diferentes); as laboriosas etapas de emasculação e polinização; a quantidade de pólen de milho disponível para a polinização; aplicação de ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D) para promover a formação do embrião e posterior duplicação química do genoma com colchicina

(FORSTER et al., 2007), fez com que a obtenção de plantas haploides de trigo via ginogênese (eliminação somática), preferida em relação a outros métodos, fosse também aos poucos sendo substituída e deixando de ser utilizada. Essas razões motivaram um avanço no plano metodológico de produção de plantas haploides, surgindo métodos mais modernos, que combinariam as qualidades dos métodos anteriormente descritos. Assim, o surgimento da técnica de micrósporos isolados vem sendo estabelecida e adotada em muitos laboratórios, representando um avanço nos processos de haploidização, contribuindo tanto para estudos básicos como para apoio aos programas de melhoramento.

1.4. Cultura de micrósporos isolados

Embriogênese do micrósporo consiste na reprogramação induzida de grãos de pólen ou de seus precursores, os micrósporos, desviando-os de seu caminho original em direção à embriogênese. Essa opção foi pela primeira vez induzida em anteras de uma espécie de solanácea, *Datura innoxia* (GUHA; MAHESHWARI, 1964). Depois desse estudo pioneiro, esse fenômeno foi recriado em angiospermas para mais de 250 espécies, mas protocolos eficientes estão disponíveis para apenas 20 delas (MALUSZYNSKI et al., 2003).

Desde os primeiros relatos da cultura de micrósporo isolado em *Triticum aestivum* (MEJZA et al., 1993; TUVESON; ÖHLUND, 1993), tem havido progressos notáveis no desenvolvimento deste sistema. O crescente número de trabalhos publicados com esta metodologia demonstra a importância e a eficiência desta técnica na produção de plantas duplo-haploides (LIU et al., 2002a; PATEL et al., 2004; RODRIGUES et al., 2004; CISTUÉ et al., 2009).

A técnica de cultura de micrósporos isolados vem sendo preferida em muitos laboratórios por apresentar várias vantagens sobre a cultura de anteras, principalmente pela facilidade de milhões de micrósporos poderem ser facilmente isolados e desenvolverem-se sincronizadamente, sendo excelentes fontes na transformação genética, visto que a transferência de genes para estas células vai dar origem a plantas haploides transformadas, e que se tornarão homozigotas diploides (FOLLING; OLESEN, 2001; FERRIE; MÖLLERS, 2011).

No cultivo de micrósporos isolados não há interferência de tecidos esporofíticos da antera (tapete, endotécio, camada média e epiderme), o que conferiria uma competição desnecessária por espaço e nutrientes do meio. Além disso, é possível avaliar o efeito direto da aplicação de tratamentos diretamente sobre as células alvo do cultivo (micrósporos), diferindo da cultura de anteras, onde a presença dos tecidos pode retardar ou neutralizar os efeitos dos tratamentos. Além do mencionado, esta técnica ainda permite o acompanhamento das divisões de cada célula ao microscópio invertido, enquanto que no cultivo de anteras, a resposta dos micrósporos envolvidos por tecidos esporofíticos, não pode ser acompanhada sem a destruição dos estratos parietais (RODRIGUES et al., 2004; FERRIE; CASWELL, 2011; ASIF, 2013).

O isolamento dos micrósporos pode ser feito de maneira passiva, por deiscência das anteras, ou por rompimento mecânico das anteras seguido de purificação, ou seja, centrifugação sequencial e resuspensão das células em novo meio (PETERS et al., 1999).

A elevada taxa de duplicação espontânea dos cromossomos também é uma característica positiva observada na cultura de micrósporos, sendo que em cevada e trigo, dependendo do genótipo, foram observadas frequências de duplicação de 75-85%, resultando em plantas duplo-haploides completamente férteis (HU; KASHA, 1999; KASHA et al., 2001b).

Em cevada, vários trabalhos já foram realizados mostrando a eficiência da técnica de cultivo de micrósporos isolados (KASHA et al., 2001a; KASHA et al., 2001b) inclusive em genótipos considerados recalcitrantes, com baixa taxa de regeneração (LI; DEVAUX, 2001; ESTEVES et al., 2014).

1.4.1. Desenvolvimento do micrósporo e do grão de pólen

O aparelho reprodutor masculino, denominado androceu, é composto pelos estames. Este por sua vez divide-se em filete, tecido conectivo e antera. Em geral, os estames têm como principal função, a produção de esporos (andrósporos, ou também, micrósporos).

A antera é formada por quatro microsporângios ou sacos polínicos. Cada saco polínico possui as células mãe de pólen, circundadas por um tecido

denominado tapete, que nutre e contribui para o desenvolvimento e maturação dos micrósporos.

Nas angiospermas o ciclo de vida está dividido em duas fases, a fase gametofítica, onde se tem n cromossomos, ou seja, é uma fase haploide que fica contida completamente dentro da flor; e a fase esporofítica, ou diploide já que esta fase inicia-se com a fertilização e posterior formação do embrião, através do zigoto (ZANETTINI; LAUXEN, 2003).

Durante a microsporogênese, as células mãe de pólen ($2n$) irão sofrer meiose, originando quatro micrósporos haploides (n cromossomos) (Figura 3). Os micrósporos inicialmente permanecem juntos numa tétrade, envoltos por uma parede de calose e após um tempo serão liberados pela ação da enzima calase, secretada pelo tapete com a função de degradar a parede que une-os na tétrade. Denominando-se então micrósporos, à medida que um vacúolo e as duas membranas (exina, mais desenvolvida, e intina, menos desenvolvida) se desenvolvem, estas células irão começar a aumentar de volume e, um poro torna-se evidente na parede de exina. Também apresentarão muitos ribossomos em seu citoplasma e um grande vacúolo central que desloca o núcleo para a periferia da célula, no sentido oposto ao poro. Esta migração do núcleo constitui uma etapa chave da microgametogênese, uma vez que, em seguida se dá a primeira divisão mitótica, tornando-se um grão de pólen bicelular. Esta divisão é uma divisão assimétrica, resultando na formação de uma célula vegetativa grande e uma célula generativa menor. Ao final observa-se a formação de duas células com o mesmo material genético, mas estruturalmente diferentes. Logo depois desta divisão, a célula vegetativa migra para uma posição adjacente ao poro e o vacúolo é rapidamente reabsorvido, dando lugar à síntese de amido.

A segunda mitose do pólen envolve apenas o núcleo generativo, enquanto a célula vegetativa permanece quiescente. Esta divisão dá origem a duas células espermáticas. Assim o gametófito maduro é constituído de três células: a vegetativa e as duas gaméticas (ZANETTINI; LAUXEN, 2003).

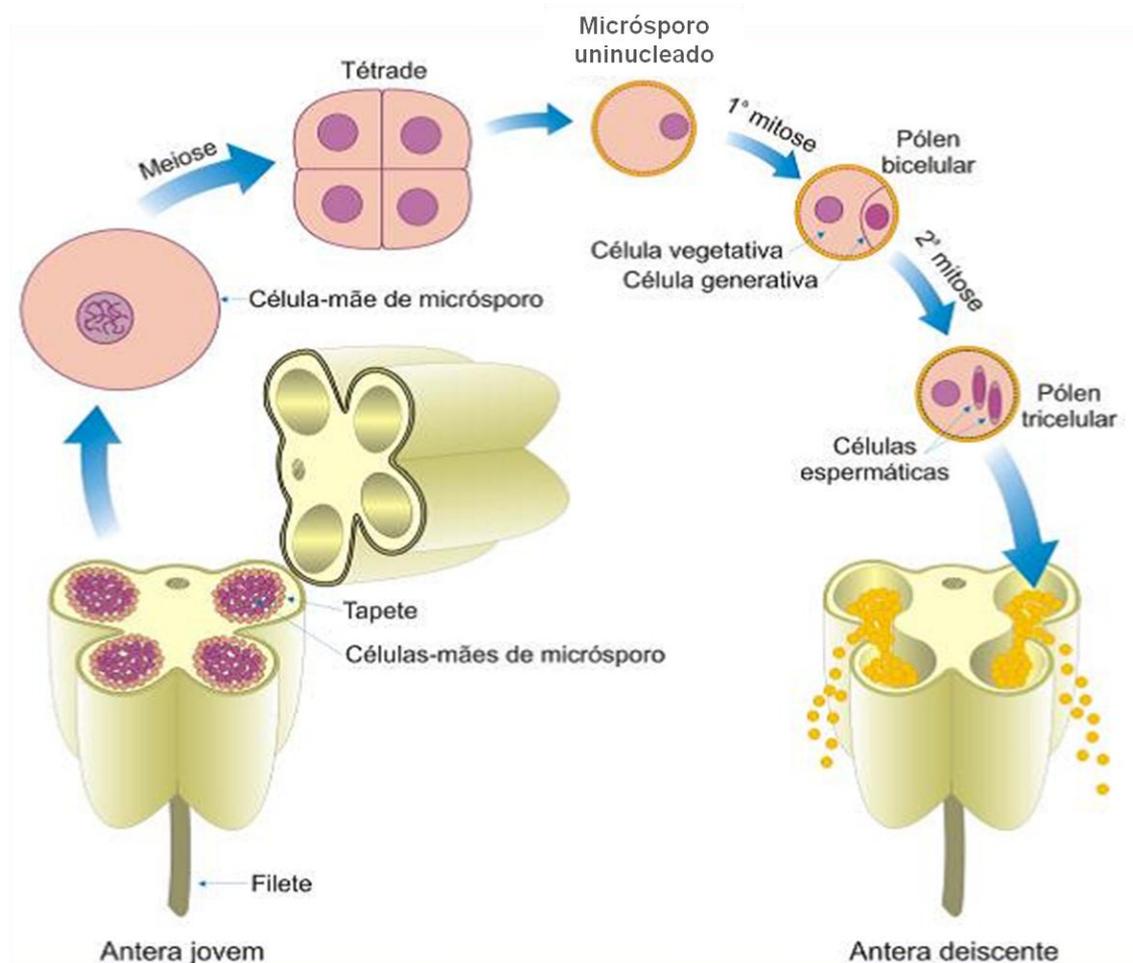


Figura 3 – Diagrama de uma antera mostrando o desenvolvimento dos grãos de pólen. Fonte: ZANETTINI; LAUXEN, 2003.

1.4.1.1. Rotas alternativas do micrósporo

A formação do pólen compreende dois eventos: a microsporogênese e a microgametogênese. O processo da microsporogênese começa com a meiose e termina com a formação de um micrósporo haploide polarizado (TOURAEV et al., 1997). A partir deste ponto, alguns desses micrósporos são capazes de abandonar sua rota gametofítica (usual) de desenvolvimento e seguir uma nova rota de desenvolvimento esporofítica (alternativa), a qual pode ser a da organogênese ou da embriogênese. No primeiro caso, há a desdiferenciação do micrósporo, o que forma um calo que pode ser induzido a formar uma planta; no segundo, o micrósporo sofre

sucessivas mitoses e forma um embrião, o qual se desenvolverá em uma planta adulta.

Para que o grão de pólen seja androgenético e siga a rota esporofítica, o micrósporo deve estar num determinado estágio de desenvolvimento. Na maioria das vezes este estágio corresponde a fase anterior à primeira mitose e logo após o término da divisão, ou seja, no estágio uninucleado tardio. Nesta fase nota-se uma alta síntese de rRNA e tRNA. Nenhum dos estágios anterior à tétrade e posterior a mitose foram capazes de promover a rota esporofítica (PETERS et al., 1999).

Estudos com trigo e cevada usando o acompanhamento de todo o processo da embriogênese a partir de um único micrósporo mostraram que uma morfologia interna semelhante a uma estrela (*star-like*), que exibe um núcleo centralizado cercado por fios citoplasmáticos está associada com a divisão celular (INDRIANTO et al., 2001; MARASCHIN et al., 2005a). Outro marcador celular que é frequentemente associado com a indução de embriões é a divisão simétrica inicial dos micrósporos. A ocorrência deste tipo de divisão foi avaliada numa ampla gama de espécies, incluindo trigo (INDRIANTO et al., 2001) e cevada (PULIDO et al., 2005).

Independente do padrão inicial de segmentação, tendo ingressado na rota embriogênica, o pólen ou micrósporo sofre divisões tornando-se multicelular e resultando, futuramente em uma planta (TOURAEV et al., 2001; SILVA, 2012).

1.4.2. Fatores que influenciam o cultivo de micrósporos

Vários fatores podem influenciar na produção de plantas duplo-haploides derivadas de cultura de micrósporos isolados. Estes fatores farão com que a técnica seja realizada com eficiência para a obtenção de bons resultados, ou seja, bons índices de formação de embriões e de regeneração de plantas verdes.

a) Genótipo

A dependência do genótipo é um fator crítico que afeta o grau de sucesso na produção de haploides. A embriogênese do micrósporo é muito dependente do

genótipo e existem vários genótipos agronomicamente importantes que são recalcitrantes, principalmente devido à baixa taxa de embriogênese e / ou uma alta regeneração de plantas albinas (LI; DEVAUX 2001; MUÑOZ-AMATRIAÍN et al., 2008).

Não são apenas diferentes espécies, mas também diferentes cultivares dentro das espécies e, mesmo os indivíduos de uma mesma cultivar que podem mostrar diferenças nas respostas embriogênicas (SEGUÍ-SIMARRO; NUEZ, 2008).

b) Fisiologia das plantas doadoras

A qualidade das plantas doadoras das espigas tem uma influência decisiva sobre o sucesso da cultura de micrósporo, ou qual for o método adotado (CISTUÉ et al., 2009). Fatores ambientais imprescindíveis ao desenvolvimento das plantas como intensidade luminosa e qualidade de luz, fotoperíodo, temperatura, sanidade das plantas e nutrição interagem entre si, influenciando o estado da planta doadora e o potencial dos grãos de pólen que entrarão em divisão celular e que poderão regenerar uma nova planta.

A temperatura a que as plantas doadoras são cultivadas desempenha um papel crítico na resposta da cultura de micrósporo. Em trigo, temperaturas mais baixas (12-18°C) tem efeito positivo na resposta da cultura (ZHENG, 2003), porque as plantas crescem mais lentamente, o que resulta em desenvolvimento mais homogêneo da população de micrósporos.

O número de micrósporos capazes de divisão e regeneração pode variar amplamente dentro de um genótipo devido às condições ambientais em que as plantas doadoras foram cultivadas (HEBERLE-BORS, 1989). A fim de assegurar um estado fisiológico ótimo, as plantas doadoras devem ser mantidas livres de doenças, pragas e outros estresses ambientais (JÄHNE; LÖRZ, 1995).

c) Estádio de desenvolvimento do grão de pólen

Tem sido verificado que o estágio de desenvolvimento do micrósporo tem um papel crucial na eficiência da indução da embriogênese. Tudo indica que, em

determinados períodos, o micrósporo apresenta-se mais suscetível a alterações em sua via ontogenética e, assim, competente para a androgênese.

O estágio exato de desenvolvimento do micrósporo, que é mais facilmente desviado para um caminho esporofítico, parece variar com as espécies. No entanto, para a grande maioria das espécies, o micrósporo jovem poderá expressar seu potencial androgenético quando atingir a fase uninucleada intermediária ou tardia de desenvolvimento, anterior à primeira mitose, e tal potencial está relacionado com a eliminação incorreta das moléculas carreadoras de informações esporofíticas (mRNA, ribossomos e proteínas) acarretando a reativação do processo embriogênico (SANTOS; ZANETTINI, 2002).

Em trigo e cevada, micrósporos no estágio uninucleado intermediário a tardio exibem maior responsividade em cultura de micrósporos isolados (HU et al., 1995; KASHA et al., 2001b).

d) Pré- tratamento das espigas/anteras

Estudos têm mostrado que o redirecionamento da ontogenia do gametófito masculino no sentido de formar uma célula embriogênica necessita de um estímulo ou sinal (TOURAEV et al., 1997).

Segundo estes mesmos autores, a aplicação de fatores externos torna o micrósporo competente para a androgênese. O estresse dado às espigas atua como promotor da rota esporofítica dos grãos de pólen jovens, fazendo com que estes saiam da rota gametofítica (em condições naturais de desenvolvimento - que iria levar ao desenvolvimento de um gameta) e mudem para a rota esporofítica.

Vários tipos de estresses (químicos ou físicos) isoladamente ou em combinação agem como gatilhos para a indução dessas vias esporofíticas (SHARIATPANAHI et al., 2006). No entanto, muitas espécies ainda permanecem recalcitrantes à embriogênese do micrósporo ou porque a etapa de pré-tratamento não foi ainda otimizada, ou ainda pela natureza genética das células de micrósporos serem insensíveis ao estresse aplicado.

O tratamento das espigas por um período de frio melhora a resposta androgênica dos micrósporos e tem sido utilizado rotineiramente em diferentes espécies vegetais (SHARIATPANAHI et al., 2006). Para cevada e trigo, o pré-

tratamento de frio durante 28 dias a 4°C tem sido mais comumente usado (JÄHNE; LÖRZ, 1995).

O pré-tratamento a frio diminui o metabolismo da antera, retardando a senescência da parede e aumentando a quantidade de aminoácidos livres. Além disso, o frio pode alterar a composição da membrana plasmática do pólen, aumentando a síntese e a incorporação de ácidos graxos insaturados que ampliam a fluidez da membrana, aumentando a capacidade de sobrevivência dos grãos de pólen ao estresse pela troca de ambiente (HEBERLE-BORS, 1985).

Segundo Oleszczuk et al. (2006) o tipo de tratamento de estresse tem efeito no número de plantas albinas e verdes regeneradas e na fertilidade dessas plantas. Neste estudo, o pré-tratamento das espigas no frio aumentou a razão de plantas albinas regeneradas, mas a frequência de plantas verdes com duplicação cromossômica espontânea foi quase de 100%.

Além dos tratamentos baseados em baixas temperaturas por diferentes períodos de tempo, outros métodos podem ser usados, alternativamente para promover o desvio da rota, como manitol, manitol e frio, etanol, altas temperaturas e até radiações ionizantes. Na cultura de micrósporos isolados de trigo e cevada, muitos trabalhos foram descritos utilizando pré-tratamento de choque causado pelo frio e frio combinado ao manitol obtiveram sucesso (KASHA et al., 2001b; OLESZCZUK et al., 2006; LABBANI et al., 2007).

De acordo com Kasha et al. (2001b) uma boa resposta foi obtida com a combinação de pré-tratamento de 3-4 dias em 0,3 M manitol a 4°C. A utilização dessa combinação não só induz a um grande número de embriões, mas também tende a atrasar as divisões das células, o que poderia levar a uma população mais sincronizada de micrósporos. Labbani et al. (2007) mostraram que o pré-tratamento que consiste em 0,3 M de manitol e frio durante 7 dias teve um forte efeito sobre o número de embriões produzidos e a regeneração de plantas verdes.

e) Albinismo

As plantas albinas são o grande gargalo para a produção de haploides por androgênese, e minimizar a sua ocorrência é um grande desafio. O albinismo é caracterizado por uma perda parcial ou completa de pigmentos de clorofila e de uma

diferenciação incompleta das membranas dos cloroplastos. Em algumas cultivares de cevada recalcitrantes, até 100 % das plantas haploides regeneradas são albinas, desprovidas de clorofila e com proplastídeos indiferenciados (CAREDDA et al., 2000).

A causa direta do albinismo em plantas obtidas via androgênese foi definida como a inabilidade de proplastídeos se transformarem em cloroplastos; no entanto, os mecanismos biológicos ainda não foram completamente elucidados (MAKOWSKA; OLESZCZUK, 2014).

Estudos sugerem que a formação de plantas albinas se deve a alterações dos plastídeos durante a microsporogênese *in vitro*. Os cloroplastos são formados a partir de proplastídeos durante o desenvolvimento celular e em plantas albinas estes proplastídeos não conseguem diferenciar-se em cloroplastos, levando ao mau desenvolvimento dos tilacóides, local do fotossistema que contém clorofila (KUMARI et al., 2009).

A produção de plantas albinas também pode ser devido à falta de expressão dos genes responsáveis pelo desenvolvimento normal dos cloroplastos e da biossíntese de clorofila nas condições de cultivo *in vitro* (LENTINI et al., 1997). Ambos os genomas nucleares e dos cloroplastos codificam proteínas essenciais para o desenvolvimento e função destas organelas. Assim, a formação dos cloroplastos pode ser afetada por mutações em ambos os genes nucleares e de cloroplastos (KUMARI et al., 2009).

A regeneração dos micrósporos em plantas verdes ou albinas depende de uma série de fatores, incluindo o genótipo e o estado fisiológico das plantas doadoras de anteras, os tipos de pré-tratamento, o tipo e a concentração de carboidratos em combinação com reguladores de crescimento e também do estágio de desenvolvimento do micrósporo (KUMARI et al., 2009). No entanto, muitos estudos afirmam que o genótipo é acima de tudo responsável por mais de 60% da variação da resposta obtida nas culturas de anteras/micrósporos de trigo e de cevada (LARSEN et al., 1991).

A importância do genótipo na regeneração de plantas verdes ou albinas também pôde ser comprovada em estudo mais recente, onde foi relatado que a eficiência da androgênese se baseia em três processos distintos: o desenvolvimento de embriões (transformação dos micrósporos uninucleados em estruturas multicelulares); a capacidade de regeneração destes embriões em plantas e; a

frequência de plantas verdes formadas. Tais processos são regulados por genes nucleares e governados por mecanismos genéticos independentes (KRZEWSKA et al., 2012).

Estudos da herança do DNA de cloroplastos juntamente com observações usando microscopia eletrônica demonstraram que a transmissão das características dos plastídeos pode ser maternal, paternal ou biparental, mesmo dentro do mesmo gênero (KUMARI et al., 2009).

Apesar de determinada por fatores genéticos, a formação de plantas albinas pode ser minimizada otimizando os meios de cultura e as formas de pré-tratamento aplicado às espigas. Estudo realizado por Wojnarowiez et al. (2002), utilizando como modelo a cultivar de cevada Igri mostrou a influência positiva de sulfato de cobre na embriogênese dos micrósporos. No trabalho, quando 10 μ M de sulfato de cobre foi adicionado ao meio de pré-tratamento de anteras, o número de plantas duplo-haploides obtidas através da cultura de anteras foi expressivamente melhorada e a proporção de plantas albinas reduzida. Estes efeitos estão relacionados com uma maior sobrevivência dos micrósporos e com a sincronização da primeira divisão embriogênica (WOJNAROWIEZ et al., 2002).

Jacquard et al. (2009) também obtiveram bons resultados em cevada adicionando sulfato de cobre ao meio de pré-tratamento (10 ou 20 μ M). Plantas verdes derivadas de micrósporos foram regeneradas em todas as cultivares testadas, mesmo em cultivares conhecidas por produzirem plantas exclusivamente albinas. A presença de corpos prolamelar em embriões derivados de micrósporos após quatro semanas de cultura indicam que o sulfato de cobre induz a desdiferenciação de amiloplastos em proplastídeos antes de entrar no desenvolvimento do cloroplasto (JACQUARD et al., 2009).

Nos cereais, o cobre tem um papel fundamental durante o desenvolvimento do pólen, uma vez que afeta o tapete das anteras e o metabolismo do pólen. Na maioria dos casos, a deficiência de cobre conduz ao aborto do embrião e mais comumente à esterilidade masculina. Além disso, o cobre está envolvido em muitos outros processos fisiológicos, especialmente em relação à biossíntese de clorofila e na fotossíntese (MAKSYMIEC, 1997; MAKOWSKA; OLESZCZUK, 2014).

f) Meios de indução

A composição do meio de cultura é conhecida por afetar o sucesso da cultura de anteras/micrósporos. Em trigo, o meio NPB-99 (KONZAK et al., 1999) tem sido amplamente usado na cultura de micrósporos isolados.

Geralmente, o meio líquido é utilizado para cultura de anteras/ micrósporos. Uma vantagem adicional do meio de cultura líquido é que os nutrientes são mais uniformemente disponíveis para a divisão dos micrósporos, reduzindo assim possíveis efeitos de concorrência entre os embriões em desenvolvimento. Conseqüentemente, as anteras e micrósporos afundam no meio de cultura, e os tecidos são expostos a baixo teor de oxigênio, resultando na produção de lactato e álcool desidrogenase que danificam a estrutura interna e o DNA dos plastídeos, conduzindo à regeneração de plantas albinas (KAO et al., 1991). Mas essas condições anaeróbicas podem ser evitadas pela adição de Ficoll, um polímero sintético, caracterizado por proporcionar um aspecto coloidal aos meios de cultura, mantendo os micrósporos purificados na parte mais superficial do meio. Cistué et al. (2004) mostraram que os embriões se desenvolvem muito melhor em um meio com alta pressão osmótica ou alta viscosidade, que foi traduzido em um aumento do número de divisão de micrósporos.

A fonte de carboidratos também tem um papel decisivo no início da embriogênese. O metabolismo rápido de sacarose, glicose ou frutose leva à hipoxia e ao acúmulo de etanol, provocando assim a morte de micrósporos. Em contraste, o metabolismo mais lento de maltose não tem conseqüências letais, permitindo assim a indução da androgênese (SCOTT et al., 1995). Devido ao seu efeito benéfico, a maltose é o açúcar habitualmente aplicado nas culturas de micrósporos de ambos cevada e trigo.

O balanço de hormônios exógenos no meio de cultura é crucial tanto para o rendimento e qualidade de embriões. Auxina e citocinina são os dois tipos de regulador de crescimento mais utilizados nos meios para cultura de anteras/micrósporos. A inclusão de Ácido Fenil Acético (PAA) foi benéfica para a cultura de micrósporo de trigo (HU et al., 1995). A combinação de 2,4-D, cinetina e PAA em cultura de micrósporo de trigo tem sido relatada como a ideal para o desenvolvimento do embrião (ZHENG et al., 2001).

Outro aspecto importante para a indução da cultura é o co-cultivo de micrósoros isolados com ovários. Embora o mecanismo exato da ação dos ovários sobre as células cultivadas seja desconhecido, alguns aspectos da sua função têm sido documentados. Köhler e Wenzel (1985) sugeriram que a liberação de proteínas e de aminoácidos a partir dos ovários pode contribuir para a melhoria da resposta do micrósporo em cultura. Outros estudos apontam a hipótese de que a função biológica de um ovário é de ter um tipo de efeito estimulante na embriogênese, já que o ovário tem função biológica natural para a embriogênese zigótica (MEJZA et al., 1993). De acordo com Zheng et al. (2002), o ovário fornece uma substância essencial para manter a embriogênese já desencadeada durante o pré-tratamento. Quando os ovários foram adicionados à cultura de micrósoros em trigo, o número de embriões e plantas regeneradas aumentou significativamente.

Os meios de cultura são ricos em açúcar, aminoácidos e minerais, e são, portanto, uma fonte potencial de nutrientes para microrganismos tais como bactérias, leveduras e fungos. Embora os antibióticos, controlem o crescimento da maior parte dos contaminantes bacterianos, alguns antibióticos podem trazer benefícios adicionais para a cultura de micrósporo. Yu e Wei (2008) investigaram a contribuição de cefotaxima e carbenicilina na regeneração de calos de trigo e reportaram aumento de 55% na regeneração de plantas verdes de trigo com a adição de 100 mg L⁻¹ de cefotaxima no meio de regeneração. Recentemente, Asif et al. (2013c) observaram que o meio de indução suplementado com cefotaxima a 50 e 100 mg L⁻¹, aumentou substancialmente a formação de embriões e plantas verdes em tritcale e trigo, respectivamente. Assim, além de contribuir para minimizar as contaminações frequentes observadas em cultura de células e tecidos, o uso de certos tipos de antibiótico também tem mostrado uma resposta positiva em relação à embriogênese.

Estudos têm relatado que o estresse oxidativo induzido por pré-tratamentos pode afetar a taxa de embriogênese do micrósporo num grau considerável, influenciando a viabilidade e o metabolismo destas células (ASIF et al., 2013a). Plastídeos e mitocôndrias são os sítios-alvo/produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante estresses abióticos (FOYER et al., 1994). ERO são naturalmente produzidas pelo metabolismo celular, que por sua vez, conta com a ação de antioxidantes e de enzimas específicas para a neutralização destes compostos. Na mitocôndria, estresses abióticos causam prejuízos graves que levam

ao aumento de transporte de elétrons, produção de H_2O_2 , depleção de ATP e, finalmente, a morte celular (TIWARI et al., 2002). Em plastídeos o aumento do nível de ERO pode ser correlacionado com albinismo, uma vez que plantas albinas são desprovidas de clorofila (CAREDDA et al., 2000). Asif et al. (2013a), avaliaram quatro antioxidantes de mitocôndria e três antioxidantes de plastídeo para reduzir o estresse oxidativo e observaram que dentre os antioxidantes de plastídeo a glutathiona ($2,0 \mu M$), teve efeito mais significativo no aumento da produção de embriões e plantas verdes. Entre o grupo de candidatos antioxidantes mitocondriais, a prolina ($10 mM$) aumentou o número de estruturas de embrião em triticales e aumentou a produção de plantas verdes em triticales e na maioria das cultivares de trigo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos, na Embrapa Trigo – Passo Fundo, RS, no período de maio de 2013 a janeiro de 2014.

Material vegetal

Para este estudo, foram utilizadas plantas F₁ oriundas do cruzamento entre Toropi x BRS 194. A escolha de trabalhar com esse cruzamento deu-se pelo fato de que o mesmo tem grande importância no projeto da Unidade “Resistência Genética às Ferrugens da Folha e do Colmo como Fator de Sustentabilidade da Triticultura no Brasil”. A população duplo-haploide advinda da técnica de cultura de micrósporos isolados será utilizada em estudos para mapeamento de genes de resistência de planta adulta (RPA) à ferrugem da folha da cultivar Toropi.

Toropi é uma cultivar brasileira antiga, lançada em 1965, que apresenta RPA às principais raças causadoras de ferrugem da folha (*Puccinia triticina*). Barcellos (1994) identificou dois genes complementares e recessivos que conferem resistência estritamente em planta adulta em Toropi, designados *Trp-1* e *Trp-2*. Embora possua características importantes de resistência a doenças, essa cultivar não tem qualidade industrial que atenda aos quesitos para panificação, ou rendimento satisfatório na lavoura, sendo usada em programas de melhoramento para transferência desta resistência para materiais altamente produtivos e com aspectos agrônômicos desejáveis. Além dos genes de RPA de Toropi, o cromossomo 4D possui genes ligados à uma maior tolerância ao alumínio tóxico do solo (LAGOS et al., 1991).

A cultivar BRS 194, é uma cultivar mais moderna, desenvolvida pelo programa de Melhoramento Genético da Embrapa Trigo que apesar de apresentar suscetibilidade à ferrugem da folha, possui porte mais baixo e ciclo mais curto. A escolha dos genitores desta população F₁ (Toropi x BRS 194) foi fortemente baseada por estes apresentarem características contrastantes em relação à Ferrugem da Folha, fato este de extrema importância, já que oferece um maior conteúdo de informação genética e aumenta a possibilidade de selecionar combinações híbridas superiores.

O genótipo Pavon 76 reconhecido como altamente responsivo à androgênese (ZHENG et al., 2002) foi utilizado como controle no experimento 3. No entanto, o mesmo não foi submetido nos experimentos iniciais (1 e 2) devido ao número limitado de câmaras de crescimento na época da condução de ambos os experimentos, onde os mesmos eram conduzidos paralelamente com experimentos de uma aluna de doutorado.

Foram realizados três experimentos com o mesmo material vegetal. No entanto, o material em pré-tratamento, o pré-tratamento, o tipo de tecido usado nas extrações e o meio de indução diferiram nos três ensaios (Tabela 1). Os experimentos não foram realizados simultaneamente, sendo a distinção de experimento 1, 2 e 3 a ordem cronológica do desenvolvimento de cada um.

Tabela 1 – Esquema diferenciando os três ensaios.

	Material (pré-tratamento)	Pré-tratamento	Tipo de tecido (extração)	Meio Indução
Experimento 1	Anteras	Sulfato de Cobre + frio	Anteras	NPB-99 (tradicional)
	Anteras	Manitol + frio	Anteras	NPB-99 (tradicional)
	Anteras	Sulfato de Cobre + Manitol + frio	Anteras	NPB-99 (tradicional)

Experimento 2	Espiguetas	Sulfato de Cobre + frio	Espiguetas	NPB-99 (tradicional)
	Espiguetas	Manitol + frio	Espiguetas	NPB-99 (tradicional)
	Espiguetas	Sulfato de Cobre + Manitol + frio	Espiguetas	NPB-99 (tradicional)

Experimento 3	Afilhos	Frio	Espiguetas	NPB-99 (tradicional) – controle
	Afilhos	Frio	Espiguetas	NPB-99 (trad.) + sulfato de cobre
	Afilhos	Frio	Espiguetas	NPB-99 (trad.) + prolina
	Afilhos	Frio	Espiguetas	NPB-99 (trad.) + glutaciona
	Afilhos	Frio	Espiguetas	NPB-99 (trad.) + cefotaxima
	Afilhos	Frio	Espiguetas	NPB-99 (trad.) + sulfato de cobre + sulfato de cobre
	Afilhos	Frio	Espiguetas	NPB-99 (trad.) + sulfato de cobre + prolina
	Afilhos	Frio	Espiguetas	NPB-99 (trad.) + sulfato de cobre + glutaciona
	Afilhos	Frio	Espiguetas	NPB-99 (trad.) + sulfato de cobre + cefotaxima

Germinação e condições de crescimento das plantas doadoras

As sementes das plantas doadoras foram previamente tratadas com uma mistura de Imidacloprido ($0,004\text{g L}^{-1}$) e Triadimenol ($2,5\text{ ml L}^{-1}$). As sementes foram colocadas para germinar em papel germitest, umedecido com água destilada, onde permaneceram durante quatro dias a temperatura de 4°C , para que houvesse superação da dormência. Após, as sementes foram mantidas em câmara de crescimento a 23°C até a emergência das plântulas. Quando as plântulas apresentaram parte aérea e raiz, as mesmas foram transplantadas para baldes (2 plantas / balde), contendo uma mistura de vermiculita: terra: substrato Tecnomax (1:1:1).

As plantas doadoras foram mantidas em câmaras de crescimento com condições controladas, livre de pragas, com fotoperíodo de 16 horas/luz; temperatura de 18°C (dia) e 14°C (noite), umidade relativa entre 60 – 80%, onde foram fertilizadas semanalmente com solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1938) (ANEXO 1), até o estágio 10 da escala Feekes (LARGE, 1954).

Coleta e assepsia

Os afilhos das plantas doadoras foram coletados quando os micrósporos estavam no estágio adequado para o cultivo *in vitro*, ou seja, uninucleado. Para confirmar o estágio de desenvolvimento dos micrósporos as anteras foram coradas com Acetocarmine (FAN et al., 1988) que promove a coloração do núcleo destas células sendo possível verificar a fase de desenvolvimento do micrósporo tendo como base a posição do núcleo em relação ao poro em microscopia óptica (Figura 4B) (KASHA et al., 2001b). Além das observações feitas ao microscópio, os afilhos foram pré-selecionados com base na distância entre a lígula da folha bandeira e a da folha imediatamente anterior (Figura 4A). Todos os afilhos foram coletados quando atingiram um estágio similar de desenvolvimento morfológico (estádio 10 da escala Feekes).



Figura 4 – Estádios morfológico e citológico da célula de micrósporo de trigo apropriada para o cultivo *in vitro*. A) Estádio morfológico observado quando as células de micrósporos se encontram na fase uninucleada (distância entre a lígula da folha bandeira e folha anterior). B) Estádio citológico ótimo da cultura (estádio uninucleado tardio). Barra representa 20 µm. Embrapa Trigo, Passo Fundo-RS, 2014.

As coletas foram feitas diariamente, sempre no início da manhã. Imediatamente após a coleta, as folhas que envolvem as espigas foram removidas, e as aristas cortadas (Experimentos 1 e 2).

A assepsia das espigas dos três experimentos foi realizada com solução 15% v/v de alvejante comercial a base de hipoclorito de sódio acrescido de uma gota de Tween 20, em constante agitação durante 10 minutos, seguidas de quatro lavagens com água destilada autoclavada, um minuto cada, em câmara de fluxo laminar.

Pré-tratamento

Experimento 1

Para cada pré-tratamento utilizou-se um grupo de 12 espigas, sendo cada pré-tratamento repetido três vezes. As espiguetas basais e apicais de cada espiga foram excluídas, sendo utilizadas as espiguetas da região mediana de cada espiga. As anteras das espiguetas basais e apicais foram descartadas porque o estágio de desenvolvimento dos micrósporos não era sincronizado com as demais. As anteras coletadas foram incubadas em placas de Petri contendo 30 mL de meio líquido de pré-tratamento. Foram testadas três soluções de pré-tratamentos: a) manitol (62 g L^{-1}) + 15 µM de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); b) manitol (62 g L^{-1}) e c) 15 µM de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). As anteras foram pré-tratadas a 4°C no escuro durante quatro dias a 80% de umidade relativa.

Experimento 2

As espiguetas de um grupo de 12 espigas foram retiradas com auxílio de uma pinça, em câmara de fluxo laminar e incubadas em um Erlenmeyer contendo solução de pré-tratamento. Foram testadas as mesmas soluções de pré-tratamento do experimento anterior, com quatro repetições cada, com a diferença de que neste experimento foram usadas espiguetas inteiras e não apenas anteras como no anterior. As espiguetas foram pré-tratadas a 4°C no escuro em agitação durante quatro dias.

Experimento 3

Grupos de 12 afilhos foram embalados em papel alumínio e colocados em um recipiente com água destilada, durante 21 dias, \pm 3 dias a 4°C. Passado o período de pré-tratamento, as folhas externas foram removidas e a assepsia das espigas foi realizada conforme item anteriormente descrito.

Extração dos micrósporos

Experimento 1

Após o pré-tratamento, as anteras foram separadas da solução de pré-tratamento com auxílio de uma peneira estéril e transferidas, sem enxague, para um mini liquidificador (“blender”) refrigerado contendo 30 mL de meio NPB-99 líquido a 4°C (KONZAK et al., 1999), cuja composição está descrita na Tabela 2. As anteras foram trituradas duas vezes em baixa velocidade durante sete segundos e a suspensão obtida foi filtrada em uma peneira de 100 *mesh* e o volume filtrado transferido para um tubo Falcon de 50 mL, sendo submetido a um ciclo de centrifugação (100xg por 5 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o pellet de micrósporo foi ressuspenso em um tubo Falcon de 15 mL, adicionado meio NPB-99 e submetido à nova centrifugação como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o pellet contendo os micrósporos, ressuspenso em 2,0 mL de meio NPB-99 e transferidos cuidadosamente com auxílio de pipeta de vidro estéril para outro tubo contendo 4,0 mL de maltose 20% para ser novamente centrifugado. A banda dos micrósporos que se formou na interface de NPB-99/maltose foi coletada com pipeta de vidro, transferida para um novo tubo de 15 mL, diluída em meio NPB-99 e centrifugado novamente para obtenção de um novo pellet. O sobrenadante foi eliminado e o pellet final foi ressuspenso em um volume total de 1–2,0 mL. O

número total de micrósporos foi contado utilizando-se um hemocitômetro (Câmara de Neubauer). A partir da contagem, foi possível estabelecer o número de células em cada placa. A concentração de micrósporos estabelecida foi de $60.000 \text{ células mL}^{-1} \pm 3.000$.

Devido à trituração ineficiente das anteras (Figura 5), ocorrida no experimento 1, nos experimentos subsequentes as mesmas foram substituídas por espiguetas.



Figura 5 – Anteras parcialmente trituradas obtidas no experimento 1 (após processo de trituração). Embrapa Trigo, Passo Fundo-RS, 2014.

Experimento 2

Passado o período do pré-tratamento as espiguetas foram retiradas da solução de pré-tratamento e transferidas, sem enxágue, para um “blender” refrigerado contendo 50 mL de meio NPB-99 líquido a 4°C (Tabela 2). As espiguetas foram trituradas duas vezes em baixa velocidade durante cinco segundos e a suspensão obtida foi filtrada em uma peneira estéril de 100 *mesh* e o volume filtrado transferido para dois tubos Falcon de 50 mL. A solução obtida foi submetida a um primeiro ciclo de centrifugação (100xg por 5 minutos a 4°C) para remoção dos principais detritos e resíduos celulares. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets reunidos em um tubo Falcon de 50 mL, adicionado meio NPB-99 e submetido à nova centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet contendo as células foi ressuspenso em um tubo Falcon de 15 mL, adicionado meio NPB-99 e submetido à centrifugação nas mesmas condições que anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o pellet contendo os micrósporos, ressuspenso em 2,0 mL de meio NPB-99 e transferidos cuidadosamente com auxílio de pipeta de vidro estéril para outro tubo contendo 4,0 mL de maltose 20% para ser novamente

centrifugado (Figura 6A). A banda contendo as células de micrósoros que se formou na interface entre o meio NPB-99/maltose (Figura 6B) foi coletada com pipeta de vidro, transferida para um novo tubo de 15 mL, diluída em meio NPB-99 e centrifugado novamente para obtenção de um novo pellet. O sobrenadante foi eliminado e o pellet final foi ressuspensão em um volume total de 1–2,0 mL. O número total de micrósoros foi contado em hemocitômetro (Câmara de Neubauer) (Figura 6C). A partir da contagem, foi possível estabelecer o número de placas. A concentração de micrósoros estabelecida foi de $60.000 \text{ células mL}^{-1} \pm 3.000$.

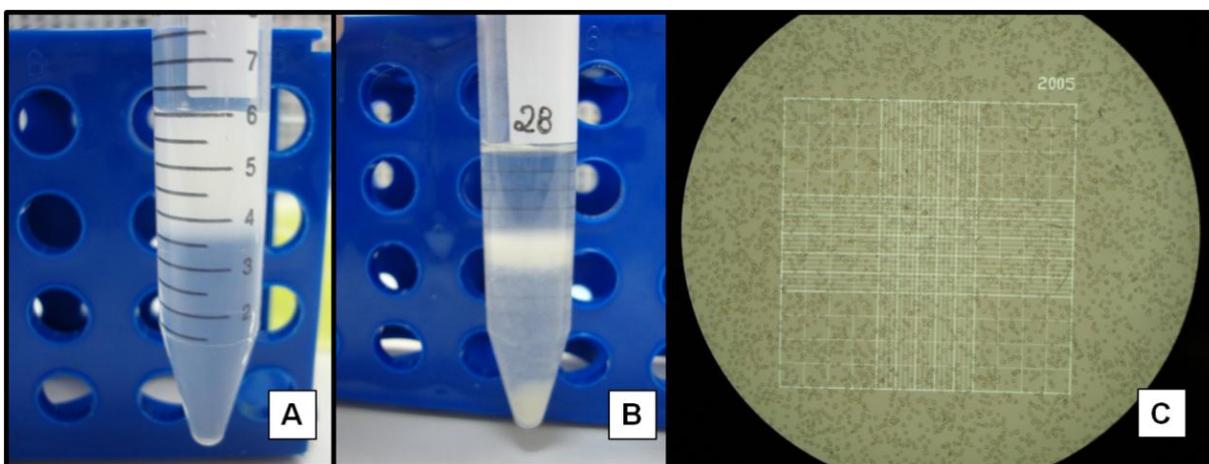


Figura 6 – A) Tubo Falcon de 15 mL contendo solução de maltose 20% na parte inferior e na parte superior uma camada de células diluídas em meio NPB-99. B) Banda de micrósoros formada na interface NPB-99/maltose. C) Campo de contagem de micrósoros - hemocitômetro. Embrapa Trigo, Passo Fundo-RS, 2014.

Experimento 3

Em câmara de fluxo laminar, após assepsia das espigas provenientes do pré-tratamento a frio, as glumas externas de cada espiga foram removidas e as espiguetas retiradas com auxílio de uma pinça estéril e colocadas em um “blender” refrigerado contendo meio NPB-99. As etapas posteriores de trituração e purificação das células foram iguais às etapas descritas no experimento anterior.

Indução

Após a contagem das células, o pellet resultante da extração foi distribuído em placas de Petri contendo meio NPB-99 (Tabela 2), acrescido de Ficoll (100 g L^{-1}) + Larcoll (10 mg L^{-1}). Todas as placas receberam quatro ovários para co-cultivo oriundos de espigas do mesmo cruzamento (Toropi x BRS 194).

Como houve um intervalo entre um experimento e outro, foi possível observar que as soluções utilizadas nos pré-tratamentos dos experimentos 1 e 2 não promoveram (da forma esperada) a indução da androgênese. Por essa razão, no experimento 3, houve uma modificação no meio de indução, quando foram testados nove tratamentos: controle (meio de indução padrão), sulfato de cobre (2,0 μM), prolina (10 mM), glutathione (2,0 μM), cefotaxima (100 mg L^{-1}), sulfato de cobre (4,0 μM), sulfato de cobre (2,0 μM) + prolina (10 mM), sulfato de cobre (2,0 μM) + glutathione (2,0 μM), sulfato de cobre (2,0 μM) + cefotaxima (100 mg L^{-1}).

No genótipo responsivo a androgênese (controle) Pavon 76, foram testados cinco dos nove tratamentos testados em Toropi x BRS 194, sendo eles: controle, sulfato de cobre (2,0 μM), prolina (10 mM), glutathione (2,0 μM) e cefotaxima (100 mg L^{-1}). Essa restrição deu-se pela limitação do número de “blenders” e centrífugas, pois paralelamente a execução deste experimento, também eram feitas extrações de materiais de interesse ao programa de melhoramento.

Neste experimento, as placas foram usadas como repetições, sendo que o número de repetições variou em cada tratamento devido ao rendimento de células em cada extração.

As placas contendo as células de micrósoros foram vedadas com parafilme, identificadas e colocadas no escuro, em BOD, a uma temperatura de 27°C por um período de no máximo 30 - 40 dias, até que as primeiras divisões celulares fossem observadas.

Regeneração

Para dar início ao processo de regeneração, os embriões formados (Figura 7) nas placas de Petri maiores que 1,0 mm foram transferidos para o meio de germinação de embriões em monocotiledôneas (GEM) sólido (EUDES et al., 2003) descrito na Tabela 2 e incubados a temperatura de 23°C, com fotoperíodo de 16 horas de luz, por aproximadamente 30 dias.

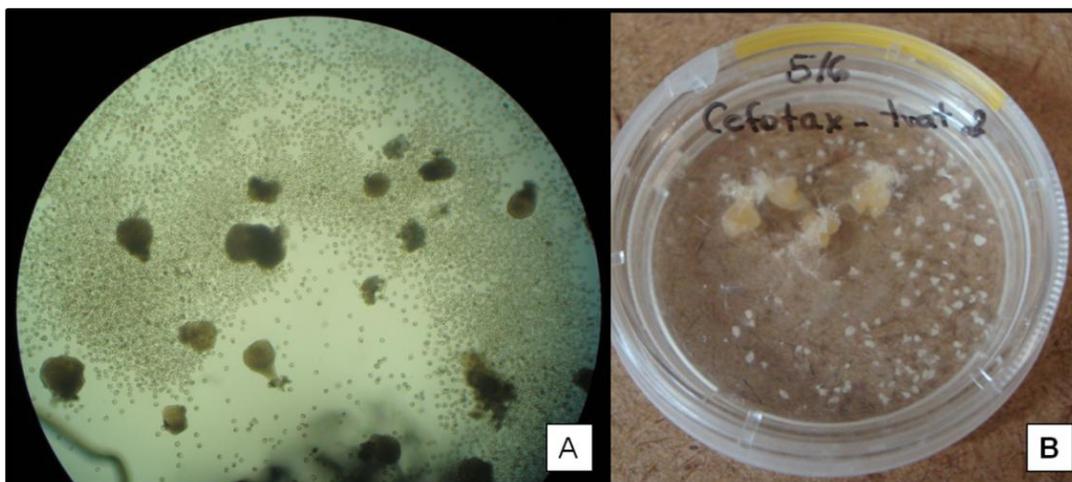


Figura 7 – A) Visualização dos embriões em microscópio óptico. B) Embriões formados do cruzamento entre Toropi x BRS 194, no meio de indução contendo cefotaxima (100 mg L^{-1}). Embrapa Trigo, Passo Fundo-RS, 2014.

Enraizamento das plantas

Para a formação do sistema radicular, as plantas obtidas foram transferidas para o meio de enraizamento (Figura 8). O meio de cultura utilizado nesta fase foi o ROOTING (EUDES et al., 2003), apresentado na Tabela 2.

As condições de incubação foram as mesmas da etapa de regeneração.



Figura 8 – Planta verde regenerada através da cultura de micrósporos isolados de trigo. Embrapa Trigo, Passo Fundo-RS, 2014.

Aclimatização e transferência das plantas para casa de vegetação

Quando as plantas apresentaram *in vitro*, um sistema radicular bem desenvolvido, as mesmas foram transferidas para potes contendo vermiculita molhada com solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1938). Os potes foram cobertos com um béquer invertido que foi retirado aos poucos, expondo gradativamente as plantas ao ambiente da câmara de crescimento, com condições controladas de luz e temperatura (Figura 9). Duas semanas após a antese, a fertilidade foi avaliada com base no conjunto de sementes.

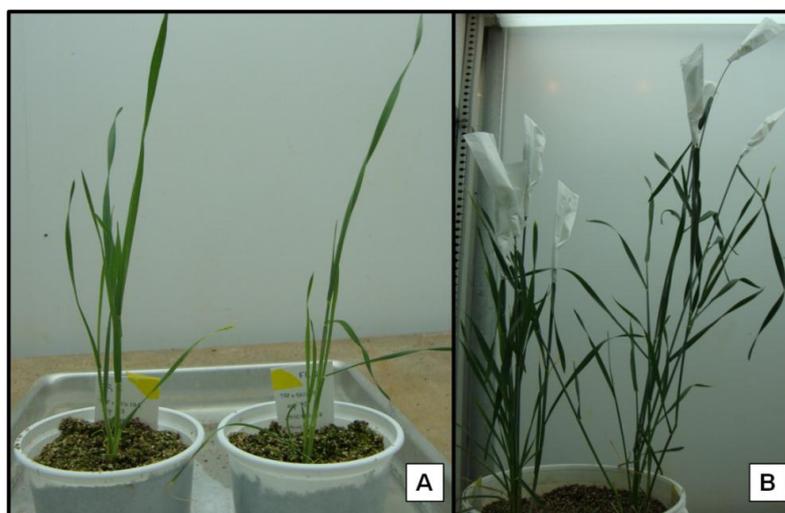


Figura 9 – A) Plantas expostas ao ambiente da câmara de crescimento. B) Plantas oriundas da cultura de micrósporos isolados após antese. Embrapa Trigo, Passo Fundo-RS, 2014.

Avaliação dos embriões formados e plantas regeneradas

Em cada experimento foram avaliados: número de embriões, número de plantas verdes e albinas formadas, e ocorrência de plantas duplo-haploides espontâneas ou haploides.

As avaliações dos embriões foram efetuadas no momento da transferência para o meio GEM.

Para avaliar a regeneração das plantas de trigo, foi contado o número de embriões com plantas verdes e albinas. Nas plantas verdes regeneradas, após a antese, foi avaliada a ocorrência de duplicação espontânea ou não dos cromossomos.

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o programa estatístico GENES (CRUZ, 2001).

Tabela 2 – Composição dos meios de cultura utilizados para extração e indução dos embriões - NPB-99 (KONZAK et al., 1999); germinação de embriões em monocotiledôneas – GEM (EUDES et al., 2003) e enraizamento – ROOTING (EUDES et al., 2003).

Composição (mg L⁻¹)	NPB-99	GEM	ROOTING
<i>Sais</i>			
KNO ₃	1415	1900	1900
(NH ₄) ₂ SO ₄	232	-	-
KH ₂ PO ₄	200	170	170
CaCl ₂ .2H ₂ O	83	440	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	93	370	370
NH ₄ NO ₃	-	165	1650
KI	0,4	-	0,83
MnSO ₄ .7H ₂ O	5	22	22
H ₃ BO ₃	5	6,2	6,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5	8,6	8,6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0125	0,2	0,2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0125	0,15	0,15
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,0125	0,25	0,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	37,3	37,3	37,3
Na ₂ EDTA	27,8	27,8	27,8
<i>Carboidratos</i>			
Maltose	90.000	15.000	-
Sacarose	-	5.000	10.000
Xilose	-	350	-
Ribose	-	350	-
Mio-inositol	50	200	-
<i>Aminoácidos</i>			
L-Glutamina	500	750	-
L-Asparagina	-	60	-
L-Arginina	-	30	-
Ácido γ-amino butírico	-	80	-
L-Serina	-	55	-
L-Alanina	-	30	-
L-Cistina	-	10	-
L-Leucina	-	10	-
L-Isoleucina	-	10	-
L-Prolina	-	10	-
L-Lisina	-	10	-

Tabela 2 – (continuação)

Composição (mg L⁻¹)	NPB-99	GEM	ROOTING
L-Fenilalanina	-	5	-
L-Triptofano	-	5	-
L-Metionina	-	5	-
L-Valina	-	5	-
L-Histidina	-	2,5	-
L-Treonina	-	2,5	-
L-Glicina	-	2,5	-
<i>Vitaminas</i>			
Piridoxina-HCl	0,5	1	-
Tiamina-HCl	5	1	-
Pantotenato	-	0,5	-
Ácido Nicotínico	0,5	1	-
Riboflavina	-	0,2	-
Ácido Fólico	-	0,2	-
Biotina	-	0,2	-
Betaína Clorada	-	7,9	-
Colina-HCl	-	10	-
Ácido Ascórbico	-	0,4	-
<i>Ácidos Orgânicos</i>			
Ácido Málico	-	1.000	-
Ácido Fumárico	-	200	-
Ácido Succínico	-	20	-
Ácido α -cetoglutárico	-	20	-
Ácido Pirúvico	-	5	-
Ácido Cítrico	-	5	-
Ágar	-	-	5.000
Gelrite	-	3.000	-
<i>Reguladores de crescimento</i>			
2,4-D	0,2	-	-
Kinetin	0,2	-	-
PAA	1	-	0,5
Espermina	-	1	-
Espermidina	-	4	-
Cefotaxima	0,0857	-	-
pH	7	5,8	6

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimentos 1 e 2

Os resultados apresentados nas análises de variância dos experimentos 1 e 2 (Apêndices A e B) permitem evidenciar que a fonte de variação tratamento (solução a) sulfato de cobre; b) manitol; c) sulfato de cobre + manitol) não demonstrou efeito significativo em nenhuma das variáveis avaliadas a 5% de probabilidade de erro, o que determina que a variação causada pelos pré-tratamentos foi de magnitude semelhante.

Três formas de pré-tratamentos foram comparados no presente estudo, em plantas de trigo F₁ oriundas do cruzamento entre Toropi x BRS 194, a fim de selecionar aquela mais eficiente para induzir a rota esporofítica de células de micrósporos, promovendo a formação de embriões e a regeneração de plantas verdes através da cultura de micrósporos isolados.

Com base na análise dos dados obtidos (Tabela 3), o isolamento de micrósporos a partir de anteras (experimento 1) mostrou valores baixos para a variável número de células mL⁻¹, visto que cada placa continha 3,0 mL de suspensão de micrósporos com uma densidade ajustada para 60.000 micrósporos por mL, quando comparado ao experimento 2, onde espiguetas inteiras (no lugar das anteras) foram usadas para extração dos micrósporos, formando um total de 17 placas no experimento 1 e 75 placas no experimento 2. O baixo número de células observado no experimento 1 pode ser fortemente explicado pelo ineficiente processo de trituração das anteras, etapa inicial no processo de extração e purificação das células. Mesmo após trituração, muitas anteras permaneceram intactas (Figura 5), impedindo a liberação das células destes tecidos. O processo de extração e liberação de células de micrósporos já foi objeto de estudo de muitos trabalhos, já que esta etapa é de fundamental importância para o sucesso do método (JÄHNE; LÖRZ 1995; ZHENG, 2003). As plantas doadoras de ambos os experimentos (1 e 2) exibiam ótimas condições fisiológicas e livres de patógenos e pragas. Por esta razão, a diferença na quantidade de células obtidas nos dois experimentos foi atribuída aos diferentes tecidos e processos de extração e purificação.

Tabela 3 – Número de células de micrósoros de trigo inoculadas em meio de indução.

Pré-tratamentos	Nº células mL ⁻¹
Experimento 1	
Sulfato de cobre	160.221
Manitol	410.806
Sulfato de cobre + manitol	415.665
Experimento 2	
Sulfato de cobre	958.910
Manitol	2.217.444
Sulfato de cobre + manitol	1.501.066

Outra característica importante na cultura de micrósoros isolados se baseia não apenas na quantidade de células purificadas, mas também na qualidade destas células. Um processo eficiente de isolamento das células deverá minimizar os possíveis danos causados pelo processo de trituração e/ou liberação das células de micrósoros (Figura 10). A presença de detritos e restos celulares poderá comprometer a qualidade dos micrósoros embriogênicos, mesmo que estes estejam presentes em grande quantidade, podendo interferir no desenvolvimento dos embriões pela liberação de compostos fenólicos e mudança na composição do meio, como pH e osmolaridade (LIU, et al., 2002a). Apesar das análises estatísticas não mostrarem diferenças significativas para a variável número de células mL⁻¹, foi possível observar um aumento considerável do número de células obtido com o mesmo número de espigas, no segundo experimento. Sabendo que apenas uma parte dos micrósoros seguirá a rota esporofítica, após estresse apropriado, conseguir aumentar o número de células purificadas aumenta as chances de um grupo maior de células conseguir desviar de sua rota gametofítica original.

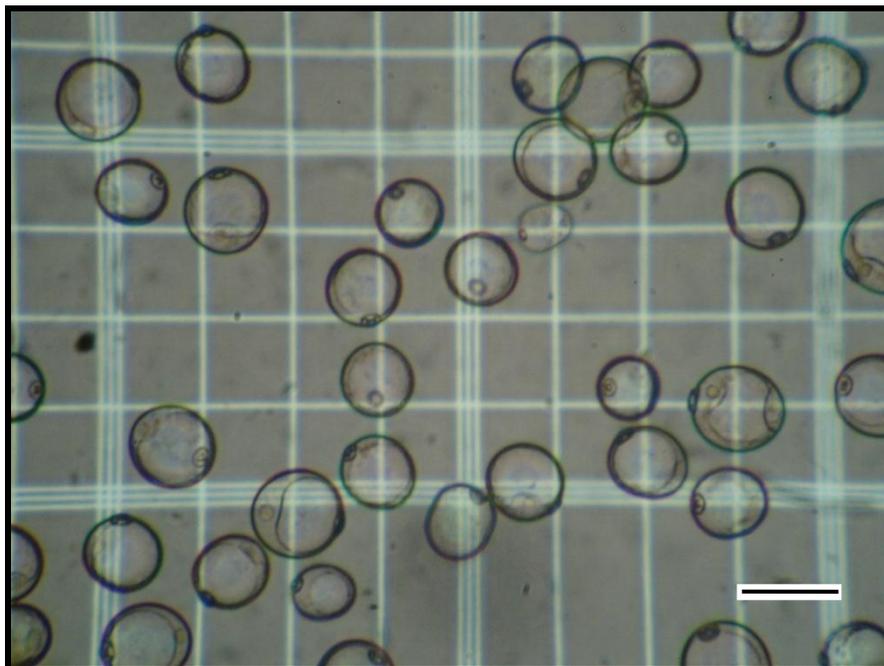


Figura 10 – Micrósporos uninucleados resultantes de um eficiente processo de purificação das células, livres de detritos e restos celulares. Barra equivale a 50 μm . Embrapa Trigo, Passo Fundo-RS, 2014.

Nos três experimentos, a formação dos embriões através da cultura de micrósporos isolados ocorreu entre 20 e 40 dias após plaqueamento das células no meio de indução. Estatisticamente não foi possível detectar diferença significativa entre os pré-tratamentos para a variável número de embriões (Tabela 4), pois a variação foi muito grande entre as placas. No experimento 1, por exemplo, no pré-tratamento com sulfato de cobre, as repetições (placas) variaram de zero até 45 embriões, no pré-tratamento com manitol essa variação foi de zero até 6 embriões, e no pré-tratamento com sulfato de cobre e manitol, as repetições variaram de zero a 3 embriões por placa (Apêndice C).

De acordo os dados apresentados na Tabela 4, é possível verificar que para a variável número de embriões o pré-tratamento com sulfato de cobre (15 μM) em ambos os experimentos (1 e 2) apresentou melhor desempenho quando comparado aos demais, onde o maior valor foi obtido no experimento 2 (128 embriões), seguido do experimento 1 (45 embriões). No experimento 2, a solução de pré-tratamento contendo sulfato de cobre e manitol não formou nenhum embrião.

Tabela 4 – Efeito de diferentes pré-tratamentos em anteras/espiguetas na resposta da cultura de micrósporos isolados do cruzamento entre Toropi x BRS 194.

Pré-tratamento	N° embriões	Pl. albinas		N° pl. verdes	
		N°	%	DH espontânea	Haploide
Experimento 1					
Sulfato de cobre	45	21	46,67	1	1
Manitol	6	3	50	0	0
Sulfato de cobre + manitol	4	0	0	0	0
Experimento 2					
Sulfato de cobre	128	41	32,03	1	0
Manitol	9	5	55,56	0	0
Sulfato de cobre + manitol	0	0	0	0	0

O desenvolvimento embriogênico durante a androgênese é dividido em três fases distintas: na primeira fase, a aquisição de potencial embriogênico por estresse envolve a repressão do desenvolvimento gametofítico e leva à desdiferenciação das células; na segunda fase, as divisões celulares levam à formação de estruturas multicelulares contidas pela parede da exina; e na terceira fase, os pró-embriões são liberados pelo rompimento da parede da exina (MARASCHIN et al., 2005b; SORIANO et al., 2013). Um problema encontrado com o pré-tratamento de cobre, por exemplo, (Figura 11) foi observado entre uma e duas semanas de cultura. A maioria dos pró-embriões multicelulares não foram capazes de explodir a exina dos micrósporos e abortaram. Esse problema também foi verificado por Hu e Kasha (1999).

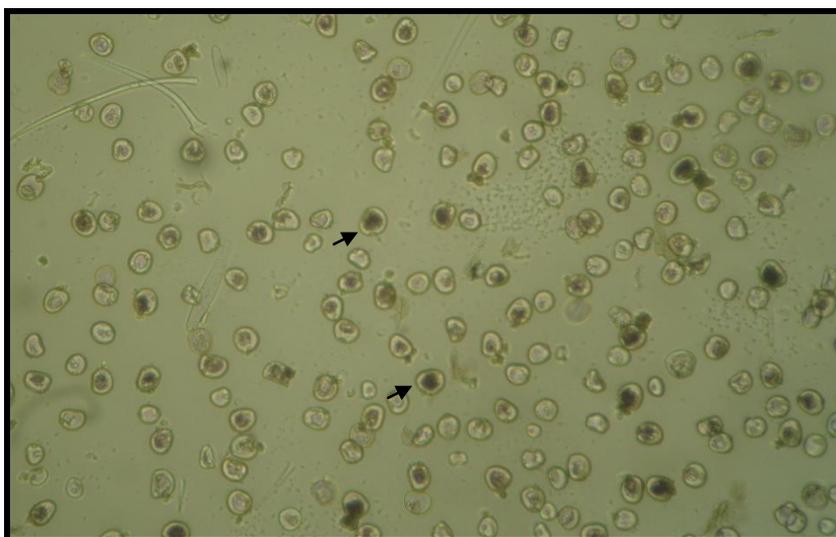


Figura 11 – Micrósporos embriogênicos incapazes de romper a exina (indicados pela seta). Embrapa Trigo, Passo Fundo-RS, 2014.

Embora neste trabalho os pré-tratamentos com base no manitol não tenham sido eficientes, apresentando baixa frequência de indução embriogênica e ausência de plantas verdes, muitos estudos têm mostrado a importância da pressão osmótica, durante o pré-tratamento, a fim de se obter plantas verdes. O manitol tem sido relatado por penetrar nas células facilmente e lentamente, devido à presença de seis grupos hidroxilas (DIAMOND; WRIGHT, 1969). Hu e Kasha (1999) relataram que o pré-tratamento das espigas combinando solução 0,4 M de manitol e frio por quatro dias em trigo, essencialmente, atrasou a divisão mitótica do núcleo, mantendo todos os micrósporos no mesmo estágio de desenvolvimento durante o pré-tratamento, e também aumentou a indução de embriões e regeneração de plantas verdes. Kasha et al. (2001b), verificaram que a combinação de baixa temperatura (4°C) mais manitol (0,3 M) por 3 a 4 dias foi muito eficaz para o pré-tratamento de espigas e resultou em uma maior proporção de regenerantes verdes do que outros pré-tratamentos usados no estudo. No trabalho também foi verificado o efeito da duração do pré-tratamento (4 a 28 dias) a frio (4°C) mais manitol (0,3 M) no genótipo de cevada Igri e os mesmos não foram cruciais para a resposta.

Também foi relatado por Labbani et al. (2007) que um pré-tratamento que consiste em um conjunto de manitol 0,3 M e frio durante 7 dias teve um forte efeito sobre o número de embriões produzidos e a regeneração de plantas verdes. Recentemente, Asif et al. (2013b) mostraram que a utilização de 9 g L⁻¹ manitol (350 mOsm kg⁻¹) no meio de indução (NPB-99) melhorou o número de embriões, regeneração de plantas verdes e minimizou o albinismo em trigo e triticale.

A baixa resposta embriogênica observada neste estudo pode estar relacionada com a recalcitrância do genótipo utilizado. De acordo com Liu et al. (2002b), alguns genótipos naturalmente respondem melhor do que outros ao pré-tratamento aplicado. Em experimentos realizados anteriormente pelo laboratório de Cultura de Tecidos/Embrapa Trigo (dados não publicados), utilizando-se plantas doadoras oriundas do mesmo cruzamento (Toropi x BRS 194) e com afilhos submetidos à pré-tratamento em baixa temperatura durante ± 21 dias, verificou-se a formação de um massivo número de plantas albinas e baixíssima regeneração de plantas verdes, indicando ter havido uma resposta positiva ao processo da androgênese, mas uma falha na formação de plantas verdes.

A produção de plantas verdes em trigo através da cultura de micrósporos isolados é problemática em relação à cultura de anteras ou hibridização trigo x

milho. Os principais fatores limitantes são a alta frequência de morte celular nas primeiras 24 h de cultura, baixa produção de embriões, efeitos genotípicos e alta frequência de plantas albinas (ASIF et al., 2013b). O albinismo, um dos grandes problemas encontrados na cultura de micrósporos isolados também foi observado neste trabalho (Figura 12). Quando a diferenciação dos plastídeos durante a embriogênese do micrósporo foi estudada em genótipo de cevada conhecido por regenerar muitas plantas albinas, características anormais que afetam principalmente o tamanho e estrutura de plastídeos foram encontradas (CAREDDA et al., 2000). Demonstrou-se que, após o tratamento de estresse, os plastídeos dos micrósporos tinham se diferenciado exclusivamente em amiloplastos, acumulando amido e perdendo seus tilacoides (CAREDDA et al., 2000). Neste trabalho, nos três pré-tratamentos testados, em ambos os experimentos, o sulfato de cobre e o manitol formaram mais plantas albinas do que verdes. Os maiores índices ocorreram nos pré-tratamentos com manitol, onde 55,56% e 50% de plantas albinas foram formadas no experimento 2 e 1, respectivamente. O pré-tratamento com sulfato de cobre foi responsável pela formação de 46,67% de plantas albinas no experimento 1 e 32,03% no experimento 2. A aplicação de sulfato de cobre durante o pré-tratamento tem mostrado diminuir o número de plantas albinas em trigo, como anteriormente mostrado na cevada, mas o mecanismo exato por trás do efeito benéfico de cobre não é entendido (JACQUARD et al., 2009). Jacquard et al. (2009) observaram que a concentração adequada de sulfato de cobre no pré-tratamento e no meio de indução afetou favoravelmente a sobrevivência dos micrósporos após a ativação do estresse, o número de anteras responsivas, a regeneração de plantas e a proporção de plantas verdes: albinas. Além disso, o sulfato de cobre induziu a desdiferenciação de amiloplastos em proplastídeos. O sulfato de cobre reduziu o número de plantas albinas para 2,2% em relação ao controle em Igri e para 18,7% em Cork, sendo que nessa última cultivar apenas plantas albinas poderiam ser regeneradas anteriormente (WOJNAROWIEZ et al., 2002; JACQUARD et al., 2009).

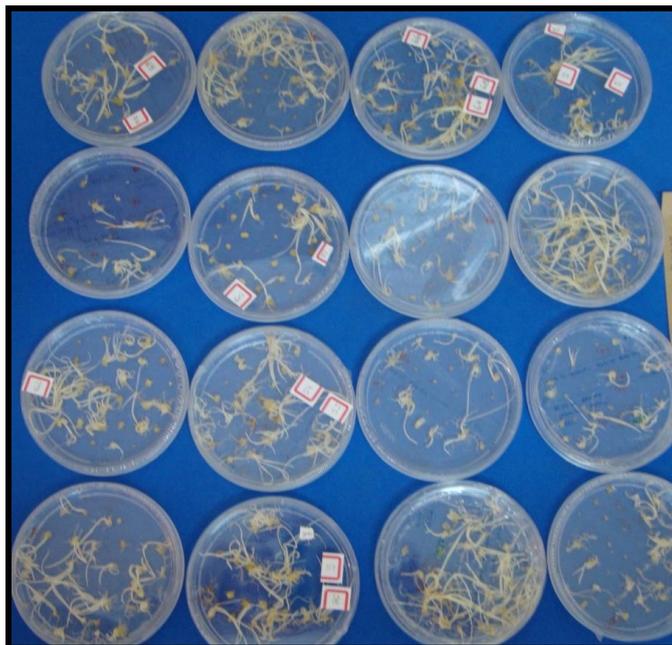


Figura 12 – Regeneração de plantas albinas em trigo. Embrapa Trigo, Passo Fundo-RS, 2014.

Com relação a variável número de plantas verdes, o melhor resultado foi obtido com o pré-tratamento com $15 \mu\text{M}$ de sulfato de cobre em ambos os experimentos (1 e 2). Com este pré-tratamento foi possível a obtenção de 45 embriões (transferidos para o meio de regeneração) e destes, foram obtidas duas plantas verdes, sendo uma delas com cromossomos duplicados espontaneamente no experimento 1, enquanto no experimento 2, dos 128 embriões formados, apenas um embrião regenerou planta verde duplo-haploide. A produção de plantas verdes extremamente baixa observada neste estudo mostrou que os diferentes pré-tratamentos aplicados na forma de estresse não foram suficientes para induzir a rota esporofítica, confirmando que o albinismo ainda representa um obstáculo para a androgênese. Assim, mais pesquisas serão necessárias visando à melhoria do protocolo, especialmente considerando que linhagens parentais são escolhidas com base em características agronômicas, e não pela compatibilidade de uma determinada metodologia e produção de duplo-haploides (SNAPE et al., 1986; HENRY et al., 1994). Não obstante, a adição de sulfato de cobre durante o pré-tratamento foi crucial para a obtenção das poucas plantas verdes regeneradas, uma vez que o cobre tem papel importante na biossíntese da clorofila e fotossíntese, estando diretamente envolvido como um componente da plastocianina na cadeia de transporte de elétrons (MAKSYMIEC, 1997; MAKOWSKA; OLESZCZUK, 2014). Este

pré-tratamento parece ser promissor e servirá como base para futuros estudos com a técnica. A influência positiva do cobre no processo da embriogênese dos micrósporos foi observada por Wojnarowiez et al. (2002) na cultivar de cevada Igri, influenciando tanto na redução do número de plantas albinas como no aumento do número de plantas verdes regeneradas, quando 10 μM de sulfato de cobre foi adicionado tanto no pré-tratamento com o no meio de cultura. Estes efeitos estão relacionados com uma maior sobrevivência dos micrósporos, durante a androgênese e com a sincronização da primeira divisão simétrica do micrósporo. Estudo recente, realizado por Brew-Appiah et al. (2013) para geração de linhas de trigo duplo-haploides transgênicas utilizando-se a técnica de micrósporos isolados mostrou que um pré-tratamento com solução de CuSO_4 (500 mg L^{-1} ; 2,0 mM) aplicado às espigas, a 4°C durante 10 dias resultou na recuperação de um grande número de plantas regenerantes verdes.

Neste estudo, foi possível observar que os pré-tratamentos testados levaram a um bloqueio do desenvolvimento gametofítico, mas, após o cultivo das células uninucleadas em meio de indução essas células foram incapazes de seguir o desenvolvimento esporofítico (Figura 13).



Figura 13 – Células sem resposta após 60 dias de cultivo. Embrapa Trigo, Passo Fundo-RS, 2014.

Experimento 3

Como o plantio das plantas doadoras foi feito de maneira escalonada, o início das coletas do terceiro experimento foi feito quando os resultados dos experimentos 1 e 2 já estavam próximos de serem finalizados. Desta forma, no experimento 3 os afilhos foram submetidos exclusivamente ao frio (4°C) como pré-tratamento, durante ± 21 dias. Além da diferença no pré-tratamento, também foi feita uma modificação nos meios de indução.

O terceiro experimento foi conduzido para avaliar a contribuição do sulfato de cobre, prolina (antioxidante de mitocôndria), glutathione (antioxidante de plastídeo) e cefotaxima (antibiótico) na resposta da embriogênese dos micrósoros em termos de número de embriões, plantas verdes, e albinas.

Os resultados apresentados pela análise de variância (Tabela 5) permitem evidenciar variações significativas a 5% de probabilidade de erro pelo teste F para a fonte de variação tratamento para todas as variáveis estudadas, excetuando-se número de plantas albinas, indicando que estas variáveis (nº de embriões, plantas verdes) são responsivas ao efeito dos diferentes tratamentos. Para a variável número de plantas verdes, os dados não seguiram distribuição normal e os mesmos foram submetidos à transformação com $\sqrt{x + 1}$.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância para as variáveis número de embriões, número de plantas verdes e albinas estudados nos diferentes tratamentos em micrósoros de trigo.

Fonte de variação	GL*	QM		
		Nº embriões	Nº pl. verdes ^Δ	Nº pl. albinas
Tratamentos	12	5777,55 *	4,29 *	67,72 ^{ns}
Erro	45	642,8	0,9	46,83
Média Geral		28,52	3,74	4,82
CV (%)		88,9	25,36	141,76

GL = graus liberdade; QM = quadrado médio; * significativo a 5% de probabilidade de erro; ^{ns} = não significativo; * variável nº pl. verdes apresenta GL = 3 para tratamento e GL = 8 para erro; ^Δ dados transformados $\sqrt{x + 1}$.

Na análise de comparação de médias (Tabela 6), é possível observar que para a variável número de embriões, os melhores resultados foram obtidos com a modificação no meio de indução, quando adicionou-se: a) sulfato de cobre (100,5 embriões); b) glutathione (107 embriões) e c) cefotaxima (100,33 embriões) no

genótipo responsivo a androgênese Pavon 76. No entanto, essa resposta não foi significativamente diferente dos tratamentos com glutathione (26,67 embriões) e cefotaxima (33,75 embriões) no cruzamento entre Toropi x BRS 194, e o tratamento com prolina (29,5 embriões) em Pavon 76. A presença dos demais tratamentos, assim como a junção dos tratamentos com sulfato de cobre não foram significativamente diferentes do tratamento controle no cruzamento entre Toropi x BRS 194.

Nas placas de Pavon 76, ocorreu em sua grande maioria o desvio da rota gametofítica para esporofítica, comprovado pela formação dos embriões e plantas verdes. As placas com tratamento controle que não formaram embriões são aquelas que, por alguma razão desconhecida, ficam inertes a qualquer tipo de estímulo.

Tabela 6 – Resposta da cultura de micrósporos isolados de trigo em resposta aos tratamentos testados no meio de indução.

Tratamentos		Nº embriões	Nº pl. albinas	Nº pl. verdes ^Δ
Toropi x BRS 194	Controle	5 b	2,67	0 c
	Sulfato de cobre	6,5 b	2,5	0 c
	Prolina	7 b	5	0 c
	Glutathione	26,67 ab	11	0 c
	Cefotaxima	33,75 ab	14	0 c
	Sulfato de cobre + sulfato de cobre	8 b	3,83	0 c
	Sulfato de cobre + prolina	0,4 b	0,2	0 c
	Sulfato de cobre + glutathione	13 b	5,87	0 c
	Sulfato de cobre + cefotaxima	17,37 b	7,87	0 c
Pavon 76	Controle	0 c	0	0 c
	Sulfato de cobre	100,5 a	1	10 ab
	Prolina	29,5 ab	1,5	2 b
	Glutathione	107 a	2,5	18 ab
	Cefotaxima	100,33 a	1,83	19,33 a

Concentrações dos tratamentos na placa: Sulfato de cobre (2,0 μM); Prolina (10 mM); Glutathione (2,0 μM); Cefotaxima (100 mg L⁻¹); Sulfato de cobre (2,0 μM) + sulfato de cobre (2,0 μM); Sulfato de cobre (2,0 μM) + prolina (10 mM); Sulfato de cobre (2,0 μM) + glutathione (2,0 μM); Sulfato de cobre (2,0 μM) + cefotaxima (100 mg L⁻¹). ^Δ transformação dos dados $\sqrt{x+1}$.

Com relação ao tratamento com glutathione (2,0 μM), este apresentou bom desempenho no número de embriões formados no genótipo responsivo, com uma média de 107 embriões e 18 plantas verdes regeneradas. Estes resultados estão de acordo com observações anteriores onde Cistué et al. (2009) mostraram que o

número de divisões e, portanto, o número de embriões e plantas verdes aumentou significativamente com a adição de glutathiona (90 mg L^{-1}) e glutamina ao meio de indução. O fornecimento exógeno de glutathiona ($2,0 \text{ }\mu\text{M}$) ajudou a reduzir o estresse oxidativo em plastídeos que levou à produção de mais plantas verdes em genótipos de trigo recalcitrantes (ASIF et al., 2013a). Neste estudo, no cruzamento recalcitrante a presença de glutathiona apresentou desempenho satisfatório, com uma média de 26,67 embriões formados que deram origem a 11 plantas albinas, mas nenhuma planta verde.

O ajuste da concentração de cobre parece ser um ponto-chave para promover a regeneração de plantas verdes, mas depende do tipo de cultura *in vitro* e a cultivar testada. Em cevada, Wojnarowicz et al. (2002) otimizando o protocolo de cultura de anteras, mostraram que o sulfato de cobre a $10 \text{ }\mu\text{M}$ no meio de cultura apresentou os melhores resultados, enquanto que a concentração ideal para a embriogênese somática a partir de escutelo é de $5,0 \text{ }\mu\text{M}$ (CHO et al., 1998). Os meios de cultura de tecidos vegetais geralmente contêm baixas concentrações de cobre. Com relação à androgênese em trigo, o meio usado como controle – NPB-99 (KONZAK et al., 1999) contém concentração padrão de $0,05 \text{ }\mu\text{M}$ de sulfato de cobre. Neste trabalho, a concentração de sulfato de cobre 40 vezes mais elevada ($2,0 \text{ }\mu\text{M}$) do que o meio controle não apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao meio controle para o cruzamento entre Toropi x BRS 194, mantendo o mesmo desempenho quando a concentração de cobre adicionada ao meio de indução foi de $4,0 \text{ }\mu\text{M}$ (80 vezes mais elevada). A presença de $2,0 \text{ }\mu\text{M}$ de sulfato de cobre no genótipo responsivo foi responsável por um dos melhores desempenhos no número de embriões com uma média de 100,5 embriões formados e 10 plantas verdes regeneradas.

A presença de cefotaxima no meio de indução, além de aumentar o número de embriões, também foi responsável pelo maior número de plantas verdes regeneradas (19,33) no genótipo Pavon 76. No entanto, essa resposta não foi significativamente diferente dos tratamentos com glutathiona e sulfato de cobre, onde uma média de 18 e 10 plantas verdes foram regeneradas, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com as observações anteriores, onde cefotaxima foi descrito por melhorar o crescimento do calo durante a embriogênese somática e subsequente regeneração de plantas em trigo (MATHIAS; BOYD, 1986). Da mesma forma, Grewal et al. (2006) relataram aumento da taxa de embriogênese somática

em arroz indica, usando cefotaxima. Efeitos semelhantes também foram obtidos com a inclusão do antibiótico cefotaxima (500 mg L^{-1}) no meio de cultura em três variedades de cana (MITTAL et al., 2009). Em estudos recentes, a adição do antibiótico cefotaxima demonstrou aumento substancial na formação de embriões e plantas verdes em triticale (50 mg L^{-1}) e trigo (100 mg L^{-1}) (ASIF et al., 2013c). A degradação da cefotaxima pelo metabolismo celular da planta pode produzir um composto metabólito que exerce atividade semelhante a de um regulador de crescimento que poderiam ser responsáveis pelos efeitos observados (MATHIAS; BOYD, 1986; MITTAL et al., 2009).

Neste estudo, a prolina apresentou comportamento semelhante ao meio controle para a variável número de embriões no cruzamento (Toropi x BRS 194), já no genótipo responsivo este tratamento mostrou um desempenho satisfatório, com uma média de 29,5 embriões formados, mas este tratamento significativamente reduziu o número de plantas verdes. Asif et al. (2013a) testaram um grupo de candidatos antioxidantes mitocondriais e dentre eles, a prolina (10 mM) aumentou o número de embriões em triticale e aumentou a produção de plantas verdes em triticale e na maioria das cultivares de trigo.

Em relação à formação de plantas albinas, não foram encontradas diferenças significativas no cruzamento (Toropi x BRS 194) e no genótipo Pavon 76. No cruzamento entre Toropi x BRS 194, os tratamentos testados no experimento 3 não levaram à produção de plantas verdes, mas houve a formação de embriões. Isso indica que o sinal dado aos micrósporos, neste caso, o pré-tratamento a frio durante ± 21 dias foi eficaz para desviar a rota gametofítica para a rota esporofítica, tornando-os competentes para a androgênese. No entanto, a capacidade de conversão dos embriões formados em plantas verdes é governada por mecanismos genéticos diferentes dos promotores da embriogênese do grão de pólen. Apesar de ser também um mecanismo genético, com grande variação entre genótipos diferentes, tais mecanismos poderiam ser minimizados ao se conseguir tentar otimizar os meios de regeneração.

4. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados preliminarmente obtidos no presente estudo, foi possível identificar que a solução de pré-tratamento contendo 15 μM de sulfato de cobre foi a mais eficiente para desencadear a embriogênese dos micrósporos e regenerar plantas verdes em trigo. Este pré-tratamento parece ser promissor e é essencial para a realização de novos experimentos para melhorar a sua resposta.

O meio de indução suplementado com 100 mg L^{-1} de cefotaxima mostrou-se eficaz tanto para aumentar a formação de embriões como para regeneração de plantas verdes em trigo.

O presente protocolo mostrou-se eficiente para regeneração de plantas verdes duplo-haplóides em genótipo de trigo responsivo à androgênese (Pavon 76), no entanto, ainda necessita de modificações para que possa ser aplicado numa maior gama de genótipos, em especial os conhecidos com recalcitrantes. Mais estudos abrangendo modificações nas etapas de pré-tratamento e na composição dos meios de cultura de indução e regeneração são recomendados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASIF, M. Androgenesis: A Fascinating Doubled Haploid Production Process. In: Progress and Opportunities of Doubled Haploid Production. **SpringerBriefs in Plant Science**, v. 6, p. 7-44, 2013.

ASIF, M.; EUDES, F.; GOYAL, A.; AMUNDSEN, E.J.; RANDHAWA, H.S.; SPANER, D.M. Organelle antioxidants improve microspore embryogenesis in wheat and triticale. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. DOI: 10.1007/s11627-013-9514-z, 2013a.

ASIF, M.; EUDES, F.; RANDHAWA, H.S.; AMUNDSEN, E.J.; SPANER, D. Induction medium osmolality improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. DOI 10.1007/s11627-013-9545-5, 2013b.

ASIF, M.; EUDES, F.; RANDHAWA, H.S.; AMUNDSEN, E.J.; YANKE, L.J.; SPANER, D.M. Cefotaxime prevents microbial contamination and improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 10, p. 1637-1646, 2013c.

BARCELLOS, A. L. **Genetica da resistencia de planta adulta a ferrugem da folha na cultivar brasileira de trigo Toropi (*Triticum aestivum* L. em Thell)**. Ph.D. thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 1994.

BRAMMER, S.P.; BARCELLOS, A.L.; MORAES-FERNANDES, M.I.B. de; MILACH, S.K. Bases genéticas da resistência durável à ferrugem da folha do trigo e estratégias biotecnológicas para o melhoramento no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 5-20, 2000.

BREW-APPIAH, R.A.T.; ANKRAH, N.; LIU, W.; KONZAK, C.F.; von WETTSTEIN, D.; RUSTGI, S. Generation of doubled haploid transgenic wheat lines by microspore

transformation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11: e80155. doi:10.1371/journal.pone.0080155, 2013.

CAREDDA, S.; DONCOEUR, C.; DEVAUX, P.; SANGWAN, R.S.; CLÉMENT, C. Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Sex Plant Reprod**, v. 13, p. 95-104, 2000.

CHO, M.J.; JIANG, W.; LEMAUX, P.G. Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. **Plant Science**, v. 138, p. 229–244, 1998.

CISTUÉ, L.; ROMAGOSA, I.; BATTLE, F.; ECHÁVARRI, B. Improvements in the production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated micropore culture. **Plant Cell Reports**, New York, v. 28, n. 5, p. 727-735, 2009.

CISTUÉ, L.; VALLÉS, M.P.; ECHÁVARRI, B.; SANZ, M.; CASTILLO, A.M. Production of barley doubled haploids by anther and microspore culture. In: MUJIB, A.; CHO, M-J.; PREDIERI, S.; BANERJEE, S. (eds) *In vitro* application in crop improvement. **Science Publishers, Inc., Enfield**, p. 1-17, 2004.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_10_15_07_19_boletim_graos_janeiro_2014.pdf>. Acesso em: janeiro de 2014.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001.

DIAMOND, J.M.; WRIGHT, E.M. Biological membranes-physical basis of ion and nonelectrolyte selectivity. **Annu Rev Physiol**. v. 31, p. 581-646, 1969.

DONG, L.; HUO, N.; WANG, Y.; DEAL, K.; LUO, M.; WANG, D.; ANDERSON, O.D.; GU, Y.Q. Exploring the diploid wheat ancestral A genome through sequence

comparison at the high-molecular-weight glutenin locus region. **Mol Genet Genomics**, p. 855-866, 2012.

DUNWELL, J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant Biotechnology Journal**. v. 8, p. 377–424, 2010.

ESTEVEES, P.; CLERMONT, I.; MARCHAND, S.; BELZILE, F. Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II-exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism. **Plant Cell Reports**, p. 1-9, 2014.

EUDES, F.; ACHARYA, S.; LAROCHE, A.; SELINGER, L.B.; CHENG, K.J. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.73, p.147-157, 2003.

FAN, Z.; ARMSTRONG, K.C.; KELLER, W.A. Development of microspores *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* L. **Protoplasma** v. 147, p. 191–199, 1988.

FELDMAN, M.; LUPTON, F.G.H.; MILLER, T.E. Wheats. In: SMARTT, J.; SINMONDS, N.W. (eds) Evolution of crops, Edition 2. **Longman Scientific, London**, p. 184–192, 1995.

FELDMAN, M. Wheats. In: SIMMONDS, N. W. (Ed.). Evolution of crop plants. **London: Longman**, p. 120-128, 1977.

FERREIRA, M. A.; CALDAS L. S.; PEREIRA E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH. v. 1, p. 21-43, 1998.

FERRIE, A.M.R.; CASWELL, K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. **Plant Cell, Tissue Organ Cult**, v. 104, p. 301–309, 2011.

FERRIE, A.M.R.; MÖLLERS, C. Haploid and doubled haploids in *Brassica* spp. for genetic and genomic research. **Plant Cell, Tissue Organ Cult**, v.104, p. 375–386, 2011.

FOLLING, L.; OLESEN, A. Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-derived callus and microspores by particle bombardment. **Plant Cell Reports**. New York, v. 20, n.7, p. 629-636, 2001.

FORSTER, B.P., HEBERLE-BORS, E., KASHA, K.J. AND TOURAEV, A. The resurgence of haploids in higher plants. **Trends Plant Sci**. v. 12, p. 368–375, 2007.

FOYER, C.H.; DESCOURVIERES, P.; KUNERT, K.J. Protection against oxygen radicals an important defense-mechanism studied in transgenic plants. **Plant Cell Environ**, v. 17, p. 507–523, 1994.

GREWAL, D.; GILL, R.; GOSAL, S.S. Influence of antibiotic cefotaxime on somatic embryogenesis and plant regeneration in indica rice. **Biotechnol J**, v. 1, p. 1158–1162, 2006.

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

HEBERLE-BORS, E. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. **Plant Science**, v.71, p.361-374, 1985.

HEBERLE-BORS, E. Isolated pollen culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. **Sex. Plant. Reprod**. v. 2, p. 1-10, 1989.

HEDDEN, P. The genes of the Green Revolution. **Trends in Genetics**, v. 19, n.1, p. 5-9, 2003.

HENRY, Y.; VAIN, P.; de BUYSER, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**. v.79, p. 45-58, 1994.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**. Circ. n. 347, 1938.

HU, T.C.; KASHA, K.J. A cytological study of pretreatment effects on isolated microspore culture of wheat *Triticum aestivum* cv. Chris. **Genome**, v.42, p.432-441, 1999.

HU, T.C.; ZIAUDDIN, A.; SIMION, E.; KASHA, K.J. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) in a defined media: I. Effects of pretreatment, isolation methods, and hormones. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 31, p. 79-83, 1995.

INDRIANTO, A.; BARINOVA, J.; TOURAEV, A.; HEBERLE-BORS, E. Tracking individual wheat microspores in vitro: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. **Planta**, v. 212, p. 163–174, 2001.

JACQUARD, C.; NOLIN, F.; HÉCART, C.; GRAUDA, D.; RASHAL, I.; DHONDT-CORDELIER, S.; SANGWAN, R.S.; DEVAUX, P.; MAZEYRAT-GOURBEYRE, F.; CLÉMENT, C. Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. **Plant Cell Reports**. v. 28, 1329-1339, 2009.

JÄHNE, A.; LÖRZ, H. Cereal microspore culture. **Plant Science**, Limerick, v. 109, n. 1, p. 1-12, 1995.

KAO, K.N.; SALEEM, M.; ABRAMS, S.; PEDRAS, M.; HORN, D.; MALLARD, C. Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. **Plant Cell Rep**. v. 9, p. 595-601, 1991.

KASHA, K.J.; HU, T.C.; ORO, R.; SIMION, E.; SHIM, Y.S. Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. **Journal of experimental botany**, v. 52, n. 359, p. 1227-1238, 2001a.

KASHA, K.J.; SIMION, E.; ORO, R.; YAO, Q.A.; HU, T.C.; CARLSON, A.R. An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. **Euphytica**. v.120, p.379-385, 2001b.

KIM, K.M.; BAENZIGER, P.S. A simple wheat haploid and doubled haploid production system using anther culture. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Gaithersburg, v. 41, p. 22-27, 2005.

KÖHLER, F.; WENZEL, G. Regeneration of isolated barley microspores in conditioned media and trials to characterize the responsible factors. **Journal of Plant Physiology**. v. 121, p.181-191, 1985.

KONZAK, C.F.; POLLE, E.A.; LIU, W.; ZHENG, Y. Methods for generating doubled-haploid plants. Int Patent Applic PCT/US99/19498, 1999.

KRZEWSKA, M.; CZYCZYŁO-MYSZA, I.; DUBAS, E.; GOŁEBIOWSKA-PIKANIA, G.; GOLEMIEC, E.; STOJAŁOWSKI, S.; CHRUPEK, M.; ZUR, I. Quantitative trait loci associated with androgenic responsiveness in triticale (*x Triticosecale* Wittm.) anther culture. **Plant Cell Rep**, v. 31, p. 2099-2108, 2012.

KUMARI, M.; CLARKE, H.J.; SMALL, I.; SIDDIQUE, K.H. Albinism in plants: a major bottleneck in wide hybridization, androgenesis and doubled haploid culture. **Critical Reviews Plant Sciences**, v. 28, p. 393-409, 2009.

LABBANI, Z.; BUYSER, J.de.; PICARD, E. Effect of mannitol pretreatment to improve green plant regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum* ssp. *durum* cv. 'Jennah Khetifa'. **Plant Breeding** v. 126, p. 565-568, 2007.

LAGOS, M. B. **História do Melhoramento do Trigo no Brasil**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisas Agronômicas, 1983.

LAGOS, M.B.; MORAES FERNANDES, M.I.B.; CAMARGO, C.E. de O., FEDERIZZI, L.C.; CARVALHO, F.I.F. Genetics and monosomic analysis of aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.14, p.1011-1020, 1991.

LARGE, E.C. Growth stages in cereals illustration of the Feeks scales. **Plant Pathology**, v.4, p. 22-24, 1954.

LARSEN, E. T.; TUVESON, I.K.D.; ANDERSEN, S. B. Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 82, p. 417-420, 1991.

LEÃO, F.S.C; GIRAFFA, H.A.R; MOTTA, J.C.M. **O trigo no Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1972.

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

LI, H.; DEVAUX, P. Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. **Plant Cell Rep**, v. 20, p.475–481, 2001.

LIU, W.; ZHENG, M.; POLLE, E.; KONZAK, C. Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 3, p. 686-692, 2002a.

LIU, W.; ZHENG, M.Y.; KONZAK, C.F. Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Cell Rep**. v. 20, p. 821-824, 2002b.

MACKEY, J. The boundaries and subdivision of the genus *Triticum*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 23 p. Trabalho apresentado no XII International Botany Congress, Leningrad, 1975.

MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K.J.; SZAREJKO, I. Published doubled haploid protocols in plant species. In: MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K.; FORSTER, B.P.; SZAREJKO, I. (eds) **Doubled haploid production in crop plants. A manual.** Kluwer, Dordrecht, p.309–335, 2003.

MAKSYMIEC, W. Effect of copper on cellular processes in higher plants. **Photosynthetica**, v.34, p. 321-342, 1997.

MAKOWSKA, K.; OLESZCZUK, S. Albinism in barley androgenesis. **Plant Cell Rep**, v. 33, p. 385–392, 2014.

MARASCHIN, S.F.; VENNIK, M.; LAMERS, G.E.; SPAINK, H.P.; WANG, M. Time-lapse tracking of barley androgenesis reveals position-determined cell death within pro-embryos. **Planta** 220:531–540, 2005a.

MARASCHIN, S.F.; de PRIESTER, W.; SPAINK, H.P.; WANG, M. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1711–1726, 2005b.

MATHIAS, R.J.; BOYD, L.A. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). **Plant Sci** v. 46, p. 217–223, 1986.

MEJZA, S.J.; MORGANT, V.; DIBONA, D.E.; WONG, J.R. Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum* L. **Plant Cell Rep**. v. 12, p. 149-153, 1993.

MITTAL, P.; GOSAL, S.S.; SENGER, A.; KUMAR, P. Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane. **Physiol Mol Biol Plants**, v. 15, p. 257–265, 2009.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. Obtenção de plantas haploides 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, 1990.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. de; CAETANO, V. da R.; SCHEEREN, P.; MOREIRA, J.C.S.; BRAMMER, S.P.; HAAS, J.C.; SILVA, S. dos A. Produção de linhagens duplo-haploides e lançamento da cultivar Trigo BR 43 na Embrapa Trigo, através de seleção simultânea para capacidade androgenética e caracteres agrônômicos. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 404p. p. 119-134, 2002.

MORAES-FERNANDES, M.I.B.; STIVAL, A.L.; BRAMMER, S.P., GRANDO, M.F. Haplodiploidização: genética e melhoramento. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB. v. 2, p. 613 - 650, 1999.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. de; ZANATTA, A.C.A.; PRESTES, A.M.; CAETANO, V.R.; BARCELLOS, A.L.; ANGRA, D.C.; PANDOLFI, V. Cytogenetics and immature culture embryo at Embrapa Trigo breeding program: transfer of disease from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). **Genetics and Molecular Biology**. v. 23, n. 4, p. 1051-1062, 2000.

MUÑOZ-AMATRIAÍN, M.; CASTILLO, A.M.; CHEN, X.W.; CISTUÉ, L.; VALLÉS, M.P. Identification and validation of QTLs for green plant percentage in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. **Mol Breeding**, v. 22, p. 119-129, 2008.

NEVO, E.; KOROL, A.B.; BEILES, A.; FAHIMA, T. Evolution of wild emmer wheat and wheat improvement. In: TENTH INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 1. Paestum. **Proceedings**: Istituto Sperimentale per la Cerealcoltura, p. 29-33, 2003.

OLESZCZUK, S.; SOWA, S; ZIMNY, J. Androgenic response to preculture stress in microspore cultures of barley. **Protoplasma**. v. 228, p. 95-100, 2006.

PALMER, C.E.; KELLER, W.A. Overview of haploidy. In: PALMER, C.E.; KELLER, W.A.; KASHA, K.J. (Ed.). **Haploids in Crop Improvement II**. Berlin: Springer-Verlag. p. 3-9, 2005.

PATEL, M.; DARVEY, N.L.; MARSHALL, D.R.; BERRY, J.O. Optimization of culture conditions for improved plant regeneration efficiency from wheat microspore culture. **Euphytica**, Wageningen, v. 140, n. 3, p. 197-204, 2004.

PAUX, E.; ROGER, D.; BADAIEVA, E.; GAY, G.; BERNARD, M.; SOURDILLE, P.; FEUILLET, C. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. **The Plant Journal**, v. 48, p. 463–474, 2006.

PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V.L.; ROSINHA, G.M.S. Produção de haploides e duplo-haploides. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 864p. v. 2, p. 569-611, 1999.

PULIDO, A.; BAKOS, F.; CASTILLO, A.; VALLÉS, M.; BARNABAS, B.; OLMEDILLA, A. Cytological and ultrastructural changes induced in anther and isolated-microspore cultures in barley: Fe deposits in isolated-microspore cultures. **J Struct Biol**, v. 149, p. 170–181, 2005.

RODRIGUES, R.L.; MARIATH, J.E.A.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Cultivo de anteras x cultivo de micrósporos isolados. **Biotecnologia Ciência e desenvolvimento**, ano VII, n. 33, 2004.

SANTOS, E.K.; ZANETTINI, M.H.B. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, v. 32, n.1, p. 165-173, 2002.

SCHEEREN, P.L.; CAIERÃO, E.; SÓ E SILVA, M.; BONOW, S. Melhoramento de trigo no Brasil. In: PIRES, J.L.F.; VARGAS, L.; CUNHA, G.R. da. **Trigo no Brasil: bases para produção competitiva e sustentável**. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, p. 427-452, 2011.

SCOTT, P.; LYNE, R.L.; REES, T. Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.). **Planta**, v. 197, p. 435-441, 1995.

SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore derived embryogenesis. **Physiologia Plantarum**, v. 134, p. 1-12, 2008.

SHARIATPANAHI, M.E.; BAL, U.; HEBERLE-BORS, E.; TOURAEV, A. Stresses applied for the reprogrammation of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. **Physiol. Plant.**v.127, p. 519-534, 2006.

SILVA, T.D. Microspore Embryogenesis. **Embryogenesis**, Dr. Ken-Ichi Sato (Ed.). p. 573 – 596, 2012.

SNAPPE, J.W., de BUYSER, J., HENRY, Y. SIMPSON, E. A comparison of methods of haploid production in a cross of wheat, *Triticum aestivum*. **Journal of Plant Breeding**. v. 96, p. 320-330, 1986.

SORIANO, M.; LI, H.; BOUTILIER, K. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. **Plant Reprod.** v. 26, p. 181–196, 2013.

THOMAS, W.T.B.; FORSTER, B.P.; GERTSSON, B. Doubled Haploids in Breeding. In: MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K.J.; FORSTER, B.P.; SZAREJKO, I. (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants: **A manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht**, p. 337-349, 2003.

TIWARI, B.S.; BELENGHI, B.; LEVINE, A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. **Plant Physiol**, v. 128, p. 1271-1281, 2002.

TORP, A.M.; ANDERSEN, S.B. Albinism in microspore culture. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B.P.; JAIN, S.M. (eds) Advances in haploid production in higher plants. **Springer, The Netherlands**. p. 155-160, 2009.

TOURAEV, A.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E. Initiation of microspore embryogenesis by stress. **Trends in Plant Science**, v.2, p.297-302, 1997.

TOURAEV, A.; PFOSSER, M.; HEBERLE-BORS, E. The microspore: a haploid multipurpose cell. **Adv. Bot. Res.** v. 35, p. 53–109, 2001.

TUVESSON, I.K.D.; ÖHLUND, R.C.V. Plant regeneration through culture of isolated microspores of *Triticum aestivum* L. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** v. 34, p. 163-167, 1993.

WOJNAROWIEZ, G.; JACQUARD, C.; DEVAUX, P.; SANGWAN, R.S; CLÉMENT, C. Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Sci.** v. 162, p. 843–847, 2002.

YU, Y.; WEI, Z.M. Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. **Biol Plant**, v. 52, p. 553–556, 2008.

ZANETTINI, M.H.B., LAUXEN, M.S. Reprodução Sexual nas Angiospermas, In: FREITAS, L.B., BERED, F. (org.) **Genética e Evolução Vegetal**. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 463 p, 2003.

ZHENG, M.Y. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis. **Plant Cell. Tissue and Organ Culture**, v. 73, p.213-230, 2003.

ZHENG, M.Y.; LIU, W.; WENG, Y.; POLLE, E.; KONZAK, C.F. Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals. **Plant Cell Rep.** v. 20, p. 685-690, 2001.

ZHENG, M.Y.; WENG, Y.; LIU, W.; KONZAK, C.F. The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Cell Rep**, v. 20, p. 802-807, 2002.

6. APÊNDICES

APÊNDICE A - Resumo da análise de variância para as variáveis número de células mL⁻¹, número de embriões e número de plantas albinas estudados nos diferentes pré-tratamentos em anteras de trigo – Experimento 1.

Fonte de variação	GL	QM		
		Nº células mL ⁻¹	Nº embriões	Nº pl. albinas
Tratamentos	2	7114893847 ^{ns}	176 ^{ns}	54 ^{ns}
Erro	6	8701773598	229,32	75
Média geral		109632,44	6,17	4
CV (%)		85,09	245,57	216,51

GL = graus liberdade; QM = quadrado médio; ^{ns} = não significativo; * variável nº pl. albinas apresenta GL= 1 para tratamento e GL = 4 para erro.

APÊNDICE B - Resumo da análise de variância para as variáveis número de células mL⁻¹, número de embriões e número de plantas albinas estudados nos diferentes pré-tratamentos em espiguetas de trigo – Experimento 2.

Fonte de variação	GL	QM		
		Nº células mL ⁻¹	Nº embriões	Nº pl. albinas
Tratamentos	1	1,97988E+11 ^{ns}	1752,32 ^{ns}	160,2 ^{ns}
Erro	6	56195220932	1206,42	120,4
Média geral		397044,25	17,1	5,78
CV (%)		59,7	203,12	190

GL = graus liberdade; QM = quadrado médio; ^{ns} = não significativo.

APÊNDICE C – Estatística descritiva Experimento 1.

		N° células mL ⁻¹	N° embriões	N° pl. albinas	N° pl. verdes	DH espontânea	Haploide
Sulfato de cobre	Média	41259	15	7	0,67	0,33	0,33
	Maior valor	54222	45	21	2	1	1
	Menor valor	18222	0	0	0	0	0
	Variância	266742738	450	98	0,89	0,22	0,22
	Desvio Padrão	16332,26	21,21	9,90	0,94	0,47	0,47
	CV(%)	39,58	141,42	141,42	141,42	141,42	141,42
Manitol	Média	126535,33	2,13	1	0	0	0
	Maior valor	297940	6	3	0	0	0
	Menor valor	24000	0	0	0	0	0
	Variância	14878679803,56	7,50	2	0	0	0
	Desvio Padrão	121978,19	2,74	1,41	0	0	0
	CV(%)	96,40	128,39	141,42	0	0	0
Sulfato de cobre + manitol	Média	138555	1,33	0	0	0	0
	Maior valor	186222	3,00	0	0	0	0
	Menor valor	44333	0	0	0	0	0
	Variância	4439098732,67	1,56	0	0	0	0
	Desvio Padrão	66626,56	1,25	0	0	0	0
	CV(%)	48,09	93,54	0	0	0	0

APÊNDICE D – Estatística descritiva Experimento 2.

		N° células mL ⁻¹	N° embriões	N° pl. albinas	N° pl. verdes	DH espontânea	Haploide
Sulfato de cobre	Média	239727,5	31,75	10,25	0,25	0,25	0
	Maior valor	552222	104	33	1	1	0
	Menor valor	60355	0	0	0	0	0
	Variância	36363680793	1807,19	177,19	0,19	0,19	0
	Desvio Padrão	190692,63	42,51	13,31	0,43	0,43	0
	CV(%)	79,55	133,89	129,87	173,21	173,21	0
Manitol	Média	554361	2,25	1,25	0	0	0
	Maior valor	924778	6	4	0	0	0
	Menor valor	376000	0	0	0	0	0
	Variância	47929150605	6,1875	2,6875	0	0	0
	Desvio Padrão	218927,27	2,49	1,64	0	0	0
	CV(%)	39,49	110,55	131,15	0	0	0
Sulfato de cobre + manitol	Média	375266,5	0	0	0	0	0
	Maior valor	542222	0	0	0	0	0
	Menor valor	182400	0	0	0	0	0
	Variância	16483405583	0	0	0	0	0
	Desvio Padrão	128387,72	0	0	0	0	0
	CV(%)	34,21	0	0	0	0	0

APÊNDICE E – Estatística descritiva Experimento 3.

			N° embriões	N° pl albinas	N° pl verdes
Toropi x BRS 194	Controle	Média	5	2,67	0
		Maior valor	21	13	0
		Menor valor	0	0	0
		Variância	62	22,56	0
		Desvio Padrão	7,87	4,75	0
		CV(%)	157,48	178,10	0
	Sulfato de cobre	Média	6,5	2,5	0
		Maior valor	19	8	0
		Menor valor	0	0	0
		Variância	60,25	10,75	0
		Desvio Padrão	7,76	3,28	0
		CV(%)	119,42	131,15	0
	Prolina	Média	7	5	0
		Maior valor	14	10	0
		Menor valor	0	0	0
		Variância	49	25	0
		Desvio Padrão	7	5	0
		CV(%)	100	100	0
	Glutaciona	Média	26,67	11	0
		Maior valor	38	18	0
		Menor valor	5	4	0
		Variância	234,89	32,67	0
		Desvio Padrão	15,33	5,72	0
		CV(%)	57,47	51,96	0
	Cefotaxima	Média	33,75	14	0
		Maior valor	83	29	0
		Menor valor	8	5	0
		Variância	853,69	81	0
		Desvio Padrão	29,22	9	0
		CV(%)	86,57	64,29	0
Sulfato de cobre + sulfato de cobre	Média	8	3,83	0	
	Maior valor	30	15	0	
	Menor valor	0	0	0	
	Variância	120,33	27,81	0	
	Desvio Padrão	10,97	5,27	0	
	CV(%)	137,12	137,56	0	
Sulfato de cobre + prolina	Média	0,4	0,2	0	
	Maior valor	2	1	0	
	Menor valor	0	0	0	
	Variância	0,64	0,16	0	
	Desvio Padrão	0,8	0,4	0	
	CV(%)	200	200	0	

	Sulfato de cobre + glutatona	Média	13	5,88	0
		Maior valor	49	21	0
		Menor valor	0	0	0
		Variância	357	65,86	0
		Desvio Padrão	18,89	8,12	0
		CV(%)	145,34	138,13	0
	Sulfato de cobre + cefotaxima	Média	17,38	7,88	0
		Maior valor	49	26	0
		Menor valor	0	0	0
		Variância	442,98	92,11	0
		Desvio Padrão	21,05	9,60	0
		CV(%)	121,13	121,87	0
Pavon 76	Controle	Média	0	0	0
		Maior valor	0	0	0
		Menor valor	0	0	0
		Variância	0	0	0
		Desvio Padrão	0	0	0
		CV(%)	0	0	0
	Sulfato de cobre	Média	100,5	1	10
		Maior valor	113	2	14
		Menor valor	88	0	6
		Variância	156,25	1	16
		Desvio Padrão	12,5	1	4
		CV(%)	12,44	100,00	40
	Prolina	Média	29,5	1,5	2
		Maior valor	32	2	4
		Menor valor	27	1	0
		Variância	6,25	0,25	4
		Desvio Padrão	2,50	0,50	2
		CV(%)	8,47	33,33	100
	Glutatona	Média	107	2,5	18
		Maior valor	123	4	21
		Menor valor	91	1	15
		Variância	256	2,25	9
		Desvio Padrão	16	1,5	3
		CV(%)	14,95	60	16,67
Cefotaxima	Média	100,33	1,83	19,33	
	Maior valor	165	5	30	
	Menor valor	10	0	5	
	Variância	2688,89	3,14	55,22	
	Desvio Padrão	51,85	1,77	7,43	
	CV(%)	51,68	96,64	38,44	

7. ANEXOS

ANEXO 1– Solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1938) utilizada para irrigar as plantas doadoras.

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	136,09
KNO ₃	101,11
Ca(NO ₃) ₂	164,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,48
NH ₄ NO ₃	80,5
<i>Micronutrientes</i>	
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,22
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
H ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,02
<i>Fe EDTA</i>	
Na ₂ EDTA	7,46
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,56