

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Cultura *in vitro* de micrósporos de trigo: efeito do pré-tratamento de espigas e do genótipo doador de ovários**

Mônica Bossardi Coelho

Passo Fundo

2017

Mônica Bossardi Coelho

Cultura *in vitro* de micrósporos de trigo: efeito do pré-tratamento de espigas e do genótipo doador de ovários

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Agronomia.

Orientador:

PhD. Magali Ferrari Grando

Coorientador:

Dra. Sandra Mansur Scagliusi

Passo Fundo

2017

CIP – Catalogação na Publicação

---

- C672c Coelho, Mônica Bossardi  
Cultura in vitro de micrósporos de trigo: efeito do pré-  
tratamento de espigas e do genótipo doador de ovários /  
Mônica Bossardi Coelho. – 2017.  
95 f. : il. color. ; 30 cm.
- Orientador: Prof. PhD. Magali Ferrari Grando.  
Coorientador: Dra. Sandra Mansur Scagliusi.  
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade  
de Passo Fundo, 2017.
1. Trigo - Produção. 2. Trigo - Melhoramento genético.  
3. Cultura in vitro. I. Grando, Magali Ferrari, orientador.  
II. Scagliusi, Sandra Mansur, coorientador. III. Título.

CDU: 633.11

# ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



**PPGAgro**

Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

**“CULTURA *IN VITRO* DE MICRÓSPOROS DE TRIGO: EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DE  
ESPIGAS E DO GENÓTIPO DOADOR DE OVÁRIOS”**

Elaborada por

**Mônica Bossardi Coelho**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em  
Agronomia – Produção e Proteção de Plantas

Aprovada em: 05/04/2017  
Pela Comissão Examinadora



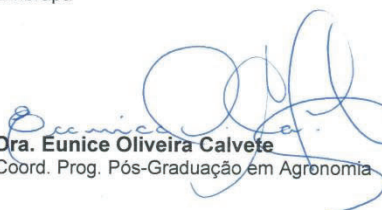
**Dra. Magali Ferrari Grando**  
Presidente da Comissão Examinadora  
Orientadora



**Dra. Eleni Yamazaki Lau**  
Embrapa



**Dra. Sandra Mansur Scagliusi**  
Embrapa Trigo  
Coorientadora



**Dra. Eunice Oliveira Calvete**  
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia



**Dra. Sandra Patussi Brammer**  
Embrapa Trigo



**Dr. Hejio Carlos Rocha**  
Diretor FAMV

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus incríveis pais, Danilo e Jane, por tudo que sempre fizeram por mim, jamais medindo esforços para a minha formação, e ao meu querido irmão Maurício, que mesmo longe sempre esteve junto comigo. Muito obrigada pelo valioso incentivo de sempre, pelo apoio e por acreditarem em mim. Sem vocês esta conquista não seria possível!

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à Universidade de Passo Fundo, por oportunizar a realização do Curso de Mestrado em Agronomia.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, Profa. PhD. Magali Ferrari Grando, a quem sempre muito admirei pelo amor, entusiasmo e competência exemplar que tem por sua profissão. Com certeza isso me direcionou a este trabalho. Agradeço por ter me recebido para essa jornada.

À Embrapa Trigo, por ter permitido o desenvolvimento deste estudo.

À minha coorientadora Dra. Sandra Maria Mansur Scagliusi, que antes de tudo, é um excelente ser humano. Obrigada pela valiosa e incansável contribuição, pela paciência, confiança e amizade. Agradeço muito por ter me guiado durante essa trajetória.

Ao professor Florindo Castoldi por sua solicitude, prontidão e pelo valioso suporte nas análises estatísticas.

À toda equipe do Laboratório de Biotecnologia por toda ajuda e pelos momentos de boas conversas e risadas.

Aos meus pais, Danilo e Jane, e meu irmão Maurício, que dentre tantas coisas de valor, me ensinaram o amor e me apresentaram a importância do caminho da honestidade e persistência, permitindo que eu alcançasse esse sonho. Muito obrigada pelo apoio incondicional.

Ao querido Felipe, por todo carinho, compreensão e força, principalmente nos momentos mais difíceis. Muito obrigada por ter estado ao meu lado nessa fase tão importante da minha vida.

Agradeço por fim, a minha família e todos os amigos, que souberam compreender minha ausência e por estarem sempre torcendo por mim.

## **EPIGRAFE**

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

## RESUMO

O trigo é uma das principais fontes alimentícias da população mundial, sendo um dos cereais mais cultivados no mundo. No Brasil, a produção de trigo não é suficiente para suprir o consumo interno anual, liderando a lista de importações da balança comercial brasileira. Objetivando alterar este quadro, o melhoramento genético tem buscado produzir novas cultivares com características de rendimento e qualidade superiores. Este processo, usualmente longo, pode ser abreviado através da produção de plantas duplo-haploides, permitindo reduzir consideravelmente o processo de obtenção de novas cultivares. O método, via cultura de micrósporos isolados, se destaca como promissor dentro das diversas ferramentas biotecnológicas aplicadas aos programas de melhoramento genético vegetal. Entretanto, apresenta entraves devido à sua alta dependência genotípica, limitando sua aplicação de maneira prática e rotineira. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar o protocolo de cultura de micrósporos isolados em trigo, modificando fatores exógenos à planta que interferem na resposta do método, como pré-tratamentos e genótipos doadores de ovários. Foi avaliada a resposta embriogênica das cultivares BRS 194, Embrapa 27 e Fielder, conhecidos, respectivamente, por produzir um grande número de plantas albinas, por ser altamente recalcitrante e por ser responsivo à cultura de micrósporos. As espigas foram submetidas a diferentes pré-tratamentos para indução da androgênese, sendo o frio (4°C) usado como padrão. Como doadores de ovários, foram testados os mesmos genótipos doadores de micrósporos. Os resultados mostraram haver uma forte interação entre os pré-tratamentos, os genótipos testados e os ovários, havendo respostas diferentes para cada combinação de tratamento. Houve maior indução da resposta androgênica quando Fielder foi usado como doador de ovários, independente do pré-tratamento aplicado às espigas e do genótipo testado. No entanto, a fisiologia das plantas doadoras se destacou como sendo determinante para o sucesso do processo androgênico, afetando a resposta até do genótipo responsivo ao método.

Palavras-chave: 1. *Triticum aestivum* L.. 2. Haploidização. 3. Cultura *in vitro*. 4. Androgênese 5. Co-cultura de ovários.



## ABSTRACT

Wheat is one of the main food sources of the world's population and represents the most widely grown cereal grain, occupying 17% of the total cultivated land around the globe. In Brazil, wheat production is not sufficient to supply the annual domestic consumption, leading the list of imports of the Brazilian trade balance. In order to change this scenario, genetic breeding programs have sought to produce new cultivars with better traits regarding superior yield and quality. This process, usually long, can be shortened through the production of double-haploid plants, considerably reducing the time to the development of new cultivars. Isolated microspore culture stands out as a promising biotechnological tool that could be efficiently applied to plant breeding programs. However, due to its high genotypic dependence, its application is hampered to be used in a large scale and routine practices. To overcome this limitation, the objective of this work was to improve the protocol of wheat isolated microspore culture, modifying plants exogenous factors that interfere in the response of the method, such as pre-treatments and ovary donor genotypes. The embryogenic response of three cultivars was evaluated: BRS 194, Embrapa 27 and Fielder, respectively known for producing: a) a large number of albino plants, b) negative control (highly recalcitrant) and c) positive control (highly responsive) to microspore culture. The spikes were submitted to different pre-treatments for induction of androgenesis, as cold (4 °C) used as the standard one. Ovary donor genotypes were also tested. The results showed a strong interaction between pre-treatments, genotypes and ovaries, with different responses for each treatment combination. The highest induction of androgenic response was obtained when Fielder was used as ovary donor, regardless of the pre-treatment applied to the spikes or the genotype. However, the status and physiology of donor plants greatly influenced the androgenic response, negatively affecting all three genotypes, including Fielder, the responsive control.

Keywords: 1. *Triticum aestivum* L.. 2. Haploidization. 3. *In vitro* culture. 4. Androgenesis. 5. Ovary co-culture.

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>   | <b>11</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b>  | <b>15</b> |
| 2.1      | <i>Origem e Evolução do Trigo</i>   | 15        |
| 2.2      | <i>O Trigo e o Melhoramento Genético</i>  | 18        |
| 2.3      | <i>Métodos de Produção de Plantas Duplo-Haploides e o Melhoramento Genético</i> | 19        |
| 2.4      | <i>Cultura de Micrósporos Isolados</i>  | 24        |
| 2.5      | <i>Microsporogênese: Desenvolvimento do Micrósporo e do Grão de Pólen</i>       | 25        |
| 2.6      | <i>Fatores Determinantes que Interferem no Processo Androgênico</i>             | 29        |
| 2.6.1    | Genótipo  | 29        |
| 2.6.2    | Fisiologia das Plantas Doadoras   | 30        |
| 2.6.3    | Estádio de Desenvolvimento do Grão de Pólen                                     | 31        |
| 2.6.4    | Pré-Tratamento  | 32        |
| 2.6.5    | Albinismo   | 35        |
| 2.6.6    | Meios de Indução  | 36        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>   | <b>40</b> |
| 3.1      | <i>Material Vegetal</i>   | 40        |
| 3.2      | <i>Germinação e Crescimento das Plantas Doadoras</i>                            | 41        |
| 3.3      | <i>Coleta</i>   | 42        |
| 3.4      | <i>Assepsia</i>   | 43        |
| 3.5      | <i>Pré-Tratamento das Espigas</i>   | 44        |
| 3.6      | <i>Isolamento e Purificação dos Micrósporos</i>                                 | 45        |
| 3.7      | <i>Indução</i>  | 46        |
| 3.8      | <i>Regeneração</i>  | 47        |
| 3.9      | <i>Enraizamento</i>   | 48        |
| 3.10     | <i>Aclimação</i>  | 48        |
| 3.11     | <i>Avaliação do Número de Embriões Formados</i>                                 | 49        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | <b>52</b> |
| 4.1      | <i>Condução das Plantas Doadoras em Ambientes Controlados</i>                   | 52        |
| 4.2      | <i>Indução</i>  | 56        |
| 4.3      | <i>Pré-Tratamento das Espigas</i>   | 59        |
| 4.4      | <i>Transferência de Embriões e Regeneração de Plantas</i>                       | 73        |
| 4.5      | <i>Transferência das Plântulas para Meio de Enraizamento</i>                    | 75        |

|   |           |
|---|-----------|
| <i>4.6 Transferência das Plântulas para a Vermiculita e Aclimação</i> | <i>76</i> |
| <b>5 CONCLUSÃO</b>  | <b>78</b> |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>   | <b>79</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>  | <b>80</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Entre os cereais mais cultivados no mundo, o trigo (*Triticum aestivum* L.) se destaca como uma das principais “commodities” agrícolas comercializadas, tendo contribuído de maneira histórica na formação da civilização humana, e representa, até os dias de hoje, uma das principais fontes da ingestão calórica da população mundial. No Brasil, a produção de trigo não é suficiente para suprir o consumo interno anual (10,5 milhões toneladas/ano), fazendo com que este cereal lidere a lista de importações da balança comercial brasileira, resultando em grandes prejuízos econômicos e à dependência da importação do trigo estrangeiro.

Por se tratar de cultura de grande importância econômica e estratégica para a segurança alimentar mundial, torna-se imperativo desenvolver programas de melhoramento genético, que gerem cultivares de trigo mais produtivas, adaptadas e tolerantes aos estresses bióticos e abióticos, elevando a média de produção brasileira e buscando atender a demanda nacional necessária, e ainda, vislumbrando um cenário de crescente evolução demográfica e rápidas mudanças climáticas. Assim, na busca por soluções para os mais variados tipos de estresses que afetam a cultura (estresse hídrico, alumínio tóxico no solo, ferrugem da folha, fusariose e brusone), além de buscar continuamente pelo aumento do potencial produtivo e da qualidade de grãos, novos programas de melhoramento genético devem ser estabelecidos com abordagens assertivas e inovadoras. Para isso, a geração de novos materiais com características superiores deve ser feita de maneira contínua e acelerada, tornando possível a renovação de germoplasma de maneira mais eficiente, proporcionando resultados visíveis e com impacto direto na competitividade dos programas de melhoramento genético da cultura.

Para o alcance destes desafios, faz-se necessário o uso tecnologias que visem acelerar estes processos, minimizando o tempo e contribuindo diretamente no desenvolvimento de novas linhagens e cultivares.

De maneira inversa à velocidade necessária para obtenção de novas cultivares de trigo, o processo convencional de geração de ativos biológicos, que darão origem a novos genótipos, é extremamente demorado e trabalhoso, necessitando de aproximadamente 14 anos para sua conclusão. Este processo depende essencialmente, entre outros fatores, de um número significativo de plantas geneticamente estáveis e homozigotas. Para que a homozigose seja obtida, utilizando-se do método convencional, são necessários em média, de sete a nove ciclos de autofecundação, levando muitos anos até que a estabilidade genética seja totalmente alcançada.

Por outro lado, utilizando-se de recursos biotecnológicos como a cultura de tecidos, é possível minimizar o tempo de formação de novos genótipos, acelerando expressivamente o processo de desenvolvimento de novas cultivares. Através da produção *in vitro* de plantas haploides (haploidização) com posterior duplicação do genoma, plantas totalmente homozigotas são obtidas em uma única geração, facilitando a seleção de genótipos desejáveis, além de proporcionar efetiva redução de custos, espaço e mão de obra (DUNWELL, 2010), oferecendo aos programas de melhoramento genético, um avanço significativo no processo de criação de novas cultivares. Através da haploidização, é possível a completa regeneração de uma nova planta originada de uma célula gamética não-fecundada, possuindo assim, a metade do seu patrimônio genético (metade do número de cromossomos da espécie). Por serem originadas de gametas não-fecundados, estas plantas se caracterizam na maioria das vezes, por serem estéreis, havendo a necessidade de duplicar, de maneira espontânea ou induzida, seus cromossomos. Posteriormente, sua fertilidade é restaurada, voltando ao seu nível de ploidia original e tornando-se duplo-haploide (MORAES-FERNANDES, 1990).

As plantas duplo-haploides (DH) obtidas passam a ser homozigotas e uniformes para todos os *loci* de seus cromossomos, em apenas uma única geração, podendo então ser usadas imediatamente nos processos de seleção e melhoramento varietal. Além do rápido alcance da homozigose para atender os programas de melhoramento, também é possível, através da haploidização, realizar estudos genéticos dos mais variados tipos: detecção de ligações e interações gênicas, estimativa de variância genética e o número de genes para características quantitativas, além de facilitar a inserção de genes via transformação genética e estudos de mutação.

Diferentes métodos já foram descritos para a obtenção de plantas DH, como a hibridização interespecífica ou intergenérica, a partenogênese e a androgênese. Dentre as diferentes estratégias já estabelecidas, em cereais destacam-se a hibridização e a androgênese (TADESSE et al., 2012). Ambos os métodos possuem vantagens e limitações, as quais deverão ser consideradas na escolha de qual método será usado.

A produção de DH através da hibridização é alcançada pelo cruzamento artificial de plantas de espécies ou gêneros sexualmente incompatíveis ou distantemente relacionados, ocorrendo a completa eliminação uniparental do genoma masculino, originando um embrião sem carregar o material genético da espécie doadora do pólen (GERNAND et al., 2005; KOMEDA; et al., 2007). Assim, as plantas desenvolvidas através deste procedimento contêm apenas o genoma haploide materno (NIU et al., 2014). Embora seja conhecido por apresentar menor dependência genotípica, a aplicabilidade do método via hibridização, acaba sendo limitada em função da sua laboriosa execução, em virtude das numerosas etapas que identificam o método: o cultivo de plantas de diferentes espécies para uso do pólen exógeno (muitas vezes em condições ambientais diferentes da planta alvo de estudo), a emasculação, a polinização, a aplicação de reguladores de crescimento para viabilizar a fecundação, o resgate *in vitro* dos embriões imaturos haploides, além do emprego de substâncias que promovem a duplicação cromossômica, para restaurar a fertilidade da planta haploide formada.

Diferentemente da hibridização, a androgênese consiste na regeneração de uma nova planta originada do gameta masculino (o micrósporo) que, após alteração da sua rota de desenvolvimento, é capaz de originar um novo indivíduo, contendo apenas seu número haploide (ou gamético) de cromossomos (BARNABÁS et al., 2001). Como principal característica deste método, podemos citar a simplicidade dos protocolos, sendo desnecessárias as etapas de emasculação e polinização da hibridização intergenérica, não havendo a necessidade de se manter plantas de outras espécies como doadoras de pólen, além de oferecer uma maior variabilidade genética, em virtude do maior número de células gaméticas masculinas, comparada às femininas. Apesar de mais simples, a obtenção de DH via androgênese também se caracteriza por ser “genótipo-dependente”, dificultando a sua aplicação para um grande número de genótipos. A haploidização via androgênese (utilizando-se das células gaméticas *masculinas*), pode ser obtida através de duas técnicas distintas: pelo cultivo de anteras e pela cultura de micrósporos isolados. A técnica de micrósporos isolados

oferece uma série de vantagens e aplicações sobre a de anteras, sendo uma delas a possibilidade de seleção *in vitro* para caracteres expressos no estado gametofítico, permitindo estudos citológicos e moleculares, eliminando os efeitos adversos originados dos tecidos das anteras (efeito materno).

De forma semelhante a outros complexos processos biológicos envolvendo múltiplos fatores e inúmeras etapas, a embriogênese do micrósporo e sua eficiência para produzir duplo-haploides é dependente e está fortemente associada a muitos aspectos endógenos e exógenos peculiares do método, sendo alguns mais determinantes que outros. Dentre eles, o genótipo é o fator mais decisivo para tal sucesso, os quais podem variar notavelmente na sua capacidade de responder e na sua propensão para produzir embriões e plantas.

Desse modo, em função das limitações dos métodos aqui descritos e da relevância dos duplo-haploides para os programas de melhoramento, é de fundamental importância buscar formas de otimizar tais protocolos, viabilizando a regeneração de um maior número de plantas férteis a partir de uma única espiga, além de aumentar a eficiência do processo de seleção na criação de novos genótipos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de otimizar o protocolo de produção de DH via cultura de micrósporos isolados, ampliando a base genética apta ao método, modificando fatores exógenos ao processo androgênico. Foram estudados os efeitos de duas variáveis que atuam de maneira direta (pré-tratamento das espigas) e indireta (genótipos doadores de ovários) na embriogênese do micrósporo, buscando permitir que esta valiosa ferramenta possa ser usada em larga escala, acelerando a formação de ativos biológicos, que poderão ser usados, tanto para estudos genéticos, como em programas de melhoramento genético vegetal na obtenção de novas cultivares.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Origem e Evolução do Trigo

A história da origem e evolução do trigo se confunde com a história da agricultura, cujo início ocorreu por volta de 10.000 anos AC, durante a Era Neolítica, período conhecido como a “Revolução Neolítica”, marcado pela transição da caça e da colheita de alimentos para o início da prática da agricultura (DUBCOVSKY; DVORAK, 2007). Pertencente à tribo Triticeae e à família Poaceae, o trigo tem como centro de origem a região do Oriente Médio e é proveniente do cruzamento de outras plantas silvestres oriundas das redondezas dos rios Tigre e Eufrates, sendo uma das primeiras espécies a ser cultivada na história (COOPER, 2015). Algumas espécies de gramíneas silvestres foram relatadas como possíveis doadoras dos genomas que fazem parte da espécie de trigo hoje cultivada (*Triticum aestivum* L.), conforme ilustrado na Figura 1. As plantas originadas dos cruzamentos entre estas espécies selvagens foram ao longo dos anos sendo cultivadas e localmente selecionadas, supostamente devido ao seu rendimento superior e outras características notáveis, ocorrendo, mesmo que involuntariamente, os primeiros indícios do processo de melhoramento de plantas de forma clara e não-científica (SHEWRY, 2009). Após sucessivas mudanças genéticas durante o processo de domesticação, o trigo saiu de seu local de origem e sua dispersão ocorreu aos poucos para todos os continentes, fazendo com que seu cultivo se tornasse uma condição crucial à civilização humana, e respondendo, até os dias de hoje, por até 20% do total da ingestão calórica da população mundial (PENG; SUN; NEVO, 2011).



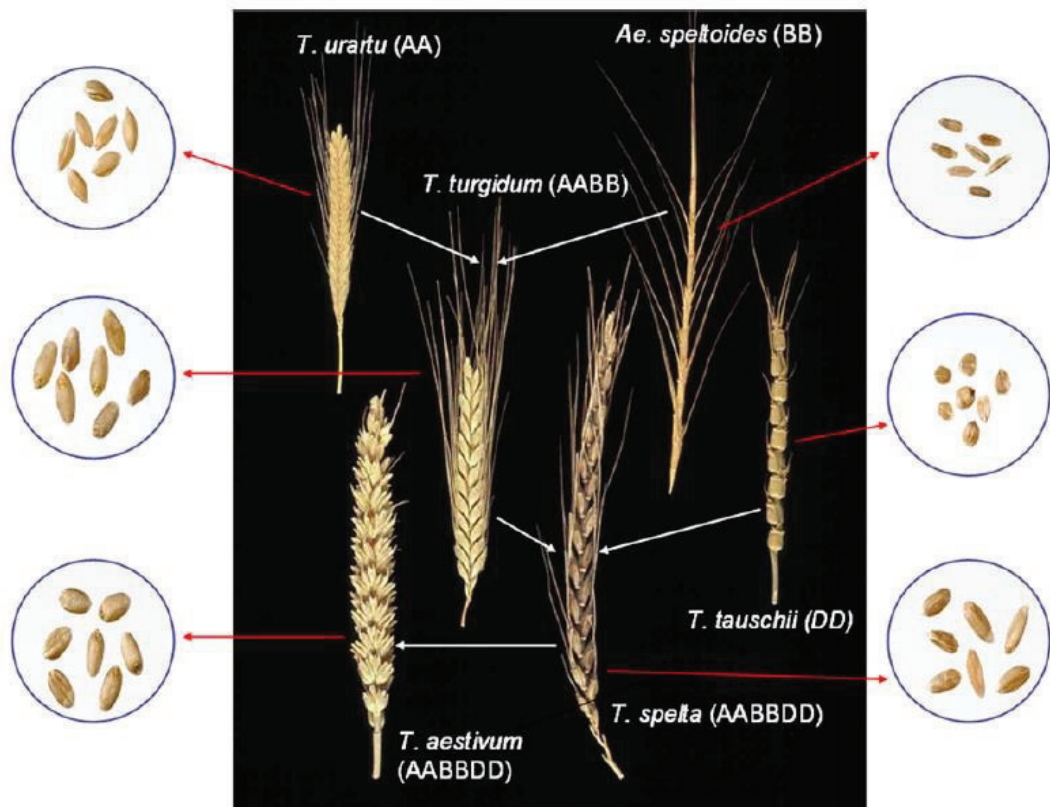


Figura 1- Relação evolucionária e genômica entre as espécies cultivadas de trigo (*Triticum aestivum* L. e *T. turgidum* spp. *durum*) e as espécies diploides selvagens. Modificado de Snape e Pankova (2006) e Shewry (2009), com permissão de reprodução da editora John Wiley & Sons Ltd.

O trigo caracteriza-se por ser uma espécie autógama e hexaploide, constituída pelos genomas AA, BB e DD resultante de hibridizações interespecíficas seguidas de duplicações cromossômicas que ocorreram naturalmente ao longo do tempo, viabilizando o surgimento de características jamais vistas em função das novas combinações genéticas. O primeiro evento de poliploidização ocorreu entre 500.000 a 150.000 anos atrás, entre *Triticum urartu* ( $2n=2x=14$  cromossomos, genoma AA) e uma espécie desconhecida, possivelmente extinta, estreitamente relacionada com *Aegilops speltoides*, criando assim uma nova espécie com 14 pares de cromossomos, *Triticum turgidum* L. ssp. *dicoccoides* (ou *T. dicoccoides*,  $2n=4x=28$  cromossomos, genoma AABB). Esta espécie foi então domesticada e evoluiu como *T. turgidum* ssp. *dicoccum* Schübl. (ou *T. dicoccum*), que é progenitor do trigo duro (*Triticum turgidum* subsp. *durum*). O segundo evento de poliploidização ocorreu há cerca de 10.000 anos, entre o tetraploide domesticado *T. turgidum* e a espécie selvagem diploide *T. tauschii*

(DD), originando a espécie hexaploide hoje cultivada *Triticum aestivum* L., ( $2n=6x=42$  cromossomos, genoma AABBDD) (CHARMET, 2011).

Com a domesticação da espécie, a cultura tritícola tornou-se a base de sustentação para o desenvolvimento agrícola mundial, impulsionando avanços científicos e tecnológicos nesta área. Ao longo do tempo, o cereal adquiriu notável importância, sendo um dos mais plantados ao redor do mundo, oferecendo em termos de proteína, cerca de 20% da totalidade necessária à alimentação humana (DONG et al., 2012). A cultura também gerou demanda por equipamentos e outros produtos agrícolas nas diversas etapas do processo de produção, desde a lavoura até a industrialização do grão, alavancando o desenvolvimento industrial e da agricultura. Esse progresso abriu caminho e deu suporte para o crescimento de outras espécies agrícolas importantes, tais como soja e arroz (PIANA; CARVALHO, 2008).

Em contrapartida à evolução do trigo cultivado, a seleção de traços genéticos que os separavam de seus ancestrais selvagens, de maneira consciente ou inconsciente feita pelo homem, foi lentamente impondo mudanças no cereal, tornando-o dependente da interferência humana e dos ambientes por ela modificados, tornando-o mais sensível a condições ambientais desfavoráveis (FULLER, 2007; SHEWRY, 2009). Essas mudanças resultaram num processo hoje identificado como a “síndrome da domesticação”, onde características fenotípicas de uma determinada espécie ou planta cultivada (alteradas antropologicamente) se distinguem consideravelmente dos seus ancestrais silvestres (BROWN et al., 2009). Por meio deste fenômeno, foram eliminadas informações genéticas anteriormente existentes, responsáveis por grande parte da variabilidade gênica, resultando assim, num estreitamento da base genética das espécies hoje cultivadas. Em busca da criação de novas variedades com alto potencial de rendimento, estes eventos foram repetidamente incorporados nos programas de melhoramento genético, perdendo-se muito da diversidade das variedades crioulas e cultivares antigas. Assim, com interesse de se obter resistência e tolerância a estresses bióticos e abióticos, hoje os melhoristas direcionam seus esforços com o objetivo de reparar a diversidade genética perdida, por meio da introdução de forma científica e planejada de genes das espécies ancestrais selvagens.

## 2.2 O Trigo e o Melhoramento Genético

O melhoramento de trigo no Brasil teve início em 1919, quando o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou estações experimentais localizadas em Alfredo Chaves (hoje município de Veranópolis, Rio Grande do Sul) e em Ponta Grossa, Paraná (CAIERÃO et al., 2013; 2014). Em virtude disso, passaram a ser oferecidas, as primeiras cultivares de trigo obtidas mediante a seleção de germoplasma introduzido em áreas coloniais (SOUSA, 1998). Como um marco importante, no ano de 1924, o geneticista sueco Iwar Beckman deu início aos seus estudos na antiga Estação de Seleção de Sementes de Alfredo Chaves, realizando a primeira hibridização de trigo no Brasil (linhagem Alfredo Chaves x Polysu). Dentre os genótipos oriundos desse cruzamento (de maneira indireta), destacou-se a cultivar Frontana, que apresentava os caracteres de boa adaptação local, precocidade, porte intermediário e resistência à ferrugem-do-colmo. Como consequência, Frontana tornou-se a base para muitas das atuais cultivares brasileiras, sendo muito utilizada em programas de melhoramento no Brasil e no mundo (PIANA; CARVALHO, 2008). Durante o início da década de setenta, novos caminhos foram abertos para ampliar o desenvolvimento da pesquisa em trigo, impulsionados pela criação de novos centros de pesquisa, dentre eles a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa (CAIERÃO et al., 2013; 2014). Desde então, avanços significativos vêm sendo obtidos nos últimos anos, resultando em novas variedades e linhagens, apresentando, com frequência, constante elevação do potencial genético. Mais recentemente, os programas de melhoramento genético têm buscado novos alelos em espécies selvagens (VEASEY et al., 2011), objetivando fundamentalmente, o aumento de produtividade, porém buscando também, uma melhor arquitetura de planta e resistência e tolerância a estresses bióticos e abióticos (PIANA; CARVALHO, 2008; SOUSA; CAIERÃO, 2014). A qualidade tecnológica do trigo também tem merecido atenção, envolvendo atributos como uso final do grão, valor nutritivo, teor de amido e proteína, aspecto comercial do grão, entre outras características. Contudo, o desenvolvimento de cultivares tolerantes a estresses como seca, baixa fertilidade dos solos e resistência a pragas e doenças talvez sejam uma das maiores contribuições do melhoramento à agricultura (MACHADO, 2014).

De modo geral, apesar de progressos evidentes observados ao longo de quase um século de pesquisa em trigo, uma das principais dificuldades para a obtenção de novas

cultivares com características desejáveis, se refere ao tempo de formação de um novo genótipo. Por ser uma espécie autógama, os métodos de melhoramento empregados na cultura do trigo se baseiam em hibridizações ou retro-cruzamentos, seguidos de seleção para uniformidade das características desejadas. Para atingir esta uniformidade, são necessários de sete a nove ciclos de autofecundação e de seis a sete anos de avaliação das linhagens em experimentos regionais, o que resulta num montante de doze a quinze anos, desde o cruzamento inicial até a liberação da nova variedade (CAMARGO, 1993).

Assim, buscando abreviar as etapas do processo de formação de novas cultivares, a biotecnologia, quando empregada durante as etapas de obtenção da homozigose, pode atuar como uma ferramenta propulsora capaz de maximizar a precisão e o sucesso dos programas de melhoramento. Suas aplicações têm auxiliado no desenvolvimento da agricultura e na geração de emprego e renda, baseando-se no conhecimento e na inovação. Das estratégias biotecnológicas já utilizadas, a cultura de tecidos e a biologia molecular são as que mais têm trazido resultados práticos para a agricultura (FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998). Utilizando-se da cultura de tecidos, através da totipotência celular (capacidade de uma célula ou tecido em regenerar o fenótipo do organismo completo e diferenciado do qual ela é derivada – sem haver fecundação), é possível abreviar significativamente as etapas de obtenção de novas cultivares, impactando não apenas no tempo, mas também nos recursos investidos de maneira mais limpa e com menor impacto ambiental.

### **2.3 Métodos de Produção de Plantas Duplo-Haploides e o Melhoramento Genético**

Embora a obtenção de novas cultivares seja extremamente necessária para atender às demandas permanentes de uma população crescente e os desafios de um clima em mudança, o desenvolvimento de cultivares é um processo muito lento e demorado, levando muitos anos para sua conclusão. Este processo depende principalmente da obtenção de plantas geneticamente estáveis e homozigotas. Pelo método convencional de melhoramento de plantas, a homozigose é alcançada por meio da realização de sete a nove ciclos de autofecundações, no qual são necessárias pelo menos seis gerações para se alcançar níveis mínimos de homozigose aceitáveis, antes de se testar o desempenho agrônômico das linhagens obtidas (DWIVEDI et al., 2015). No entanto, pelo método de produção *in vitro* de

plantas duplo-haploides (DH), é possível chegar à homozigose em uma única geração, reduzindo o tempo significativamente. Ao antecipar a formação de linhas homozigotas, são eliminados vários ciclos de sucessivas etapas de autofecundação, promovendo uma notável economia de recursos e tempo quando comparados com os procedimentos feitos de maneira convencional (ZHENG, 2003; DUNWELL, 2010) (Quadro 1).

Quadro 1- Tempo necessário para a obtenção de uma nova cultivar de trigo através do método convencional, convencional com avanço de geração de verão e via duplo-haploides. \* Etapas com tempo fixo para os três métodos. VCU: Valor de Cultivo e Uso; DHE: Distinguíbilidade, Homogeneidade e Estabilidade

| Etapas para geração de cultivares                          | Métodos de Melhoramento |   |                     |
|--|-------------------------|---|---------------------|
|  | Convencional            | Convencional com avanço de geração de verão | Via Duplo-haploides |
| Cruzamento*  | 1 ano                   | 1 ano                                       | 1 ano               |
| Obtenção da linhagem homozigota                            | 7 anos                  | 5 anos                                      | 1 ano               |
| Obtenção de sementes para ensaios                          | 0 ano                   | 0 ano                                       | 1 ano               |
| Ensaio preliminar de 1º ano*                               | 1 ano                   | 1 ano                                       | 1 ano               |
| Ensaio preliminar de 2º ano*                               | 1 ano                   | 1 ano                                       | 1 ano               |
| Ensaaios de VCU e DHE*                                     | 3 anos                  | 3 anos                                      | 3 anos              |
| Lançamento da cultivar (com volume comercial de sementes)* | 1 ano                   | 1 ano                                       | 1 ano               |
| <b>Total de tempo</b>                                      | <b>14 anos</b>          | <b>12 anos</b>                              | <b>9 anos</b>       |

Inicialmente, a produção *in vitro* de DH foi descoberta acidentalmente e com surpresa por Guha e Maheshwari (1964) em *Datura innoxia* quando verificaram que os grãos de pólen em meio de cultura estavam se transformando em estruturas multicelulares, originando plantas haploides. Anos depois, Kasha e Kao (1970), noticiaram a descoberta de uma maneira alternativa e promissora para produção de haploides, através de cruzamentos

interespecíficos entre diferentes espécies de cevada. Tais pesquisas pioneiras revolucionaram mundialmente o uso da tecnologia DH na criação de plantas geneticamente estáveis, passando a ser adotada em vários centros de pesquisa e empresas privadas de melhoramento genético (DWIVEDI et al., 2015).

Através desse método e explorando a totipotência celular, uma célula gamética (n), com apenas metade do seu patrimônio genético, é capaz de originar uma nova planta, sem haver a fecundação. Assim, o genoma desta planta precisa ser duplicado para restaurar o número cromossômico da espécie. Posteriormente, com a duplicação do genoma (espontânea ou induzida por agentes antimitóticos) sua fertilidade é restabelecida, tornando-se diplohaploide (DH) (MORAES-FERNANDES, 1990). Assim, as plantas DH obtidas passam a ser homocigotas e uniformes para todos os *loci* de seus cromossomos em apenas uma geração (Figura 2). A eficiência de seleção passa ser muito maior via DH, já que, apenas dois tipos de genótipos ocorrem para um par de alelos (A e a), com a frequência de  $\frac{1}{2}$  AA e  $\frac{1}{2}$  aa, enquanto que no método convencional, ocorrem três tipos de genótipos com a frequência de  $\frac{1}{4}$  AA,  $\frac{1}{2}$  Aa,  $\frac{1}{4}$  aa. Como exemplo, se AA fosse um genótipo desejável, a probabilidade de obtenção desse genótipo seria maior via DH do que no método convencional. Se  $x$  *loci* estão segregando (onde  $x$  é o número de genes), a probabilidade de se obter o genótipo desejável é  $(\frac{1}{2})^x$  via DH e  $(\frac{1}{4})^x$  via convencional, aumentando cada vez mais a eficiência de seleção, com o aumento do número de genes a ser considerado (MORAES-FERNANDES et al., 1999).

Plantas DH podem ser obtidas mediante diferentes métodos já descritos, como a hibridização interespecífica ou intergenérica (conhecida como resgate de embriões imaturos), a partenogênese e a androgênese, a qual pode ocorrer pela cultura de anteras ou de micrósporos isolados (JAUAR; XU; BAENZIGER, 2009; SEGUÍ-SIMARRO; NUEZ, 2008; DUNWELL, 2010).

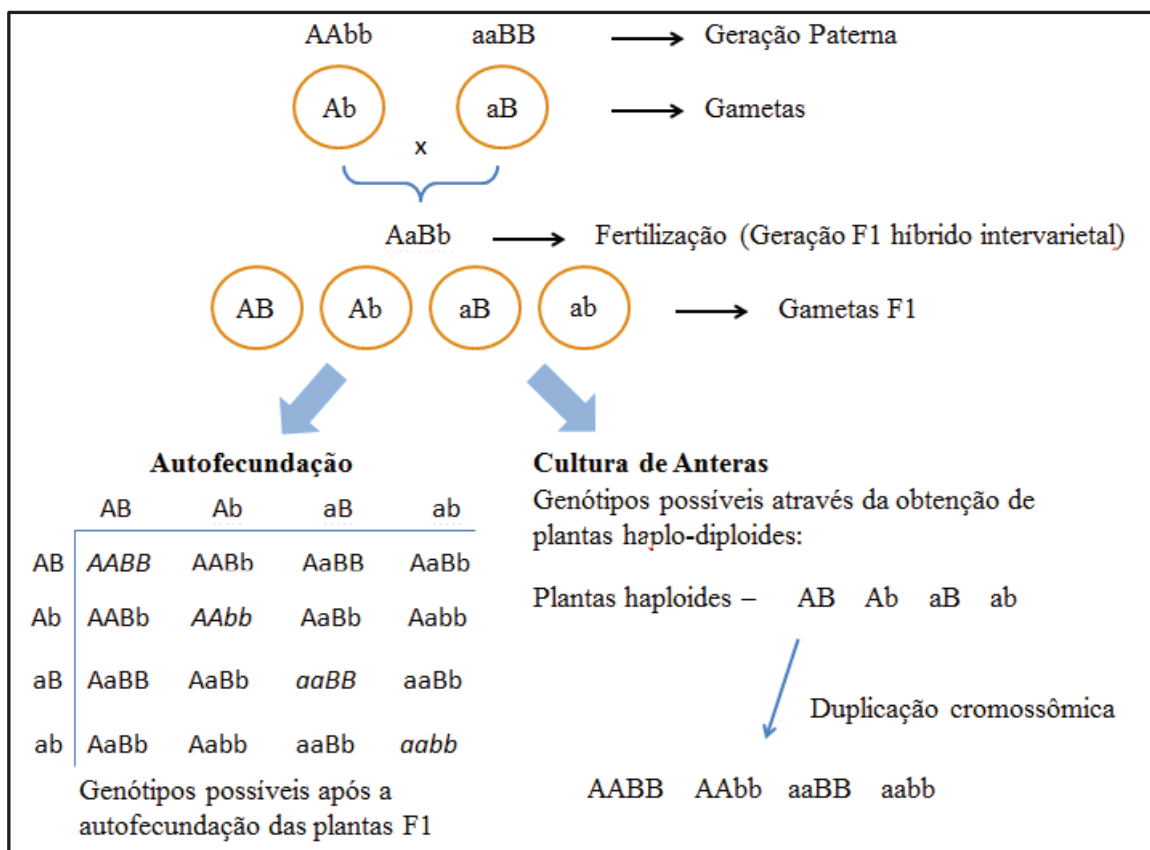


Figura 2- Vantagens da haploidização em relação à autofecundação convencional quando os genitores diferem por dois genes (MORAES-FERNANDES, 1990).

Em *Arabidopsis thaliana*, foi descrito um novo método para obtenção de haploides, baseando-se em mudanças substanciais na histona centromérica H3 (CENH3), produzindo linhas mutantes indutoras de haploidia. Neste método, quando mutantes nulos de *cenh3* expressando alteração nas proteínas CENH3 são cruzadas com o tipo selvagem, os cromossomos do mutante são eliminados, produzindo-se uma progênie haploide (RAVI; CHAN, 2010; KARIMI-ASHTIYANI et al., 2015; ISHII; KARIMI-ASHTIYANI; HOUBEN, 2016). Independentemente do método utilizado, hoje a produção de plantas DH representa um inquestionável avanço na produção de linhagens homozigotas para atender os programas de melhoramento genético, assim como para estudos genéticos e até para introdução de genes via transgenia.

De modo geral, qualquer célula vegetal diferenciada que mantém o seu núcleo, pode se reverter para o estado embriogênico e regenerar uma planta completa, sem haver fecundação, baseando-se no fenômeno da totipotência (TORRES; CALDAS; BUSO, 1999).



No entanto, determinadas células ou tecidos vegetais podem expressar a totipotência em diferentes intensidades. A embriogênese gamética é um exemplo fascinante de totipotência celular, e é chamada de gimnogênese quando se inicia a partir de um gameta feminino e de androgênese quando tem como origem um gameta masculino (GERMANÀ, 2011). Na androgênese, os grãos de pólen imaturos destinados a formar gametas, desviam de sua programação natural, assumindo uma rota alternativa de desenvolvimento e iniciando um crescimento direcionado, resultando no desenvolvimento de plantas contendo seu número haploide (gamético) de cromossomos. Para tanto, é imprescindível que a célula gamética, ainda jovem, seja submetida a um tratamento de estresse, o qual atuará como um gatilho e permitirá a ocorrência da reprogramação celular, viabilizando o desvio para uma nova rota a ser seguida.

A androgênese, através da cultura de anteras, foi amplamente utilizada pela vantagem de poder produzir mais de cem plantas a partir de uma única espiga (LIU; ZHENG; KONZAK, 2002, LIU et al., 2002). No entanto, este método mostrou-se limitado quanto à sua aplicação a determinados genótipos, apresentando alta dependência genotípica. Assim, em virtude dessa limitação, a cultura de anteras abriu espaço para um método alternativo, conhecido como hibridização intergenérica ou interespecífica (ou ainda, resgate de embriões imaturos), cuja aplicação se mostrou mais favorável à uma ampla base genotípica (ausência da característica “genótipo-dependente” do parental feminino). Neste método, embriões haploides são originados de plantas de trigo emasculadas e polinizadas com pólenes de espécies distantes (ex. cruzamento trigo x milho). Neste caso, o embrião haploide será formado pela célula gamética feminina “pseudo” fecundada, ocorrendo a completa eliminação do genoma doador do pólen.

O mecanismo envolvido neste processo ainda está longe de ser esclarecido, no entanto, algumas proposições foram levantadas. Uma delas se baseia no fato de que os centrômeros dos cromossomos de ambas as espécies (doador do pólen e doador de ovários) se interagem desigualmente com o fuso mitótico causando uma perda seletiva dos cromossomos (RAVI; CHAN, 2010). A divisão celular subsequente ao “pseudo” zigoto formado, resulta na eliminação dos cromossomos paternos formando um embrião haploide, que posteriormente será resgatado pela cultura *in vitro* (FOSTER et al., 2007). Apesar de apresentar aspectos positivos para a produção de haploides em trigo, já que não possui a característica de ser



genótipo-dependente, as laboriosas etapas deste método (emasculação, manutenção de plantas de milho doadoras de pólen, polinização, aplicação de 2,4-D para o desenvolvimento do embrião e o tratamento com colchicina para duplicação artificial dos cromossomos), foram lentamente despertando o interesse de seus usuários para outras formas de produção de DH, dando espaço a métodos mais práticos. Embora ambos os métodos possuam vantagens e limitações, tais questões permitiram que novos estudos abrissem perspectivas a metodologias mais modernas e menos laboriosas, como a cultura de micrósporos isolados (também via androgênese), a qual vem sendo adotada em muitos laboratórios pelo seu potencial prático e por apresentar características que vão além da produção de plantas duplo-haploides.

## 2.4 Cultura de Micrósporos Isolados

Descoberta por Guha e Maheshwari (1964), a embriogênese do micrósporo revolucionou a cultura de tecidos vegetais. Esses autores observaram pela primeira vez a formação de embriões a partir de grãos de pólen de *Datura innoxia* cultivados *in vitro*. Foi observado que alguns grãos de pólen, quando propriamente "estimulados", sofriam um desvio da sua rota normal de desenvolvimento e passavam por inúmeras divisões mitóticas dando origem a estruturas multi-celulares, posteriormente originando plantas haploides. Uma década depois, houve o primeiro registro da cultura de micrósporos isolados em *Nicotiana tabacum* (NITSCH, 1974), onde os mesmos foram retirados das anteras e cultivados *in vitro*.

Passados alguns anos, descobriu-se a possibilidade de isolar mecanicamente os micrósporos em *Brassica* para seu cultivo (LICHTER, 1982), o que foi o pontapé inicial para outros estudos utilizando-se da cultura de micrósporos isolados. Após o registro destes primeiros trabalhos, o método da androgênese foi reproduzido para inúmeras espécies, sendo este fenômeno conhecido como “embriogênese do micrósporo”, tendo como modelos de estudo duas espécies de dicotiledôneas (*Brassica napus* e tabaco) e duas monocotiledôneas (cevada e trigo) (SEGUÍ-SIMARRO; NUEZ, 2008; SORIANO; LI; BOUTILIER, 2013).

A cultura de micrósporos isolados se caracteriza pela purificação das células após completa remoção dos tecidos da antera, seguido do cultivo *in vitro*, enquanto que a cultura de anteras envolve o cultivo da antera inteira. Apesar de haver ainda muitos trabalhos recentes

em duplo-haploides utilizando a cultura de anteras como método escolhido, a cultura de micrósporos isolados vem gradualmente a substituindo (FERRIE; CASWELL, 2011).

Algumas vantagens podem ser apontadas no processo de obtenção de haploides via micrósporos isolados e entre elas estão: a) no cultivo das células jovens de micrósporos, os tecidos das anteras são removidos durante o processo de purificação, evitando a ocorrência de uma possível interferência desses tecidos sobre as células purificadas, que poderiam ter um efeito inibitório sobre a regeneração dessas células, ou ainda, produzir calos que podem gerar embriões somáticos diploides; b) os tratamentos feitos *in vitro* são aplicados diretamente sobre as células alvo (purificadas), proporcionando uma melhor disponibilidade de nutrientes; c) o sistema de micrósporos isolados permite a separação dos debrís celulares da suspensão, eliminando células de diferentes estádios (não-alvo); d) a proporção de micrósporos responsivos é sempre maior quando purificados; e) o cultivo dos micrósporos isolados permite recursos adicionais de manipulação genética, originando plantas haploides transformadas; f) o estabelecimento dos micrósporos isolados em meio de cultura é mais prático enquanto que na cultura de anteras é extremamente demorado e dependendo da espécie pode requerer habilidades muito minuciosas; g) a cultura de micrósporos isolados permite o acompanhamento do desenvolvimento dos micrósporos e a formação dos embriões de cada célula (RODRIGUES; MARIATH; BODANESE-ZANETTINI, 2004; FERRIE; CASWELL, 2011). Tendo em vista suas numerosas vantagens e aplicações, a cultura de micrósporos isolados é uma promissora estratégia biotecnológica que merece destaque, representando uma importante ferramenta para os programas de melhoramento genético de plantas. No entanto, algumas limitações dificultam sua completa adoção como rotina e em larga escala, sendo elas: a ausência de resposta para algumas combinações genótípicas (genótipo-dependente) e o alto índice de plantas albinas (KUMARI et al, 2009; DUNWELL, 2010; SCAGLIUSI, 2014).

## **2.5 Microsporogênese: Desenvolvimento do Micrósporo e do Grão de Pólen**

O ciclo de vida das angiospermas é dividido por duas gerações distintas e alternadas: gametofítica (fase haploide =  $n$ ) e esporofítica (fase diploide =  $2n$ ). O desenvolvimento embrionário é visto apenas na geração diploide. O embrião zigótico, no

entanto, é produzido pela fusão de gametas, que são formados apenas pela geração haploide. Assim, a compreensão da relação entre as duas gerações é importante no estudo do desenvolvimento das plantas, via embriogênese do micrósporo. A formação do pólen (n) envolve células especializadas localizadas nas estruturas masculinas das flores. O androceu, órgão reprodutor masculino é composto por um conjunto de estames, os quais são constituídos de filete, conectivo e antera. A microsporogênese requer a especificação e a diferenciação de células que estão dentro das anteras (DREWS; YADEGARI, 2002; MARIATH; SANTOS; BITTENCOURT, 2003, MA, 2005) que por sua vez são compostas por quatro sacos polínicos, fusionados e ligados ao filete. Cada saco polínico internamente possui as células-mãe de grãos de pólen, as quais são envolvidas por um tecido chamado tapete, que tem como função nutrir e auxiliar os micrósporos durante seu desenvolvimento e maturação. O início da geração gametofítica ocorre com a diferenciação das células-mãe do micrósporo (MAUNSET, 1995). Durante a microsporogênese, as células-mãe de pólen (que são células diploides) mediante o processo de meiose, produzem quatro células haploides (esporos ou micrósporos), que inicialmente permanecem unidos formando uma tétrade cercada por uma parede de calose. À medida que o desenvolvimento dos micrósporos evolui, a parede de calose começa a ser digerida pela enzima calase até a liberação dos micrósporos (ZANETTINI; LAUXEN, 2003). Após a separação das paredes de calose, as células liberadas irão aumentar de volume, formando um grande vacúolo, contendo duas membranas (exina e intina), um poro e um núcleo bastante característico. Com o desenvolvimento da célula, ocorre a migração do núcleo para a periferia da célula, circundando a parede interna, até chegar ao sítio diametralmente oposto ao poro (Figura 3), ocorrendo então, a primeira divisão mitótica. A primeira divisão é assimétrica, resultando em uma célula vegetativa, ou macronúcleo grande (que posteriormente dará origem ao tubo polínico) e uma generativa (ou reprodutiva) menor, compostas pelo mesmo material genético, mas com estruturas diferentes (SHI et al., 2015).

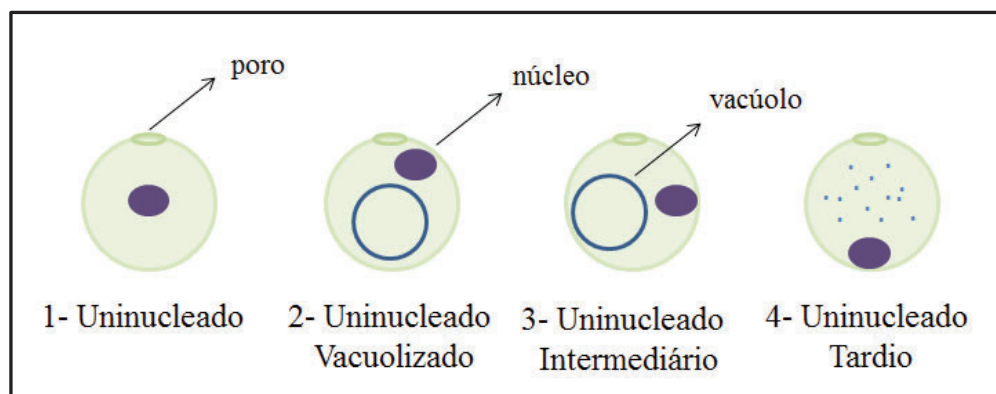


Figura 3- Desenvolvimento do micrósporo acompanhado pela movimentação do núcleo até o sentido oposto do poro, antes de ocorrer a primeira divisão mitótica.

Logo após a primeira divisão, a célula vegetativa migra ficando próxima ao poro e ocorre uma absorção do vacúolo, dando início a síntese de amido. A partir desta fase, a célula de micrósporo segue a rota gametofítica de desenvolvimento, amadurece e se torna um grão de pólen, fazendo com que a androgênese não possa mais ser desencadeada (TOURAEV; VICENTE; HEBERLE-BORS, 1997; BABBAR et al., 2004). Já, na segunda mitose do pólen, a célula vegetativa permanece adormecida e a célula generativa se divide originando duas células espermáticas, finalizando o processo de formação do grão de pólen (agora maduro), constituído de uma célula vegetativa e duas células gaméticas ou espermáticas (MA, 2005; SHI et al., 2015). Cada célula do pólen (vegetativa e espermáticas) são altamente especializadas e desempenham funções biológicas específicas, variando desde a simples orientação do crescimento do tubo polínico (vegetativa) até a fecundação da oosfera, formando o zigoto e o endosperma triploide (espermáticas) (TOURAEV; PFOSSER; HEBERLE-BORS, 2001).

De uma maneira geral, toda célula de micrósporo é programada para produzir um grão de pólen. No entanto, por efeito de fatores ambientais, o micrósporo pode deixar sua rota normal desenvolvimento (gametofítica) e seguir o desenvolvimento esporofítico, levando à formação de embrioides e plantas. Esta capacidade, entretanto, somente é possível nos estágios iniciais de desenvolvimento, ou seja, quando a célula gamética ainda é totipotente (REYNOLDS, 1997; TOURAEV; PFOSSER; HEBERLE-BORS, 2001; ZHENG et al., 2001). Os mecanismos básicos que determinam a mudança da rota de desenvolvimento de gametofítica para a esporofítica ainda são pouco compreendidos (TYANKOVA;

ZAGORSKA, 2008). Seguindo um modelo determinístico proposto por Grando e Moraes-Fernandes (1997), o micrósporo pode sofrer alteração da sua via de desenvolvimento natural e adquirir o potencial androgenético em dois momentos distintos, e ambos acontecem nas fases iniciais do desenvolvimento do grão de pólen. O primeiro momento seria no início da meiose e o segundo durante o estágio uninucleado do pólen. Há indícios de que a eliminação de moléculas carreadoras de informações esporofíticas (mRNA, ribossomos e proteínas) supostamente ocorra nestas duas fases, de forma que se não houver a correta eliminação destas moléculas o processo embriogênico terá grandes chances de ser retomado (GRANDO; MORAES-FERNANDES, 1997). Estudos revelaram que a maioria dos genes identificados como diferencialmente expressos durante o tratamento de estresse para induzir a androgênese estão envolvidos com hormônios de estresse, proteção celular contra o estresse, metabolismo de sacarose-amido e proteólise, indicando que a aquisição do potencial androgênico depende em grande parte da desdiferenciação celular, um processo pelo qual os perfis transcricionais e de tradução existentes são provavelmente apagados ou alterados para bloquear o desenvolvimento do pólen e desencadear a via embriogênica (MARASCHIN et al., 2005b). Mais recentemente, foi realizado o primeiro estudo de sequenciamento de transcritos e de pequenos RNAs, em grande escala, de micrósporos de trigo responsivos à androgênese, onde foi demonstrado que transcritos relacionados com metabolismo celular e biossíntese possuem a expressão diminuída após aplicação de estresses para indução da embriogênese, comparando com micrósporos antes da aplicação do estresse. Neste mesmo período, ocorre o aumento da expressão de transcritos relacionados com o remodelamento da cromatina, representando a desdiferenciação dos micrósporos, seguido da reprogramação para a rota do desenvolvimento da embriogênese (SEIFERT et al., 2016). Em ambos os estudos, houve indícios de que a desdiferenciação celular é um dos processos-chave para desencadear a rota embriogênica dos micrósporos.

Assim, ao seguir a rota alternativa (esporofítica), os micrósporos reprogramados mudam de aspecto, particionando o seu grande vacúolo inicial, resultando em oito ou mais vacúolos pequenos, formando um círculo no citosol. O núcleo se move para o centro da célula e é cercado por um citoplasma com fios radiais entre os vacúolos, formando uma estrutura fibrilar chamada de “star-like”, sendo este tipo de conformação, às vezes usado como estrutura “sinalizadora” da indução embriogênica (LIU et al., 2002; ZHENG et al., 2002;

MARASCHIN et al., 2005a; SEIFERT et al., 2016). No entanto, nem todas as células que seguem a rota embriogênica se diferenciam nesta conformação (tipo “star-like”), podendo haver células de micrósporos cultivadas *in vitro*, que resultam na formação de embriões e plantas, sem ter passado por esta característica. Ao adotar a rota embriogênica de desenvolvimento, as células de micrósporos seguem, na maioria das vezes, um padrão organizado de divisões e diferenciações celulares que levam a formação dos embriões e estes em plantas (ZHENG, 2003; MUÑOZ-AMATRIAÍN et al., 2009).

## **2.6 Fatores Determinantes que Interferem no Processo Androgênico**

O sucesso do estabelecimento da rota embriogênica do micrósporo depende de inúmeros fatores, já que trata-se de um processo biológico complexo, baseado na totipotência de uma célula ou tecido vegetal. Assim como ocorre com outros processos biológicos, a eficiência da resposta embriogênica das células de micrósporos está fortemente associada a inúmeros aspectos endógenos e exógenos à planta. Cada uma das etapas ou elementos envolvidos no processo pode comprometer os resultados e variar notavelmente o sucesso na regeneração de embriões e plantas.

### **2.6.1 Genótipo**

O genótipo desempenha um papel essencial e é um dos fatores mais determinantes da resposta androgênica. Não só diferentes espécies, mas também diferentes cultivares dentro de uma espécie, podem diferir significativamente na sua capacidade de responder e conseqüentemente na sua aptidão para produzir calos ou embriões, de forma que cada genótipo pode requerer distintas condições para que haja o estímulo e o desenvolvimento das estruturas embriogênicas (SEGUÍ-SIMARRO; NUEZ, 2008; TYANKOVA; ZAGORSKA, 2008).

Muito ainda se tem a elucidar em relação aos fatores genéticos envolvidos na resposta androgênica. A vasta literatura encontrada sobre a embriogênese do micrósporo relata, em grande parte, o sucesso do processo e suas causas; porém não explica qual fator foi determinante para tais genótipos terem respondido ao protocolo. Nestes casos, o sucesso da

resposta foi meramente atribuído ao caráter “responsivo” do genótipo e, logo em segundo plano, aos efeitos das possíveis variáveis estudadas nos trabalhos. Assim, poucos estudos buscaram elucidar este complexo mecanismo, sendo que em um deles, foi relatado que parte da resposta androgenética estava associada a elementos genéticos instáveis (nucleares e citoplasmáticos) supostamente de forma independente, sendo uma classe atuando sobre a diferenciação embriogenética e outra sobre o desenvolvimento de plantas (PICARD et al., 1990). No entanto, outros trabalhos mais recentes mostram não haver associação da resposta androgenética com genes não-nucleares (mitocondriais e de cloroplastos), ou pelo menos indicam que, na maioria das vezes, apenas os genes nucleares são os principais envolvidos na resposta à androgênese (AL-ASHKAR, 2014).

Não somente em cereais, mas também em outras espécies, o genótipo da planta doadora é de fato um dos fatores mais decisivos para desencadear a rota embriogênica dos micrósporos. Por se tratar de fator de difícil controle (a genética da planta doadora), os protocolos de produção de haploides, via micrósporos, buscam caminhos alternativos para minimizar esta limitação, sendo que, em muitos casos, a otimização das condições de crescimento das plantas doadoras e outros fatores exógenos (pré-tratamento das espigas e meios de indução) poderiam transpor as barreiras impostas pelo próprio genótipo.

## **2.6.2 Fisiologia das Plantas Doadoras**

Frequentemente, a indução do gatilho androgenético e a formação dos embriões podem ser prejudicados pela ocorrência de condições ambientais desfavoráveis durante o desenvolvimento das plantas doadoras (ZHENG, 2003; BROUGHTON, 2008; CISTUÉ et al., 2009). Assim, um pré-requisito para se atingir o sucesso do método são plantas saudáveis e livres de patógenos. Condições adequadas de cultivo não só desempenham um importante papel na resposta quanto à produção de embriões, mas também na regeneração desses embriões em plantas (FERRIE; CASWELL, 2011). O cultivo das plantas doadoras em câmaras de ambiente controlado permite eliminar muitos estresses bióticos e abióticos que podem afetar negativamente a androgênese (DEVAUX; PICKERING, 2005). Assim, um ambiente livre de estresses promove resultados mais confiáveis e seguros. Importantes fatores como o fotoperíodo (duração e intensidade luminosa), temperatura, necessidade de água e

nutrientes são cruciais à androgênese e por isso norteiam o desenvolvimento das plantas doadoras (BROUGHTON, 2008; CISTUÉ et al., 2009). Por outro lado, embora se tenha conhecimento que o estado fisiológico da planta é determinante, ainda não foram definidos claramente os fatores fisiológicos responsáveis pelo sucesso da androgênese (TYANKOVA; ZAGORSKA, 2008).

### **2.6.3 Estádio de Desenvolvimento do Grão de Pólen**

O isolamento dos micrósporos na fase correta corresponde a um importante aspecto na indução da embriogênese e obtenção de plantas haploides. Somente na fase inicial de desenvolvimento do micrósporo que ocorre a expressão de alguns genes específicos, voltados à embriogênese, representando assim, apenas uma breve etapa do seu desenvolvimento, quando se encontram responsivos ao processo androgênico. Variações podem ocorrer entre espécies e genótipos, no entanto, de uma maneira bastante generalizada, a fase mais apropriada para indução da androgênese se caracteriza por apresentar células uninucleadas e altamente vacuolizadas (Figura 4) (WANG; BERGEN; DUIJN, 2000; ZHENG, 2003; DUNWELL, 2010), correspondendo ao estágio Zadoks 45 no trigo hexaploide, conforme ilustrado na Figura 6. Algumas características morfológicas da planta doadora podem contribuir para a identificação da fase mais apropriada da coleta das espigas. Porém, apenas a análise citológica observada ao microscópio óptico garantirá sua correta identificação.



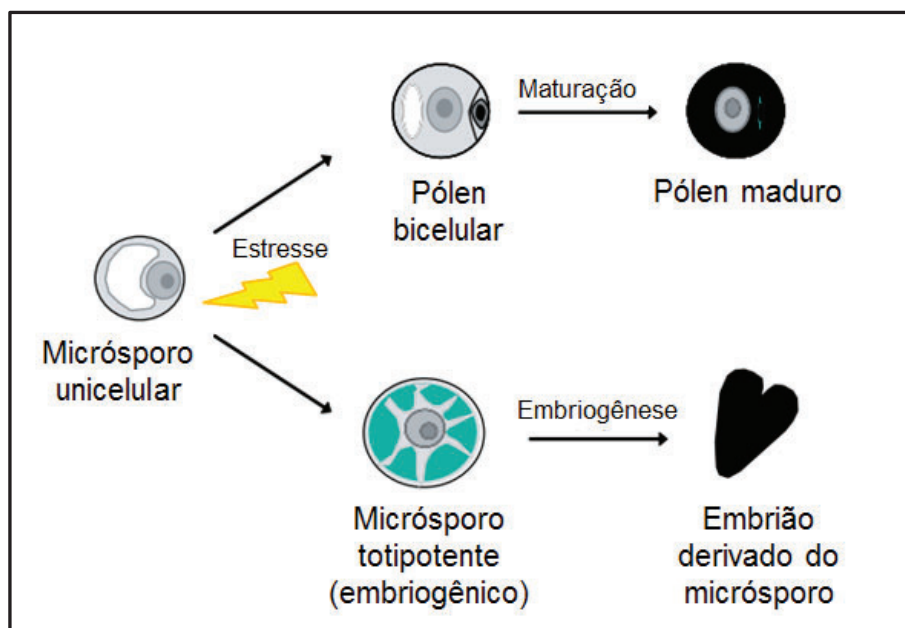


Figura 4- Representação esquemática do micrósporo vacuolizado seguindo a rota gametofítica e esporofítica (Adaptado de SHARIATPANAH et al., 2006).

#### 2.6.4 Pré-Tratamento

Dentre os fatores exógenos, o pré-tratamento indutor do estresse é considerado um ponto chave para a produção de duplo-haploides via androgênese. Embora o micrósporo seja fisiologicamente e geneticamente determinado a desenvolver um gametófito, sua ontogenia pode ser redirecionada formando uma célula embriogênica quando submetido a um estímulo ou sinal (BARNABÁS et al., 2001).

De modo geral, os pré-tratamentos consistem na aplicação de um tratamento de estresse em plantasadoras *in vivo*, ou em inflorescências excisadas, botões de flores, anteras ou micrósporos isolados *in vitro*, antes de serem transferidos para o meio de cultura (TOURAEV; VICENTE; HEBERLE-BORS, 1997), sendo que espécies diferentes e até mesmo genótipos diferentes podem responder de maneira diferente a cada tipo de estresse.

Para que ocorra a reprogramação, o micrósporo deve passar por algum estresse ambiental, nutricional ou químico que leve ao estímulo da sua rota esporofítica. Durante a exposição a condições de estresse, genes específicos podem ser ativados ou desativados, determinando o sucesso do processo androgenético (MARASCHIN et al., 2005a). Dessa forma, se realizado adequadamente, o pré-tratamento a ser adotado permite que a célula

abandone o desenvolvimento gametofítico e se redirecione para a embriogênese (ZHENG, 2003; FERRIE; CASWELL 2011).

Diferentes pré-tratamentos (utilizados isoladamente ou simultaneamente) já foram descritos como gatilhos para promover a androgênese (TOURAEV, A.; VICENTE; HEBERLE-BORS, 1997, ZHENG, 2003, ISLAM; TUTEJA, 2012), sendo que o pré-tratamento mais adequado e seu tempo de duração podem variar para cada espécie ou genótipo.

O tipo de estresse aplicado desempenha papel importante não só pela conversão dos micrósporos a embriões, mas reflete também no desenvolvimento de plantas verdes, na fertilidade das mesmas e no número de plantas albinas que poderão ser formadas (LIU et al., 2002; OLESZCZUK; SOWA; ZIMNY, 2006; SHARIATPANAHI et al., 2006). Assim, o sucesso da produção de plantas duplo-haploides está diretamente vinculado ao tipo do pré-tratamento aplicado.

O pré-tratamento de frio a 4° C é um dos tipos de estresses mais utilizados em várias espécies, e sua aplicação tem efeitos positivos na resposta androgenética e na duplicação cromossômica (KASHA et al., 2003; CISTUÉ; KASHA, 2005). Estudo realizado por Oleszczuk, Sowa e Zimny, (2006) mostrou que apesar do pré-tratamento de frio ter aumentado a formação de plantas albinas em cevada, a frequência de duplicação espontânea nas plantas verdes foi de quase 100%. A baixa temperatura atua na redução do metabolismo da antera, retarda a senescência da parede, aumenta a quantidade total de aminoácidos livres e pode alterar a composição da membrana plasmática do pólen. Também aumenta a síntese e a incorporação de ácidos graxos insaturados, aumentando a capacidade de sobrevivência dos grãos de pólen ao estresse pela troca de ambiente (HEBERLE-BORS, 1985). Além disso, a baixa temperatura retarda a divisão mitótica do núcleo, sincronizando assim a fase dos micrósporos durante o pré-tratamento, resultando em uma frequência de indução mais elevada (HU; KASHA, 1997).

Como métodos alternativos de pré-tratamentos outros indutores de estresses também podem ser utilizados para promover o desenvolvimento esporofítico: manitol, manitol associado ao frio, etanol, altas temperaturas e até mesmo radiações ionizantes. Assim como o frio, o manitol também é amplamente utilizado e atua provocando inanição (do inglês “*starvation*”) e alta pressão osmótica ao micrósporo. Em cereais como o trigo e a cevada,

muitos trabalhos de sucesso já foram descritos utilizando pré-tratamento de choque de frio associado ao manitol na cultura de micrósoros isolados (KASHA et al., 2001; LABBANI; BUYSER; PICARD, 2007; CISTUÉ et al., 2009; ISLAM; TUTEJA, 2012). Quando colocados em um meio contendo manitol, os micrósoros sofrem alterações estruturais e metabólicas que são mediados pela percepção e transmissão de informação do meio externo para o interior da célula através da transdução de sinais que ocorre pela membrana plasmática (MARASCHIN et al., 2005a; MUÑOZ-AMATRIAIN et al., 2006). Estudos indicam que o estresse hiperosmótico, assim como o estresse de baixa temperatura, podem reduzir a fluidez da membrana, enquanto que o estresse hipotônico e choque de calor provocam a fluidização das mesmas (LOS; MURATA, 2004; LOS; MIRONOV; ALLAKHVERDIEV, 2013, ECHÁVARRI; CISTUÉ, 2016). Isto se deve ao fato de que, os componentes da membrana celular são susceptíveis a alterações que podem subsequentemente alterar a fluidez da membrana, a permeabilidade e as funções metabólicas celulares (HUANG, 2006). Diversos elementos podem agir provocando alterações nas propriedades físicas da membrana do micrósoro, supondo-se que tais mudanças poderiam coordenar as atividades de proteínas de membrana e de proteínas sensoriais, que trazem sinais externos para o interior da célula, influenciando a regulação da expressão gênica (LOS; MURATA 2004; MALIK et al., 2014), desencadeando por sua vez a reprogramação das células de micrósoros em embriões.

Mais recentemente, outros tipos de pré-tratamentos vêm sendo empregados com relativo sucesso na indução da embriogênese de micrósoros de trigo e/ou outros cereais, os quais são usados em conjunto com o choque de frio, tais como: sulfato de cobre (JACQUARD et al., 2009; BREW-APPIAH et al., 2013; MAKOWSKA; OLESZCZUK, 2014), putrescinas (REDHA; SULEMAN, 2011, 2013), dimetil-sulfoxide – DMSO (ECHÁVARRI; CISTUÉ, 2016), prolina (ASIF et al., 2013a) e arabino-galactans (LETARTE et al., 2006; CASTILLO; SÁNCHEZ-DÍAZ; VALLÉS, 2015; LIPPMANN et al., 2015). A diversidade de substâncias usadas para os tratamentos das espigas reflete, em parte, as diversas formas usadas para desencadear a rota embriogênica dos micrósoros.

### 2.6.5 Albinismo

Um dos maiores obstáculos que impedem o uso de maneira rotineira a cultura de micrósporos isolados para produção de haploides, é a grande proporção de plantas albinas geradas, cuja condição reflete na redução do número de plantas verdes férteis, prejudicando a produção de plantas em maior escala (ZHENG, 2003). Tais plantas são capazes de alcançar apenas os estágios iniciais de desenvolvimento e somente quando mantidas *in vitro*.

Em alguns genótipos de cevada, há relatos mostrando que em cerca de 100% das plantas geradas via cultura de micrósporos ou anteras ocorre albinismo (CAREDDA et al., 2000). Sua causa direta é a incapacidade de conversão dos proplastídeos em cloroplastos, levando ao fraco desenvolvimento das membranas dos cloroplastos (os tilacoides), local do fotossistema que contém a clorofila (KUMARI et al., 2009). Embora o mecanismo biológico ainda não tenha sido elucidado, estudos indicam que a formação de plantas albinas derivadas da androgênese se deve a alterações que ocorrem durante a microsporogênese *in vitro*. Portanto, a não conversão a cloroplastos pode ser uma consequência da reprogramação mal-sucedida. (MAKOWSKA; OLESZCZUK, 2014).

O albinismo é uma característica altamente hereditária. Tanto o genoma nuclear quanto o dos cloroplastos codificam proteínas essenciais para o desenvolvimento e funcionamento do cloroplasto. Logo, a formação destas organelas pode ser afetada por mutações de genes nucleares e dos próprios cloroplastos (KUMARI et al., 2009).

Mesmo sendo geneticamente predeterminado, o albinismo pode ser amenizado em função das condições do protocolo estabelecido, tais como: as condições de crescimento das plantas doadoras, os tipos de pré-tratamentos, o equilíbrio de carboidratos e reguladores de crescimento, bem como o estágio de desenvolvimento do micrósporo, assim como as condições ambientais do meio de cultura em que os embriões foram mantidos, como o oxigênio, luz e temperatura (KUMARI et al., 2009). Como exemplo dessa influência interferindo no albinismo, cabe destacar o papel do sulfato de cobre, que quando utilizado na solução de pré-tratamento com manitol, é possível haver redução significativa na formação de plantas albinas em cevada (DAVIES, 2003; JACQUARD et al., 2009). Em função de ser um dos componentes de várias enzimas importantes envolvidas no transporte de elétrons, na

biossíntese de proteínas e carboidratos, o cobre pode atuar favoravelmente na regeneração de plantas verdes em cevada (DAHLEEN, 1995).

O Ficoll, um polissacarídeo de alto peso molecular utilizado junto ao meio de indução, também pode influenciar na regeneração de plantas verdes. Na fase de indução, os micrósporos são bastante propensos a afundar no meio líquido, diminuindo a exposição ao oxigênio, ocasionado a produção de lactato e álcool desidrogenase, que danificam a estrutura interna do DNA e dos plastídios, conduzindo a uma deficiência na regeneração e na geração de plantas sem clorofila (KAO et al., 1991). Assim, através da suplementação com Ficoll é possível conferir maior viscosidade ao meio, evitando que as células se depositem no fundo das placas, e por consequência disso fiquem mais expostas ao oxigênio. Eudes e Amundsen (2005) comprovaram que o meio de indução complementado com Ficoll tem efeito significativo em triticale, dando origem, em média, a 2/3 plantas verdes, enquanto que o mesmo meio sem Ficoll desenvolveu apenas 1/3 de plantas verdes. Os mesmos resultados foram observados por Poersch-Bortolon e colaboradores (2016) também para trigo, onde foram produzidas mais plantas verdes e férteis em meios de cultura com Ficoll.

Ao longo dos últimos vinte anos de estudos voltados para a embriogênese do micrósporo, otimizações dos protocolos têm sido feitas e o número de plantas verdes foi melhorado em torno de 100 a 1000 vezes em cereais (WOJNAROWIEZ et al., 2002; SHARIATPANAH; TOURAEV, 2010; LAZARIDOU et al., 2011; ISLAM et al., 2013). Entretanto, o albinismo continua sendo um grande desafio a ser contornado e um problema crítico da androgênese em monocotiledôneas.

O evento crucial para a ocorrência do albinismo parece ser a reprogramação dos micrósporos do desenvolvimento gametofítico para o esporofítico, porém se desconhece como o estresse altera a rota de desenvolvimento, quais genes são responsáveis por essa transição e também como os distúrbios da androgênese conduzem à formação de plantas albinas (MAKOWSKA; OLESZCZUK, 2014).

### **2.6.6 Meios de Indução**

Sabe-se que a reprogramação das células de micrósporos é desencadeada pela aplicação de algum tratamento de estresse, mas a eficiência do processo é controlada por uma

interação de fatores genéticos e fisiológicos (SHIRDELMOGHANLOO; MOIENI; MOUSAVI, 2009). Sempre que as condições forem inadequadas, muitos micrósporos competentes podem não se dividir ou suspender as suas divisões, interrompendo o seu processo embriogênico, o que reduz substancialmente a produção de plantas originadas de micrósporos (ZHENG; KONZAK 1999; ZHENG et al., 2001). Portanto, uma vez que o potencial embriogênico é acionado, é crucial fornecer aos micrósporos condições apropriadas para seu desenvolvimento durante a fase de indução. A condição e composição do meio de indução são determinantes e requerem um equilíbrio adequado de componentes nutricionais, já que afetam diretamente a taxa de formação de embrioides (ZHENG, 2003; SANTRA et al., 2012). De modo geral, na cultura de micrósporos isolados, é utilizado o meio semi-líquido para a indução das estruturas embrionárias, cuja vantagem é a homogeneidade na distribuição de nutrientes aos micrósporos, permitindo um maior aproveitamento dos componentes do meio.

Dentre os vários componentes do meio de indução, estão os reguladores de crescimento, que são conhecidos como moléculas-chave sinalizadoras que controlam o desenvolvimento e iniciação de vias de transdução de sinal em resposta a estímulos ambientais (KOHLI et al., 2013). *In vitro*, os reguladores de crescimento mais utilizados são as auxinas e citocininas, cuja função é controlar a divisão celular e a morfogênese (WEŁDZONY et al., 2009). Esses dois grupos de hormônios geralmente agem antagonicamente, porém seus efeitos são modulados pelo genoma e de acordo com a especificidade do tecido (MOUBAYIDIN; DI MAMBRO; SABATINI, 2009).

Sabe-se que a homeostase dos reguladores de crescimento é uma das mudanças mais dinâmicas na resposta a condições de estresse (KOHLI et al., 2013). Como a sensibilidade dos tecidos e células muda durante o desenvolvimento da planta em resposta às mudanças ambientais ou genéticas (DAVIES, 2010), pode-se supor que as interações entre esses reguladores, induzidas pelo estresse e a sensibilidade genótipo-específicos aos reguladores, coordenem a reprogramação do micrósporo que irão regular sua eficiência embriogênica (ZUR et al., 2015).

Os carboidratos também desempenham um importante papel no início da androgênese, sendo que a maltose é o açúcar mais comumente utilizado na cultura de micrósporos isolados (SCOTT; LYNE, 1994). A maltose fornece um metabolismo mais lento

e não letal, ao passo que outros açúcares como sacarose, glicose e frutose provocam metabolismo mais rápido, levando a hipóxia e acúmulo de etanol, resultando na morte das células (SCOTT; LYNE; AP REES, 1995). Os carboidratos presentes em meios de cultura têm uma dupla finalidade: primeiro, como fonte de carbono e energia, e segundo como um osmoprotetor.

A osmolaridade durante a fase de indução influencia a viabilidade dos micrósporos e sustenta a divisão celular, especialmente durante o estágio inicial da embriogênese (OCHATT et al., 2009; AYED et al., 2010). Uma vez isolados, os micrósporos são muito sensíveis à pressão osmótica, dessa forma a osmolaridade inadequada pode ser gravemente prejudicial, causando encolhimento ou ruptura, levando à morte celular (GUO; PULLI 2000).

De modo geral, os meios de cultura são ricos em açúcar, aminoácidos e minerais, e são, portanto, uma fonte potencial de nutrientes para microorganismos tais como bactérias, leveduras e fungos (ASIF et al., 2013b). A contaminação por esses organismos pode surgir de plantas doadoras infectadas, manipulação do fluxo laminar e condições sépticas inadequadas levando ao comprometimento do material em cultivo (SHEN et al., 2010; THOMAS; GOPLAKRISHNAN; KRISHNAREDDY, 2011). Enquanto normalmente os antibióticos agem no controle do crescimento da maioria dos contaminantes bacterianos, alguns antibióticos podem trazer vantagens adicionais para a cultura de micrósporos isolados. Tal benefício foi constatado através da adição de 100 mg/L de cefotaxima em meio de indução em trigo e triticale, onde foi observado a eficácia na eliminação da maioria dos contaminantes, proporcionando melhor formação de embriões e a redução de ocorrência de albinismo (ASIF et al., 2013b).

Um outro aspecto crítico para a embriogênese dos micrósporos é o co-cultivo dos mesmos com ovários vivos, colocados nos meios de indução (LI, DEVAUX, 2001; ZHENG et al., 2001; LIU et al., 2002). A presença dos ovários auxilia os micrósporos no seu potencial embriogênico, de forma que quando adicionados ao meio de cultura com os micrósporos, o número de embriões e plantas regeneradas tende a aumentar significativamente (HU; KASHA, 1997; ZHENG et al., 2002; ZHENG, 2003), inclusive em genótipos menos responsivos ou recalcitrantes. Durante o cocultivo de ovários foi evidenciado o envolvimento de substâncias semelhantes a auxinas ou indutoras da divisão celular, como os bio-polímeros

“arabinogalactans” (BORDERIES et al., 2004; LETARTE et al., 2006). Acredita-se dessa forma que os ovários vivos sejam fontes de moléculas sinalizadoras essenciais, liberadas lentamente durante o cultivo das células, que por sua vez mantêm e prolongam o potencial embriogênico já desencadeado durante o pré-tratamento (ZHENG et al., 2002). Há relato mostrando que, mesmo em genótipos de trigo responsivos ao processo androgênico, o cocultivo de ovários é fundamental para iniciar a formação dos embriões (SCAGLIUSI, 2014). Porém, ainda há necessidade de esclarecer quais outras moléculas estão envolvidas neste processo e por qual razão extratos purificados de ovários não atuam da mesma maneira que o cocultivo com ovários frescos e intactos (EL-TANTAWY et al., 2013).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia – área de Cultura de Tecidos, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Trigo), em Passo Fundo, RS, no período de abril de 2015 a dezembro de 2016.

#### 3.1 Material Vegetal

As sementes de trigo foram obtidas pela Embrapa Trigo e a escolha desse material foi baseada por representarem um perfil agrônomo mais próximo da triticultura atual (BRS 194) e por serem controles responsivo (Fielder) e recalcitrante (Embrapa 27) ao processo androgênico. A cultivar Embrapa 27 foi lançada em 1994 pela Embrapa Trigo, sendo originada do cruzamento entre os genótipos: PF 83743/5/PF 83182/4/CNT 10\*4//Lagoa Vermelha\*5/Agatha/3/Londrina\*4/Agent//Londrina\*3/Nyu Bai. Caracteriza-se por ter ciclo curto, estatura média e por apresentar resistência à fusariose, além de estar presente na genealogia de muitos genótipos de trigo brasileiros. Neste estudo, o uso deste genótipo foi baseado pelo comportamento recalcitrante ao cultivo *in vitro* de micrósoros isolados.

A criação da cultivar BRS 194 teve como objetivo reunir características favoráveis de três outras cultivares, que por sua vez apresentavam boa adaptação ao cultivo do trigo no Sul do Brasil, sendo resultante do cruzamento CEP 14/BR 23//CEP 17. Lançada pela Embrapa Trigo em 2000, a cultivar BRS 194 é recomendada para o cultivo em todas as regiões tritícolas do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Apresenta rusticidade, elevado rendimento de grãos e, por sua crescente aceitação na lavoura, foi a segunda cultivar com a maior disponibilidade de sementes para plantio no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina em 2005. Suas plantas possuem porte baixo e ciclo curto, apresentando suscetibilidade à ferrugem

da folha e à fusariose. Embora apresente uma boa resposta embriogênica, o albinismo é um fator limitante de grande parte das plantas regeneradas.

Fielder é um genótipo americano, muito utilizado como modelo na cultura de micrósoros isolados por ser responsivo a androgênese, além de ser também suscetível aos métodos de transformação genética, via biobalística e *Agrobacterium tumefaciens* (JONES; DOHERTY; WU, 2005). Como genealogia, este genótipo foi originado do cruzamento entre 4\*Yt 54A//Nrn 10/Bvr/3/2\*Y 50/4/ Nrn 10/Bvr//Baart/Onas, em 1974, tendo destaque naquela época pela satisfatória qualidade para pastelaria e resistência à ferrugem da folha.

### **3.2 Germinação e Crescimento das Plantas Doadoras**

As sementes foram quimicamente tratadas com uma solução de fungicida e inseticida 1:1 (Imidacloprid 600 g/L: Triadimenol 150 g/L) e foram distribuídas em papel germitest umedecido com água destilada, reservadas dentro de um becker e mantidas no escuro a 4 °C, por sete dias. Em seguida foram transferidas para câmara de crescimento, onde ficaram pelo mesmo período de tempo, a 24 °C com 16 horas/luz. Quando já estavam com parte radicial e aérea formadas, as plantas foram transferidas para os baldes. Foram plantadas de 3 a 4 plântulas por balde – 7 litros (cada balde medindo 20 cm de diâmetro) contendo uma mistura homogênea de solo, vermiculita e substrato Mecplant (1:1:1) (Figura 5).

As plantas foram cultivadas em câmaras de ambiente controlado à 18/14 °C (dia/noite) com 16h de fotoperíodo, umidade relativa entre 70 a 80% e receberam semanalmente solução nutritiva Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1938).

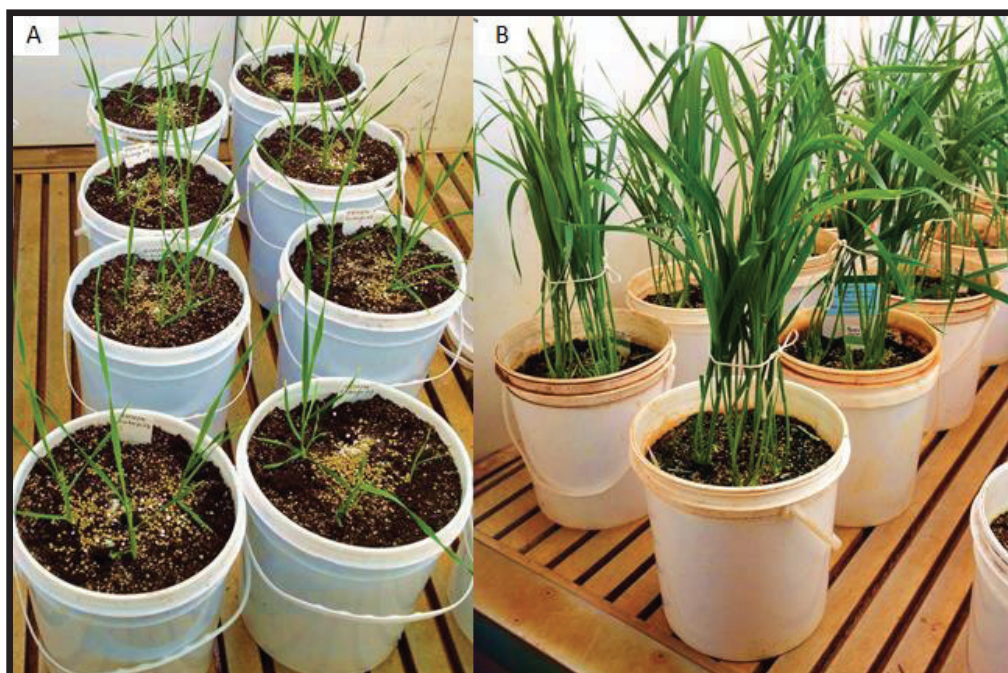


Figura 5- a) Plantas doadoras mantidas em câmaras de crescimento com condições controladas, após 15 dias da germinação. b) Plantas desenvolvidas e livres de patógenos, no final da fase vegetativa. Embrapa Trigo, 2016.

### 3.3 Coleta

As coletas foram realizadas diariamente, selecionando-se os perfilhos com as espigas na fase 45 da escala Zadoks (ZADOKS; CHANG; KONZAK, 1974), quando os micrósoros estavam apresentando a fase uninucleada de desenvolvimento (intermediário ou tardio) (Figura 6). A confirmação da fase uninucleada foi feita pela coloração das células com carmim acético (FAN; ARMSTRONG; KELLER, 1988) e visualização ao microscópio óptico das anteras retiradas da porção mediana das duas primeiras espigas de cada genótipo, onde foi observado o núcleo e sua posição em relação ao poro (KASHA et al., 2001). As espigas para co-cultivo de ovários foram coletadas em estágio mais avançado de desenvolvimento (fase 56 da escala Zadoks), já que o co-cultivo das células isoladas com ovários aumenta a eficiência de regeneração (BROUGHTON, 2008). Após a coleta, todas as espigas foram envoltas em papel alumínio, agrupadas em recipientes com água destilada e mantidas em BOD até o momento da extração.

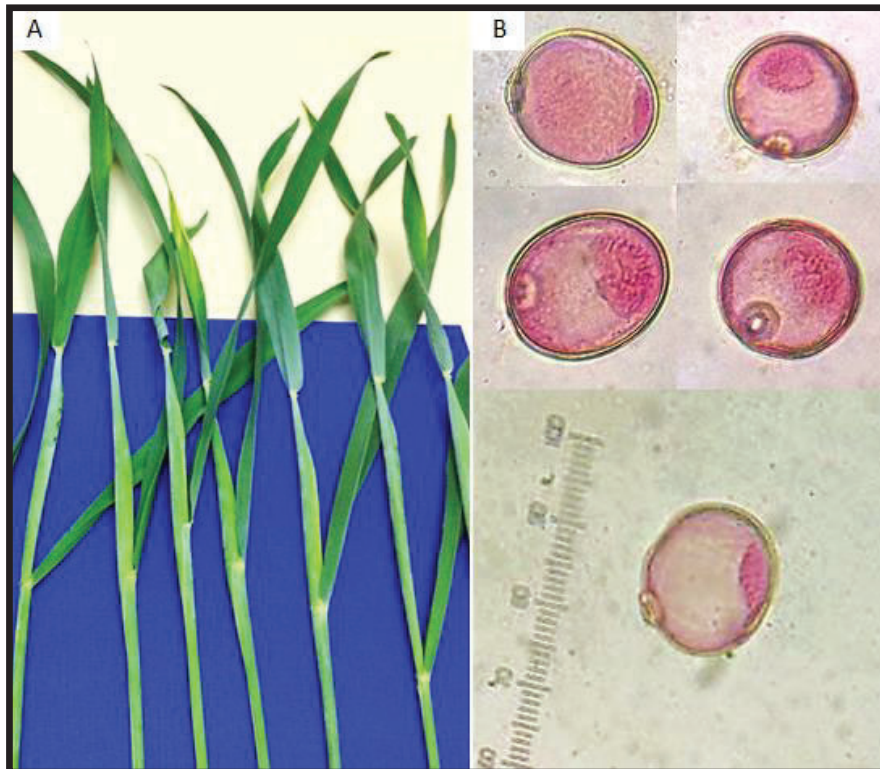


Figura 6- a) Estádio morfológico ótimo de colheita (Zadoks 45), em que as células apresentam-se uninucleadas. b) Micrósporos corados com carmalum acético, em fase uninucleada tardia (migrando para fase bi-nucleada). Embrapa Trigo, 2016.

### 3.4 Assepsia

Para a assepsia, as folhas e aristas foram retiradas e as espigas lavadas por 10 min em constante agitação, em um frasco autoclavado contendo uma gota de Tween 20, água esterilizada e 10% de água sanitária (2.5% de hipoclorito de sódio). As espigas foram enxaguadas cinco vezes com água deionizada autoclavada em fluxo laminar (Figura 7).

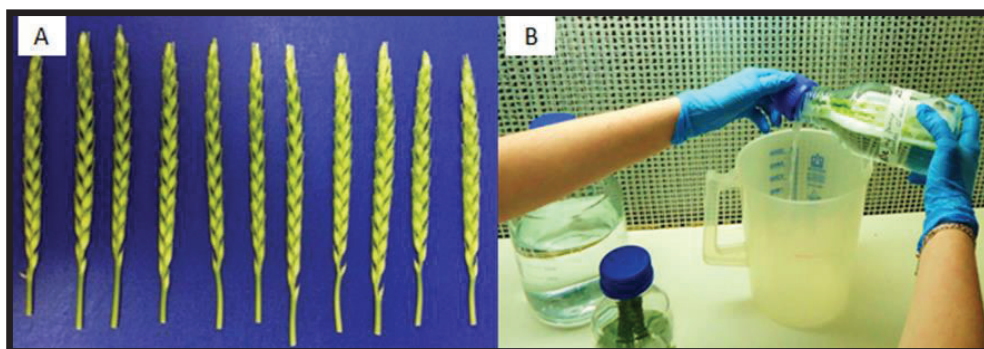


Figura 7 - a) Grupo de 10 espigas com folhas e aristas removidas prontas para o processo de assepsia. b) Enxágue das espigas em fluxo laminar após a lavagem com 10% de água sanitária e detergente líquido. Embrapa Trigo, 2016.

### 3.5 Pré-Tratamento das Espigas

Para todos os cinco pré-tratamentos (Tabela 1), após a coleta das espigas, grupos homogêneos de 10 perfilhos foram embalados em papel alumínio e reservados em recipiente contendo água destilada, sendo mantidos em BOD no escuro a 4 °C por cerca de 15 a 30 dias. Após esse período de incubação, as espigas tiveram suas folhas e aristas removidas para processo de assepsia com hipoclorito de sódio (2,5%), conforme descrito anteriormente.

Tabela 1 – Composição das soluções de pré-tratamento utilizadas como estresses para indução do desenvolvimento esporofítico dos micrósoros isolados

| 1) Frio 4 °C   | 2) PTB                 | 3) PTT  | 4) PTX   | 5) TSA          |
|----------------|------------------------|---|--|-----------------|
| Água destilada | Glicerol = 30 g/L      | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O = 5 mg/L | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O = 26 mg/L | NPB-99          |
|                | L-Prolina = 200 g/L    | Manitol = 55 g/L                              | L-Prolina = 100 mg/L                           | TSA = 0,15 mg/L |
|                | Espermina = 101 mg/L   | DMSO = 1%                                     | Cinetina = 2mg/L                               |                 |
|                | Glucosamina = 200 mg/L | AGP's = 50 mg/L                               | ABA = 13 mg/L                                  |                 |
|                | ABA = 13 mg/L          | TSA = 0,15 mg/L                               |  |                 |
|                | AGP's = 50 mg/L        |   |  |                 |
| pH = 5,7       | pH = 6,5               | pH = 6,3                                      | pH = 6,0                                       | pH = 7,0        |

Após assepsia em câmara de fluxo laminar, as espigas tiveram suas glumas descartadas e foram retiradas as espiguetas de cada espiga com auxílio de uma pinça. Por serem menos viáveis, as espiguetas basais e apicais por sua vez foram excluídas, sendo utilizadas somente as espiguetas da região mediana de cada espiga. Para os grupos de espigas que foram tratados apenas com frio, o isolamento e purificação das células de micrósoro foram realizados logo após esta etapa.



Já as espigas que passaram pelos pré-tratamentos osmótico e químico (PTB, PTX e PTT), após os dias de frio, tiveram suas espiguetas incubadas em um frasco contendo 100 mL da solução de pré-tratamento, e armazenadas por três dias em BOD, no escuro a 4 °C até o momento da extração.

Para o pré-tratamento TSA, após ter sido aplicado o frio, foi realizado o isolamento das células, obtendo-se os micrósoros purificados. Uma vez purificados, o tubo contendo o pellet de células recebeu por sua vez 14 mL de uma solução composta de meio NPB-99 (Tabela 2) de extração acrescido de 0,5 µM de TSA (conforme metodologia descrita por Li et al., 2014). Os micrósoros foram resuspensoes nessa solução, onde foram mantidos por 24 horas a 4 °C (Figura 8). Após esse período, as células foram centrifugadas novamente e lavadas com o meio de extração NPB-99.

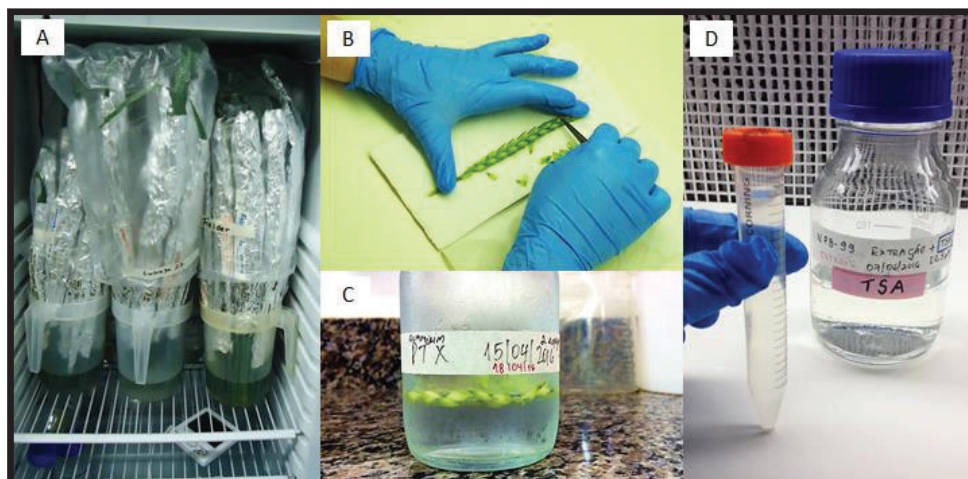


Figura 8 - a) Espigas embaladas em papel alumínio durante o pré-tratamento de frio, a 4°C. b) Coleta das espiguetas a serem colocadas em solução de pré-tratamento (glumas descartadas). c) Frasco contendo espiguetas em pré-tratamento por 3 dias. d) Micrósoros purificados em solução de pré-tratamento TSA. Embrapa Trigo, (2016).

### 3.6 Isolamento e Purificação dos Micrósoros

Após o pré-tratamento, os micrósoros foram isolados e cultivados conforme o protocolo estabelecido por Eudes & Amundsen (2005). Para cada procedimento de extração, as espiguetas assepticamente coletadas originadas de 10 espigas foram colocadas em um mini-blender autoclavado contendo aproximadamente 40 mL de meio líquido NPB 99 de extração (Tabela 2) gelado (LIU; ZHENG; KONZAK, 2002). As espiguetas foram trituradas

duas vezes (por 7 segundos) em velocidade baixa e o extrato foi filtrado por uma peneira de aço inoxidável autoclavada, essa suspensão foi novamente filtrada utilizando um filtro de células com uma malha estéril de 100  $\mu\text{m}$ . A solução filtrada foi dividida em dois tubos de 50 mL, e os micrósoros foram sedimentados por centrifugação (100 x g por 5 min a 4 °C). O sobrenadante foi descartado e os micrósoros foram coletados em um tubo apenas, de 50 mL, ressuspensos em 35 mL de meio NPB 99 líquido para mais um ciclo de centrifugação. O pellet foi colocado em um tubo de 15 mL, ressuspensão novamente e centrifugado, resultando em um pellet dissolvido em 2 mL de meio NPB 99 líquido. A suspensão com os micrósoros foi cuidadosamente pipetada sobre uma solução estéril de maltose (20%) formando uma banda espessa contendo as células-alvo. O pellet final com células purificadas foi obtido após a última centrifugação (Figura 9).

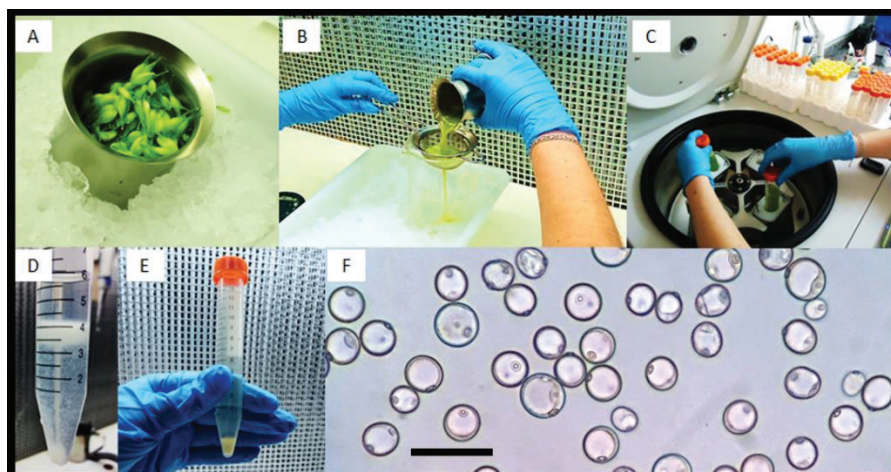


Figura 92- a) Blender de centrifugação mantido no gelo para evitar ações enzimáticas enquanto são removidas as espiguetas a serem trituradas. b) Extrato sendo filtrado para becker estéril gelado. c) Primeiro ciclo de centrifugação do extrato, por 5 minutos a 4°C. d) Banda de micrósoros depositada entre a maltose e o meio NPB 99. e) Pellet resultante da última centrifugação, com células já purificadas. f) Suspensão livre de fragmentos de tecidos vegetais, contendo micrósoros uninucleados viáveis. Barra representa 100  $\mu\text{m}$ . Embrapa Trigo, 2016.

### 3.7 Indução

Ao pellet final foi adicionado 1 mL do meio líquido de extração NPB 99 (Tabela 2) e a concentração de células foi determinada em hemocítômetro. Após a contagem, as células foram diluídas em meio semi-sólido (NPB 99 + 10% Ficoll, + 10 mg/L goma arábica + 0,2 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L cinetina + PAA 1 mg/L) e a concentração celular foi ajustada

para  $7-8 \times 10^4$  células/mL. Após a distribuição dos micrósporos em placas de Petri (30 mm), dez ovários foram assepticamente retirados das espigas (recém coletadas ou armazenadas no frio) e colocados em cada uma das placas, sendo que cada genótipo doador de micrósporo foi combinado com ovários de diferentes genótipos (BRS 194 ou Embrapa 27 ou Fielder) conforme a disponibilidade dos mesmos. As placas contendo os micrósporos e os ovários foram seladas com parafilme, e colocadas em placas maiores (150 mm) contendo uma placa pequena aberta, contendo água estéril. Uma vez seladas, estas placas maiores foram incubadas no escuro à 27 °C por cerca de 20 a 40 dias (Figura 10).

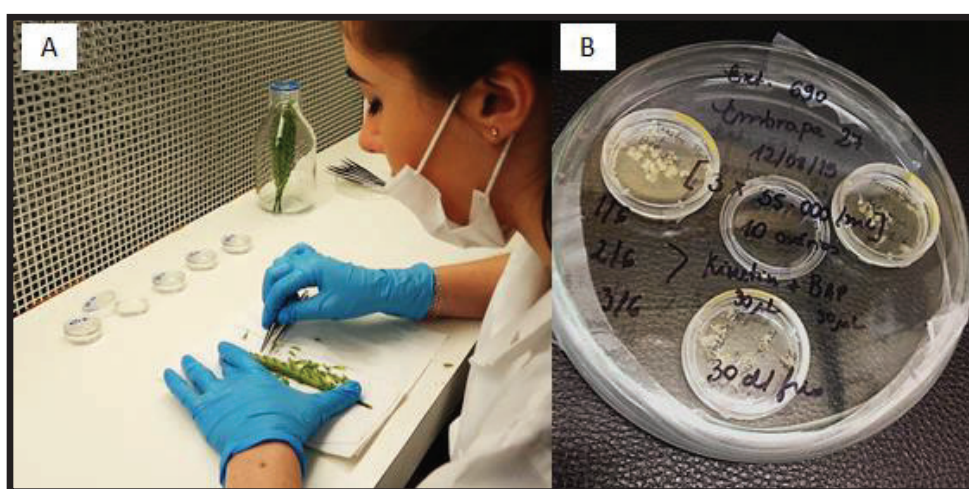


Figura 10- a) Micrósporos purificados em meio semi-sólido (placas 30 mm) recebendo ovários vivos. b) Placas seladas prontas para incubação a 27 °C para indução da androgênese. Embrapa Trigo 2016.

### 3.8 Regeneração

Os embriões com tamanho aproximado de 1 mm (Figura 11), foram transferidos em condições estéreis em câmara de fluxo laminar para meio sólido GEM (Tabela 2) (EUEDES et al., 2003) para placas de Petri com 100 mm de diâmetro contendo 20 mL de meio sólido GEM. As placas de Petri foram seladas com parafilme e transferidas para câmaras de crescimento, onde permaneceram por cerca de 30 dias, com fotoperíodo e temperatura controlados (16 horas de luz à aproximadamente 24°C).



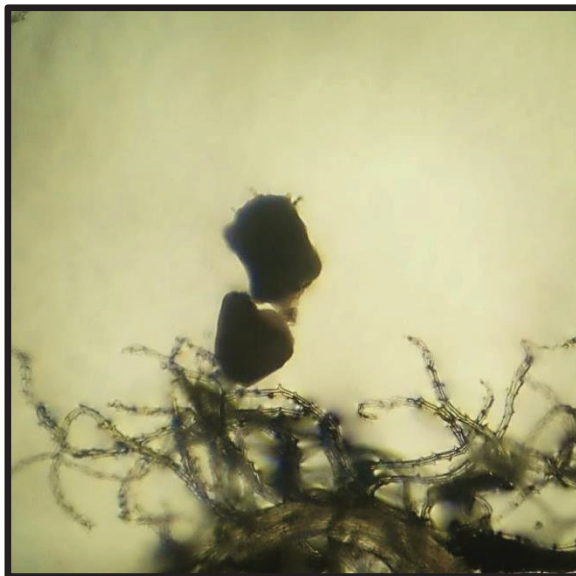


Figura 11-Embriões de 1 mm de tamanho obtido através da cultura de micrósporos isolados prontos para serem transferidos ao meio sólido GEM.

### **3.9 Enraizamento**

As plântulas verdes obtidas foram transferidas ao meio de enraizamento “rooting” (Tabela 2) (EUDES et al., 2003) em tubos de ensaio e colocadas em câmara de crescimento sob as mesmas condições da etapa anterior (16 horas de luz à aproximadamente 24 °C).

### **3.10 Aclimação**

Assim que as plantas apresentavam sistema radicular desenvolvido, foram transferidas para um recipiente com vermiculita, recebendo solução nutritiva a cada três dias. O recipiente inicialmente foi coberto por uma tampa, a qual foi sendo retirada aos poucos, até o total descobrimento das plantas. Após aclimatadas, as plantas foram transferidas para vasos nas mesmas condições das plantas doadoras (24 °C com 16 horas/luz).

### 3.11 Avaliação do Número de Embriões Formados

Foi avaliado o número de embriões no momento da transferência para o meio de regeneração GEM, o número de plantas verdes e albinas obtidas e a porcentagem de duplicação espontânea. O trabalho foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, onde os três genótipos doadores de micrósoros (BRS 194, Embrapa 27 e Fielder) foram combinados com cinco pré-tratamentos (Frio convencional, PTB, PTX, PTT e TSA) e com três genótipos doadores de ovários (BRS 194, Embrapa 27 e Fielder) conforme a disponibilidade dos mesmos.

De forma inerente à técnica, houve variação do número de repetições (de 1 a 21), sendo que cada repetição consistiu de uma placa de petri (30 mm) contendo um número aproximado de 225.000 células. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey-Kramer (5%) utilizando o programa estatístico Costat (COHORT SOFTWARE, 2003).

Tabela 2 – Componentes dos meios de cultura NPB-99 (LIU; ZHENG; KONZAK, 2002), utilizado na extração e indução dos embriões; GEM (EUDES et al., 2003), para a regeneração dos embriões; e Rooting (EUDES et al., 2003), para o enraizamento das plântulas verdes

| Composição<br>(mg/L)                                 | NPB-99<br>(Indução) | GEM<br>(Regeneração) | ROOTING<br>(Enraizamento) |
|--|---------------------|----------------------|---------------------------|
| <u>Sais</u>  |                     |                      |                           |
| KNO <sub>3</sub>                                     | 1415                | 1900                 | 1900                      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 232                 | -                    | -                         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 200                 | 170                  | 170                       |
| CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O                | 83                  | 440                  | 440                       |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                | 93                  | 370                  | 370                       |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                      | -                   | 165                  | 1650                      |
| KI   | 0,4                 | -                    | 0,83                      |
| MnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                | 5                   | 22                   | 22                        |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 5                   | 6,2                  | 6,2                       |
| ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                | 5                   | 8,6                  | 8,6                       |
| CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O                | 0,0125              | 0,2                  | 0,2                       |
| CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O                | 0,0125              | 0,15                 | 0,15                      |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O | 0,0125              | 0,25                 | 0,25                      |
| FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                | 37,3                | 37,3                 | 37,3                      |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                 | 27,8                | 27,8                 | 27,8                      |
| <u>Carboidratos</u>                                  |                     |                      |                           |
| Maltose  | 90.000              | 15.000               | -                         |

Tabela 2 – Continuação...

|                                |     |       |        |
|--------------------------------|-----|-------|--------|
| Sacarose                       | -   | 5.000 | 10.000 |
| Xilose                         | -   | 350   | -      |
| Ribose                         | -   | 350   | -      |
| Mio-inositol                   | 50  | 200   | -      |
| <u>Aminoácidos</u>             |     |       |        |
| L-Glutamina                    | 500 | 750   | -      |
| L-Asparagina                   | -   | 60    | -      |
| L-Arginina                     | -   | 30    | -      |
| Ácido $\gamma$ -amino butírico | -   | 80    | -      |
| L-Serina                       | -   | 55    | -      |
| L-Alanina                      | -   | 30    | -      |
| L-Cistina                      | -   | 10    | -      |
| L-Leucina                      | -   | 10    | -      |
| L-Isoleucina                   | -   | 10    | -      |
| L-Prolina                      | -   | 10    | -      |
| L-Lisina                       | -   | 10    | -      |
| L-Fenilalanina                 | -   | 5     | -      |
| L-Triptofano                   | -   | 5     | -      |
| L-Metionina                    | -   | 5     | -      |
| L-Valina                       | -   | 5     | -      |
| L-Histidina                    | -   | 2,5   | -      |
| L-Treonina                     | -   | 2,5   | -      |
| L-Glicina                      | -   | 2,5   | -      |
| <u>Vitaminas</u>               |     |       |        |
| 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   | -      |
| Betaina Clorada                | -   | 7,9   | -      |
| Colina-HCl                     | -   | 10    | -      |
| Ácido Ascórbico                | -   | 0,4   | -      |
| <u>Ácidos Orgânicos</u>        |     |       |        |
| Ácido Málico                   | -   | 1.000 | -      |
| Ácido Fumárico                 | -   | 200   | -      |
| Ácido Succínico                | -   | 20    | -      |
| Ácido $\alpha$ -cetoglutárico  | -   | 20    | -      |
| Ácido Pirúvico                 | -   | 5     | -      |
| Ácido Cítrico                  | -   | 5     | -      |
| Ágar                           | -   | -     | 5.000  |
| Gelrite                        | -   | 3.000 | -      |

Tabela 2 – Continuação...

| Reguladores de crescimento |        |     |   |     |
|----------------------------|--------|-----|---|-----|
| 2,4-D                      | 0,2    | -   | - | -   |
| Kinetin                    | 0,2    | -   | - | -   |
| PAA                        | 1      | -   | - | 0,5 |
| Outros                     |        |     |   |     |
| Espermina                  | -      | 1   | - | -   |
| Espermidina                | -      | 4   | - | -   |
| Cefotaxima                 | 0,0857 | -   | - | -   |
| Ph                         | 7      | 5,8 | - | 6   |

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No presente estudo foi avaliada a resposta embriogênica de três cultivares de trigo (BRS 194, Embrapa 27 e Fielder) em relação a cinco pré-tratamentos e ao co-cultivo de ovários, oriundos dos três genótipos citados, com o objetivo de otimizar o método de produção de DH via micrósporos isolados, identificando quais variações se destacam na indução da embriogênese do micrósporo, inclusive para genótipos recalcitrantes à androgênese.

### **4.1 Condução das Plantas Doadoras em Ambientes Controlados**

Assim como os tratamentos utilizados, as condições nas quais as plantas doadoras são cultivadas, também desempenham papel decisivo no sucesso da cultura de micrósporos isolados. Apesar de não ter sido variável de estudo neste trabalho, o desenvolvimento das plantas doadoras para produção de haploides requer constante atenção e cuidado. O cultivo das plantas doadoras em câmaras de crescimento com ambiente controlado (Convicon) garantiu que as mesmas se desenvolvessem até o final do ciclo em condições livres de insetos e patógenos, sem necessidade de aplicação de pesticidas, resultando em plantas completamente saudáveis. Entretanto, apesar do rigoroso cuidado com as plantas doadoras, foi possível observar alguns sintomas foliares, em todos os ciclos de plantio, como uma ligeira clorose nas pontas de folhas mais jovens, semelhante ao relatado por Bugbee & Koerner (1997), como sendo típicos de plantas cultivadas em ambientes controlados, especialmente sob luz contínua (emitindo ar quente), e com fotoperíodo prolongado ou em rápido crescimento (Figura 12).



Figura 3- a) Leve clorose apresentada na ponta das folhas (setas) de todos os genótipos, possivelmente atribuída ao crescimento de plantas em ambientes controlados. Embrapa Trigo, (2016).

Em alguns momentos, muitas plantas (principalmente as do genótipo Fielder) apresentavam acentuada clorose internerval em suas folhas, o que pode configurar alguma deficiência nutricional, mesmo com constante aplicação de solução nutritiva (Figura 13).

Além disso, outro tipo de sintoma, ocorrendo também na ponta das folhas, porém como necrose, foi outra característica observada, notada com mais frequência, estando presente de forma mais homogênea entre as plantas. Interessantemente, Embrapa 27 foi o genótipo que menos apresentou tais sintomas, muito provavelmente devido à rusticidade desta cultivar.



Figura 4- Clorose internerval acentuada (setas) apresentada no genótipo Fielder, possivelmente atribuída à deficiência de Ferro. Embrapa Trigo, (2016).

Os sintomas observados nas plantas doadoras diferiram entre os vários ciclos de plantio, apesar de terem sido mantidas as mesmas condições de crescimento entre os ciclos (mesma mistura na composição dos baldes, foto-período e temperaturas diurna e noturna). Entre a diversidade dos sintomas apresentados, os mais marcantes foram as folhas rasgadas ou dentadas e a acentuada necrose das pontas das folhas mais jovens, sintoma conhecido como “morte dos ponteiros das folhas” (Figura 14), sugerindo em alguns casos, deficiência causada por cálcio ou ainda por micronutrientes, como cobre e boro. Análises de solo foram feitas nas amostras contidas nos baldes e nenhuma deficiência nutricional foi apontada.



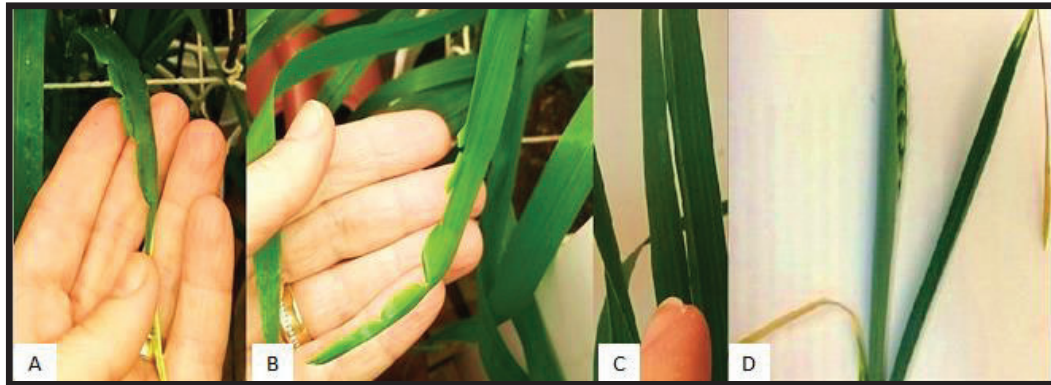


Figura 5- a, b, c) Sintomas de folhas “rasgadas” possivelmente atribuídos à deficiência de cálcio. d) Acentuada morte dos ponteiros das folhas mais jovens no genótipo BRS 194. Embrapa Trigo, (2016).

Como as condições de crescimento das plantas doadoras foram as mesmas durante todos os ciclos, não foi possível explicar as diferenças observadas entre os ciclos, especialmente após os resultados das análises originadas do Laboratório de Solos, comprovando a ausência de deficiência nutricional na mistura usada para o crescimento das plantas. Os sintomas, de uma maneira geral, iniciavam na fase final do perfilhamento, início do alongamento (fase Zadoks 31). Com o desenvolvimento das plantas, próximo à fase de coleta, os sintomas pareciam diminuir ou serem amenizados, persistindo apenas aqueles nas plantas com acentuada morte dos ponteiros (necrose da ponta das folhas). Diante desta problemática, foram coletadas espigas de plantas sem sintomas (quando possível), ou com sintomas menos evidentes, e de preferência, de perfilhos principais, visto que tal associação já foi relatada anteriormente, como sendo mais responsivos à androgênese (SRISKANDARAJAH et al., 2015).

A fisiologia das plantas doadoras representa um dos principais fatores das muitas etapas que interferem na produção de haploides (independentemente do método escolhido), e, portanto, afeta de maneira direta a resposta ao processo androgênico (KASHA; ZIAUDDIN; CHO, 1990; JÄHNE e LÖRZ, 1995, ZHENG, 2003). Tendo conhecimento sobre a influência direta do status das plantas doadoras em relação à resposta androgênica, vários plantios foram feitos, buscando produzir plantas sem sintomas. No entanto, durante o desenvolvimento deste trabalho, todas as plantas apresentaram algum tipo de sintoma.



## 4.2 Indução

Através da visualização ao microscópio óptico, foi possível verificar determinados padrões quanto à morfologia das células em cada genótipo. Enquanto Fielder e BRS 194 apresentavam na sua maioria, células grandes e globosas, com aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro, (Figura 15) nitidamente Embrapa 27 se caracterizava por apresentar células ligeiramente menores.

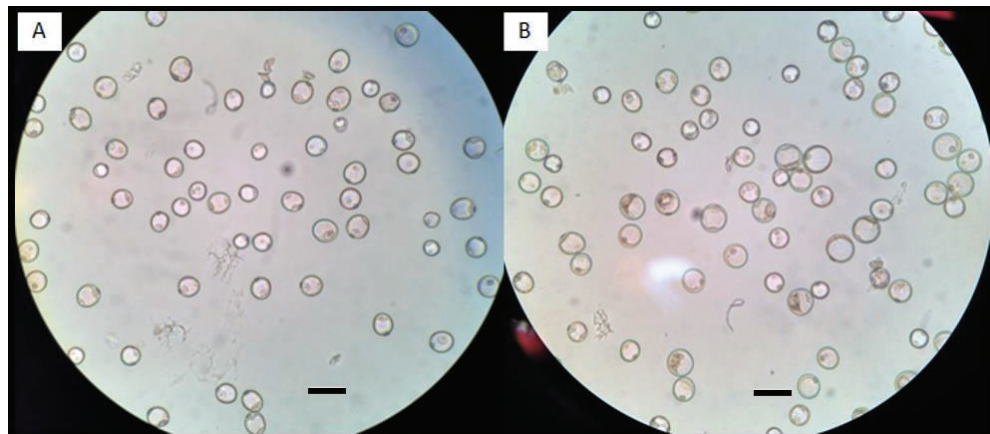


Figura 6- Microsporos do genótipo Embrapa 27 (a), apresentando menor tamanho e microsporos de BRS 194 (b), com diâmetro notavelmente maior, observados em microscópio óptico. Barra representa 100  $\mu\text{m}$ . Embrapa Trigo, (2016).

Além disso, regularmente, as extrações de Fielder evidenciavam células com estruturas fibrilares formando círculos, do tipo “star-like” (Figura 16), padrão de células definido como “sinalizadoras” da rota embriogênica (INDRIANTO et al., 2001; MARASCHIN et al., 2005a).

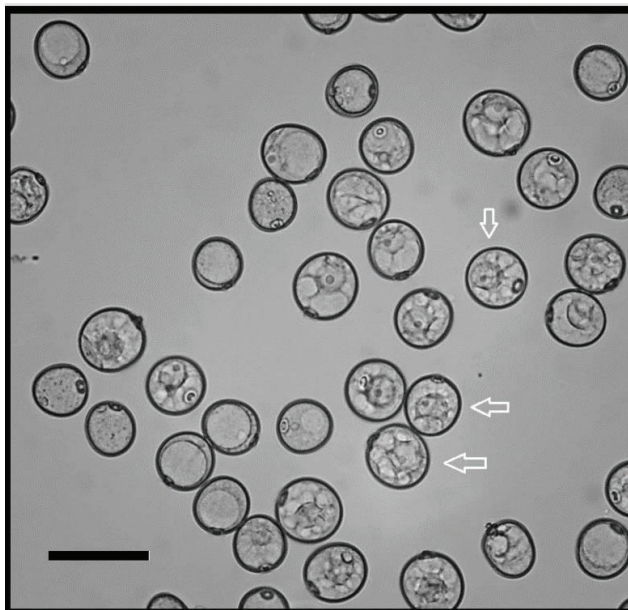


Figura 7- Micrósporos purificados oriundas do genótipo Fielder apresentando morfologia tipo “star-like” (setas). Barra representa 100  $\mu\text{m}$ . Embrapa Trigo, (2016).

Verificou-se também que, quando o período de armazenamento no frio excedia 27 dias, grande parte das células passava a apresentar aspecto envelhecido, resultando em extrações com poucas células viáveis, retidas durante o processo de centrifugação, entre o meio de extração e o colchão de maltose, havendo muitas células depositadas no fundo do tubo (descartadas). Por estarem em fase avançada de desenvolvimento (devido ao longo período no frio), as células maiores (e mais pesadas) desciam para a parte final do tubo, após a centrifugação, restando poucas células viáveis na porção retida pelo gradiente de maltose. Por outro lado, o longo período de frio pareceu favorecer o aparecimento de células “star-like” em Fielder, mesmo resultando num menor número de células.

Os micrósporos tipo “star-like” foram relatados como embriogênicos em canola, cevada, trigo e tabaco (MARASCHIN et al., 2005a; SORIANO; LI; BOUTILIER., 2013). Entretanto, apesar de ser considerado como um marcador do início do processo embriogênico dos micrósporos, em *Brassica napus* os micrósporos não exibem estas estruturas citoplasmáticas estreladas, apresentando apenas um aumento no tamanho das células, seguido por divisões simétricas. Desta maneira, ainda não se sabe exatamente qual a característica dos micrósporos que pode ser adotada como um sinal universal do estado de totipotência (SHARIATPANAH et al., 2006). Isto esclarece em parte o fato de que, neste trabalho, algumas células, originadas de diferentes grupos de extrações, mostraram ser embriogênicas

(resultando na formação de embriões), porém nem sempre apresentavam células do tipo “star-like” em sua composição.

Em condições adequadas, após as etapas de pré-tratamento e purificação das células, seguido de um período de incubação de aproximadamente sete dias no meio de indução (semi-líquido NPB-99), os micrósporos uninucleados começavam a flutuar, fragmentando o grande e único vacúolo em vários outros pequenos compondo uma estrutura fibrilar. Logo após essa fase, foi possível observar as primeiras divisões dos micrósporos. Com aproximadamente 20 dias de incubação, em todos os genótipos verificou-se estruturas multicelulares prestes a romper a exina (Figura 17).



Figura 8- a) Micrósporos embriogênicos (morfologia “star-like”); b) Massa celular prestes a romper a exina do micrósporo (seta) após 10 dias no meio de indução; c) Formação de estruturas embriogênicas em meio de indução, com aproximadamente 21 dias de cultivo. Barra representa 100  $\mu$ m. Embrapa Trigo, (2016).

Entre os três genótipos estudados, houve diferenças visíveis em relação ao número de dias em que estas estruturas multicelulares surgiram após a incubação e principalmente quanto ao número de estruturas formadas. Fielder e BRS 194 iniciavam a conversão das células em estruturas multi-celulares muito mais rapidamente que Embrapa 27, indicando haver um atraso na conversão dessas células em esporófitos. Apesar de ter recebido o estímulo para o desvio da rota, a grande maioria das células deste genótipo recalcitrante, quando observadas ao microscópio óptico, pareciam inalteradas ou “congeladas” durante a fase de indução, ocorrendo posteriormente, uma gradativa deterioração do conteúdo celular, concomitantemente com a oxidação dos ovários.

### 4.3 Pré-Tratamento das Espigas

De maneira geral, para todos os genótipos, os diferentes pré-tratamentos aplicados às espigas resultaram em extrações com um ótimo rendimento de células, com valores variando entre  $7-8 \times 10^4$  células/mL, não havendo diferenças aparentes quanto a esse aspecto. O bom rendimento foi, de certa maneira, inesperado, uma vez que além de estar associado ao genótipo e ao tratamento aplicado às espigas, também depende grandemente das condições fisiológicas das plantas doadoras. Quando plenamente saudáveis, favorece as chances de se conseguir um maior número de células totipotentes. Isto ocorre porque apenas uma pequena porcentagem das células de micrósporos será capaz de mudar sua rota de desenvolvimento, de gametas para esporófitos, mesmo que todas tenham recebido o sinal para que isso ocorra. Assim, aumentando o número de células iniciais e viáveis, aumenta-se a frequência de se obter micrósporos embriogênicos.

Na embriogênese dos micrósporos, o tipo de estresse aplicado às espigas desempenha um papel importante não só para a reprogramação das células da sua rota natural de desenvolvimento, de gametofítico para o esporofítico, mas também no desenvolvimento de embriões em plântulas verdes. Assim, a escolha e aplicação de um estresse adequado atuam fortemente sobre três aspectos críticos em protocolos de produção de DH: a taxa de indução embriogênica, a taxa de geração de plantas verdes e a ocorrência de albinismo entre as plantas regeneradas (WÜRSCHUM; TUCKER; MAURER, 2014). Uma ampla variedade de estresses aplicados às espigas já foi utilizada para a indução da androgênese (SHARIATPANAH et al., 2006; ISLAM; TUTEJA, 2012). Dentre eles, está o estresse sob forma de frio, o qual foi relatado pela primeira vez por Nitsch e Norrel (1973) em micrósporos de *Datura innoxia*. Considerado um tratamento físico e de simples aplicação, este pré-tratamento é relatado em muitos trabalhos, sendo amplamente utilizado para produção de haploides em muitas espécies de plantas cultivadas por todo o mundo (ISLAM; TUTEJA, 2012).

Os resultados obtidos neste trabalho apontaram que o pré-tratamento feito com o frio tradicional (4 °C) promoveu a androgênese em várias combinações de fatores (genótipo x pré-tratamento x genótipo doador de ovários). No entanto, as respostas mais expressivas foram observadas para BRS 194 (com ovários de Fielder – média de 84 embriões por repetição), e Fielder (com ovários de Fielder – média de 31 embriões). Apesar da expressiva

resposta causada pelo tratamento de frio padrão (Figura 7 B), para três genótipos testados, cabe destacar que, não apenas o pré-tratamento promoveu a androgênese, mas também o genótipo doador de ovários, uma vez que, ovários de Fielder estimulou mais a embriogênese nos três genótipos testados (Tabela 3 e Figura 18 C). Tal resultado explica a característica multi-fatorial da resposta androgênica, evidenciando que apenas o pré-tratamento não seja suficiente para o desvio da rota e consequente formação de embriões.

Ao utilizar-se da baixa temperatura como estresse, a mesma parece agir freando o desenvolvimento da maioria dos micrósporos, o que poderia desencadear o aumento da viabilidade embriogênica destas células. Neste sentido, o frio é responsável por atrasar a divisão mitótica do núcleo, sincronizando de modo geral, a fase dos micrósporos durante o pré-tratamento, resultando em frequências de indução mais elevadas (HU; KASHA, 1997).

Embora amplamente utilizado, o mecanismo pelo qual as baixas temperaturas desencadeiam a resposta androgênica ainda permanece desconhecido. Foi demonstrado que o frio reprime a via gametofítica induzindo divisões mitóticas simétricas e retardando o desenvolvimento do pólen (SHIRDELMOGHANLOO et al., 2009). O choque de frio também é feito para assegurar a sobrevivência de um maior número de células (SHARIATPANAH et al., 2006). De acordo com esses autores, a compreensão de um mecanismo preciso de estresse, no que diz respeito à embriogênese do micrósporo, ainda está longe de ser elucidada, independentemente do tipo de estresse escolhido (frio, calor, químico ou outros). Com base nessas informações, alguns autores acreditam que o frio não é propriamente um estresse, mas sim um tratamento aplicado às células que visam protegê-las, mais do que prejudicá-las, e que o verdadeiro estresse seria causado pela privação de alimentos, processo conhecido como “starvation” (ZORINIANTS et al., 2005). Assim, o pré-tratamento de frio a 4° C durante vários dias é tido como um estímulo benéfico na resposta androgênica do trigo, atuando também, de forma positiva, na duplicação espontânea dos cromossomos (HU e KASHA, 1997; ZHENG 2003; CISTUÉ e KASHA, 2005).

Tabela 3 – Efeito dos genótipos doadores de micrósporos, pré-tratamentos e dos genótipos doadores de ovários na produção de embriões haploides/ duplo-haploides de trigo

| Genótipo doador de micrósporos | Pré-tratamento   | Genótipo doador de ovários | n  | Média nº embriões |
|--------------------------------|------------------|----------------------------|----|-------------------|
| BRS 194                        | Frio °C          | Fielder                    | 17 | 84 a              |
| BRS 194                        | Frio °C          | Embrapa 27                 | 11 | 1,7 b             |
| BRS 194                        | Frio °C          | BRS 194                    | 11 | 1,5 b             |
| BRS 194                        | PTB (3 dias/4°C) | Fielder                    | 12 | 10,3 a            |
| BRS 194                        | PTB (3 dias/4°C) | Embrapa 27                 | 2  | 9,0 a             |
| BRS 194                        | PTB (3 dias/4°C) | BRS 194                    | 4  | 0,3 a             |
| BRS 194                        | PTT (3 dias/4°C) | Embrapa 27                 | 8  | 66 a              |
| BRS 194                        | PTT (3 dias/4°C) | Fielder                    | 21 | 7,9 b             |
| BRS 194                        | PTT (3 dias/4°C) | BRS 194                    | 5  | 6,4 b             |
| BRS 194                        | PTX (3 dias/4°C) | Fielder                    | 15 | 24,6 a            |
| BRS 194                        | PTX (3 dias/4°C) | Embrapa 27                 | 5  | 0,8 a             |
| BRS 194                        | TSA (24h/4°C)    | Fielder                    | 13 | 3,4 a             |
| BRS 194                        | TSA (24h/4°C)    | Embrapa 27                 | 4  | 0 a               |
| Embrapa 27                     | Frio 4°C         | Fielder                    | 20 | 1,6 a             |
| Embrapa 27                     | Frio 4°C         | Embrapa 27                 | 7  | 0,3 a             |
| Embrapa 27                     | Frio 4°C         | BRS 194                    | 1  | 0 a               |
| Embrapa 27                     | PTB (3 dias/4°C) | Fielder                    | 15 | 2,4 a             |
| Embrapa 27                     | PTB (3 dias/4°C) | BRS 194                    | 2  | 0 a               |
| Embrapa 27                     | PTB (3 dias/4°C) | Embrapa 27                 | 4  | 0 a               |
| Embrapa 27                     | PTT (3 dias/4°C) | Fielder                    | 19 | 0,4 a             |
| Embrapa 27                     | PTT (3 dias/4°C) | BRS 194                    | 12 | 0,3 a             |
| Embrapa 27                     | PTT (3 dias/4°C) | Embrapa 27                 | 1  | 0 a               |
| Embrapa 27                     | PTX (3 dias/4°C) | Fielder                    | 16 | 10,6 a            |
| Embrapa 27                     | PTX (3 dias/4°C) | BRS 194                    | 2  | 0 a               |
| Fielder                        | Frio 4°C         | Fielder                    | 19 | 31 a              |
| Fielder                        | Frio 4°C         | Embrapa 27                 | 3  | 3,6 a             |
| Fielder                        | PTT (3 dias/4°C) | Fielder                    | 14 | 19 a              |
| Fielder                        | PTT (3 dias/4°C) | Embrapa 27                 | 3  | 0,3 a             |
| Fielder                        | PTX (3 dias/4°C) | Fielder                    | 15 | 3,5 a             |
| Fielder                        | PTX (3 dias/4°C) | Embrapa 27                 | 3  | 0 a               |
| Fielder                        | TSA (24h/4°C)    | Fielder                    | 7  | 8,6 a             |
| Fielder                        | TSA (24h/4°C)    | Embrapa 27                 | 5  | 0 a               |

Valores seguidos pela mesma letra (dentro dos sub-grupos) não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer a 5% de probabilidade. n = número de repetições (placa de 30 mm)

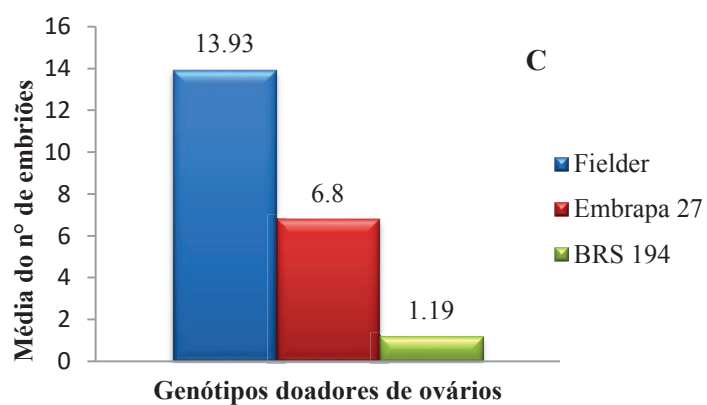
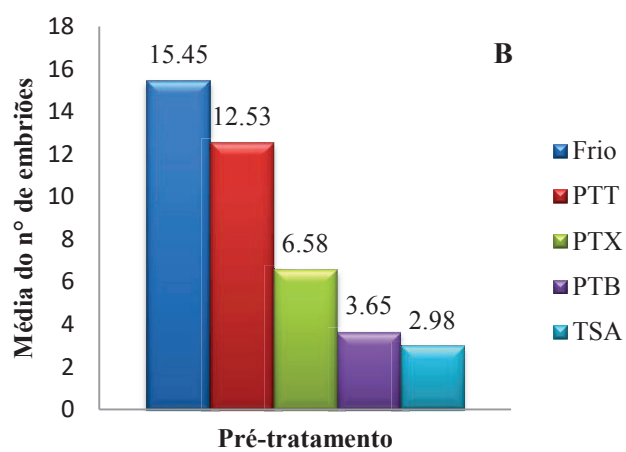
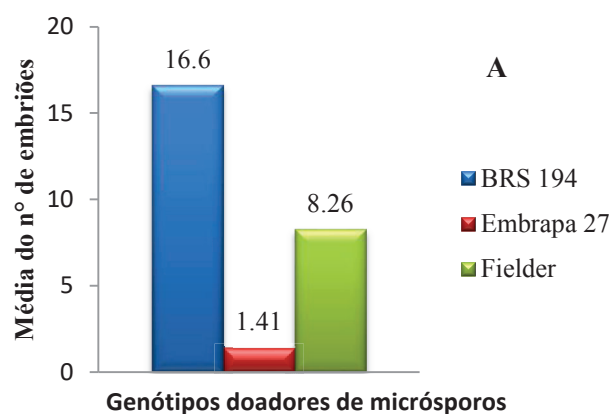


Figura 9- Média total do número de embriões obtidos por A) Genótipos, B) Pré-tratamentos e C) Genótipos doadores de ovários. Embrapa, (2016).



Na literatura, sobre a cultura de micrósporos isolados em cereais, além do frio, outros pré-tratamentos frequentemente utilizados são os de baixa temperatura em associação com tratamentos químicos e osmóticos, em especial com manitol (HU e KASHA, 1997; LANTOS et al., 2006; AYED et al., 2010; SANTRA et al., 2012). O uso desses mesmos tratamentos (químicos e osmóticos) também pode se dar em conjunto com o choque de calor ao invés do frio, cujo efeito é relatado como benéfico (INDRIANTO et al., 2001; OLESZCZUK; SOWA; ZIMNY, 2006). Alguns autores relatam que até resultados melhores podem ser obtidos com a substituição do frio pelo choque de calor à 33 °C (TOURAEV et al., 1996; LIU et al., 2002). Entretanto, em ensaios preliminares deste estudo, também foram utilizadas temperaturas mais altas que o frio “padrão”, tratando as espigas com soluções de pré-tratamento incubadas à 22 °C (dados não mostrados). Porém, tais tratamentos resultaram em espiguetas amareladas e num baixo rendimento de células uninucleadas, revelando uma aceleração no estágio de desenvolvimento dos micrósporos, uma vez que na sua grande maioria, as células apresentavam-se já binucleadas e com deposição de amido (dados não mostrados). Por essa razão, no presente estudo, todos os pré-tratamentos foram realizados em baixa temperatura (4 °C).

Trabalhos mais recentes vêm mostrando que a associação do frio com tratamentos químicos ou osmóticos resultam numa melhora significativa da resposta embriogênica. Como exemplo dessa associação, muitos trabalhos foram feitos aplicando estresse de quatro ou mais dias de frio (4 °C), em combinação com o manitol, resultando num maior número de embriões e de plantas verdes, conforme relatado por vários autores (LANTOS et al., 2006; LABBANI; BUYSER; PICARD, 2007; SHIRDELMOGHANLOO et al., 2009; SANTRA et al., 2012; ASIF et al., 2013a).

Entretanto, os resultados obtidos neste estudo apontaram que, nem sempre o uso de manitol e associações resultaram numa melhor resposta embriogênica (Figura 18 B). Entre os fatores estudados, o pré-tratamento com o frio (convencional), para o genótipo BRS 194 foi o que mais se destacou, produzindo o maior número de embriões, sobressaindo-se até do genótipo controle (Fielder), conhecido como altamente responsivo à androgênese. Assim, baseando-se nesses resultados foi possível depreender que, mesmo sendo fundamental para indução da resposta androgênica, os pré-tratamentos possuem forte influência sobre os genótipos, havendo respostas diferentes para genótipos diferentes. No entanto, apesar desta



influência entre genótipos e pré-tratamentos, a baixa resposta observada em Fielder foi atribuída aos sintomas fisiológicos apresentados nas plantas doadores deste genótipo. Dos três genótipos estudados, Fielder foi o que apresentou sintomas mais severos, variando desde a simples queima da ponta das folhas, até mais fortes como a clorose internerval e a morte dos ponteiros. O bom rendimento de células obtidas para este genótipo não descarta a possibilidade de ter havido um comprometimento na natureza e genética dessas células, alterando seu padrão de resposta à androgênese. Em ensaios anteriores a este estudo (dados não mostrados), Fielder se comportou como altamente responsivo ao método, e juntamente com Pavon 76 vem sendo universalmente usado como controle positivo à androgênese (SCAGLIUSI, 2014; CASTILLO; SÁNCHEZ-DÍAZ; VALLÉS, 2015).

Além do tratamento tradicional de frio, outros dois pré-tratamentos se destacaram para a conversão das células de micrósoros para esporófitos (Tabela 3). O primeiro foi identificado como PTT, que para o genótipo BRS 194, em combinação com ovários de Embrapa 27, produziu em média 66 embriões por placa. Este pré-tratamento, além de conter manitol à 300 mM, foi adicionado DMSO (1%), sulfato de cobre (20  $\mu$ M), TSA (0,5  $\mu$ M) e AGP's (50 mg/L). Cada um dos componentes deste tratamento desempenham um papel chave na indução da embriogênese.

Entre os componentes do primeiro pré-tratamento, o manitol se destaca como promotor de choque osmótico, atuando no fenômeno do movimento de entrada e saída de água das células vegetais. Em estudo realizado por Wojnarowicz e colaboradores (2004), evidenciou-se que o uso do manitol durante três dias a 4 °C induz tanto uma pressão osmótica estável nos meios de pré-tratamento como uma privação de carboidratos pelas células de micrósoros. Isso ocorre porque o manitol age penetrando nas células de forma passiva e lenta, uma vez que a membrana plasmática é pouco permeável a ele. Dessa forma, quando o manitol é usado em alta concentração, a água é incapaz de penetrar nos micrósoros, desencadeando um importante sinal de déficit hídrico na célula, o que provavelmente levaria à mudança na sua rota de desenvolvimento (AYED et al., 2010).

Esta resposta induzida pelo manitol está fortemente associada com os componentes da membrana celular, já que estes desempenham um papel fundamental na transdução de sinal de estresses, sendo suscetíveis a alterações que podem alterar a fluidez da membrana, modificando a permeabilidade e as funções metabólicas celulares (HUANG,

2006). Os sinais externos induzidos pelo manitol provocariam alterações nas propriedades físicas da membrana do micrósporo, influenciando a regulação da expressão gênica (LOS; MURATA 2004; MALIK et al., 2014), desencadeando por sua vez a reprogramação das células de micrósporos em esporófitos, deflagrando o mecanismo conhecido como a “embriogênese do micrósporo”. Em seguida, ocorre a fusão dos núcleos, ocorrendo várias divisões subsequentes, levando à formação de estruturas multi-celulares, embriões e plantas, evento já relatado para várias espécies vegetais (WOJNAROWIEZ et al., 2004).

Estudos de expressão gênica em micrósporos de cevada (após tratamento com manitol) mostraram que os genes associados com a habilidade destas células em se dividir e formar embriões, estavam especialmente envolvidos com a membrana plasmática, onde mudanças metabólicas e estruturais foram observadas (MARASCHIN et al., 2005a; MUÑOZ-AMATRIÁIN et al., 2006). Assim, em função do importante papel de “coordenar” as proteínas ligadas à membrana e as proteínas sensoriais que “captam” os sinais externos à célula, a membrana plasmática é peça fundamental ao sucesso do processo androgênico. Baseado neste conhecimento foi postulado que, possíveis modificações nos constituintes da membrana celular, tais como lipídios, poderiam estar envolvidos na percepção precoce do sinal de estresse e transdução (MUNNIK; MEIJER, 2001), beneficiando o gatilho do processo embriogênico. Utilizando-se deste mesmo fundamento, Echávarri e Cistué (2016) propuseram o uso do dimetilsulfóxido (DMSO) no pré-tratamento de espigas de trigo e cevada, para modificar a fluidez da membrana plasmática, já que além de alterar a permeabilidade, também poderia aumentar o fluxo de moléculas de baixo peso molecular para dentro da célula, trazendo respostas positivas ao processo androgênico. Estes autores perceberam que, em cevada, a adição de 1% de DMSO à solução de pré-tratamento das espigas, conduziu a um aumento de 1,4 a 2,8 vezes em variedades recalcitrantes ao processo androgênico e a um aumento de 1,1 a 1,5 vezes nos genótipos responsivos.

Em trigo, os mesmos autores relatam que a adição de DMSO também teve um efeito positivo, aumentando em até três vezes o número de embriões e plantas verdes formadas, entre os três genótipos testados: Antequera, Atae e Kilopondio, sendo neste último, a mais evidente.

O DMSO, um dos componentes do pré-tratamento PTT usado neste estudo, devido à sua capacidade antioxidante, pode neutralizar os efeitos negativos de espécies

reativas de oxigênio (ROS), levando a um maior número de micrósoros vivos. Isto poderia explicar o aumento no número de plantas obtidas usando o tratamento contendo DMSO. Echávarri e Cistué destacam também que através da suplementação com DMSO a 1% foi possível aumentar a produção de plantas diploides espontâneas em trigo, variando de 14 – 50% para o controle sem DMSO e de 19,2 – 66,7% com DMSO. A capacidade do DMSO em diminuir a espessura da membrana enquanto aumenta a permeabilidade celular já é conhecida por muito tempo. Estudos realizados em cultura de células vegetais mostraram que o aumento da permeabilidade e a diminuição da espessura da bi-camada lipídica causada pelo DMSO promove a passagem de substâncias importantes para as células (BRODELIUS; NILSSON 1983; ÖRVAR et al., 2000; SANGWAN et al., 2001). Echávarri e Cistué (2016) relatam que o DMSO poderia facilitar a entrada de nutrientes nos estágios iniciais da embriogênese, levando ao crescimento mais rápido de estruturas multi-celulares, aumentando a probabilidade desta massa de células em se tornar um embrião haploide.

Outras substâncias também vêm sendo usadas com frequência na indução da androgênese, de maneira direta (induzindo os micrósoros a seguir a rota embriogênica) ou indiretamente (minimizando a formação de plantas albinas). Utilizado conjuntamente, a adição de sulfato de cobre também é capaz de atuar benéficamente, proporcionando uma melhoria da sobrevivência das células e na sincronização da primeira divisão embriogênica, que por sua vez irá refletir num aumento significativo no número de plantas, provocando uma redução na proporção de plantas albinas (WOJNAROWIEZ et al., 2002). Em trabalho realizado por Jacquard e colaboradores (2009), em cevada, foi possível obter pela primeira vez, a regeneração de plantas verdes através da cultura de anteras, em cultivares conhecidas por regenerar somente plantas albinas.

Verificou-se que a adição de 10  $\mu$ M de sulfato de cobre aos meios de pré-tratamento e também no meio de cultura (2,5 mg/L) aumentou a densidade de plastídeos três vezes mais em embriões da cultivar de cevada Igri e duas vezes na cultivar Cork. Assim, segundo os mesmos autores, o sulfato de cobre atua na divisão dos plastídeos e no desenvolvimento paralelo das membranas internas dos cloroplastos.

A presença de corpos prolamelares nos embriões após quatro semanas de cultura indica ainda que o sulfato de cobre induz a desdiferenciação do amiloplasto em proplastídeo antes de entrar no desenvolvimento do cloroplasto. O mecanismo exato do efeito benéfico do

cobre sobre a resposta embriogênica ainda não é totalmente compreendido, porém, um número cada vez maior de protocolos para produção de haploides vem sendo descritos com sucesso, após adição de sulfato de cobre para tratamento das espigas, principalmente minimizando a formação de plantas albinas (BREW-APPIAH et al., 2013; MAKOWSKA; OLESZCZUK, 2014).

Com a necessidade de se gerar protocolos cada vez mais eficientes para produção de plantas duplo-haploides, novas substâncias vêm sendo testadas mais recentemente, para desencadear o processo androgênico, utilizando caminhos alternativos, diferentes dos convencionalmente usados, através do choque térmico e osmótico. Baseando-se nos fundamentos da epigenética, cujo mecanismo permite a diversificação da expressão de genes contidos na mesma fita de DNA, alguns trabalhos pioneiros vêm utilizando deste fenômeno para induzir a resposta androgênica. Esta forma de herança, baseada não na sequência de DNA, mas sim na organização da cromatina celular, permite a modulação das atividades de expressão gênica em resposta a sinais externos (ZHAO et al., 2008). Para tanto, cada célula diferenciada possui o mesmo material genético, porém apresenta um padrão de expressão gênica específico, que é atingido pelo silenciamento gênico e pela ativação de determinados genes tecido-específicos (LI, 2002).

É sabido que a reprogramação da célula vegetal e a aquisição da capacidade de totipotência envolve a repressão e a ativação de inúmeros genes, associados com o novo desenvolvimento celular, assim como com a reorganização global do genoma, e que marcas epigenéticas estão envolvidas na expressão gênica durante este processo de reorganização (SOLÍS et al., 2015). De uma maneira geral, nas células eucarióticas, aproximadamente 6 milhões de pares de bases de DNA estão presentes, que codificam em torno de 30.000 proteínas diferentes. No entanto, a maior parte da fita de DNA permanece armazenada, sob uma forma de organização de cromatina compactada que dificulta ou impossibilita a transcrição de genes (GOODSELL, 2003). Desta forma, apenas uma parte do DNA é utilizado para expressão de genes em cada tecido. Esta organização da cromatina é estabelecida por modificações epigenéticas que incluem: a metilação do DNA e modificações pós-traducionais das histonas, entre outras. Assim, baseando-se nestes fundamentos que Li e colaboradores (2014) utilizaram de substâncias que atuam nas modificações que ocorrem nas histonas, bloqueando a ação de enzimas (desacetilases de histonas - HADCs) que modificariam estas

proteínas. Bloqueando a atividade das HDACs pelo uso de Tricostatina A (TSA) foi possível aumentar o número de células de micrósporos que desviaram de sua rota gametofítica para esporofítica. Esses resultados foram obtidos tanto para *Brassica napus*, espécie conhecida por responder à androgênese, quanto para *Arabidopsis thaliana*, conhecida por ser recalcitrante à embriogênese do micrósporo (LI et al., 2014). A adição do TSA à solução de pré-tratamento atuou provocando o bloqueio da atividade das enzimas HDACs, causando a hiperacetilação das histonas H3 e H4. Dessa forma, os autores propõem que a totipotência do micrósporo é mantida sob controle de um mecanismo dependente de HDAC e que os tratamentos de estresse utilizados para induzir o desenvolvimento do embrião haploide em cultura afetam esta via dependente de HDAC (LI et al., 2014).

Apesar dos resultados positivos obtidos por Li et al. (2014) com a adição do TSA à solução de pré-tratamento, nossos resultados não foram expressivos quando utilizado este tratamento (NPB 99 + TSA) (Tabela 3). No entanto, cabe destacar mais uma vez que, tal resultado poderia ser diferente, caso as plantas doadoras utilizadas neste estudo, estivessem em perfeitas condições fisiológicas. Assim, novos ensaios deverão ser feitos, verificando o verdadeiro papel deste bloqueador enzimático.

Ainda seguindo os fundamentos da epigenética, porém utilizando como alvo, a própria fita de DNA, e não mais as proteínas que o envolvem, um estudo ainda mais recente apontou que, substâncias inibidoras da metilação do DNA podem estar envolvidas na indução da embriogênese, em micrósporos de canola e cevada (SOLÍS et al., 2015). A metilação do DNA feita por enzimas (DNA metil-transferases) se constitui numa modificação epigenética significativa que ocorre na cromatina durante a reprogramação da célula de micrósporo, após desviar da sua rota original de desenvolvimento. Assim, foi observado nesses estudos que, modificações na metilação global do DNA que acompanharam a mudança do programa de desenvolvimento do micrósporo rumo à embriogênese, levaram à uma reprogramação epigenética dos micrósporos para um estado totipotente, dando início à embriogênese. Esta reprogramação epigenética envolveu uma diminuição da metilação do DNA com a ativação da proliferação celular e um subsequente aumento da metilação do DNA com o início da diferenciação das células (passando de uma estrutura multi-celular para embriões), ocorrendo em espécies de plantas muito diferentes, como *Brassica napus* (SOLÍS et al., 2015), *Hordeum vulgare* (EL-TANTAWY et al., 2014) e *Quercus suber* (RODRIGUEZ-SANZE et al., 2014),

provando ser um mecanismo comum à espécies e gêneros muito diferentes (SOLÍS et al., 2015).

O segundo pré-tratamento combinado que se destaca em induzir a androgênese foi o PTX, cuja formulação contém prolina, ácido abscísico, cinetina e sulfato de cobre. Conforme observado na Tabela 3, o PTX teve destaque por ter promovido a melhor resposta embriogênica do genótipo recalcitrante Embrapa 27, entre os quatro tratamentos testados para este genótipo, produzindo uma média de 10,56 embriões por placa.

Entre os componentes da solução, a prolina se sobressai, uma vez que é considerada um dos aminoácidos mais importantes na iniciação embriogênica da planta, acreditando-se que a mesma desempenha um efeito positivo na tolerância osmótica (HITA et al., 2003). As espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas por estresses (neste caso a geração do sinal que inicia a reprogramação dos micrósporos) podem modificar a eficácia da embriogênese destes tecidos, influenciando tanto a viabilidade como o metabolismo celular. No entanto, graças ao efeito antioxidante da prolina, permite a ocorrência do estresse necessário para o desvio da rota de desenvolvimento, porém simultaneamente protegendo as células dos efeitos tóxicos da produção de ROS (ZUR et al., 2009, 2014). Outra característica atribuída a este aminoácido é a capacidade de funcionar como uma chaperona molecular capaz de proteger a integridade da proteína e melhorar as atividades de diferentes enzimas (AHMADI; SHARIATPANAH, 2015). Quando aplicada exogenamente a plantas expostas a estresses, a prolina atua melhorando o crescimento e outras características fisiológicas das plantas tratadas (HAYAT et al., 2012). Em *Brassica napus*, a embriogênese dos micrósporos aumentou significativamente em função do uso de prolina. Foi observado um aumento de aproximadamente 30 a 55% na formação de embriões com a exposição a 100 mg/L de prolina nos meios de indução (AHMADI; SHARIATPANAH, 2015). Resultados similares foram encontrados em trigo e triticale, através da adição de prolina ao meio de indução, produzindo maior número de estruturas embrionárias e plantas verdes (ASIF et al., 2013a).

Presentes nos pré-tratamentos PTT e PTB, as proteínas arabinogalactanas (AGP's) também atuam favoravelmente na indução da embriogênese. As AGP's são moléculas glicosiladas representadas em angiospermas por uma grande família de genes (MAJEWSKA-SAWKA; NOTHNAGEL, 2000), sendo encontradas em vários órgãos vegetais, incluindo raízes, caules, folhas, flores e sementes (SHOWALTER, 2001). Essas proteínas são

sintetizadas no sistema endomembranal e secretadas por vesículas em direção à superfície celular e são depositadas na parede celular ou liberadas no apoplasto (LAMPORT et al., 2006). A maior parte de suas moléculas consiste em carboidratos com arabinosil e galactosil como os principais constituintes do açúcar. Sua pequena cadeia protéica contribui com cerca de 10% da massa total e é rica em hidroxiprolina/prolina, alanina, serina e treonina. Suas funções estão relacionadas com diferentes aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas (MAJEWSKA-SAWKA; NOTHNAGEL, 2000).

Em estudo realizado por Capataz-Tafur e colaboradores (2010), foi relatada a ocorrência de secreção de AGP's em meio com suspensões de células de *Beta vulgaris*. Assim, como resultado do aumento da concentração inicial de sacarose, com uma maior secreção de AGP's para o meio, as células apresentaram tendência a se agregarem umas às outras. Com base nisso concluiu-se que as AGP's são moléculas necessárias no processo de agregação celular de culturas em suspensão de *B. vulgaris* (CAPATAZ-TAFUR et al., 2011). Para Letarte e colaboradores (2006), o efeito mais marcante do arabinogalactano Larcoll foi a diminuição da taxa de mortalidade de micrósoros durante a indução da embriogênese, que ficou clara após 10 dias de cultura a uma concentração de 10 mg/L, ocorrendo também uma melhora significativa na regeneração de plantas verdes na cultura de micrósoros isolados em trigo (LETARTE et al., 2006; FERRIE; CASWELL, 2011).

Estudos mais recentes vêm mostrando que esta complexa família de glicoproteínas, ricas em hidroxiprolina, ficam ancoradas à membrana plasmática, características que as tornam candidatas perfeitas para se envolverem em mecanismos de sinalização, em vários processos de desenvolvimento de plantas (PEREIRA; LOPES; COIMBRA, 2016). Contudo, apesar de terem sido relatados diferentes benefícios e se ter conhecimento que as AGP's estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento das plantas, estando presentes nas superfícies celulares, as funções exatas dessas proteínas ainda são desconhecidas (CAPATAZ-TAFUR et al., 2011). Nossos resultados mostraram respostas pouco expressivas quando esta família de proteínas foi utilizada nas soluções de pré-tratamentos (PTB e PTT). Mas, de maneira igual ao atribuído ao Thrichostatin A, novos ensaios deverão ser repetidos com esta classe de proteínas, utilizando plantas doadoras em perfeitas condições fisiológicas.



Como observado na Tabela 3, as espigas do genótipo BRS 194 submetidas ao tratamento PTT foram as que apresentaram a segunda melhor resposta em relação à formação do número de embriões (média de 66 embriões/ extração). O bom desempenho apresentado por este genótipo sugere estar relacionado, não somente ao pré-tratamento utilizado (PTT), mas também, haver interação entre as variáveis “genótipo x pré-tratamento x genótipo doador de ovários” já que resultados diferentes foram observados, quando se utilizou BRS 194 e Fielder como genótipos doadores de ovários. Já é conhecido que para algumas monocotiledôneas, o co-cultivo de ovários desempenha um efeito significativo na androgênese (LANTOS et al., 2009). Neste contexto, Zheng e colaboradores (2002) perceberam que quando os micrósporos de trigo foram co-cultivados com ovários, a produção de embriões androgenéticos aumentou em até 4,5 vezes mais do que o controle (sem ovários), indicando que a inclusão de ovários vivos em meio de cultura parece estimular a embriogênese e/ou melhorar a qualidade dos embriões (ZHENG et al., 2002; PATEL et al., 2004). Isso enfatiza a ideia de que nutrientes ou "fatores nutritivos" liberados pelos ovários são estimuladores da embriogênese em micrósporos, uma vez que mesmo para os genótipos responsivos, a ausência total de ovários em cultura resulta num rendimento substancialmente inferior da resposta embriogênica (ZHENG et al., 2002; SCAGLIUSI, 2014).

Os ovários podem ter seus efeitos utilizados de forma direta, por meio de co-cultivo no meio de indução, ou também através de meio pré-condicionado com os mesmos (OVCM), o qual por sua vez, é adicionado junto aos micrósporos em meio de cultura. Neste sentido, em estudo realizado por Castillo, Sánchez-Díaz e Vallés (2015), mostrou-se que tanto a utilização de um meio pré-condicionado de ovários como a co-cultura de ovários frescos têm um efeito positivo na cultura de anteras de cultivares de trigo de alta e média-baixa resposta, levando a um aumento de 6 e 11 vezes no número de embriões e plantas verdes, respectivamente.

Os resultados observados neste estudo apontam que, para todos os genótipos testados, em sua grande maioria, independentemente do pré-tratamento aplicado, as melhores respostas embriogênicas obtidas apresentavam em comum, ovários do genótipo Fielder em suas combinações, demonstrando haver um forte efeito não somente do genótipo da planta doadora de micrósporos, mas também do genótipo da planta doadora de ovários. Das várias combinações aqui testadas (entre genótipos x pré-tratamentos x ovários), um grupo com



ovários de Embrapa 27 apresentou a segunda melhor resposta embriogênica (BRS 194, média de 66 embriões), conforme dados da Tabela 3. Tal resultado foi atribuído especificamente aos ovários de Embrapa 27, uma vez que, quando utilizado ovários de Fielder e BRS 194 para a mesma combinação de genótipo e pré-tratamento, os resultados foram significativamente menores.

Usualmente, tanto na cultura de anteras como na cultura de micrósporos isolados, adotou-se como padrão utilizar para co-cultivo, ovários oriundos do mesmo genótipo das plantas doadoras das anteras/micrósporos (HU; KASHA, 1997, KUNZ et al., 2000, BROUGHTON, 2008). Até recentemente, o cocultivo de ovários não era visto como um fator importante na androgênese, uma vez que seus efeitos positivos sobre os micrósporos eram pouco difundidos. Porém, ao longo do tempo foi demonstrado que o co-cultivo de ovários representa um elemento crucial para a resposta embriogênica, e que ovários de outros genótipos também poderiam ser usados para co-cultivo, não necessariamente apenas dos genótipos doadores de anteras e micrósporos (LANTOS et al., 2006; BROUGHTON, 2008), havendo efeitos positivos até sobre a duplicação espontânea dos cromossomos (CASTILLO; SÁNCHEZ-DÍAZ; VALLÉS, 2015). O relato de que o co-cultivo de ovários de trigo para promover a embriogênese em micrósporos de cevada (BRUINS; RAKOCZY-TROJANOWSKA; SNIJDERS, 1996), comprovou haver efeito benéfico até para outras espécies.

Resultados positivos também foram obtidos com o uso de uma solução enriquecida com ovários do genótipo Chris foi utilizada para indução da embriogênese de outro genótipo (ZHENG et al., 2002). Neste trabalho, os autores usaram a solução enriquecida com ovários (OVCM) e compararam com ovários frescos, retirados do mesmo genótipo. Os resultados mostraram que a solução de OVCM pode aumentar a indução embriogênica em até 100 vezes para genótipos recalcitrantes. No entanto, as melhores respostas foram obtidas quando misturou-se a solução OVCM e ovários frescos. Apesar de ser etapa bastante recomendada para indução da embriogênese, a natureza e a base do efeito indutivo dos ovários sobre a embriogênese dos micrósporos ainda permanecem desconhecidas (EL-TANTAWY et al., 2013).

#### 4.4 Transferência de Embriões e Regeneração de Plantas

Depois de cerca de 30 a 40 dias no meio de indução, os embriões formados com tamanho superior a 1 mm foram transferidos para o meio de regeneração GEM (EUDES et al., 2003). Alguns embriões flutuavam sobre o meio semi-líquido, e na maioria das vezes, estes apresentavam maior tamanho comparados com os que ficavam no fundo da placa. Os que flutuavam, em contato com o meio de regeneração, se transformavam rapidamente em plântulas, resultado mais frequente entre os genótipos Fielder e BRS 194 (Tabela 4). Outros embriões apenas aumentavam de tamanho após a transferência para este meio, não havendo a conversão destes em plântulas, o que foi mais comumente observado em Embrapa 27, que por ter apresentado a menor taxa de formação de embriões (Figura 18 A), apresentou também uma baixa taxa de regeneração (1,2% de plantas verdes) (Tabela 4). Para este genótipo, esse resultado pode ser explicado por sua natureza recalcitrante, já que suas plantas, de modo geral, apresentavam boas condições fisiológicas.

Tabela 4- Número de embriões, plântulas verdes e albinas formados em cada genótipo testado.

| Genótipo doador de micrósporos | Nº de Embriões | Nº de Plântulas Verdes | Nº de Plântulas Albinas |
|--------------------------------|----------------|------------------------|-------------------------|
| BRS 194                        | 2.739          | 18 (0,65%)             | 1.243 (45,38%)          |
| Embrapa 27                     | 250            | 3 (1,2%)               | 21 (8,4%)               |
| Fielder                        | 991            | 17 (1,71%)             | 261 (26,33%)            |

Ao contrário do observado para Embrapa 27, as plantas doadoras de micrósporos do genótipo Fielder apresentaram muitos sintomas, como clorose internerval e morte dos ponteiros, sintomas provavelmente atribuídos à deficiência de cálcio, boro e cobre (em conjunto ou isoladamente). Por desempenharem importante papel na formação da parede celular e da viabilidade do grão de pólen, tais sintomas poderiam influenciar negativamente a natureza das células de micrósporos e sua capacidade de totipotência, resultando numa baixa taxa androgenética para Fielder. Além da baixa taxa embriogênica, neste mesmo genótipo foi possível observar uma conversão para plântulas verdes também considerada muito abaixo do normal e incomum para genótipos utilizados como controle responsivo, visto que a

regeneração foi de apenas 1,71%, (Tabela 4) sendo um número relativamente próximo do genótipo recalcitrante Embrapa 27 (1,2%).

Dentre os três genótipos testados, BRS 194 foi o genótipo mais responsivo à androgênese, sendo até mais responsivo que o genótipo controle (Fielder). Aproximadamente metade dos embriões formados converteram-se em plantas, o que é um número bastante elevado. Entretanto, a grande maioria das plantas desenvolvidas eram albinas (Tabela 4 e Figura 20). Enquanto BRS 194 converteu 45,38% dos embriões em plântulas albinas, uma taxa de apenas 0,65% foi capaz de regenerar plântulas verdes. Esta limitação é comumente apresentada em plantas com deficiência no seu apparatus fotossintético e/ou originadas da cultura de anteras ou micrósporos. Os resultados aqui apresentados indicam que o pré-tratamento de estresse foi capaz de reprogramar a via gametofítica dos micrósporos para a esporofítica, formando muitos embriões. No entanto, para BRS 194 apenas uma pequena proporção foi regenerada em plantas verdes, com eficiência de regeneração extremamente baixa (0,65%). Resultados semelhantes foram encontrados por Broughton (2008) para a cultivar de trigo "Datatine", que produziu 35,9 embriões por espiga, mas apenas três plantas verdes.

Foi relatado anteriormente que a eficiência do processo de androgênese se baseia nos seguintes três componentes independentes: a formação de estruturas multicelulares, a capacidade de regeneração e a frequência de plantas verdes, todas elas reguladas por herança nuclear e separadas por controle genético, embora alguma porção da eficiência de regeneração é também determinada por fortes influências ambientais (KRZEWSKA et al., 2012). Assim, considerando a influência das condições ambientais como fatores exógenos que influenciam o método, melhores respostas poderiam ser obtidas quanto ao número de plantas verdes, com o tratamento de estresse apropriado e a otimização dos meios de cultura (LIU et al., 2002).

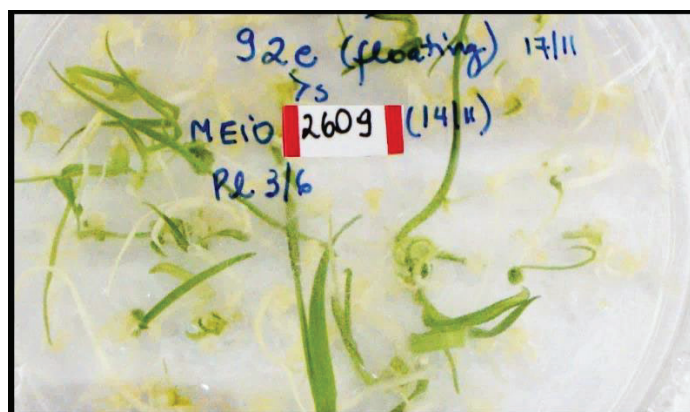


Figura 10- Embriões em meio de regeneração desenvolvendo as primeiras plantas verdes e albinas. Embrapa Trigo, (2016).



Figura 20- Massiva produção de plantas albinas obtidas do genótipo BRS 194, exibindo o potencial do método em produzir plantas. Embrapa Trigo, (2016).

#### 4.5 Transferência das Plântulas para Meio de Enraizamento

Após cerca de 10 a 20 dias no meio de regeneração, as plântulas verdes geradas, foram transferidas para tubos de ensaio contendo 18 mL de meio de enraizamento “rooting” (EUDES et al., 2003), sob as mesmas condições de luz e temperatura (24 °C, 16 horas/luz).

Durante esta etapa, as plantas transferidas apresentavam em geral, bom sistema radicular (Figura 21). Algumas plantas verdes formadas no meio de regeneração, quando removidas das placas de Petri e transferidas para os tubos para enraizamento fracassavam em formar sistema radicular e desenvolver parte aérea, as quais foram descartadas.

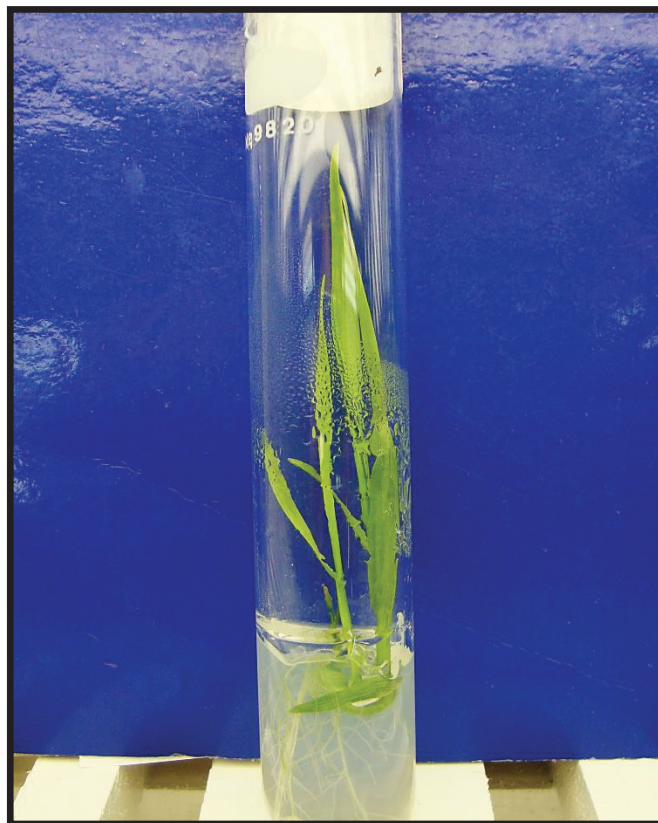


Figura 21- Planta originada da cultura de micrósporos isolados em meio de enraizamento, apresentando raízes já desenvolvidas. Embrapa Trigo, (2016).

#### **4.6 Transferência das Plântulas para a Vermiculita e Aclimação**

Assim que as plântulas apresentavam folhas e raízes bem desenvolvidas (Figura 20), as mesmas foram individualmente transferidas para bandejas com compartimentos de 250 mL, contendo vermiculita, onde foram mantidas em câmaras de crescimento (sob as mesmas condições anteriores) por cerca de 7 a 14 dias, tendo a tampa removida gradativamente (Figura 22).



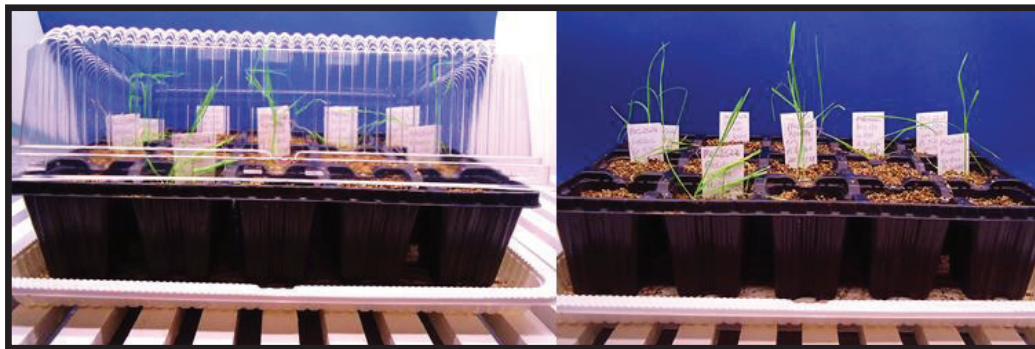


Figura 22- Plântulas originadas da cultura de micrósporos isolados em aclimação em câmara de crescimento. Embrapa Trigo, (2016).

Após a aclimação, as plântulas foram transplantadas para baldes, em câmaras de ambiente controlado, onde ficaram acondicionadas nas mesmas condições das plantas doadoras, recebendo semanalmente solução nutritiva. O nível de ploidia foi estimado pela checagem da presença de sementes em cada uma das plantas verdes geradas e também visualmente, uma vez que plantas haploides possuem menor porte, diâmetro de caules e hastes e folhas mais estreitas. Para o genótipo BRS 194, 29,41% das plantas regeneradas mostraram-se duplo-haploides enquanto que 70,58% apresentaram número cromossômico haploide. Por outro lado, para o genótipo recalcitrante Embrapa 27, 66,7% das plantas tiveram seus cromossomos duplicados espontaneamente, de maneira que 33,33% das mesmas eram haploides. Fielder apresentou a menor taxa de duplicação cromossômica, onde apenas 11,76% das plantas eram duplo-haploides e 88,23% haploides. Assim como a resposta androgênica, a duplicação espontânea dos cromossomos é fortemente ligada ao genótipo, havendo pouca interação desta característica com os fatores exógenos do processo de produção de haploides.

Neste estudo foi possível avaliar os mecanismos que envolvem a androgênese e promovem a embriogênese em três genótipos de trigo (BRS 194, Embrapa 27 e Fielder), combinados com dois outros fatores que afetam a resposta androgênica: os pré-tratamentos aplicados às espigas e os genótipos doadores de ovários. Apesar da conclusão do processo de formação de embriões em plantas, através da embriogênese do micrósporo, nos três genótipos testados, o rendimento final de embriões e plantas verdes ficou muito aquém do esperado, principalmente no genótipo Fielder, usado como controle responsivo à androgênese. A fisiologia das plantas doadoras utilizadas para este estudo comprometeu a resposta dos ensaios, afetando o efeito dos pré-tratamentos aplicados às espigas.

## 5 CONCLUSÃO

A fisiologia das plantas doadoras afeta a resposta dos genótipos testados via androgênese, mostrando ter influenciado até genótipos responsivos à androgênese, como o genótipo Fielder.

Os pré-tratamentos aplicados às espigas influenciam a resposta androgênica e são indispensáveis para o desvio da rota de desenvolvimento das células de micrósporos, porém seu efeito é mascarado em função da fisiologia das plantas doadoras.

Apesar da influência da fisiologia das plantas doadoras sobre o método aqui testado, os genótipos doadores de ovários interferem na resposta androgênica, porém este fator isolado não é suficiente para promover a embriogênese do micrósporo, haja vista a ausência de resposta no genótipo recalcitrante (Embrapa 27).



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embrapa 27 teve como melhor combinação o pré-tratamento PTX associado aos ovários do genótipo Fielder. Apesar da sua recalcitrância, Embrapa 27 trata-se de um genótipo extremamente importante, uma vez que está incorporado na genealogia de muitas cultivares atuais. Desta forma, a partir deste estudo pioneiro e exploratório, é necessário que se dê continuidade aos esforços voltados à capacidade androgenética de Embrapa 27.

## REFERÊNCIAS

- AHMADI, B.; SHARIATPANAH, M. E. Proline and chitosan enhanced efficiency of microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration in *Brassica napus* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 1, p. 57-65, 2015.
- AL-ASHKAR, I. M. Genetic Contribution of Parental Genotypes on Anther Culture Response of Bread Wheat F1 Hybrids. **Middle East Journal of Agriculture Research**, v. 3, n. 3, p. 472-478, 2014.
- 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**, v. 49, p. 489-497, 2013a.
- 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, p. 1637-1646, 2013b.
- AYED O. S.; BUYSER J. D.; PICARD E.; TRIFA Y.; AMARA H. S. Effect of pretreatment on isolated microspores culture ability in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum Desf.). **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 30-38, 2010.
- BABBAR, S. B.; AGARWAL, P. K.; SAHAY, S.; BHOJWANI, S. S. Isolated microspore culture of Brassica: an experimental tool for developmental studies and crop improvement. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 185-202, 2004.
- BARNABÁS, B.; SZAKÁCS, É.; KARSAI, I.; BEDO, Z. *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application. **Euphytica**, v. 119, p. 211–216, 2001.
- BORDERIES, G.; BÉCHEC, M.; ROSSIGNOL, M.; LAFITTE, C.; DEUNFF, E.; BECKERT, M.; DUMAS, C.; MATTHYS-ROCHON, E. Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. **European Journal of Cell Biology**, v. 83, n. 5, p. 205-212, 2004.
- BREW-APPIAH, R. A.; 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, p. e80155, 2013.
- BRODELIUS, P.; NILSSON, K. Permeabilization of immobilized plant cells, resulting in release of intracellularly stored products with preserved cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 275-280, 1983.

BROUGHTON, S. Ovary co-culture improves embryo and green plant production in anther culture of Australian spring wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, n. 2, p. 185-195, 2008.

BROWN, T. A.; JONES, M. K.; POWELL, W.; ALLABY, R. G. The complex origin of domesticated crops in the Fertile Crescent. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 2, p.103-109, 2009.

BRUINS, M. B.; RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; SNIJDERS, C. H. Isolated microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.): the effect of co-culture of wheat or barley ovaries on embryogenesis. **Cereal Research Communications**, p. 401-408, 1996.

BUGBEE, B.; KOERNER, G. Yield comparisons and unique characteristics of the dwarf wheat cultivar 'USU-Apogee'. **Advances in Space Research**, v. 20, n. 10, p. 1891-1894, 1997.

CAIERÃO, E.; SCHEEREN, P. L.; SILVA, M. S.; CASTRO, R. L. de; CARGNIN, A. Uso do germoplasma da Embrapa nos programas de melhoramento de trigo no Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 57-63, 2013.

CAIERÃO, E.; SCHEEREN, P. L.; SILVA, M. S.; CASTRO, R. L. de. History of wheat cultivars released by Embrapa in forty years of research. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 216-223, 2014.

CAMARGO, C. E. de O. Trigo. In: FURLANI, A. M. C.; VIÉGAS, G. P. 1 ed. **O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico**. Campinas: Instituto Agronômico, 1993. p. 433-488.

CAPATAZ-TAFUR, J.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. M.; RODRÍGUEZ-MONROY, M.; TREJO-TAPIA, G.; SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G. Sucrose induces arabinogalactan protein secretion by *Beta vulgaris* L. cell suspension cultures. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, n. 4, p. 757-764, 2010.

CAPATAZ-TAFUR, J.; TREJO-TAPIA, G.; RODRÍGUEZ-MONROY, M.; SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G. Arabinogalactan proteins are involved in cell aggregation of cell suspension cultures of *Beta vulgaris* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, n. 1, p. 169-177, 2011.

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.). **Sexual Plant Reproduction**, v. 13, n. 2, p. 95-104, 2000.

CASTILLO, A. M.; SÁNCHEZ-DÍAZ, R. A.; VALLÉS, M. P. Effect of ovary induction on bread wheat anther culture: ovary genotype and developmental stage, and candidate gene association. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 402, 2015.

COHORT SOFTWARE. **Graphics and Statistics Software for Scientists and Engineers**. Monterey, California: CoHort Software, 2003.

COOPER, R. Re-discovering ancient wheat varieties as functional foods. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, n. 3, p. 138-143, 2015.

CHARMET, G. Wheat domestication: lessons for the future. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, n. 3, p. 212-220, 2011.

CISTUÉ, L.; KASHA, K. J. Gametic embryogenesis in *Triticum*: a study of some critical factors in haploid (microspore) embryogenesis. In: MUJIB, A.; SAMAJ, J. (Ed.) **Somatic Embryogenesis, plant cell monograph**. 2. ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. p. 321-342.

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

DAHLEEN, L S. Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 43, n. 3, p. 267-269, 1995.

DAVIES, P. A. Barley isolated microspore culture (IMC) method. In: MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K. J.; FORSTER, B. P.; SZAREJKO, I. **Doubled Haploid Production in Crop Plants – A manual**. Netherlands: Springer, 2003. p. 49-52.

DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: DAVIES, P. J. **Plant Hormones**. 3. ed. Ithaca: Springer, 2010. p. 1-15.

DEVAUX, P; PICKERING, R. Haploids in the improvement of Poaceae. In: PALMER, D.; KELLER, W. A., KASHA, K. **Haploids in crop improvement II**. Heidelberg: Springer, 2005. p. 215-242.

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. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 287, n. 11-12, p. 855-866, 2012.

DREWS, G. N.; YADEGARI, R. Development and function of the angiosperm female gametophyte. **Annual Review of Genetics**, v. 36, n. 1, p. 99-124, 2002.

DUBCOVSKY, J.; DVORAK, J. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. **Science**, v. 316, n. 5833, p. 1862-1866, 2007.

DUNWELL, J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 4, p. 377-424, 2010.

DWIVEDI, S. L.; BRITT, A. B.; TRIPATHI, L.; SHARMA, S.; UPADHYAYA, H. D.; ORTIZ, R. Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 812-829, 2015.

ECHÁVARRI, B.; CISTUÉ, L. Enhancement in androgenesis efficiency in barley (*Hordeum vulgare* L.) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by the addition of dimethyl sulfoxide to the mannitol pretreatment medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 125, n. 1, p. 11-22, 2016.

EL-TANTAWY, A. A.; SOLÍS, M. T.; COSTA, M. L. da; COIMBRA, S.; RISUEÑO, M. C.; TESTILLANO, P. S. Arabinogalactan protein profiles and distribution patterns during microspore embryogenesis and pollen development in *Brassica napus*. **Plant Reproduction**, v. 26, n. 3, p. 231-243, 2013.

EL-TANTAWY, A. A.; SOLÍS, M. T.; RISUEÑO, M. C.; TESTILLANO, P. S. Changes in DNA methylation levels and nuclear distribution patterns after microspore reprogramming to embryogenesis in barley. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 143, n. 1-3, p. 200-208, 2014.

EUDES, F.; AMUNDSEN, E. Isolated microspore culture of Canadian 6x triticales cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, n. 3, p. 233-241, 2005.

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 and 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, n. 2-3, p. 191-199, 1988.

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**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 1998. p. 21-43.

FERRIE, A. M. R.; CASWELL, K. L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, n. 3, p. 301-309, 2011.

FORSTER, B. P.; HEBERLE-BORS, E.; KASHA, K. J.; TOURAEV, A. The resurgence of haploids in higher plants. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 8, p. 368-375, 2007.

FULLER, D. Q. Contrasting patterns in crop domestication and domestication rates: recent archaeobotanical insights from the Old World. **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 903-924, 2007.

GERMANÀ, M. A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 5, p. 839-857, 2011.

GERNAND, D.; DRUTTEN, D.; VARSHNEY, A.; RUBTSOVA, M.; PRODANOVIC, S.; BRÜß, C.; KUMLEHN, J.; MATZK, F.; HOUBEN, A. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. **The Plant Cell**, v. 17, n. 9, p. 2431-2438, 2005.

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

GOODSELL, D. S. The molecular perspective: histone deacetylase. **The Oncologist**, v. 8, n. 4, p. 389-391, 2003.

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

GUO, Y. D.; PULLI, S. Isolated microspore culture and plant regeneration in rye (*Secale cereale* L.). **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 9, p. 875-880, 2000.

HAYAT, S.; HAYAT, Q.; ALYEMENI, M. N.; WANI, A. S.; PICHTEL, J.; AHMAD, A. Role of proline under changing environments: a review. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 11, p. 1456-1466, 2012.

HEBERLE-BORS, E. In vitro haploid formation from pollen: a critical review. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 71, n. 3, p. 361-374, 1985.

HITA, O.; GALLEGU, P.; VILLALOBOS, N.; LANAS, I.; BLAZQUEZ, A.; MARTIN, J. P.; FERNANDEZ, J.; MARTIN, L.; GUERRA, H. Improvement of somatic embryogenesis in *Medicago arborea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, n. 1, p. 13-18, 2003.

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

HU, T. C.; KASHA, K. J. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. **Genome**, v. 42, p. 432-441, 1997.

HUANG, B. Cellular membranes in stress sensing and regulation of plant adaptation to abiotic stresses. In: HUANG, B. **Plant-environment interactions**, 3. ed. Boca Raton: Taylor and Francis Group, 2006. p. 1–26.

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, n. 2, p. 163–174, 2001.

ISHII, T.; KARIMI-ASHTIYANI, R.; HOUBEN, A. Haploidization via chromosome elimination: means and mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, p. 421-438, 2016.

ISLAM, S. M. S.; TUTEJA, N. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. **Plant Science**, v. 182, p. 134-144, 2012.

ISLAM, S. S., ARA, I., TUTEJA, N.; SUBRAMANIAM, S. Efficient microspore isolation methods for high yield embryoids and regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). **World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 7, n. 12, p. 891-96, 2013.

JACQUARD, C.; NOLIN, F.; HÉCART, C.; GRAUDA, D.; RASHAL, I.; DHONDT-CORDELIER, S.; SANGWAN, R.; 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, n. 9, p. 1329-1339, 2009.

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

JAUHAR, P. M.; XU, S.; BAENZIGER, P. S. Haploidy in cultivated wheats: induction and utility in basic and applied research. **Crop Science**, v. 49, n. 3, p.737-755, 2009.

JONES, H. D.; DOHERTY, A.; WU, H. Review of methodologies and a protocol for the Agrobacterium-mediated transformation of wheat. **Plant Methods**, v. 1, n. 1, p. 5, 2005.

KAO, H. M.; BROWN, G. G.; SCOLES, G.; SEGUIN-SWARTZ, G. Ogura cytoplasmic male sterility and triazine tolerant Brassica napus cv. Westar produced by protoplast fusion. **Plant Science**, v. 75, n. 1, p. 63-72, 1991.

KARIMI-ASHTIYANI, R.; ISHII, T.; NIESSEN, M.; STEIN, N.; HECKMANN, S.; GURUSHIDZE, M.; BANAEI-MOGHADDAM, A. M.; FUCHS, J.; SCHUBERT, V.;



KOCH, K.; WEISS, O.; DEMIDOV, D.; SCHMIDT, K.; KUMLEHN, J.; HOUBEN, A. Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 36, p. 11211-11216, 2015.

KASHA, K. J.; KAO, K. N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Nature**, v. 225, n. 5235, p. 874-876, 1970.

KASHA, K. J.; SIMION, E.; MINER, M.; LETARTE, J.; HU, T. C. Haploid wheat isolated microspore culture protocol. In: M. MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K. J., FOSTER, B. P.; SZAREJKO, I. **Doubled haploid production in crop plants - A Manual**. 1. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 77-81.

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, 2001.

KASHA, K. J.; ZIAUDDIN, A.; CHO, U. H. Haploids in cereal improvement: anther and microspore culture. In: GUSTAFSON, J. P. **Gene manipulation in plant improvement II**. 2. ed. United States: Springer, 1990. p. 213-235.

KOHLI, A.; SREENIVASULU, N.; LAKSHMANAN, P.; KUMAR, P. P. The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 7, p. 945-957, 2013.

KOMEDA, N.; CHAUDHARY, H. K.; SUZUKI, G.; MUKAI, Y. Cytological evidence for chromosome elimination in wheat × *Imperata cylindrica* hybrids. **Genes & Genetic Systems**, v. 82, n. 3, p. 241-248, 2007.

KRZEWSKA, M.; CZYCYŁO-MYSZA, I.; DUBAS, E.; GOŁĘBIEWSKA-PIKANIA G.; GOLEMIEC, E.; STOJALOWSKI, S.; CHRUPEK, M.; ZUR, I. Quantitative trait loci associated with androgenic responsiveness in triticale (x *Triticosecale* Wittm.) anther culture. **Plant Cell Reports**, v. 31, n 11, 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 in Plant Science**, v. 28, n. 6, p. 393-409, 2009.

KUNZ, C.; ISLAM, S. M. S.; BERBERAT, J.; PETER, S. O.; BÜTER, B.; STAMP, P.; SCHMID, J. E. Assessment and improvement of wheat microspore derived embryo induction and regeneration. **Journal of Plant Physiology**, v. 156, n. 2, p. 190-196, 2000.

LABBANI, Z.; BUYSER, J.; 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, n. 6, p. 565-568, 2007.

LAMPORT, D. T. A.; KIELISZEWSKI, M. J.; SHOWALTER, A. M. Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function. **New Phytologist**, v. 169, n. 3, p. 479-492, 2006.

LANTOS, C., PÁRICSI, S., ZOFAJOVA, A., WEYEN, J.; PAUK, J. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with Hungarian cultivars. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 50, n. 1-2, p. 31-35, 2006.

LANTOS, C.; JUHÁSZ, A. G.; SOMOGYI, G.; ÖTVÖS, K.; VÁGI, P.; MIHÁLY, R.; KRISTÓF, Z.; SOMOGYI, N.; PAUK, J. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 97, n. 3, p. 285-293, 2009.

LAZARIDOU, T.; SISTANIS, I.; LITHOURGIDIS, A.; AMBRUS, H.; ROUPAKIAS, D. Response to in vitro anther culture of F3 families originating from high and low yielding F2 barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 3, p. 265, 2011.

LETARTE, J.; SIMION, E.; MINER, M.; KASHA, K. J. Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 12, p. 691-698, 2006.

LI, H.; DEVAUX, P. Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 6, p. 475-481, 2001.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 9, p. 662-673, 2002.

LI, H.; SORIANO, M.; CORDEWENER, J.; MUIÑO, J. M.; RIKSEN, T.; FUKUOKA, H.; ANGENENT, G. C.; BOUTILIERA, K. The histone deacetylase inhibitor trichostatin a promotes totipotency in the male gametophyte. **The Plant Cell**, v. 26, n. 1, p. 195-209, 2014.

LICHTER, R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 105, n. 5, p. 427-434, 1982.

LIPPMANN, R.; FRIEDEL, S.; MOCK, H. P.; KUMLEHN, J. The low molecular weight fraction of compounds released from immature wheat pistils supports barley pollen embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 498, 2015.

LIU, W.; ZHENG, M.; KONZAK, C. Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 9, p. 821-824, 2002.

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

LOS, D. A.; MIRONOV, K. S.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. **Photosynthesis Research**, v. 116, n. 2, p. 489-509, 2013.

LOS, D. A.; MURATA, N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1666, n. 1, p. 142-157, 2004.

MA, H. Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 303-434, 2005.

MACHADO, A. Construção histórica do melhoramento genético de plantas: do convencional ao participativo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 9, n. 1, p. 35-50, 2014.

MAJEWSKA-SAWKA, A.; NOTHNAGEL, E. A. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. **Plant Physiology**, v. 122, n. 1, p. 3-10, 2000.

MAKOWSKA, K.; OLESZCZUK, S. Albinism in barley androgenesis. **Plant Cell Reports**, v. 33, n. 3, p. 385-392, 2014.

MALIK, B.; PIRZADAH, T. B.; TAHIR, I.; REHMAN, R. U.; HAKEEM, K. R.; ABDIN, M. Z. Plant signaling: response to reactive oxygen species. In: HAKEEM, K. R.; REHMAN, R. U.; TAHIR, U. **Plant signaling: understanding the molecular crosstalk**. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2014. p. 1-38.

MARASCHIN, S. F.; 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, 2005a.

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 proembryos. **Planta**, v. 220, n. 4, p. 531-540, 2005b.

MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P.; BITTENCOURT Jr. N. S. Flor. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLHO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. p. 329-373.

MAUNSETH, J. D. **Botany – an Introduction to Plant Biology**. 2 ed. Philadelphia: Saunders, 1995.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. Obtenção de Plantas Haploides através da cultura de anteras In: TORRES A. C.; CALDAS L. S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. 1 ed. Brasília: EMBRAPA/ABCTP, 1990. p. 311-332.

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, 1999. p. 569-612.

MOUBAYIDIN, L.; DI MAMBRO, R.; SABATINI, S. Cytokinin-auxin crosstalk. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 10, p. 557-562, 2009.

MUNNIK, T.; MEIJER, H. J. G. Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants. **FEBS letters**, v. 498, n. 2-3, p. 172-178, 2001.

MUÑOZ-AMATRIAÍN, M.; SVENSSON, J. T.; CASTILLO, A. M.; CISTUÉ, L.; CLOSE, T. J.; VALLÉS, M. P. Transcriptome analysis of barley anthers: effect of mannitol treatment on microspore embryogenesis. **Physiologia Plantarum**, v. 127, n. 4, p. 551-560, 2006.

MUÑOZ-AMATRIAÍN, M.; SVENSSON, J. T.; CASTILLO, A. M.; CISTUÉ, L.; CLOSE, T. J.; VALLÉS, M. P. Expression profiles in barley microspore embryogenesis. In: TOUREAV, A.; FOSTER, B. P.; JAIN, M. **Advances in Haploid Production in Higher Plants**. 1 ed. Netherlands: Springer, 2009. p. 127-134.

NIU, Z.; JIANG, A.; HAMMAD, W. A.; OLADZADABBASABADI, A.; XU, S. S.; MERGOUM, M.; ELIAS, E. M. Review of doubled haploid production in durum and common wheat through wheat $\times$  maize hybridization. **Plant Breeding**, v. 133, n. 3, p. 313-320, 2014.

NITSCH, C. La culture de pollen isolé sur milieu synthétique. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris**, v. 278, p. 1031-1034, 1974.

NITSCH, C.; NOREEL, B. Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthere ou isolé de l'anthere. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Académie des Sciences**, Série D, v. 276, p. 303-306, 1973.

OCHATT, S.; PECH, C.; GREWAL, R.; CONREUX, C.; LULSDORF, M.; JACAS, L. Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 12, p. 1314-1328, 2009.

OLESZCZUK, S.; SOWA, S.; ZIMNY, J. Androgenic response to preculture stress in microspore cultures of barley. **Protoplasma**, v. 228, n. 1-3, p. 95-100, 2006.

ÖRVAR, B. L.; SANGWAN, V.; OMANN, F.; DHINDSA, R. S. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. **The Plant Journal**, v. 23, n. 6, p. 785-794, 2000.

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**, v. 140, n. 3, p. 197-204, 2004.

PEREIRA, A. M.; LOPES, A. L.; COIMBRA, S. Arabinogalactan proteins as interactors along the crosstalk between the pollen tube and the female tissues. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1895, 2016.

PIANA, C. F. B.; CARVALHO, F. I. F. Trigo. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 821-852.

PICARD, E.; RODE, A.; DOUSSINAULT, M.; ROUSSET, M.; RIVES, M. Wheat (*Triticum aestivum*): *In vitro* production and utilization of doubled haploids. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry: haploids in crop improvement I**, Heidelberg: Springer, 1990. p. 102-124.

PENG, J. H.; SUN, D.; NEVO, E. Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. **Molecular Breeding**, v. 28, n. 3, p. 281, 2011.

POERSCH-BORTOLON, L. B.; SCAGLIUSI, S. M. M.; YAMAZAKI-LAU, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Androgenic response of Brazilian wheat genotypes to different pretreatments of spikes and to a gelling agent. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 11, p. 1839-1847, 2016.

RAVI, M.; CHAN, S. W. L. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 615-618, 2010.

REDHA, A; SULEMAN, P. Effects of exogenous application of polyamines on wheat anther cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 3, p. 345-353, 2011.

\_\_\_\_\_ Assessment of polyamines and trehalose in wheat microspores culture for embryogenesis and green regenerated plants. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 11, p. 2218, 2013.

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

RODRIGUES, R. L.; MARIATH, J. E. A.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Cultivo de anteras x cultivo de micrósporos isolados: dez razões para uma nova abordagem da embriogênese do micrósporo. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, n. 8, p 50-53, 2004.

SANGWAN, V.; FOULDS, I.; SINGH, J.; DHINDSA, R. S. Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca<sup>2+</sup> influx. **The Plant Journal**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2001.

SANTRA, M.; ANKRAH, N.; SANTRA, D. K.; KIDWELL, K. K. An improved wheat microspore culture technique for the production of doubled haploid plants. **Crop Science**, v. 52, p. 2314-2320, 2012.

SCAGLIUSI, S. M. Establishing isolated microspore culture to produce doubled haploid plants in Brazilian wheat (*Triticum aestivum* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 6, p. 887, 2014.

SCOTT, P.; LYNE, R. L.; AP REES, T. Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.). **Planta**, v. 197, n. 3, p. 435-441, 1995.

SCOTT, P.; LYNE, R. L. The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 36, n. 1, p. 129-133, 1994.

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, n. 1, p. 1-12, 2008.

SEIFERT, F.; BÖSSOW, S.; KUMLEHN, J.; GNAD, H.; SCHOLTEN, S. Analysis of wheat microspore embryogenesis induction by transcriptome and small RNA sequencing using the highly responsive cultivar “Svilena”. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 97, 2016.

SHARIATPANAHI, M. E.; BAL U.; HEBERLE-BORS E.; TOURAEV, A. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. **Physiologia Plantarum**, v. 127, n. 4, p. 519-534, 2006.

SHARIATPANAHI, M. E.; TOURAEV, A. Microspores and their applications in basic and applied plant sciences. In: COLUMBUS, F. **Pollen: Structure, types and effects**. 1. ed. Nova Iorque: Nova Science Publishers, 2010. p. 217–234.

SHEN, H.; LI, Z.; HAN, D.; YANG, F.; HUANG, Q.; RAN, L. Detection of indigenous endophytic bacteria in *Eucalyptus urophylla* in vitro conditions. **Frontiers of Agriculture in China**, v. 4, n. 1, p. 37-41, 2010.



SHEWRY, P. R. Wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 6, p. 1537-1553, 2009.

SHI, C. Y.; ZHAO, Y. Y.; CHEN, D.; CHEN, H. N.; LIU, J. X. Genesis of megaspore and microspore as well as development of female gametophyte and male gametophyte in *Liriope spicata* (Thunberg) Loureiro. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, n. 1, p. 139-149, 2015.

SHIRDELMOGHANLOO, H.; MOIENI, A.; MOUSAVI, A. Effects of embryo induction media and pretreatments in isolated microspore culture of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Falat). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 22, p. 6134-6140, 2009.

SHOWALTER, A. M. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 10, p. 1399-1417, 2001.

SNAPE, J.; PÁNKOVÁ, K. *Triticum aestivum* (wheat). In: MARQUART, L.; JACOBS, J. R.; MCINTOSH, G. H.; POUTANEN, K.; REICKS, M. **Encyclopedia of life sciences**. John Wiley & Sons Ltd: 2006.

SOLÍS, M. T.; EL-TANTAWY, A. A.; CANO, V.; RISUEÑO, M. C.; TESTILLANO, P. S. 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 472, 2015.

SORIANO, M; LI, H; BOUTILIER, K. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. **Plant Reproduction**, v. 26, n. 3, p. 181-196, 2013.

SOUSA, C. A. N. de; CAIERÃO, E. Cultivares de trigo indicadas para cultivo no Brasil e instituições criadoras - 1922 a 2014. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2014.

SOUSA, C. N. A. de. Classification of Brazilian wheat cultivars for aluminium toxicity in acid soils. **Plant Breeding**, v. 117, n. 3, p. 217-221, 1998.

SRISKANDARAJAH, S.; SAMERI, M.; LERCETEAU-KÖHLER, E.; WESTERBERGH, A. Increased recovery of green doubled haploid plants from barley anther culture. **Crop Science**, v. 55, n. 6, p. 2806-2812, 2015.

TADESSE, W.; INAGAKI, M.; TAWKAZ, S.; BAUM, M.; VAN GINKEL, M. Recent advances and application of doubled haploids in wheat breeding. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 89, p. 15484-15492, 2012.

THOMAS, P.; GOPLAKRISHNAN, C.; KRISHNAREDDY, M. Soft rot inciting *Pectobacterium carotovorum* (syn. *Erwinia carotovora*) is unlikely to be transmitted as a latent pathogen in micro propagated banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 3, p. 423-429, 2011.



TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1 ed. v. 2. Brasília: Embrapa, 1999.

TOURAEV, A.; INDRIANTO, A.; WRATSCHKO, I.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. **Sexual Plant Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 209-215, 1996.

TOURAEV, A.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E. Initiation of microspore embryogenesis by stress. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 8, p. 297-302, 1997.

TOURAEV, A.; PFOSSER, M.; HEBERLE-BORS, E. The microspore: a haploid multipurpose cell. **Advances in Botanical Research**, v. 35, p. 53-109, 2001.

TYANKOVA, N.; ZAGORSKA, N. Factors affecting in vitro androgenesis in cereals. **International Journal of Plant Developmental Biology**, v. 2, n. 1, p. 59-78, 2008.

VEASEY, E. A.; PIOTTO, F. A.; NASCIMENTO, W. F. D.; RODRIGUES, J. F.; MEZETTE, T. F.; BORGES, A.; BIGUZZI, F. A.; SANTOS, F. R. C.; SOBIERAJSKI, G. C.; RECCHIA, G. H.; MISTRO, J. C. Processos evolutivos e a origem das plantas cultivadas. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, 2011.

WANG, M.; BERGEN, S.; DUIJN, B. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. **Plant Physiology**, v. 124, n. 2, p. 523-530, 2000.

WĘDZONY, M.; FORSTER, B. P.; ŻUR, I.; GOLEMIEC, E.; SZECHYŃSKA-HEBDA, M.; DUBAS, E.; GOTĘBIEWSKA, G. Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: TOURAEV A.; FORSTER B. P.; JAIN, S. M. **Advances in Haploid Production in Higher Plants**. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2009. p. 1-34.

WOJNAROWIEZ, G.; CAREDDA, S.; DEVAUX, P.; SANGWAN, R.; CLÉMENT, C. Barley anther culture: assessment of carbohydrate effects on embryo yield, green plant production and differential plastid development in relation with albinism. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 6, p. 747-755, 2004.

WOJNAROWIEZ, G.; JACQUARD, C.; DEVAUX, P.; SANGWAN, R. S.; CLÉMENT, C. Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Science**, v. 162, n. 5, p. 843-847, 2002.

WÜRSCHUM, T.; TUCKER, M. R.; MAURER, H. P. Stress treatments influence efficiency of microspore embryogenesis and green plant regeneration in hexaploid triticale ( $\times$  *Triticosecale Wittmack* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 50, n. 1, p. 143-148, 2014.

ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research**, v. 14, n. 6, p. 415-421, 1974.

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

ZHAO, X.; RUAN, Y.; WEI, C. L. Tackling the epigenome in the pluripotent stem cells. **Journal Genetic Genomics**, v. 35, p. 403-412, 2008.

ZHENG, M. Y. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, n. 3, 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 Reports**, v. 20, n. 8, p. 685-690, 2001.

\_\_\_\_\_ Production of doubled haploids in wheat (*Triticum aestivum* L.) through microspore embryogenesis triggered by inducer chemicals. In: MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K. J.; FORSTER, B. P.; SZAREJKO, I. **Doubled haploid production in crop plants - A Manual**. 1. ed. Dordrecht: Kluwer, 2003. p. 83-94.

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 Reports**, v. 20, n. 9, p. 802-807, 2002.

ZHENG, Y.; KONZAK, C. F. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction and plant regeneration in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 1, p. 69-73, 1999.

ZORINIANTS, S.; TASHPULATOV, A. S.; HEBERLE-BORS, E.; TOURAEV, A. The role of stress in the induction of haploid microspore embryogenesis. In: **Haploids in Crop Improvement II**. Berlin: 2005. p. 35-52.

ZUR, I.; DUBAS, E.; GOLEMIEC, E.; SZECHYŃSKA-HEBDA, M.; GOŁĘBIOWSKA, G.; WĘDZONY, M. Stress-related variation in antioxidative enzymes activity and cell metabolism efficiency associated with embryogenesis induction in isolated microspore culture of triticale (x *Triticosecale* Wittm.). **Plant Cell Reports**, v. 28, n. 8, p. 1279-1287, 2009.

ZUR, I.; DUBAS, E.; KRZEWSKA, M.; JANOWIAK, F.; HURA, K.; POCIECHA, E.; BĄCZEK-KWINTA, R.; PŁAŻEK, A. Antioxidant activity and ROS tolerance in triticale (x *Triticosecale* Wittm.) anthers affect the efficiency of microspore embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 119, n. 1, p. 79-94, 2014.

ZUR, I.; DUBAS, E.; KRZEWSKA, M.; WALIGÓRSKI, P.; DZIURKA, M.; JANOWIAK, F. Hormonal requirements for effective induction of microspore embryogenesis in triticales (*×Triticosecale* Wittm.) anther cultures. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 1, p. 47-62, 2015.



## **PPGAgro**

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

**Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV**