

**Plantas duplo-haplóides de cevada: avaliação
da resposta androgenética de genótipos
Embrapa entre os anos 2005 – 2019**



ISSN 1677-8901
Fevereiro/2021

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Trigo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
96**

Plantas duplo-haploides de cevada: avaliação
da resposta androgenética de genótipos
Embrapa entre os anos 2005 – 2019

*Sandra Maria Mansur Scagliusi
Euclides Minella
Rafaela Roessler*

Embrapa Trigo
Passo Fundo, RS
2021

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Trigo
Rodovia BR 285, km 294
Caixa Postal 3081
99050-970 Passo Fundo, RS
Telefone: (54) 3316-5800
Fax: (54) 3316-5802
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações da Embrapa Trigo

Presidente

Gilberto Rocca da Cunha

Vice-Presidente

Luiz Eichelberger

Secretária

Marialba Osorski dos Santos

Membros

Alberto Luiz Marsaro Júnior, Alfredo do Nascimento Junior, Ana Lídia Variani Bonato, Elene Yamazaki Lau, Fabiano Daniel De Bona, Gisele Abigail Montan Torres, Maria Imaculada Pontes Moreira Lima

Normalização bibliográfica

Rochelle Martins Alvorcem (CRB 10/1810)

Tratamento das ilustrações

Márcia Barrocas Moreira Pimentel

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Márcia Barrocas Moreira Pimentel

Foto da capa

Paulo Odilon Kurtz

1ª edição

Publicação digital - PDF (2021)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Trigo

Plantas duplo-haploides de cevada: avaliação da resposta androgenética de genótipos. Embrapa entre os anos 2005 – 2019. / por Sandra Maria Mansur Scagliusi... [et al.]. – Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2021.
PDF (26 p.) : il. color. - (Embrapa Trigo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento online, 96).

ISSN 1677-8901

1. Cevada. 2. Androgenética. 3. Plantas duplo-haploides. 4. Genética.
5. Cultivo in vitro. I. Scagliusi, Sandra Maria Mansur. II. Embrapa Trigo. III. Série.

CDD (21. ed.) 633.16

Rochelle Martins Alvorcem (CRB -10/1810)

© Embrapa, 2021

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	6
Material e Métodos	7
Resultados e Discussão	18
Considerações finais	24
Referências	24

Plantas duplo-haploides de cevada: avaliação da resposta androgenética de genótipos Embrapa entre os anos 2005 – 2019

Sandra Maria Mansur Scagliusi¹

Euclides Minella²

Rafaela Roessler³

Resumo – A produção de plantas duplo-haploides, via cultivo de anteras/micrósporos, tem sido amplamente utilizada há muitos anos para estudos de genética básica e aplicada, e como o método mais rápido para alcance da homozigose em programas de melhoramento. O emprego deste método vem sendo usado com relativo sucesso na criação de novas cultivares de cevada. Porém, alguns entraves ainda impedem sua aplicação em maior escala (genótipos recalcitrantes e o grande número de plantas albinas). Assim, este trabalho objetiva identificar, através do cultivo *in vitro* de anteras e de dados obtidos ao longo de 14 anos, genótipos mais responsivos ao método da androgênese. Para isso, foi feito um levantamento do número de plantas duplo-haploides produzidas entre os anos de 2005 a 2019 (com exceção de 2016), avaliando-se o número de plantas verdes obtidas por genótipo e por espiga. A variável analisada foi plantas verdes/espiga. Os resultados mais expressivos foram observados para os anos de 2013, seguido de 2012 e 2006, onde foi obtida uma média de 5,38; 3,14 e 2,0 plantas verdes por espiga, respectivamente. No entanto, ao analisarmos por genótipo, um único cruzamento (no ano de 2008), originado dos parentais (BRS Borema/PFC 2005129) rendeu o maior número de plantas verdes por espiga, totalizando 11,27 plantas. Tais informações são especialmente importantes na escolha de genótipos com alto potencial de regeneração *in vitro*, para que estes sejam preferencialmente incluídos nos blocos de cruzamento visando às futuras hibridizações.

Termos para indexação: *Hordeum vulgare*, cultura de anteras, androgênese.

¹ Bióloga, doutora em Biologia Vegetal, pesquisadora da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.

² Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Melhoramento de Plantas, pesquisador aposentado da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.

³ Estudante de Agronomia, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS. Bolsista Embrapa.

Barley doubled haploid plants: evaluation of androgenic response from Embrapa's genotypes from 2005 – 2019

Abstract - The production of doubled haploid plants, via anther or microspore culture, has been widely used for studies of basic and applied genetics, and as the fastest method to achieve homozygosity in breeding programs. This method has been used with relative success in the creation of new barley cultivars. However, some hindrances still prevent its application on a larger scale (recalcitrant genotypes and the large number of albino plants). Thus, this work aims to identify, through the *in vitro* cultivation of anthers, data obtained over 14 years, highly responsive barley genotypes via androgenesis. For this, a survey was conducted obtained from the number of doubled haploid plants produced between 2005 to 2019 (with the exception of 2016), evaluating the number of green plants by genotype and spike. Green plants/spike was the analyzed variable. The most expressive results were observed for the years 2013, followed by 2012 and 2006, where an average of 5.38, 3.24 and 2.01 green plants per spike was obtained, respectively. However, when analyzing by genotype, a single cross (in 2008), originated from parents (BRS Borema/PFC 2005129) yielded the largest number of green plants per spike, totaling 11.27 plants. Such information is especially important when choosing genotypes with high potential for *in vitro* regeneration, so that they are preferably included in the crossing blocks for future hybridizations.

Index terms: *Hordeum vulgare*, anther culture, androgenesis.

Introdução

A criação e desenvolvimento de novas cultivares é um processo complexo e lento envolvendo conhecimentos que extrapolam a genética. De uma maneira geral, em espécies autógamas, são necessários no mínimo 10 anos para o desenvolvimento e liberação de uma nova variedade. O processo de criação envolve pelo menos três etapas: hibridização (cruzamentos), condução/fixação das linhagens produzidas (ciclos de autofecundação) e ensaios de campo (avaliação das linhagens produzidas). Entre as etapas, a fase de

fixação das características das linhagens para a estabilidade dos genótipos é a mais longa e trabalhosa, sendo necessários seis a oito ciclos de autopolinização para o alcance da homozigose. Utilizando-se de técnicas biotecnológicas, este processo pode ser abreviado consideravelmente, diminuindo em até quatro ou cinco anos a geração de uma nova variedade. Através da produção *in vitro* de plantas haploides (originada de gametas) plantas totalmente homozigotas e estáveis são produzidas em apenas um ciclo de geração de plantas, antecipando as etapas de avaliação e seleção das linhagens, proporcionando redução de custos, espaço e mão de obra (Dunwell, 2010).

Os métodos de produção de haploides podem variar entre as espécies, sendo a cultura de anteras e/ou cultura de micrósporos isolados (ambos via androgênese) os mais comumente utilizados em cevada. Apesar das inúmeras vantagens desses métodos, algumas limitações impedem sua completa utilização em larga escala nos programas de melhoramento genético, sendo o efeito “genótipo-dependente” e o grande número de plantas albinas, as principais delas. O conhecimento prévio da resposta de vários genótipos de cevada frente à androgênese poderá auxiliar os programas de melhoramento genético na escolha da genealogia dos parentais que serão utilizados nos cruzamentos futuros, já que a resposta ao processo da androgênese é uma característica altamente herdável, tanto em trigo como em cevada (Foroughi-Wehr; Friedt, 1984; Dagüstü, 2008; Kahrizi; Mohammadi, 2009). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta androgenética de diferentes genótipos de cevada originados dos blocos de cruzamento da Embrapa Trigo, durante os anos de 2005 a 2019 e identificar as combinações genéticas mais responsivas à androgênese, visando aumentar a oferta de linhagens duplo-haploides aos programas de melhoramento genético.

Material e Métodos

Genótipos de cevada

No período compreendido entre 2005 a 2019, foram analisados ao todo 141 genótipos (um genótipo é representado por sementes F1 de um dado cruzamento) e utilizados como plantas doadoras de anteras na produção de plantas duplo-haploides de cevada (Tabela 1). Os genótipos F1 avaliados

neste estudo foram originados dos blocos de cruzamento do programa de melhoramento genético de cevada e representam uma seleção preliminar indicada pelo melhorista. Para cada novo ciclo de cruzamentos, uma nova seleção de sementes F1 é submetida ao processo de duplo-haploidização (anualmente).

Tabela 1. Identificação e genealogia dos genótipos de cevada usados nos cruzamentos que geraram plantas F1 doadoras de anteras para produção de plantas duplo-haploides. DHC = Duplo Haploide de Cevada; N° Esp. = número de espigas utilizadas; PVs = total de plantas verdes produzidas; PVs/Espiga = plantas verdes produzidas por espiga.

DHC 2005				
Cruzamento	Genealogia	N° Esp.	PVs	PVs/Espiga
50001	BR 2/Cellar	58	1	0,02
50002	BRS 225/PFC 2002113	51	4	0,08
50003	BRS Borema//Embrapa 127/Dash	58	0	0,00
50004	BRS Borema//BRS Greta/PFC 99206	39	8	0,21
50005	PFC 98074/Metcalfe	43	59	1,37
50006	PFC 98103/PFC 2002025	44	110	2,50
50007	(sem informação)	48	10	0,21
50008	PFC 2001048//Embrapa 128/Pyramid	42	10	0,24
50009	PFC 2001058/PFC 2002111	51	121	2,37
50010	BRS Sampa//Embrapa 128/Pyramid	41	3	0,07
50011	PFC 2002025/Prestige	46	11	0,24
50012	PFC 2001038/Prestige	62	42	0,68
50013	PFC 2001048/PFC 2002113	43	5	0,12
50014	IPFC 200117//Scarlett/PFC 9215	59	51	0,86
50015	BRS Elis/Prestige	64	21	0,33
Total		749	456	Média= 0,62
DHC 2006				
Cruzamento	Genealogia	N° Esp.	PVs	PVs/Espiga
60001	Prestige/BRS 195	54	37	0,69
60002	Barke/BRS Cauê	47	108	2,30
60004	PFC 2002113/PFC 2004188	55	10	0,18
60005	BRS 195/Danuta	62	265	4,27
60006	BRS Borema/PFC 2003032	75	35	0,47

Continua.

Tabela 1. Continuação.

DHC 2006				
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga
60007	PFC 2001048/PFC 2002113	85	54	0,64
60008	BRS Manduri/Braemar	60	6	0,10
60009	BRS Cauê/BRS Elis	100	191	1,91
60010	BRS Sampa/Danuta	78	370	4,74
60011	PFC 2002113/BRS Cauê	61	219	3,59
60012	PFC 2002113/PFC 2004193	55	89	1,62
60013	PFC 2001038/Scarlett	62	120	1,94
60014	PFC 2001038/Danuta	47	134	2,85
60015	Jersey/BRS Cauê	36	173	4,81
Total		877	1811	Média= 2,01
DHC 2007				
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga
70001	PFC 2003041/PFC 2003032	104	35	0,34
70002	PFC 2004033/PFC 2002119	132	178	1,35
70003	PFC 2004077/PFC 2003007	116	195	1,68
70004	BRS 195/Metcalfe//Barke/BRS 195	100	99	0,99
70005	BRS 195/Metcalfe//PFC 200193/Danuta	66	26	0,39
70006	BRS 195/PFC 2002027//BRS Lagoa/Auriga	67	75	1,12
70007	Jersey/BRS 195//Jersey/BRS Borema	133	167	1,26
70008	PFC 2001049/PFC 2002028//PFC 2002116/Prestige	71	66	0,93
70009	PFC 2002113/PFC 2003035//PFC 2002113/Auriga	94	51	0,54
Total		883	892	Média= 0,96
DHC 2008				
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga
80022	BRS Borema//Prestige/S. Austria	42	5	0,12
80023	PFC 99318/BRS Manduri	51	56	1,10
80024	BRS Manduri/IPFC 200117	42	12	0,29
80025	BRS Sampa/PFC 2006146	49	14	0,29
80026	BRS Brau/PFC 2003032	47	5	0,11
80027	BRS Brau/PFC 2004062	45	10	0,22

Continua.

Tabela 1. Continuação.

DHC 2008					
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga	
80028	PFC 2004062/PFC 2005052	53	34	0,64	
80029	PFC 2006102/PFC 2006138	59	30	0,51	
80030	PFC 2006102/PFC 2006146	62	12	0,19	
80031	BRS 195/IPFC 200117	8	1	0,13	
80032	BRS 195/PFC 2004062	9	6	0,67	
80033	BRS Borema/PFC 2005129	11	124	11,27	
80034	BRS Greta/PFC 2004062	13	7	0,54	
80035	BRS Mirene/IPFC 200117	10	19	1,90	
80036	BRS Sampa/PFC 2006031	10	13	1,30	
80037	BRS Elis/PFC 2003047	9	9	1,00	
80038	BRS Cauê/PFC 2004062	14	6	0,43	
80039	PFC 2003047/PFC 2004188	9	0	0,00	
80040	PFC 2004062/PFC 2006033	7	3	0,43	
80042	PFC 2006031/PFC 2004062	8	3	0,38	
80043	Danuta/PFC 2006138	12	5	0,42	
80044	PFC 2005021/PFC 2005052	10	9	0,90	
Total		580	383	Média= 1,03	
DHC 2009					
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga	
90001	BRS Elis/Ke 5	39	45	1,15	
90002	BRS Cauê/Ke 5	25	91	3,64	
90003	BRS Sampa/Ke 5	39	81	2,08	
90004	BRS Brau*2/PFC 2004033	30	20	0,67	
90005	PFC 2004021/Ke 5	23	10	0,43	
90006	PFC 2004062/PFC 2005052	20	12	0,60	
90007	(sem informação)	34	6	0,18	
90008	PFC 2007002/Ke 5	10	8	0,80	
90009	Ke 5/BRS Brau	20	13	0,65	
90010	Ke 5/PFC 2005052	15	27	1,80	
90011	Ke 5/PFC 2006031	38	54	1,42	
90012	Ke 5/PFC 2007020	24	19	0,79	
90013	Ke 5/PFC 2007037	27	8	0,30	
Total		344	394	Média= 1,12	

Continua.

Tabela 1. Continuação.

DHC 2010				
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga
10001	(sem informação)	143	47	0,33
10002	(sem informação)	117	122	1,04
10003	(sem informação)	168	103	0,61
10004	(sem informação)	101	18	0,18
10005	(sem informação)	143	19	0,13
10006	(sem informação)	14	2	0,14
10007	(sem informação)	62	13	0,21
10008	(sem informação)	81	102	1,26
Total		829	426	Média= 0,49
DHC 2011				
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga
F09-020	BRS Elis/PFC 2007020	52	4	0,08
F09-031	BRS Sampa/CGN 02857	97	27	0,28
F09-053	BRS Brau/Quest	159	106	0,67
F09-090	BRS Korbel/MN 684	98	55	0,56
F09-148	Embrapa 129/Quench	149	37	0,25
F09-172	BRS Elis/BRS Cauê//BRS Elis/PFC 2007020	81	33	0,41
Total		636	262	Média= 0,37
DHC 2012				
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga
11013	BRS Elis/MN 684//BRS Brau/Quest/3/ Embrapa129/ Quench//BRS Sampa/ CGN 02857	80	323	4,04
11023	BRS Brau/Umbrella	45	71	1,58
11092	BRS Korbel/Merlin-BAR	81	247	3,05
11100	BRS Korbel*2/MN 684	66	225	3,41
11179	BRS Cauê/PFC 2009118//BRS Cauê/ Sunshine	88	519	5,90
11214	MN 6021/PFC 2008018//PFC 2005100/ MN 6021	68	289	4,25
111282	(sem informação)	70	74	1,06
111284	(sem informação)	97	175	1,80
Total		595	1923	Média= 3,14

Continua.

Tabela 1. Continuação.

DHC 2013					
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga	
13001	BRS 195/Conchita//BRS Brau/BRS Quaranta	67	355	5,30	
13002	BRS Itanema/PFC 2008028//PFC 2005101/PFC 2006113	65	103	1,58	
13003	Publican//BRS Korbelt/Umbrella/3/Conchita*2/BRS Korbelt	53	41	0,77	
13004a	PFC 2006025/PFC 2005125//MN 6021/ PFC 2006025/3/PFC 2006025/PFC 2005125//PFC 2006025/PFC 2007020	57	415	7,28	
13005	BRS Korbelt/Ambev 31//PFC 2008028/ PFC 2008046/3/BRS Korbelt/CLE 202 RPH 15//BRS Korbelt/Conchita	58	628	10,83	
13006	BRS Cauê*2/PFC 2006113	65	51	0,78	
13007	BRS Kalibre//BRS Itanema/PFC 2007020	36	307	8,53	
13008	PFC 2008012/BRS Aurine	16	127	7,94	
Total		417	2027	Média= 5,38	
DHC 2014					
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga	
13004	BRS 195/Conchita//BRS Brau/PFC 2008058	26	40	1,54	
13031	BRS Itanema/PFC 2008028//PFC 2005101/PFC 2006113	44	6	0,14	
13059	Publican//BRS Korbelt/Umbrella/3/Conchita*2/BRS Korbelt	30	18	0,60	
13070	PFC 2006025/PFC 2005125//MN 6021/ PFC 2006025/3/PFC 2006025/PFC 2005125//PFC 2006025/PFC 2007020	36	4	0,11	
13078	BRS Korbelt/Ambev 31//PFC 2008028/ PFC 2008046/3/BRS Korbelt/CLE 202 RPH 15//BRS Korbelt/Conchita	25	55	2,20	
13103	BRS Cauê*2/PFC 2006113	43	40	0,93	
13145	BRS Kalibre//BRS Itanema/PFC 2007020	37	20	0,54	
13148	PFC 2008012/BRS Aurine	30	6	0,20	
13195	Andrea/3/PFC 2006102/PFC 2006127// PFC 2006025/PFC 2009148	38	33	0,87	
Total		309	222	Média= 0,79	

Continua.

Tabela 1. Continuação.

DHC 2015				
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga
1	BRS Brau/BRS Elis	101	9	0,09
2	BRS Korbelt/Avalon	92	29	0,32
3	PFC 2009148/Voyager	123	113	0,92
4	2B09-3944/BRS Quaranta	124	127	1,02
5	Rawson/2*BRS Korbelt	155	41	0,26
6	CLE 280/BRS Quaranta	77	3	0,04
7	BRS Quaranta/BRS Kalibre	91	47	0,52
Total		763	369	Média= 0,45
DHC 2017				
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga
DH 1	BRS Itanema/Anag 01	47	72	1,53
DH 2	BRS Itanema/PFC 2012044	19	64	3,37
DH 6	BRS Brau/Sebastian//CLE 267/BRS Quaranta/3/Latrobe//1090*3/GPT	57	14	0,25
338	CLE 280/PFC 2011133	63	7	0,11
339	BRS Brau/Planet	122	56	0,46
340	BRS Itanema/Anag 01	85	91	1,07
341	PFC 2011133//BRS Korbelt/Andrea	169	95	0,56
342	ABI 13/BRS Korbelt//CLE 267/BRS Quaranta	84	12	0,14
Total		646	411	Média= 0,94
DHC 2018				
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga
DH 18 682	Anag01*4/GPT/4/BRS Brau//Sebastian/CLE 267/BRS Quaranta/3/Latrobe//BRS Itanema*3/GPT	27	2	0,07
DH 18 683	Anag01*4/GPT/3/BRS Itanema*3/GPT//Planet	21	14	0,67
DH 1801 688	BRS Itanema/Anag01//BRS Korbelt/Planet	249	252	1,01
DH 1802 689	Anag01/MN 698//Voyager/Anag01/3/BRS Brau/Sebastian//COOID 2014	93	38	0,41

Continua.

Tabela 1. Continuação.

DHC 2018					
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga	
DH 1803 690	Avalon/C74006//BRS 225/3/GPT/BRS Korbell//CLE 280	147	13	0,09	
DH 1804 691	Anag01/Tesla//Voyager/3/BRS 225/PFC 2012037	81	27	0,33	
DH 1805 692	Planet/BRS Cauê	185	112	0,61	
Total		803	458	Média= 0,46	
DHC 2019					
Cruzamento	Genealogia	Nº Esp.	PVs	PVs/Espiga	
18003	Planet/BRS Sampa//BRS Brau/PFC 2014176	69	1	0,01	
18004	BRS Cryst/BRS Cauê//Irina	56	47	0,84	
18031	Planet//MN 6021/PFC 2014176	117	26	0,22	
18045	BRS Cauê//Irina	109	8	0,07	
18095	PFC 2014176//Irina	101	28	0,28	
18145	BRS Sampa//Irina	96	5	0,05	
18227	Anag01*2//BRS Sampa	66	11	0,17	
Total		614	126	Média= 0,24	

Condições de cultivo das plantas doadoras

As plantas de cevada (F1) foram desenvolvidas em câmaras de crescimento com ambiente climatizado (marca Conviron) para que fossem mantidas livres de patógenos e pragas, em fotoperíodo de 14-16 horas luz, com temperaturas de 18 °C (dia) e 14 °C (noite) e umidade relativa do ar de 80%. As plantas doadoras foram conduzidas de acordo com as recomendações para a cultura da cevada.

Observação das células ao microscópio óptico

Ao se aproximar da fase de início de coletas de cada ciclo, escala Zadoks Z41 (Zadoks et al., 1974), duas espigas de cada genótipo de cevada foram analisadas citologicamente para verificar o estágio de desenvolvimento das células de micrósporos, a fim de determinar a fase correta de coleta (fase uni-

nucleada intermediária). Para o preparo das lâminas, três anteras da porção mediana da espiga foram retiradas com o auxílio de uma pinça, maceradas em carmim acético a 1%, e observadas ao microscópio óptico. Através desta análise, foi possível estabelecer um parâmetro visual de seleção para a coleta das espigas, sendo variável para cada genótipo. Além da confirmação via análise citológica, a distância entre a folha-bandeira e a inserção do último nó do caule (variando de 4 – 10 cm) também foi usada para estimar a fase de coleta.

Coleta das espigas de cevada

Após estabelecer um parâmetro visual para coleta das espigas, iniciou-se o processo das coletas, sendo todas feitas no início das manhãs. Em seguida, as espigas foram superficialmente desinfetadas em câmara de fluxo laminar, com o borrifamento de álcool etílico 70%. Em ambiente asséptico, as espigas foram retiradas da bainha foliar e suas aristas cortadas, sendo então acondicionadas em placas de Petri estéreis, junto a uma placa menor contendo água destilada estéril, com o intuito de evitar a desidratação das espigas como mostra a Figura 1.

Pré-tratamento das espigas (indução da rota esporofítica)

O pré-tratamento mais comumente utilizado para indução da rota esporofítica é a submissão das espigas ao frio (4 °C) e escuro, sendo que as placas nas quais as espigas foram acondicionadas são vedadas com parafilme e embaladas para que permaneçam no escuro, por um período de sete a 10 dias, tempo suficiente para ocorrer o desvio da rota gametofítica e promover a rota esporofítica, induzindo o processo da androgênese.

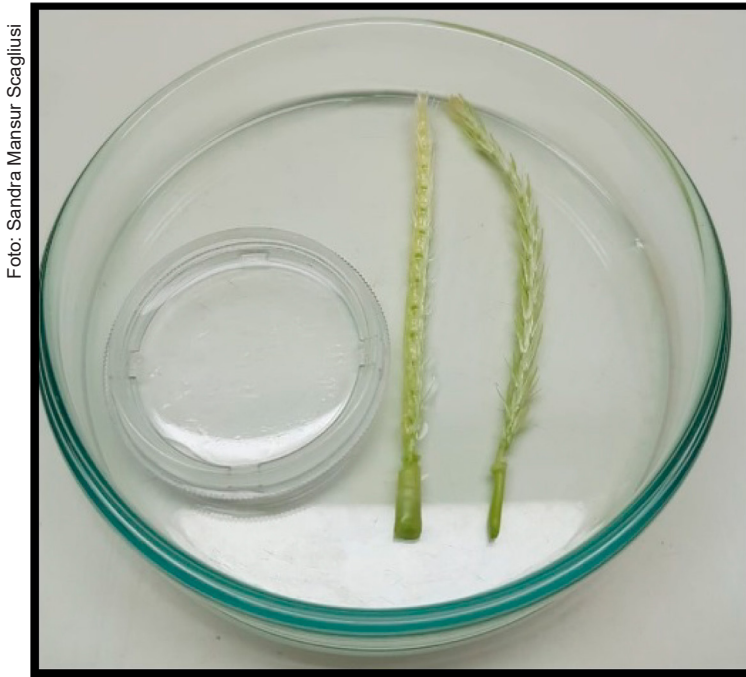


Foto: Sandra Mansur Scagliusi

Figura 1. Placa de Petri mostrando espigas jovens de cevada, já removidas da bainha foliar, contendo micrósporos na fase uninucleada (confirmação por microscópio óptico), e incubadas em ambiente úmido a 4 °C, por um período de sete a 10 dias no escuro.

Plaqueamento e cultivo das anteras

Ao final do período de indução da rota esporofítica, as anteras presentes em cada espigueta, foram cuidadosamente retiradas com o auxílio de uma pinça e lupa, e colocadas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 12 ml de meio de indução específico para cereais – FHGA (Kasha et al., 2001), com algumas modificações, quando necessário. Ao final do processo de plaqueamento das anteras, as placas foram vedadas com parafilme e mantidas em câmara de crescimento, ainda no escuro, a 25 °C por um período de 20 a 30 dias, para que o processo da embriogênese fosse iniciado. Passados os dias de escuro, as placas de Petri com as anteras foram expostas à luz, permanecendo na câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas a 25 °C, até que as estruturas embriogênicas desejadas fossem

regeneradas. As plantas verdes formadas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de enraizamento (Rooting – Eudes et al., 2003), mantidas em câmara de crescimento com mesmo fotoperíodo, até o desenvolvimento satisfatório das raízes (longas e ramificadas).

Aclimatização das plântulas

Após completo desenvolvimento de raízes e parte aérea, as plantas foram transferidas para tubetes, contendo substrato, onde foram fertilizadas semanalmente, com solução nutritiva de Hoagland (Hoagland; Arnon, 1938), na proporção 2:1 (água:solução nutritiva). As plantas foram mantidas em câmaras com ambiente controlado para aclimatização (marca Conviron), em fotoperíodo de 14-16 horas luz, 18 °C (dia) e 14 °C (noite).

Duplicação induzida dos cromossomos

A avaliação da duplicação espontânea dos cromossomos foi realizada no início da fase reprodutiva. As plantas visualmente identificadas como haploides foram tratadas com colchicina (0,25%) e DMSO 2% (Dimethyl Sulfoxide) para a duplicação artificial dos cromossomos. Este procedimento envolve a poda dos afilhos e raízes das plantas haploides, colocando-as em frascos contendo a solução de colchicina por um período de quatro horas, com borbulhador para aeração. Após lavagem para remoção da colchicina, as plantas são transferidas para vasos com mistura de terra:substrato:vermiculita (1:1:1) e mantidas em ambientes com condições controladas, com temperatura noturna variando de 8-10 °C. As plantas duplo-haploides espontâneas e ou duplicadas artificialmente foram acompanhadas até o final do ciclo reprodutivo, quando as sementes foram colhidas e repassadas ao programa de melhoramento genético da cevada.

Análise dos dados

Ao final de cada ciclo, foi quantificado o número total de plantas produzidas por genótipo, determinado o número de plantas produzidas por espiga e a média do ano, dentro de cada ano do estudo. Além dos dados obtidos por

cruzamento, os genótipos usados como parentais (individualmente) foram posteriormente agrupados e a média de plantas verdes por espiga, para cada genótipo também foi registrada (cruzamentos simples). Em alguns casos, um mesmo genótipo participou em mais de um cruzamento, ou foi utilizado repetidamente, dentro de um mesmo cruzamento, porém de natureza mais complexa (cruzamentos multi-parentais, como o caso do genótipo 13004a – Tabela 1). Assim, para obter esses dados, os genótipos parentais que foram usados em mais de um cruzamento, ou repetidas vezes, foram individualizados, para que o peso de sua potencial influência na produção de plantas verdes, fosse ponderado e corretamente atribuído.

Resultados e Discussão

No presente estudo foi avaliada a resposta androgenética de 143 genótipos de cevada originados do programa de melhoramento genético de cevada da Embrapa Trigo, ao longo dos anos de 2005 a 2019. O levantamento feito neste estudo considerou apenas a *resposta genética* ao método da androgênese, não levando em consideração, outros fatores que conhecidamente afetam a resposta ao método, tais como as condições fisiológicas das plantas doadoras; possíveis variações no estágio de desenvolvimento das anteras quando plaqueadas e mudanças na composição do meio de indução (quando necessário).

As plantas doadoras foram sempre conduzidas em ambientes controlados (Câmaras Conviron), não havendo variação nos tratamentos de condução das plantas, ao longo do período avaliado. Dessa forma, assegura-se a qualidade fitossanitária das plantas, minimiza-se a infestação por insetos e pragas, reduz-se a contaminação por patógenos, além de se evitar eventos meteorológicos extremos, diferentemente do que ocorreria num cultivo a campo. Entretanto, mesmo com o controle de temperatura, fotoperíodo e umidade adequados para a espécie em estudo, tais ambientes podem ser estressantes para o desenvolvimento das plantas, interferindo inevitavelmente no desenvolvimento e na fisiologia das mesmas.

Os resultados observados (Tabela 1) mostraram uma ampla variação de resposta entre os anos e dentro do ano (entre os genótipos). O número de cruzamentos em cada ano variou, sendo, por exemplo, apenas seis, para o

ano de 2011, e 24 para o ano de 2008, não havendo nenhum dado para o ano de 2016 (razões não técnicas). O número de cruzamentos utilizados para os demais anos encontra-se na Tabela 1. O resultado para cada genótipo foi representado pelo número de plantas verdes formadas por espiga utilizada, conforme dados expressos na Tabela 1. Os valores observados entre todos os cruzamentos, não considerando o ano, variou de zero até 11,27 plantas verdes por espiga. Diante deste espectro de variabilidade, foi determinado arbitrariamente como número de plantas aceitáveis e de interesse ao objetivo deste estudo, intervalo de valores entre estes dois extremos. Assim, ao analisar as médias entre os anos, os resultados mais expressivos foram observados para os anos de 2013, seguido de 2012 e 2006, onde foram obtidas médias de 5,38; 3,14 e 2,01 plantas verdes por espiga, respectivamente. Já analisando por cruzamento, o nº 80033 (do ano de 2008), originado dos parentais BRS Borema/PFC 2005129, com apenas 11 espigas coletadas, produziu 124 plantas verdes, rendendo o maior número de plantas verdes por espiga, com um total de 11,27 plantas. O segundo maior número de plantas formadas por espiga foi de 10,83 plantas, apresentada pelo cruzamento nº 13005 (do ano de 2013), originado do cruzamento BRS Korbel/Ambev 31//PFC 2008028/PFC 2008046/3/BRS Korbel/CLE 202 RPH 15//BRS Korbel/Conchita.

Considerando o grande número de micrósporos presentes em uma única antera e o grande número de anteras por espiga, parece razoável acreditar que o número de plantas geradas a partir de uma única espiga seja de dezenas de milhares. Contudo, tal resultado não acontece na realidade, e o número de plantas verdes regeneradas para cada 100 anteras pode variar de zero a algumas centenas, dependendo do genótipo (Li; Devaux, 2003; Jacquard et al., 2009). As razões para essa grande disparidade se devem a uma variedade de fatores, incluindo as condições fisiológicas das plantas doadoras, a capacidade dos micrósporos de alterar sua rota de desenvolvimento (de gametofítica para esporofítica), as taxas de sobrevivência das células de micrósporos (*in vitro*), a eficiência da produção androgênica de embriões, e a capacidade de regeneração para formar plantas verdes, bem como o fenômeno altamente importante do albinismo (Makowska; Oleszczuk, 2014). Ratificando os dados observados na literatura (Logue et al., 1993; Cistué et al., 2003; Lazaridou et al., 2005; Kahrizi et al., 2011), os dados obtidos neste estudo, em especial para o ano de 2008, indicam um acentuado

efeito do genótipo sobre a resposta da androgênese. Neste ano, muitos genótipos apresentaram baixo número de plantas verdes; sendo que dos 24 cruzamentos testados, 14 apresentaram um número de plantas inferior a 0,5 planta verde por espiga. No entanto, neste mesmo ano, um dos cruzamentos (nº 80033), apresentou o maior valor de rendimento (11,27 plantas verdes por espiga), sugerindo o forte efeito do genótipo sobre a resposta androgenética. Resultados similares foram obtidos no estudo feito por Kahrizi et al. 2011, mostrando que o principal fator que afeta a formação de plantas verdes na cultura de anteras é a predeterminação genética de uma planta doadora. O efeito do genótipo sobre a resposta frente à androgênese também foi relatado em outro estudo, tanto para variedades de cevada de hábitos inverniais (em genótipos de inverno, o meristema apical deve ser exposto a baixas temperaturas por um período mínimo de tempo, para induzir a fase de desenvolvimento reprodutivo), como de primavera (Makowska et al., 2015). Além do efeito genótipo, outro fator que contribuiu para a baixa produção de plantas no ano de 2008 foi o elevado número de cruzamentos, limitando o trabalho da coleta de espigas para cada genótipo. Outros anos avaliados também foram frustrantes, com produção de poucas plantas duplo-haploides, ficando com médias próximas (ou inferiores) de 0,5 planta verde por espiga, tais como: 2010 (0,49 planta verde/espiga); 2011 (0,37 planta verde/espiga); 2015 (0,45 planta verde/espiga); 2018 (0,46 planta verde/espiga) e o mais baixo de todos 2019 (0,24 planta verde/espiga). Como mencionado anteriormente, os resultados aqui apresentados apenas se referem à resposta dos *genótipos* frente ao método da androgênese, não levando em consideração outros fatores que afetam o processo. No caso específico do ano de 2019, houve problemas durante o preparo dos meios de cultura que prejudicaram os resultados, levando a um número extremamente baixo de plantas duplo-haploides produzidas para todos os cruzamentos avaliados. Diversamente aos anos de baixa produção, os anos de 2006 (2,01), 2012 (3,14) e 2013 (5,38) se destacaram com as mais altas médias de plantas verdes produzidas por espiga, totalizando 5.761 plantas duplo-haploides nos três anos de destaque.

Quando analisamos a genealogia dos cruzamentos e a frequência que estes genótipos foram usados como parentais (Figura 2), podemos verificar que nem sempre os genótipos que indicaram uma melhor resposta, foram os mais usados como parentais nos cruzamentos. É de se esperar que nos programas

de melhoramento, a resposta androgenética não seja a característica alvo de um processo de seleção. No entanto, um braço paralelo dentro de programas de melhoramento, focando em genótipos mais responsivos ao processo da androgênese, poderia contribuir para otimizar a resposta dos genótipos frente ao método. Uma das melhores respostas obtidas neste estudo, baseando-se na média de plantas verdes/espiga/genótipo, foi encontrada na cultivar BRS Aurine (Figura 2), originada do cruzamento entre “BRS Sampa/Danuta” (Minella et al., 2017), e obtida via cultura de anteras, resultando na linhagem denominada PFC 2008072 (cruzamento 60010 – 2006). Esta informação é especialmente importante, uma vez que a resposta positiva em relação ao processo da androgênese é uma característica altamente herdável, como já relatado em vários artigos (Foroughi-Wehr; Friedt, 1984; Moieni et al., 1997; Kahrizi; Mohammadi, 2009; Al-Ashkar, 2013). O conhecimento prévio da resposta de diferentes genótipos frente à androgênese pode ser determinante para uma resposta mais efetiva do método, disponibilizando um maior número de plantas homocigotas ao melhorista, que poderão apresentar as características agrônômicas de interesse.

Como mencionado antes, uma das principais limitações do método de produção de haploides, via androgênese, além do genótipo, é a formação de plantas albinas (Kumari et al., 2009; Makowska; Oleszczuk, 2014). A ocorrência deste fenômeno é mais comum em genótipos de cevada de primavera, o que é o caso de todos os genótipos deste estudo (em contraste aos genótipos de hábitos inverniais, adaptados ao curto fotoperíodo e baixas temperaturas). O número de plantas albinas observadas no presente estudo superou o de plantas verdes em 10 dos 14 anos avaliados, chegando em 2018 a ser 4,25 vezes maior que o de plantas verdes (dados não mostrados). A formação de plantas albinas é uma alteração morfofisiológica ligada à combinação de uma série de fatores, tais como: efeito do genótipo, ambiente, anormalidades meióticas, desequilíbrio hormonal, incompatibilidade entre os genomas nuclear-plastídico, e até mesmo deleções no DNA plastidial (Kumari et al., 2009). Assim, torna-se praticamente impossível eliminar a formação de plantas albinas no processo de produção de plantas duplo-haploides de cevada. No entanto, vários autores relatam que tal fenômeno pode ser minimizado com o acréscimo de cobre ao meio de cultura (Jacquard et al., 2009; Makowska; Oleszczuk, 2014). Em trabalho mais recente, foi elucidada a hipótese de que a diferenciação morfológica de plastídios em micrósporos

de cevada, antes da cultura *in vitro*, afeta a capacidade do genótipo de regenerar plantas verdes. Ao antecipar a fase de coleta das anteras (para uma fase mais jovem de desenvolvimento do micrósporo), os autores observaram efeitos positivos na formação de plantas verdes, já que os plastídios destas células ainda não haviam sido totalmente diferenciados em amiloplastos e nem estavam preenchidos com amido (Gajecka et al., 2020). Assim, utilizando desses dados (acréscimo de sulfato de cobre e coleta antecipada das espigas), ensaios voltados para otimização do método poderão minimizar tais efeitos, diminuindo consideravelmente a formação de plantas albinas e contribuindo para uma maior eficiência do processo da androgênese.

Ao longo do período avaliado (14 anos), foram produzidas 10.162 linhagens duplo-haploides, entre as quais deram origem à muitas linhagens e diversas variedades de cevada: BRS-Mirene, BRS Cauê, BRS Sampa, BRS Brau, BRS Manduri, BRS Aliensa, BRS Korbel, BRS Quaranta e BRS Aurine (Minella et al., 2017), refletindo o emprego do método da haploidização na formação de novas cultivares. No Brasil, cerca de 70% da cevada cultivada é de variedades 'BRS' – nome comercial das cultivares indicadas pela Embrapa, ou seja, materiais originados do seu programa de melhoramento genético. Com isso, o alcance da tecnologia de haploidização passa para um patamar nacional, e não apenas regional, com a geração de variedades indicadas para outras regiões geográficas e não apenas para a região Sul do país. Esse é o caso da variedade BRS Sampa, produzida para áreas irrigadas, com potencial de rendimento de 7.000 kg/ha (Minella et al., 2015), contribuindo para elevar a média nacional de produtividade de cevada para 3.612 kg/ha, na safra de 2019.

Além das variedades já lançadas, as linhagens homozigotas produzidas, via haploidização, podem contribuir ainda mais com programas de melhoramento genético, se usadas de forma combinada com outras ferramentas biotecnológicas, como o uso de marcadores moleculares (MAS – Molecular Marker Assisted Selection). Com a integração das duas técnicas (haploidização e marcadores moleculares) é possível fixar características qualitativas e melhorar as frequências gênicas de características quantitativas, otimizando a taxa de sucesso na identificação de genótipos superiores, quando da etapa de avaliação das linhas DH em ensaios de campo (Humphreys; Knox, 2015).

Considerações finais

Os resultados obtidos neste levantamento possibilitam conhecer a resposta androgenética de genótipos de cevada avaliados no período, e assim indicar ou escolher os genótipos com alto potencial de regeneração *in vitro*, para que estes sejam preferencialmente incluídos nos blocos de cruzamento visando às futuras hibridizações. Alternativamente, quando genótipos com baixa capacidade de regeneração representarem fontes de genes ou características desejáveis para os programas de melhoramento, as informações relacionadas ao seu desempenho frente ao método da androgênese são igualmente úteis. Nesse caso, é possível determinar o número suficiente de plantas doadoras para se iniciar a cultura *in vitro* e produzir o número necessário de linhas duplo-haploides, visando melhor atender aos programas de melhoramento.

Referências

- AL-ASHKAR, I. M. Anther culture response and salt tolerance in some wheat genotypes. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 58, n. 2, p.139-145, dez. 2013. DOI 0.1016/j.aoas.2013.07.017.
- CISTUÉ, L.; VALLÉS, M. P.; ECHÁVARRI, B.; SANZ, J. M.; CASTILLO, A. Barley anther culture. In: MALUSZYNSKI, M.; KASHA K. J.; FORSTER B. P.; SZAREJKO I. (eds) **Doubled haploid production in crop plants**. Dordrecht: Springer, 2003.
- DAGÜSTÜ, N. Diallel analysis of anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 19, p. 3419–3423, 2008. DOI 0.4314/ajb.v7i19.59347.
- DUNWELL, J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 4, p. 377-424, May 2010. DOI 0.1111/j.1467-7652.2009.00498.x.
- EUDES, F.; ACHARYA, S.; LAROCHE, A.; SELINGER, L. B.; CHENG, K. J. A novel method to induce direct somatic embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 73, n. 2, p.147-157, 2003. DOI 10.1023/A:1022800512708.
- FOROUGHI-WEHR, B.; FRIEDT, W. Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 67, p. 377-382, Feb. 1984.
- GAJECKA, M.; MARZEC, M.; CHMIELEWSKA, B.; JELONEK, J.; ZBIESZCZYK, J.; SZAREJKO, I. Plastid differentiation during microgametogenesis determines green plant regeneration in barley microspore culture. **Plant Science**, v. 291, n.110321, Feb., 2020. DOI 10.1016/j.plantsci.2019.110321.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station,

Berkeley, Circular: 347, Dec. 1938 Disponível em: <http://hdl.handle.net/2027/uc2.ark:/13960/t51g1sb8j>. Acesso em: 2 fev. 2021.

HUMPHREYS, D. G.; KNOX, R. E. Doubled Haploid Breeding in Cereals. In: AL-KHAYRI, J. M.; JAIN S. M.; JOHNSON, D. V.(eds.) **Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular tools**, Canadá: Springer, 2015. p. 241-290.

JACQUARD, C.; NOLIN, F.; HÉCART, C.; GRAUDA, D.; RASHAL, I.; DHONDT-CORDELIER, S.; RAJBIR, S.; DEVAUX, P.; MAZEYRAT-GOURBEYRE, F.; CLÉMENT, C. Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. **Plant Cell Reports**, v. 28, n. 9, p.1329-1339, Sep. 2009. DOI 10.1007/s00299-009-0733-z.

KAHRIZI, D.; MAHMOODI, S.; KHANIKI, G. B.; MIRZAEI, M. Effect of genotype on androgenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Biharean Biologist**, v. 5, n. 2, p. 132-134, JAN. 2011.

KAHRIZI, D.; MOHAMMADI, R. Study of androgenesis and spontaneous chromosome doubling in Barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes using isolated microspore culture. **Acta Agronomica Hungarica**, v. 57, p. 155-164. DOI 10.1556/AAgr.57.2009.2.7.

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, Aug. 2001.

KUMARI, M.; CLARKE, H. J.; SMALL, I.; SIDDIQUE, K. H. M. 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, Nov. 2009. DOI 10.1080/07352680903133252.

LAZARIDOU, T. B.; LITHOURGIDIS, A. S.; KOTZAMANIDIS, S. T.; ROUPAKIAS, D. G. Anther culture response of barley genotypes to cold pretreatments and culture media. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 52, p. 696–699, Sept. 2005.

LI, H.; DEVAUX, P. High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. **Plant Science**, v. 164, n. 3, p. 379-386, March 2003. DOI 0.1016/S0168-9452(02)00424-7.

LOGUE, S. J.; GILES, L. C.; SPARROW, D. H. B. Genotype and environment strongly influence barley anther culture using Australian genotypes. **Australian Journal of Botany**, v. 41, n. 2, p. 227–236, 1993. DOI 10.1071/BT9930227.

MAKOWSKA, K.; OLESZCZUK, S. Albinism in barley androgenesis. **Plant Cell Reports**, v. 33, p. 385-392, 2014. DOI 10.1007/s00299-013-1543-x.

MAKOWSKA, K.; OLESZCZUK, S.; ZIMNY, A.; CZAPLICKI, A.; ZIMNY, J. Androgenic capability among genotypes of winter and spring barley. **Plant Breeding**, v. 134, n. 6, p. 668-674, Oct. 2015.. DOI 10.1111/pbr.12312.

MINELLA, E.; EICHELBERGER, L.; COSTAMILAN, L. M.; SCAGLIUSI, S. M. M. BRS Sampa: malting barley cultivar for irrigated production. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 43-44, 2015. DOI 10.1590/1984-70332015v15n1c7.

MINELLA, E.; COSTAMILAN, L. M.; EICHELBERGER, L.; SCAGLIUSI, S. M. M. BRS Aurine: nova opção de cevada cervejeira para a Região Sul do país. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CEVADA, 31., 2017, Guarapuava. **Anais...** Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2017. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/169671/1/2017RNPC31-Genetica7.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2021.

MOIENI, A.; LOKOS-TOTH, K.; SARRAFI, A. Evidence for genetic control and media effect on haploid regeneration in the anther culture of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Breeding**, v. 116, p. 502-505, 1997.

ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research**, v. 14, p. 415-421, Dec. 1974. DOI 10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x.

Embrapa

Trigo

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL