



Geração de linhagens homozigotas de trigo via cultura de micrósporos isolados e sua aplicação em programas de melhoramento

Sandra Maria Mansur Scagliusi⁽¹⁾ e Eduardo Caierão⁽¹⁾

⁽¹⁾ Pesquisadores, Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.

Resumo — A produção de plantas duplo-haploides (DHs) é uma importante ferramenta biotecnológica utilizada para acelerar o processo de alcance da homozigose em programas de melhoramento e para estudos genéticos mais refinados. Apesar da grande vantagem temporal proporcionada, economia de seis a sete anos no tempo de produção de uma nova variedade, sua implementação rotineira exige etapas preliminares críticas. O presente estudo teve como objetivo relatar a aplicação do método de cultura de micrósporos isolados (otimizado) para a rápida fixação de linhagens de trigo. Modificações na composição dos meios de indução foram determinantes para o sucesso do processo: adição do inibidor de desacetilases de histonas Trichostatin A (TSA) e remoção das auxinas 2,4-D e do ácido fenilacético (PAA), uma vez que estes reguladores apresentaram efeitos antagônicos quando combinados ao TSA. Para as plantas doadoras de micrósporos foram utilizadas sementes F1 e/ou sementes F2/F3 de plantas previamente selecionadas. Esses ajustes metodológicos aumentaram a eficiência na obtenção de embriões e plantas DHs, consolidando o protocolo de micrósporos como uma alternativa viável para os programas de melhoramento de trigo.

Termos para indexação: *Triticum aestivum* L.; Trichostatin A, co-cultivo ovários.

Generation of doubled haploid wheat lines via isolated microspore culture and its application in breeding programs

Abstract — The production of doubled haploid (DH) plants is an important biotechnological tool used to accelerate homozygosity in breeding programs and genetic studies. Despite the significant time advantage it provides, saving six to seven years in the development of new varieties, its routine implementation demands critical preliminary steps and improved protocols. The present study reports the application of an optimized isolated microspore culture method for the rapid fixation of wheat lines. Modifications in the induction medium composition were decisive for the success of the process: the addition of the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A (TSA) and the removal of the auxins 2,4-D and phenylacetic acid (PAA), which exhibited antagonistic effects when combined with TSA. Seeds from F1 and F2/F3 target crosses were used as microspore donor plants. These methodological

Embrapa Trigo
Rodovia BR-285, km 294
Caixa Postal 78
99001-970 Passo Fundo, RS
www.embrapa.br/trigo
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Daniel Augusto Schurt

Membros

Alaerto Luiz Marcolan, Alexandre
Ferreira do Nascimento, Alvadi
Antonio Balbinot Junior, Gilberto
Rocca da Cunha, João Leonardo
Fernandes Pires, Jorge Alberto
de Gouvêa, Joseani Mesquita
Antunes e Sandra Maria Mansur
Scagliusi

Normalização bibliográfica

Graciela Olivella Oliveira
(CRB-10/1434)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Márcia Barrocas Moreira Pimentel

Publicação digital: PDF

Todos os direitos
reservados à Embrapa.

adjustments increased the efficiency of embryo and DH plant production, consolidating the protocol as a viable alternative for wheat breeding programs.

Index terms: *Triticum aestivum* L.; Trichostatin A, ovaries co-culture.

Introdução

O desenvolvimento de novas cultivares com maior potencial de rendimento e resistentes a doenças e pragas é fundamental para garantir a segurança alimentar, frente às demandas de uma população em constante crescimento e aos impactos das mudanças climáticas (Ceran et al., 2024; Bacha et al., 2025). Contudo, o processo de criação de um novo produto é reconhecidamente longo e demorado, podendo levar muitos anos até a liberação de uma nova variedade (Jähne et al., 2020). Um dos principais fatores que limitam essa velocidade é a necessidade de se obter plantas geneticamente estáveis e homozigotas. Nos métodos tradicionais de melhoramento de plantas autógamas, a homozigose é alcançada por meio de sucessivos ciclos de autofecundação, geralmente entre sete e nove, sendo necessárias ao menos seis gerações para atingir níveis mínimos aceitáveis de homozigose antes da avaliação agrônômica das linhagens (Dermail et al., 2021; Guan et al., 2024; Sheng et al., 2025). Em contrapartida, a utilização da tecnologia *in vitro* de produção de plantas duplo-haploides (DHs) possibilita a obtenção da homozigose em apenas uma geração, acelerando de forma expressiva a pureza das linhagens. Com isso, eliminam-se diversos ciclos de autofecundação, resultando em significativa redução no tempo e nos recursos necessários, quando comparado às práticas convencionais (Guan et al., 2024; Paspureddy et al., 2025).

A tecnologia de produção de plantas duplo-haploides (DHs) tem exercido grande impacto tanto em programas de melhoramento de plantas quanto em pesquisas básicas e aplicadas (Humphreys; Knox, 2015; Weyen, 2021). Populações DH são amplamente utilizadas para acelerar a seleção de genótipos elite e viabilizar estudos genéticos e moleculares (Paspureddy et al., 2025). A integração do melhoramento genético rápido (obtida via DH) com ferramentas avançadas, como fenotipagem de alto rendimento (Speed-phenomics) e seleção assistida por marcadores (Speed-MAS), também contribuem para reduzir a duração do ciclo de melhoramento e aumentar a eficiência do processo (Tadesse et al., 2019; Aziz; Masmoudi, 2025).

A obtenção de plantas DHs pode ser realizada por três métodos principais: cultura de anteras ou de micrósporos (androgênese), cultura de óvulos não fertilizados (gimnogênese) e cruzamentos interespecíficos ou intergenéricos seguidos da eliminação cromossômica da planta doadora de pólen (Guan et al., 2024; Arabzai et al., 2025; Paspureddy et al., 2025). A eficiência de cada abordagem varia conforme a espécie. No caso do trigo, um método bastante utilizado é o cruzamento intergenérico com milho (como doador de pólen). Apesar de sua aplicabilidade, esse procedimento é altamente trabalhoso e demanda infraestrutura específica para o cultivo simultâneo de trigo e milho, além de técnicas complementares de resgate de embriões imaturos *in vitro* e duplicação cromossômica induzida por colchicina, podendo limitar sua aplicação em larga escala (Zhang et al., 2025).

Diante do contexto apresentado e considerando as vantagens e limitações dos diferentes métodos de obtenção de duplo-haploides (DHs) em trigo, a cultura de micrósporos isolados (via androgênese) foi eleita como estratégia central deste trabalho. Essa escolha fundamentou-se em sua capacidade de gerar um grande número de embriões homozigóticos em curto intervalo de tempo, aliada à possibilidade de aplicação de pressão de seleção *in vitro* – vantagens não oferecidas pelos demais métodos. Assim, este trabalho teve como objetivo relatar os resultados obtidos da adoção do método de cultura de micrósporos isolados, para geração de plantas DHs em trigo, com protocolo otimizado, visando à fixação acelerada de genótipos superiores para seleção de novas linhagens. Foram utilizados genótipos de trigo com perfis genéticos distintos, priorizando aqueles com melhor resposta ao processo da androgênese (obtidos em estudos anteriores) e resistência a doenças como brusone e giberela, além de tolerância à germinação pré-colheita na espiga – características essenciais para o desenvolvimento de cultivares resilientes e produtivas. Este trabalho está alinhado à Agenda 2030 da ONU, convergindo com o ODS 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável) e o ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis). A otimização da tecnologia de duplo-haploides acelera o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e resilientes, promovendo a segurança alimentar ao mesmo tempo em que otimiza o uso de recursos e insumos na pesquisa biotecnológica, garantindo padrões de produção mais eficientes e sustentáveis.

Material e métodos

Plantas doadoras e condições de crescimento

Trinta e sete genótipos de trigo (e genealogia) descritos na Tabela 1 foram utilizados como plantas doadoras das células de micrósporos. As sementes foram colocadas para germinar em vasos de sete litros com mistura composta de substrato-turfa, areia e

vermiculita [1:1:1], mantendo, após o desbaste inicial, três plantas em cada vaso. As plantas foram mantidas em câmaras de crescimento (Conviron) com regime de temperaturas de 20 °C (diurna) e 14 °C (noturna) e 16 horas de fotoperíodo, com intensidade luminosa de 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Figura 1). Tratos culturais foram feitos de acordo com as indicações técnicas para a cultura. A utilização de inseticidas e fungicidas limitou-se ao tratamento das sementes.

Tabela 1. Genótipos de trigo e genealogia usados como plantas doadoras para produção de plantas duplo-haploides (DHs), via cultura de micrósporos isolados, no ano de 2025.

Nº Estaca	Genealogia (Parentais)
1 437949	BRS REPONTE / TBIO CALIBRE // BRS TR209
2 462216	ORS FEROZ / PF 200252
3 462219	ORS FEROZ / PF 200256
4 462221	ORS FEROZ / PF 200253
5 462772	NORIN-61 / PF 170495 // CD 1303
6 536357	TBIO PONTEIRO / PF 220180
7 536390	TBIO PONTEIRO / BAR 20
8 536391	TBIO CALIBRE / TBIO MOTRIZ
9 536408	TBIO CALIBRE / PF 220180
10 536431	TBIO CALIBRE / TBIO TRUNFO
11 536432	TBIO CALIBRE / ORS DESTAK
12 536441	TBIO CALIBRE / BAR 20
13 536460	TBIO MOTRIZ / PF 220180
14 536510	ORS GUARDIÃO / PF220180
15 536520	ORS GUARDIÃO / PF220069
16 536562	ORS FEROZ / PF 220180
17 536585	ORS FEROZ / ORS DESTAK
18 536595	ORS FEROZ / BAR 20
19 536794	PF220069 / BRS TR209
20 536801	PF220069 / BRS 179
21 537037	ORS TURBO / BAR 20
22 537055	TBIO RAMBO / TBIO CALIBRE
23 537056	TBIO RAMBO / TBIO MOTRIZ
24 537095	BIOTRIGO TALISMÃ / BAR 20
25 537130	BIOTRIGO TITAN / ORS FEROZ
26 537148	BIOTRIGO TITAN / BAR 20
27 537268	TBIO CALIBRE / TBIO PONTEIRO // ORS GUARDIÃO /BRS TR 784
28 537270	TBIO CALIBRE / TBIO TRUNFO // ORS GUARDIÃO / ORS FEROZ
29 537614	ORS FEROZ / TBIO CALIBRE // BRS TR209 /3/ TBIO PONTEIRO
30 537634	TBIO ATON / LG FORTALEZA // TBIO CALIBRE /3/ ORS TURBO
31 537637	BRS REPONTE / TBIO CALIBRE // BRS TR209 /3/ ORS GUARDIÃO
32 537720	BRS 374 / TBIO AUDAZ // TBIO PONTEIRO /3 /BRS TR733 /4/ TBIO TRUNFO /5/ BRS 179
33 462136/137	ORS DESTAK / PF 170495
34 510209/210	BRS TR733 / TBIO TORUK
35 510216/217	BRS TR733 / CD 303
36 510232/233	BRS TR733 / FPS REGENTE
37 510237/238	BRS TR733 / CHIARO

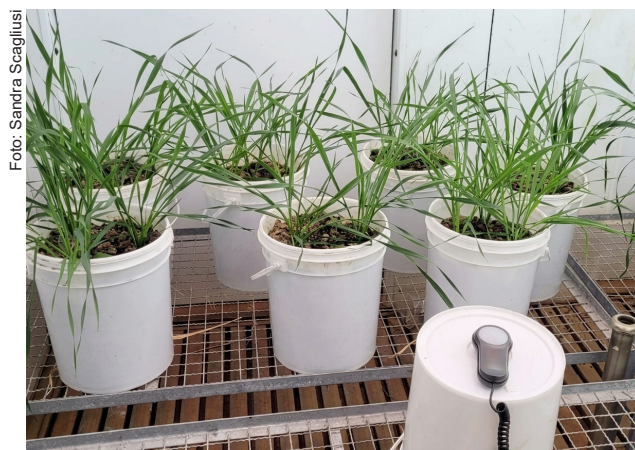


Figura 1. Plantas de trigo, doadoras de células de micrósporos, mantidas em câmaras Conviron com condições controladas de fotoperíodo e temperatura.

Coleta e pré-tratamento das espigas

As primeiras e/ou mais vigorosas espigas de cada vaso foram coletadas na fase uninucleada dos micrósporos (entre as fases 42 e 49 da escala Zadoks). Para determinar a fase correta da coleta das espigas, três anteras foram dissecadas de uma flor da porção mediana da espiga, colocadas sobre uma lâmina de vidro, coradas com carmim acético a 1%, e observadas ao microscópio óptico (Figura 2A). Para o pré-tratamento, que promoverá o desvio da rota gametofítica, as espigas foram mantidas em geladeira (4 °C) por até três semanas com suas hastes mergulhadas em água destilada e envoltas em papel alumínio. Após três semanas de pré-tratamento, um grupo de 10 – 12 espigas do mesmo genótipo

(Figura 2B) foram retiradas de seus perfilhos, e as mais homogêneas e vigorosas, foram selecionadas para o processo de extração e purificação das células. As espigas em fase de desenvolvimento mais avançado foram mantidas in vivo, quando possível, e colhidas posteriormente para remoção dos ovários. As aristas foram removidas com tesoura estéril em capela de fluxo laminar. Em seguida, as espigas foram lavadas em solução de água sanitária a 15% (hipoclorito de sódio 2,5%) durante o tempo máximo de 20 minutos, sob agitação constante, seguidas de quatro lavagens consecutivas de um minuto com água bidestilada estéril.

Extração e purificação das células de micrósporos

O processo de purificação das células de micrósporos seguiu metodologia descrita por Wang et al. (2019), com algumas modificações. Após a lavagem, as anteras ou espiguetas de cada espiga foram removidas assepticamente dentro do fluxo laminar e colocadas em um mini-blender autoclavado (Waring Micro Blender, Eberbach Corporation, EUA) contendo aproximadamente 40 mL de solução de extração (FHG-2 Solution). As anteras foram trituradas três vezes por 8s em baixa velocidade, e a suspensão foi filtrada usando um filtro de células estéril com malha de 100 µm (BD Falcon 352360, EUA). A solução filtrada foi colocada em dois tubos de 50 mL, e as células de micrósporos foram precipitadas por centrifugação (200Xg por 5 min a 4 °C). O sobrenadante foi descartado, e o pellet ressuspensionado em 35 mL de solução de extração, para nova centrifugação. O pellet resultante contendo as células de

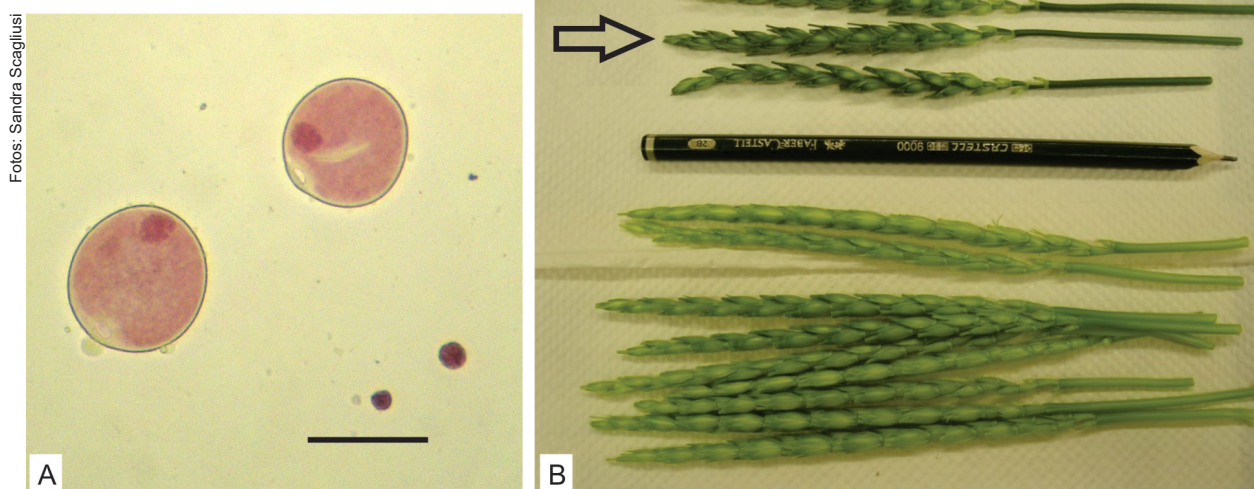
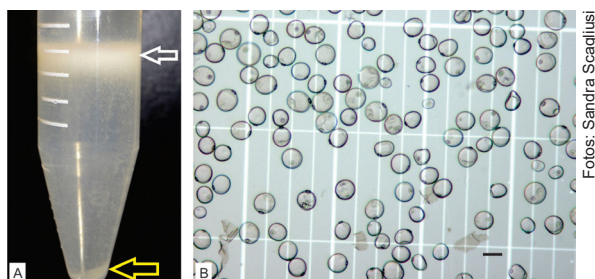


Figura 2. Coleta de espigas de trigo para extração de micrósporos. A: Células de micrósporos uninucleadas (núcleo de coloração mais intensa), coradas com carmim acético 1%, obtidas de anteras medianas de espigas em fase correta de coleta. Barra representa 40 µm. B: Grupo de espigas mais jovens em fase de coleta Zadoks 45 para extração das células de micrósporos, e em fase mais avançada para remoção dos ovários (seta).

micrósporos foi diluído e a suspensão foi cuidadosamente colocada sobre uma solução estéril de maltose (23%), para posterior centrifugação. As células presentes na banda de transição (Figura 3A) foram coletadas e diluídas em 1,0 mL de meio de extração NPB-99, para nova centrifugação. Do pellet final, foi retirada uma pequena alíquota desta solução (40 μ L) e levada ao hemocítmetro para estimar a concentração de células. Após a contagem, as células de micrósporos (Figura 3B) foram diluídas em meio semissólido NPB-99 acrescido de 10% de Ficoll (Ficoll PM-400, Sigma F-4375) e do inibidor de desacetilase de histonas Trichostatin A (TSA, Sigma T-8552) na concentração de 0,01 μ M. Com base na contagem celular, a concentração final da suspensão foi ajustada para $6-8 \times 10^4$ células/mL, sendo então distribuídas em placas estéreis multi-poços. Após a distribuição da suspensão celular, 10 ovários do mesmo genótipo foram removidos assepticamente de espigas em estágio mais avançado de desenvolvimento (Zadoks 48; Figura 2B) e adicionados em cada poço para co-cultivo com as células de micrósporos. As placas foram seladas com parafilme e incubadas no escuro a 28 °C por 30 – 45 dias.



Fotos: Sandra Scagliusi

Figura 3. Etapa do processo de extração de micrósporos. A: Células de micrósporos purificadas (seta), depositadas entre a solução de maltose 23% e o tampão de extração. Células mais velhas e restos de tecidos são os debris depositados ao fundo do tubo (seta amarela). B: Observação ao microscópio óptico de células de micrósporos purificadas e distribuídas em meio líquido NPB-99. Barra representa 40 μ m.

Indução e regeneração

As células purificadas foram observadas diretamente nas placas, usando um microscópio de luz invertida. A evolução do desenvolvimento foi avaliada diariamente, o que possibilitou observar e confirmar a origem unicelular de cada embrião formado (Figura 4), descartando a formação derivada de restos de tecidos somáticos da parede da antera. Após 21-27 dias de incubação, embriões $\geq 3,0$ mm foram transferidos para 20 mL de meio de regeneração (Jiang et al., 2017) em placas de Petri de 10 cm e mantidas em sala de crescimento com temperatura de 21 ± 2 °C,

com fotoperíodo de 16 horas/luz, e 80 μ mol/m²/s de intensidade luminosa. As plantas verdes originadas dos embriões foram transferidas assepticamente para 40 mL de meio de enraizamento (Eudes et al., 2003) em tubos de ensaio, e mantidas nas mesmas condições. Ao apresentar parte aérea e radicular suficientes, as plantas foram transplantadas para tubetes plásticos contendo mistura de substrato e vermiculita (1:1), sendo regadas semanalmente com solução nutritiva de Hoagland. Em fases mais avançadas de desenvolvimento, as plantas foram transferidas para vasos maiores (sete litros) e mantidas em ambientes controlados com as mesmas condições das plantas doadoras. O número de embriões, de plantas verdes e de plantas albinas foi registrado para cada cruzamento. O nível de ploidia das plantas (n ou 2n) foi inferido baseando-se na produção de sementes, observada apenas nas plantas 2n.

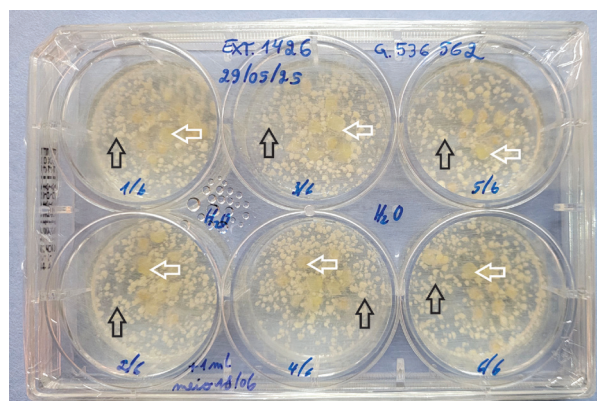


Foto: Sandra Scagliusi

Figura 4. Células cultivadas em placas, contendo inúmeros embriões (setas pretas verticais) de um genótipo responsivo ao processo da androgênese (536562 - ORS Feroz / PF 220180), após 26 dias de incubação a 28 °C. Os ovários, usados no processo de co-cultivo, aparecem como estruturas maiores e mais escuras (setas brancas horizontais).

Análise dos dados

Os dados referentes ao número de embriões, de plantas verdes e de plantas albinas por genótipo foram submetidos à análise estatística para avaliar a eficiência do protocolo otimizado. Foi realizada uma análise descritiva dos dados, na qual as médias de eficiência foram normalizadas e expressas com base em 100.000 células cultivadas, permitindo a comparação direta entre os diferentes eventos de extração. Para investigar a relação entre a densidade celular inicial e a eficiência final de regeneração (indução de embriões e conversão em plantas verdes), foi aplicado o Coeficiente de Correlação de Postos de Spearman - ρ (Miot, 2018; Bocianowski et al., 2024). Todas as análises foram realizadas considerando as variações de resposta entre os 37 genótipos avaliados no ano de 2025.

Resultados e discussão

Os resultados de regeneração apresentados na Tabela 2 demonstram uma ampla variação na resposta androgênica entre os 37 genótipos de trigo avaliados. A indução embrionária foi expressiva,

destacando-se o genótipo 536408 (TBIO Calibre / PF 220180), que produziu o maior volume absoluto de embriões (3.278), seguido pelo 536562 (ORS Feroz / PF 220180), produzindo 2.564 embriões. No entanto, ao normalizar os dados pela eficiência de regeneração por 100.000 células, o genótipo

Tabela 2. Dados obtidos no ano de 2025 (Região Sul) através da cultura de micrósporos purificados. Número de embriões (NE), de plantas verdes (PVs) e de plantas albinas (P. Alb). Os valores obtidos para regeneração de embriões (%RE), de plantas verdes (%RPV) e de regeneração de plantas albinas (%RPA) estão expressos em % com base em 100.000 células cultivadas.

Genótipos	Nº Embriões (NE)	Nº PVs	Nº P. Alb	[Concentr Células]	Div 100.000	Efic Regen (% RE)	Efic Regen (% RPV)	Efic Regen (% RPA)
536408	3278	196	171	5.635.000	56,35	58,17	3,48	3,03
536562	2564	80	340	4.875.000	48,75	52,59	1,64	6,97
537720	1838	122	247	2.740.000	27,40	67,08	4,45	9,01
536357	1569	15	284	2.770.000	27,70	56,64	0,54	10,25
536510	1554	43	259	6.875.000	68,75	22,60	0,63	3,77
536794	1322	18	144	3.816.000	38,16	34,64	0,47	3,77
510232/233	1279	153	91	1.088.000	10,88	117,56	14,06	8,36
536392	1267	53	19	2.920.000	29,20	43,39	1,82	0,65
536801	1007	13	91	2.282.000	22,82	44,13	0,57	3,99
510237/238	831	14	65	1.746.000	17,46	47,59	0,80	3,72
536432	711	17	36	2.025.000	20,25	35,11	0,84	1,78
536460	672	6	106	2.910.000	29,10	23,09	0,21	3,64
537614	649	4	51	2.202.000	22,02	29,47	0,18	2,32
510216/217	638	24	103	880.000	8,80	72,50	2,73	11,70
462219	624	3	1	2.469.000	24,69	25,27	0,12	0,04
536441	553	10	15	1.310.250	13,10	42,21	0,76	1,14
536431	537	16	13	4.155.000	41,55	12,92	0,39	0,31
537095	410	2	30	990.000	9,90	41,41	0,20	3,03
536520	405	10	44	2.700.000	27,00	15,00	0,37	1,63
462216	369	2	0	3.147.000	31,47	11,73	0,06	0,00
537037	355	7	9	888.750	8,89	39,94	0,79	1,01
536585	303	4	8	1.327.500	13,28	22,82	0,30	0,60
537634	265	7	19	862.500	8,63	30,72	0,81	2,20
462136/137	223	1	11	2.512.000	25,12	8,88	0,04	0,44
537055	214	5	6	600.000	6,00	35,67	0,83	1,00
537268	201	1	13	1.037.500	10,38	19,37	0,10	1,25
536390	176	2	11	1.480.000	14,80	11,89	0,14	0,74
536391	156	4	1	2.748.000	27,48	5,68	0,15	0,04
437949	142	6	4	1.900.000	19,00	7,47	0,32	0,21
537056	136	8	22	1.160.000	11,60	11,72	0,69	1,90
536595	108	0	17	889.000	8,89	12,15	0,00	1,91
510209/210	91	1	5	455.000	4,55	20,00	0,22	1,10
536493	48	1	2	540.000	5,40	8,89	0,19	0,37
537130	46	2	1	1.979.000	19,79	2,32	0,10	0,05
536483	43	1	0	1.365.000	13,65	3,15	0,07	0,00
537270	29	1	1	953.000	9,53	3,04	0,10	0,10
537148	17	2	0	1.001.250	10,01	1,70	0,20	0,00

510232/233 (BRS TR733 / FPS Regente) apresentou o desempenho mais robusto, com uma eficiência de 117,55 embriões, evidenciando uma competência embriogênica superior mesmo com menor concentração celular inicial.

Apesar da expressiva resposta androgênica da maioria dos genótipos avaliados, um gargalo persistente observado foi a baixa taxa de conversão de embriões em plantas verdes (PVs). Enquanto a produção de embriões atingiu números elevados, a eficiência de regeneração de PVs raramente ultrapassou 5% na maioria dos genótipos, com exceção notável de 510232/233 (14,06%), indicando a necessidade de otimização nas etapas posteriores à formação de embriões (Tabela 2).

A análise dos dados de 2025 revela uma produtividade de embriões que supera marcas históricas da literatura para cereais. Enquanto protocolos de referência para cevada (considerada espécie “modelo” para androgênese) citam cerca de 500 embriões por 4×10^4 micrósporos (Li; Devaux, 2003), genótipos como o 536408 e 536562 demonstraram um potencial de indução superior sob o efeito do TSA, atingindo patamares de eficiência produtiva raramente reportados para o trigo. Essa alta performance na fase de indução é um indicativo robusto de que os ajustes metodológicos, especificamente a sinergia entre o uso de TSA e a supressão de auxinas exógenas, foram eficazes em promover a reprogramação epigenética e a aquisição da competência embriogênica em uma ampla gama de germoplasmas. Contudo, a análise de correlação de Spearman ($P = 0,49$) sugere que a alta densidade celular e a massiva produção de embriões, embora representem um avanço técnico fundamental, não garantem linearmente a recuperação proporcional de plantas verdes. A discrepância entre a massa de embriões produzidos e a taxa de regeneração final (PVs) aponta para uma possível recalcitrância de maturação, evidenciando que os gargalos para a obtenção de plantas DHs plenamente funcionais provavelmente residem em etapas bioquímicas e fisiológicas posteriores à formação do embrião.

Uma característica bem marcante observada nas amostras de micrósporos purificados é o surgimento de células do tipo “estrela” (*star-like cells*). Estas são consideradas marcadores morfológicos da reprogramação celular ou da totipotência (Shariatpanahi et al., 2006; Sánchez-Díaz et al., 2013). Essa morfologia resulta de rearranjos no citoesqueleto que deslocam o núcleo para o centro da célula, sendo este circundado por fios citoplasmáticos radiantes (lembrando o formato estrela). Embora esse fenômeno seja comumente associado

ao primeiro sinal da indução embriogênica e/ou da reprogramação celular, os resultados do presente estudo indicam que sua presença deve ser interpretada com cautela. Apesar da literatura associar as *star-like cells* ao potencial embriogênico em cereais, foi observado que essa morfologia ocorre tanto em genótipos com alta competência para a indução embrionária, quanto naqueles com respostas marginais. Essa observação corrobora outros estudos que indicam que, embora a morfologia de estrela esteja associada à divisão celular, ela nem sempre é um marcador confiável para a embriogênese completa, podendo ocorrer inclusive em genótipos que não chegam a formar embriões (Maraschin et al., 2005; Daghma et al., 2012).

No germoplasma de trigo aqui testado, a presença de *star-like cells* foi observada em amostras de vários genótipos (Figura 5), inclusive em genótipo considerado altamente recalcitrante como Embrapa 27. Acredita-se que, apesar da sinalização ter sido iniciada (reprogramação celular), não há garantias de progressão para a formação de embriões maduros ou a regeneração efetiva de plantas verdes.

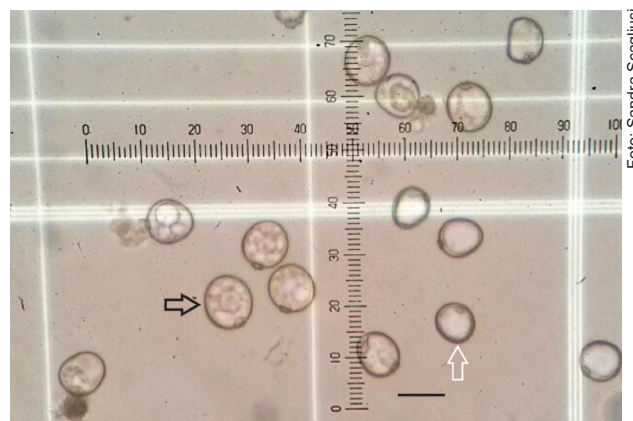


Foto: Sandra Scaglusi

Figura 5. Células de micrósporos purificadas em meio NPB-99, durante a contagem feita na Câmara de Neubauer. A imagem destaca a divergência morfológica após a indução da rota esporofítica: micrósporos com morfologia *star-like* (seta preta), com núcleo centralizado e fragmentação do citoplasma, indicando o início da reprogramação celular. Em contraste, observam-se micrósporos de menor diâmetro e com aspecto não embriogênico (seta branca), que permanecem na rota gametofítica. Barra representa 50 μ m.

Grandes avanços têm sido relatados buscando o aperfeiçoamento da produção de plantas DHs, via cultura de micrósporos em trigo, impulsionados pelo crescente interesse no método (Dubas et al., 2024; Perez-Piñar et al., 2024; Springer et al., 2025; Rawte et al., 2025). Desde o primeiro relato da técnica por Datta e Wenzel (1987), seguido pelo

estabelecimento do isolamento mecânico por Mejza et al. (1993), o protocolo sofreu modificações substanciais para aumentar sua eficiência. Nesse contexto de evolução do método, uma estratégia que merece destaque é o estabelecimento do co-cultivo com ovários imaturos (Hul; Kasha, 1997; Broughton, 2008; Castillo et al., 2015). A inclusão dessas estruturas maternas no meio de indução contendo as células purificadas (Figura 4) mostrou-se decisiva para a resposta embriogênica, atuando como um sistema de suporte biológico (*nurse culture*). Os ovários liberam no meio de cultura fatores condicionantes essenciais, como proteínas arabinogalactanas (AGPs) que sustentam a viabilidade dos micrósporos e sinalizam o início das divisões celulares, superando limitações que meios puramente sintéticos muitas vezes não conseguem suprir. Resultados anteriormente obtidos (Scagliusi, 2014) indicaram que o desenvolvimento celular na ausência do co-cultivo com ovários resultou em baixa ou nula eficiência de regeneração, reforçando a dependência crítica dessas estruturas para a embriogênese in vitro.

Por ser uma espécie hexaploide, com longa história de evolução e cultivo (Charmet, 2011; Venske et al., 2019; Gohar et al., 2022) e ampla diversidade genética (Balfourier et al., 2019; Mellers et al., 2020; Tehseen et al., 2022), o trigo demanda protocolos mais abrangentes, que possam ser amplamente aplicáveis a diferentes germoplasmas. Considerando que o genótipo é um fator intrínseco aos cruzamentos estabelecidos pelos programas de melhoramento e, portanto, não passível de manipulação direta, as melhorias implementadas neste estudo, concentraram-se na otimização de etapas críticas do protocolo, especialmente na composição do meio de indução. A adição de Trichostatin A (TSA) resultou em uma alteração marcante no padrão de resposta embriogênica entre os genótipos avaliados, refletindo-se na regeneração de embriões homozigóticos em todos os genótipos testados (Tabela 2). Esse efeito pode estar associado à ação epigenética do TSA (Trichostatin A), como inibidor das desacetilases de histonas (HDAC), promovendo maior acessibilidade da cromatina e reativando as vias transcricionais relacionadas à aquisição da competência embriogênica dos micrósporos, anteriormente silenciadas (Li et al., 2014; Bie et al., 2020; Castillo et al., 2020). O TSA atua bloqueando a função das Histonas Desacetilases (HDACs), que, em condições normais, removem os grupos "Acetil" das caudas das histonas. A remoção desses grupos acetil (desacetilação) intensifica a interação entre o DNA e as histonas, resultando em uma cromatina mais condensada e inacessível às enzimas

de transcrição, levando à repressão da expressão gênica. Ao inibir esse processo, o TSA mantém ou eleva os níveis de acetilação das histonas, relaxando a estrutura da cromatina, permitindo que genes cruciais para a reprogramação celular sejam acessados, dando início à embriogênese esporofítica, superando o silenciamento epigenético que normalmente manteria o micrósporo na rota gametofítica (Hollender; Liu, 2008; Us-Camas et al., 2014; Martínez et al., 2021). Ensaios conduzidos na ausência de TSA (dados não apresentados) evidenciaram diferenças marcantes na baixa eficiência da reprogramação celular e na regeneração de plantas DHs, reforçando o papel determinante desse modulador epigenético no sucesso da embriogênese via micrósporos em trigo. Além da adição de TSA, a remoção das auxinas do meio de indução, como o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e o PAA (ácido fenilacético), foi também considerada decisiva para a otimização do protocolo, uma vez que esses reguladores de crescimento apresentam efeitos negativos quando combinados com o inibidor de desacetilases de histonas (TSA). A retirada das auxinas do meio de indução garante que o sinal químico para desdiferenciar e reprogramar as células de micrósporos seja mais consistente, evitando a sobreposição de estímulos que podem interferir negativamente na coordenação dos processos celulares e resultar em regeneração sub-ótima ou com falhas no desenvolvimento embrionário. Esses efeitos sugerem a existência de um mecanismo de ação interligado e potencialmente antagônico entre auxinas e o inibidor de histona desacetilase TSA (Wójcikowska et al., 2018, 2024). Uma possível explicação para essa interação é que o próprio TSA pode estimular a biosíntese endógena de auxinas nas células vegetais, tornando a adição de auxinas exógenas desnecessária, redundante ou até mesmo prejudicial para o correto desenvolvimento embrionário (Wójcikowska et al., 2018).

A conversão dos embriões haploides em plantas é amplamente reconhecida como uma etapa crítica na produção de duplo-haploides em cereais (Dziurka et al., 2022), o que justificaria um foco ainda maior no aprimoramento desta fase. A baixa conversão dos embriões em plantas pode estar associada ainda à complexa natureza do processo, que envolve uma interação dinâmica de eventos bioquímicos, fisiológicos e epigenéticos (Valero-Rubira et al., 2024), os quais podem limitar a progressão do desenvolvimento embrionário e a formação de plantas verdes. Como consequência, genótipos altamente responsivos na fase inicial da indução embrionária,

podem apresentar restrições significativas nas etapas subsequentes.

Além dos mecanismos endógenos (bioquímicos/epigenéticos) previamente abordados, a eficiência da conversão embrionária depende também de fatores extrínsecos e operacionais do sistema experimental, possivelmente controláveis. Tais fatores assumem um papel importante na eficiência da conversão embrionária em plantas verdes, e incluem: as condições ambientais de crescimento das plantas doadoras, os métodos de pré-tratamento das espigas e principalmente, a composição dos meios de indução e regeneração (Zheng, 2003; Eliby et al., 2022). No entanto, é extremamente desafiador identificar o ponto exato de falha que resulta no baixo número de plantas verdes recuperadas, mesmo em genótipos que produzam expressiva resposta embriogênica. Os mecanismos biológicos envolvidos nesse processo, abrangem etapas interconectadas, desde a aquisição da totipotência pelo micrósporo (reprogramação celular), passando por profundas mudanças fisiológicas, dependentes da modulação de vias hormonais (auxina, citocinina), e de **dinâmicas epigenéticas** (acetilação de histonas, influenciada por TSA), até a conformação de divisões celulares organizadas que culminam na formação do embrião. Dada essa cascata de eventos, torna-se difícil pontuar em qual momento a intervenção seletiva deveria ser realizada para aumentar o número de plantas verdes. Uma probabilidade levantada para essa baixa eficiência de conversão é a imaturidade dos embriões haploides no momento da transferência para o meio de regeneração. Esse mecanismo de falha, que impede a conversão em plantas verdes, foi sugerido em estudos com embriões haploides de aveia (Dziurka et al., 2022) e pode representar uma barreira equivalente no processo de regeneração do trigo.

Um outro fator limitante e decisivo no processo de geração de plantas DHs, via androgênese, é a elevada incidência de plantas albinas (Kumari et al., 2009; Zur et al., 2021). Conforme observado na Tabela 2, o número de plantas albinas formadas foi, em média, quatro vezes superior ao de plantas verdes, manifestando-se de forma acentuada em genótipos como o 536357 (TBIO Ponteiro / PF 220180). Nesse genótipo, a eficiência de plantas albinas chegou a 10,25%, valor quase vinte vezes superior à taxa de plantas verdes (0,54%), o que corrobora a literatura sobre a complexidade da diferenciação plastidial em cereais sob estresse *in vitro*. Este fenômeno está diretamente ligado a falhas no desenvolvimento de cloroplastos funcionais, frequentemente associadas à incompatibilidade entre o plastoma e o

genoma nuclear ou a deleções irreversíveis no DNA plastidial durante a reprogramação celular (Kumari et al., 2009; Canonge et al., 2021). O sucesso da conversão depende de uma transição coordenada da atividade de polimerases de RNA, sem a qual a regeneração de plântulas verdes é inviabilizada. Assim, evidencia-se que a principal barreira remanescente no protocolo — após a superação da recalcitrância inicial pelo uso de TSA — é de natureza predominantemente fisiológica e associada à biogênese do cloroplasto. A eficiência da conversão dos embriões em plantas verdes, ainda depende, em algum nível, de fatores adicionais, possivelmente associados à diferenciação plastidial. A sinergia entre a supressão de auxinas e a modulação epigenética via TSA, embora eficaz na indução embrionária, não foi suficiente para eliminar completamente as limitações para a obtenção de plantas DHs plenamente funcionais. Tais evidências sugerem que a discrepância entre a alta indução embrionária e a baixa regeneração final não decorre de limitações da técnica de purificação ou do processo de extração, mas provavelmente de restrições biológicas intrínsecas ao desenvolvimento do plastídio sob condições de estresse relacionados à androgênese.

Um outro mecanismo que poderia estar dificultando a conversão de embriões em plantas foi recentemente elucidado no trigo. O manitol, usado como estresse osmótico para induzir a embriogênese de micrósporos, estimula um intenso acúmulo de auxinas endógenas nas células. Esse excesso de auxinas rompe a homeostase hormonal e pode levar a perturbações significativas nas etapas posteriores do desenvolvimento embriogênico, como a maturação e a diferenciação em plantas (Springer et al., 2025). Considerando que o protocolo aqui adotado inclui manitol no tampão de extração, é plausível inferir que o desequilíbrio hormonal por ele induzido, ocorra já nas primeiras horas de cultivo. Essa desregulação precoce pode comprometer a qualidade e a maturação dos embriões formados, tornando-os menos aptos a prosseguir para a fase de regeneração, o que explicaria a massiva produção de embriões seguida pela baixa conversão em plantas verdes.

Aliado ao ajuste fisiológico e hormonal, é importante destacar que, o expressivo número de embriões observado em cada placa de Petri reflete, não apenas as melhorias do protocolo, mas também as vantagens do método de haploidização escolhido — a cultura de micrósporos isolados (via androgênese). Isso se deve ao fato de que, em cada placa, são cultivadas pelo menos 200.000 células de micrósporos, das quais uma fração significativa

apresenta competência para desviar sua rota de desenvolvimento original, gametofítica, e assumir a rota alternativa, esporofítica, culminando na embriogênese e na formação de embriões haploides. Esses resultados podem ser observados na Figura 4 e na Tabela 2, que ilustram a elevada capacidade embriogênica do genótipo 536562 (ORS Feroz / PF 220180). Outros genótipos também apresentaram alta formação de embriões: 536408 (TBIO Calibre / PF 220180), 536510 (ORS Guardiã / PF 220180), 536357 (TBIO Ponteiro / PF 220180), 536794 (PF 220069 / BRS TR209), 510232/233 (BRS TR733 / FPS Regente), 536801 (PF 220069 / BRS 179) e 537720 (BRS 374 / TBIO Audaz // TBIO Ponteiro /3/ BRS TR733 /4/ TBIO Trunfo /5/ BRS 179). É relevante notar que, os quatro genótipos com maior produção de embriões, compartilham o mesmo parental masculino (PF 220180). Essa observação sugere que o background genético deste progenitor pode conter alelos favoráveis à androgênese, exercendo uma influência positiva na competência embriogênica das progêneses resultantes. Tal achado, se confirmado em outros estudos, reforça a importância da seleção estratégica de parentais doadores para aumentar a eficiência de protocolos de produção de duplo-haploides em trigo.

Apesar das inerentes dificuldades na conversão de embriões em plantas verdes e da complexidade biológica que sustenta a discrepância entre a alta indução (formação de embriões) e a baixa regeneração final, o processo de haploidização permanece relevante. Embora as limitações descritas ainda representem gargalos importantes, o método de produção de plantas DHs via micrósporos isolados em trigo apresenta uma vantagem competitiva determinante: a elevada taxa de duplicação cromossômica espontânea. No presente estudo, observou-se que aproximadamente 60% das plantas regeneradas apresentaram-se naturalmente diploides ($2n$), valores similares (Liu et al., 2002; Barnabás, 2003) ou até superiores observados em outros estudos (Oleszczuk et al., 2025). Essa duplicação cromossômica espontânea dispensa a necessidade de intervenção com agentes poliploidizantes, como a colchicina, simplificando significativamente o fluxo de produção de linhagens homozigotas. Este fenômeno, embora ainda não totalmente compreendido em suas bases moleculares, sugere que o estresse de indução e as condições de cultivo *in vitro* podem favorecer mecanismos de endoreduplicação ou fusão nuclear precoce durante as primeiras divisões do micrósporo (Kasha et al., 2001; Griggs; Zheng, 2016). A ocorrência dessa duplicação natural simplifica significativamente o fluxo de trabalho em

programas de melhoramento, reduzindo custos operacionais, riscos de toxicidade e o tempo de manejo em casa de vegetação. A alta eficiência na obtenção de plantas diploides férteis compensa, em grande medida, as perdas decorrentes do albinismo, consolidando o protocolo de micrósporos isolados como uma estratégia robusta para a rápida geração de linhagens homozigotas. Esta viabilidade técnica é potencializada pelo elevado valor agronômico dos genótipos parentais utilizados, que possuem backgrounds genéticos superiores para resistência a doenças e produtividade. Assim, a aplicação desta ferramenta justifica-se mesmo diante de taxas de conversão moderadas, uma vez que acelera a fixação de linhagens de elite e maximiza o potencial genético do programa de melhoramento. Além dos impactos práticos, este trabalho fornece informações fundamentais para o contínuo refinamento dos protocolos de androgênese em trigo.

Conclusões

- 1) O uso de TSA e a remoção de auxinas exógenas consolidam uma estratégia robusta para superar a recalcitrância e o silenciamento epigenético e induzir a embriogênese em diversos germoplasmas de trigo.
- 2) O principal gargalo para a eficiência do sistema reside na conversão de embriões em plantas verdes, limitada pela elevada incidência de albinismo e por restrições na maturação embrionária, fatores de natureza predominantemente fisiológica e associados à biogênese do cloroplasto. O foco de pesquisas futuras deve ser o aprimoramento dos meios de regeneração para mitigar o albinismo e aumentar a taxa de conversão de embriões em plantas verdes.
- 3) Não se observa correlação significativa entre a concentração celular inicial e a eficiência final de regeneração, indicando que a resposta ao protocolo é governada majoritariamente pela interação genótipo-ambiente *in vitro* e pela eficácia da reprogramação epigenética.
- 4) A baixa produção de plantas verdes observada para alguns genótipos pode ser superada pelo aumento do número de extrações de micrósporos, já que os dados são normalizados por 100.000 células cultivadas. Dessa forma, mesmo genótipos menos responsivos tornam-se viáveis tanto para o desenvolvimento de populações voltadas para estudo de características-alvo complexas, quanto para a obtenção de linhagens DHs com alto valor agronômico (resistência a

doenças e produtividade), permitindo ganhos genéticos em programas de melhoramento.

Agradecimentos

Às Técnicas do Laboratório de Biotecnologia, Lucimere de Fátima Morelo e Tânia Maria Bueno, pela execução dos experimentos. À Embrapa, pelo financiamento do projeto “Melhoramento genético de trigo para o Brasil - 2023 a 2026” do Sistema Embrapa de Gestão (SEG).

Referências

- ARABZAI, M. G.; HUANG, D.; MOHAMMADI, N. K.; GAO, J.; WANG, X.; ZHENG, P.; QIN, Y.; WANG, L. Techniques and advantages of microspore culture for crop improvement. **Plant Growth Regulation**, v. 105, n. 4, p. 903-918, Aug. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-025-01312-8>.
- AZIZ, M. A.; MASMOUDI, K. Molecular breakthroughs in modern plant breeding, techniques. **Horticultural Plant Journal**, v. 11, n. 1, p. 15-41, Jan. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2024.01.004>.
- BACHA, S. A.; KIRAN, S.; CUI, F. -J.; ELBOUGHDIRI, N.; ZUBAIR, A.; SUN, W. -J. The potential of advanced crop breeding technologies for sustainable food security. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 309, art. 143025, May 2025. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2025.143025](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143025).
- BALFOURIER, F.; BOUCHET, S.; ROBERT, S.; OLIVEIRA, R. de; RIMBERT, H.; KITT, J.; CHOLET, F.; APPELS, R.; FEUILLET, C.; KELLER, B.; PRAUD, S.; BAUMANN, U.; BUDAK, H.; ROGERS, J.; EVERSOLE, K.; ALAUX, M.; BEJAR, B.; LAFARGE, S.; LAGENDIJK, E.; DERORY, J.; LE GOUIS, J.; PAUX, E. Worldwide phylogeography and history of wheat genetic diversity. **Science Advances**, v. 5, n. 5, art. eaav0536, May 2019. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav0536>.
- BARNABÁS, B. Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). In: MALUSZYNSKI M.; KASHA, K. J.; FORSTER, B. P.; SZAREJKO, I. (ed.). **Doubled haploid production in crop plants**. Dordrecht: Springer, 2003. p. 65-70.
- BIE, X. M.; DONG, L.; LI, X. H.; WANG, H.; GAO, X. Q.; LI, X. G. Trichostatin A and sodium butyrate promotes plant regeneration in common wheat. **Plant Signal Behaviour**, v. 15, n. 12, art. 1820681, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1820681>.
- BOCIANOWSKI, J.; WROŃSKA-PILAREK, D.; KRYSZTOFIK-KANIEWSKA, A.; MATUSIAK, K.; WIATROWSKA, B. Comparison of Pearson's and Spearman's correlation coefficients for selected traits of *Pinus sylvestris* L. **Biometrical Letters**, v. 61, n. 2, p. 115-135, 2024. DOI: [10.2478/bile-2024-0008](https://doi.org/10.2478/bile-2024-0008).
- 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, Nov. 2008.
- CANONGE, J.; ROBY, C.; HAMON, C.; POTIN, P.; PFANNSCHMIDT, T.; PHILIPPOT, M. Occurrence of albinism during wheat androgenesis is correlated with repression of the key genes required for proper chloroplast biogenesis. **Planta**, v. 254, art. 123, Nov. 2021.
- 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, art. 402, June 2015. DOI: [10.3389/fpls.2015.00402](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00402).
- CASTILLO, A. M.; VALERO-RUBIRA, I.; BURRELL, M. A.; ALLUÉ, S.; COSTAR, M. A. VALLÉS, M. P. Trichostatin A affects developmental reprogramming of bread wheat microspores towards an embryogenic route. **Plants**, v. 9, n. 11, art. 1442, Nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9111442>.
- CERAN, M.; MILADINOVIC, D.; DORDEVIC, V.; TRKULJA, D.; RADANOVIC, A.; GLOCOVAC, S.; KONDIC-SPIKA, A. Genomics-assisted speed breeding for crop improvement: present and future. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 8, art. 1383302, Apr. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1383302>.
- CHARMET, G. Wheat domestication: lessons for the future. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, n. 3, p. 212-220, Mar. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.013>.
- DAGHMA, D. S.; KUMLEHN, J.; HENSEL, G.; RUTTEN, T.; MELZER, M. Time-lapse imaging of the initiation of pollen embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 16, p. 6017-6021, Oct. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/ers254>.
- DATTA, S. K.; WENZEL, G. Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. **Plant Science**, v. 48, n. 1, p. 49-54, 1987.
- DERMAIL, A.; CHANKAEW, S.; LERTRAT, K.; LÜBBERSTEDT, T.; SURIHARN, K. Selection gain of maize haploid inducers for the Tropical Savanna environments. **Plants**, v. 10, n. 12, art. 2812, Dec. 2021. DOI: [10.3390/plants10122812](https://doi.org/10.3390/plants10122812).
- DUBAS, E.; KRZEWSKA, M.; SURÓWKA, E.; KOPEĆ, P.; SPRNGER, A.; JANOWIAK, F.; WEIGT, D.; MIKOŁAJCZYK, S. K.; TELK, A.; ŻUR, I. New prospects

for improving microspore embryogenesis induction in highly recalcitrant winter wheat lines. **Plants**, v. 13, n. 3, art. 363, Feb. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13030363>.

DZIURKA, K.; DZIURKA, M.; MUSZYNSKA, E.; CZYCZYLO-MYSZA, I.; WARCHOL, M.; JUZON, K.; LASKOS, K.; SKRZYPEK, E. Anatomical and hormonal factors determining the development of haploid and zygotic embryos of oat (*Avena sativa* L.). **Scientific Reports**, v. 12, art. 548, Jan. 2022.

ELIBY, S.; BEKKUZHINA, S.; KISHCHENKO, O.; ISKAKOVA, G.; KYLYSHBAYEVA, G.; JATAYEV, S.; SOOLE, K.; LANGRIDGE, P.; BORISJUK, N.; SHAVRUKOV, Y. Developments and prospects for doubled haploid wheat. **Biotechnology Advances**, v. 60, art. 108007, Nov. 2022.

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, n. 2, p. 147-157, May 2003. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1022800512708>.

GOHAR, S.; SAJJAD, M.; ZULFIQAR, S.; LIU, J.; WU, J.; RAHMAN, M.-ur. Domestication of newly evolved hexaploid wheat: A journey of wild grass to cultivated wheat. **Frontiers in Genetics**, v. 13, art. 1022931, Oct. 2022. DOI: [10.3389/fgene.2022.1022931](https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1022931).

GRIGGS, R.; ZHENG, M. Y. Nuclear fusion during early stage of microspore embryogenesis indicates chromosome doubling in wheat (*Triticum aestivum*). **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, n. 3, p. 489-499, Mar. 2016.

GUAN, X.; PENG, J.; FU, D. Technology for the production of wheat doubled haploid via maize pollen induction - updated review. **Agronomy**, v. 14, n. 2, art. 375, Feb. 2024. DOI: [10.3390/agronomy14020375](https://doi.org/10.3390/agronomy14020375).

HOLLENDER, C.; LIU, Z. Histone deacetylase genes in *Arabidopsis* development. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 7, p. 875-885, July 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00704.x>.

HUL, T.; KASHA, K. J. Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. **Plant Cell Reports**, v. 16, n. 8, p. 520-525, May 1997. DOI: [10.1007/BF01142316](https://doi.org/10.1007/BF01142316).

HUMPHREYS, D. G.; KNOX, R. E. Doubled haploid breeding in cereals. In: AL-KHAYRI, J.; JAIN, S.; JOHNSON, D. (ed.). **Advances in plant breeding strategies: breeding, biotechnology and molecular tools**. Cham: Springer, 2015. p. 241-290. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-22521-0_9.

JÄHNE, F.; HAHN, V.; WÜRSCHUM, T.; LEISER, W. L. Speed breeding short-day crops by LED-controlled light schemes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 133, n. 8, p. 2335-2342, Aug. 2020. DOI: [10.1007/s00122-020-03601-4](https://doi.org/10.1007/s00122-020-03601-4).

JIANG, F.; RYABOVA, D.; DIEDHIOU, J.; HUCL, P.; RANDHAWA, H.; MARILLIA, E. -F.; FOROUD, N. A.; EUDES, F.; KATHIRIA, P. Trichostatin A increases embryo and green plant regeneration in wheat. **Plant Cell Reports**, v. 36, n. 11, p. 1701-1706, Nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2183-3>.

KASHA, K. J.; HU, T. C.; ORO, R.; SIMION, E.; SHIM, Y. M. Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 359, p. 1227-1238, June 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 Sciences**, v. 28, n. 6, p. 393-409, 2009.

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, Mar. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00424-7).

LI, H.; SORIANO, M.; CORDEWENER, J.; MUÑO, J. M.; RIKSEN, T.; FUKUOKA, H.; ANGENENT, G. C.; BOUTILIER, K. The histone deacetylase inhibitor Trichostatin A promotes totipotency in the male gametophyte. **The Plant Cell**, v. 26, n. 1, p. 195-209, Jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116491>.

LIU, W.; ZHENG, M. Y.; POLLE, E. A.; 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, May/June 2002.

MARASCHIN, S. F.; PRIESTER, W. de; 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, July 2005. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eri190>.

MARTÍNEZ, Ó.; ARJONES, V.; GONZÁLEZ, M. V.; REY, M. Histone deacetylase inhibitors increase the embryogenic potential and alter the expression of embryogenesis-related and HDAC-encoding genes in grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Mencía). **Plants**, v. 10, n. 6, art. 1164, June 2021.

MEJZA, S. J.; MORGANT, V.; DIBONA, D. E.; WONG, J. R. Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 3,

p. 149-153, Jan. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00239096>.

MELLERS, G.; GONZALEZ AGUILERA, J.; BIRD, N.; BONATO, A. L. V.; BONOW S.; CAIERÃO, E.; CONSOLI, L.; SANTANA, F. M.; SIMMONDS, J.; STEED, A.; MONTAN TORRES, G. A.; UAUY, C.; WRIGHT, T.; SCHEEREN, P. L.; NICHOLSON, P.; COCKRAM, J. Genetic characterization of a wheat association mapping panel relevant to Brazilian breeding using a high-density single nucleotide polymorphism array. **G3, Genes, Genomes, Genetics**, v. 10, n. 7, p. 2229-2239, July 2020. DOI: <https://doi.org/10.1534/g3.120.401234>.

MIOT, H. A. Análise de correlação em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 17, n. 4, p. 275-279, out./dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1677-5449.174118>.

OLESZCZUK, S.; PODSKARBI, M.; MICHALSKI, K. First regeneration of doubled haploids via anther culture in *Triticum timopheevii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 163, art. 7, Sept. 2025.

PASPUREDDY, S. L.; SASIREKHAMANI, M.; SNEHA, P. I.; DEEPANSHU; SHARMA, A.; HARSHAVARDHAN, S. S.; CHANDRAVANSI, R.; SAHU, A. Advances in haploid and doubled haploid technology for accelerating breeding cycles in crop improvement. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, v. 26, n. 7-8, p. 61-77, 2025. DOI: [10.56557/pcbmb/2025/v26i7-89369](https://doi.org/10.56557/pcbmb/2025/v26i7-89369).

PEREZ-PIÑAR, T.; HARTMANN, A.; BÖSSOW, S.; GNAD, H.; MOCK, H. -P. Metabolic changes during wheat microspore embryogenesis induction using the highly responsive cultivar Svilen. **Journal of Plant Physiology**, v. 294, art. 154193, Mar. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2024.154193>.

RAWTE, S.; DIWAN, G.; PENNA, S.; JHA, Z. Success stories of doubled-haploids. In: JHA, Z.; VERULKAR, S. B., PENNA, S. (ed.). **Doubled haploids: technological advances and role in crop improvement**. Singapore: Springer, 2025. p. 197-213. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-96-2339-6_6.

SÁNCHEZ-DÍAZ, R. A.; CASTILLO, A. M.; VALLÉS, M. P. Microspore embryogenesis in wheat: new marker genes for early, middle and late stages of embryo development. **Plant Reproduction**, v. 26, n. 3, p. 287-296, Sept. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00497-013-0225-8>.

SCAGLIUSI, S. M. 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. 887-894, 2014.

SHARIATPANAHI, M. E.; BAL, U.; HEBERLE-BORS, E.; TOURAIEV, A. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis.

Physiologia Plantarum, v. 127, n. 4, p. 519-534, Aug. 2006.

SHENG, H.; GAO, P.; YANG, C.; QUILICHINI, T. D.; KOCHIAN, L. V.; DATLA, R.; XIANG, D. Advances in genome editing through haploid induction systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 10, art. 4779, May 2025. DOI: [10.3390/ijms26104779](https://doi.org/10.3390/ijms26104779).

SPRINGER, A.; KRZEWSKA, M.; DUBAS, E.; KOPEĆ, P.; PLAČKOVÁ, L.; DOLEŽAL, K.; WEIGT, D.; ŽUR, I. Induction of microspore embryogenesis in bread wheat by mannitol pre-treatment is associated with the disruption of endogenous hormone balance and substantial accumulation of auxins. **BMC Plant Biology**, v. 25, n. 1, art. 370, Mar. 2025. DOI: [10.1186/s12870-025-06389-x](https://doi.org/10.1186/s12870-025-06389-x).

TADESSE, W.; SANCHEZ-GARCIA, M.; ASSEFA, S. G.; AMRI, A.; BISHAW, Z.; OGBONNAYA, F. C.; BAUM, M. Genetic gains in wheat breeding and its role in feeding the world. **Crop Breeding, Genetics and Genomics**, v. 1, n. 1, art. 190005, July 2019. DOI: <https://doi.org/10.20900/cbagg20190005>.

TEHSEEN, M. M.; TONK, F. A.; TOSUN, M.; ISTIPLILER, D.; AMRI, A.; SANSALONI, C. P.; KURTULUS, E.; MUBARIK, M. S.; NAZARI, K. Exploring the genetic diversity and population structure of wheat landrace population conserved at ICARDA Genebank. **Frontiers in Genetics**, v. 13, art. 900572, June 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.900572>.

US-CAMAS, R.; RIVERA-SOLÍS, G.; DUARTE-AKÉ, F.; DE-LA-PEÑA, C. In Vitro culture: an epigenetic challenge for plants. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 118, p. 187-201, Aug. 2014.

VALERO-RUBIRA, I.; VALLÉS, M. P.; ECHÁVARRI, B.; FUSTERO, P.; COSTAR, M. A.; CASTILLO, A. M. New epigenetic modifier inhibitors enhance microspore embryogenesis in bread wheat. **Plants**, v. 13, n. 6, art. 772, Mar. 2024.

VENSKE, E.; SANTOS, R. S. dos; BUSANELLO, C.; GUSTAFSON, P.; OLIVEIRA, A. C. de. Bread wheat: a role model for plant domestication and breeding. **Hereditas**, v. 156, n. 1, art. 16, Dec. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41065-019-0093-9>.

WANG, H. M.; ENNS, J. L.; NELSON, K. L.; BROST, J. M.; ORR, T. D.; FERRIE, A. M. Improving the efficiency of wheat microspore culture methodology: evaluation of pretreatments, gradients, and epigenetic chemicals. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 139, n. 3, p. 589-599, Dec. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01704-5>.

WEYEN, J. Applications of doubled haploids in plant breeding and applied research. In: SEGUI-SIMARRO, J. M. (ed.). **Doubled haploid technology**.

New York: Humana, 2021. p. 23-39. (Methods in molecular biology, 2287). DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1315-3_2.

WÓJCIKOWSKA, B.; BOTOR, M.; MORONCZYK, J.; WÓJCIK, A. M.; NODZYNSKI, T.; KARCZ, J.; GAJ, M. D. Trichostatin A triggers an embryogenic transition in *Arabidopsis* explants via an auxin-related pathway. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, art. 1353, Sept. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01353>.

WÓJCIKOWSKA, B.; CHWIAŁKOWSKA, K.; NOWAK, K.; CITERNE, S.; MORONCZYK, J.; WÓJCIK, A. M.; KIWIOR-WESOŁOWSKA, A.; FRANCIKOWSKI, J.; KWASNIEWSKI, M.; GAJ, M. D. Transcriptomic profiling reveals histone acetylation-regulated genes involved in somatic embryogenesis in *A. thaliana*. **BMC Genomics**, v. 25, art. 788, Aug. 2024.

ZHANG, N.; QI, X.; WU, L.; WANG, Z.; MA, H.; ZHU, X.; LIU, J.; NIU, W.; GUO, S. Accelerating wheat breeding by haploid induction. **The Crop Journal**, v. 13, n. 5, p. 1363-1371, Oct. 2025.

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

ZUR, I.; GAJECKA, M.; DUBAS, E.; KRZEWSKA, M.; SZAREJKO, I. Albino plant formation in androgenic cultures: an old problem and new facts. In: SEGUI-SIMARRO, J. M. (ed.). **Doubled haploid technology**. New York: Springer, 2021. v. 2, p. 3-23. (Methods in molecular biology, 2288). DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1335-1_1.