



Contemporânea

Contemporary Journal

Vol. 5 Nº. 11: p. 01-21, 2025

ISSN: 2447-0961

Artigo

DESENVOLVIMENTO DE PROEMBRIÓIDES A PARTIR DO CULTIVO IN VITRO DE ANTERAS DE TRIGO E DE CEVADA

DEVELOPMENT OF PRO-EMBRYOIDS FROM IN VITRO CULTURE OF WHEAT AND BARLEY ANTHERS

DESARROLLO DE PROEMBRIONES A PARTIR DEL CULTIVO IN VITRO DE ANTERAS DE TRIGO Y CEBADA

DOI: 10.56083/RCV5N11-076

Receipt of originals: 10/14/2025

Acceptance for publication: 11/9/2025

Sandra Patussi Brammer

Doutora em Genética e Biologia Molecular

Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Trigo

Endereço: Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: sandra.brammer@embrapa.br

Liane Balvedi Poersch Bortolon

Doutora em Genética e Biologia Molecular

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Endereço: Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: lianebpoersch@yahoo.com.br

RESUMO: A cultura de anteras é uma técnica usada como apoio ao melhoramento genético e o sucesso depende da coleta e estágio correto das espigas das plantas doadoras para o pleno desenvolvimento *in vitro* dos micrósporos até a obtenção de novas plantas. O objetivo do estudo foi o de verificar a capacidade androgenética do material analisado, determinando também a eficácia do marcador morfológico, no momento da coleta da espiga, e sua relação com a produção de proembrióides. O experimento foi realizado na Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS, em casa de vegetação e no Laboratório de Biotecnologia. Foram coletadas espigas de treze genótipos de trigo e oito de cevada, de plantas mantidas em condições controladas e com base na morfologia, observando-se a distância do último nó à folha bandeira. No laboratório, as espigas passaram por pré-tratamento a frio e escuro durante 20 dias e após foram plaqueadas em placas de Petri com meio de



cultura FHGA. Ao 15º pós-plaqueamento foram resgatadas anteras e observada a frequência de proembrióides. Para cada amostra foi feita uma lâmina citológica pela técnica de "Squash" e corante carmim acético 1%. As células foram analisadas em microscópio ótico, visando à observação da presença de micrósporos uninucleados e à formação de proembrióides. Para os genótipos de trigo, o marcador morfológico foi mais eficaz em comparação à cevada. Entretanto, a produção de proembrióides ocorreu somente em cevada (em todos os genótipos), possivelmente pelo fato do trigo necessitar de maiores ajustes no meio de cultura usado. Ao final, foi observado que os genótipos responderam diferentemente e que a estratégia do uso de marcadores morfológicos no momento da coleta pode contribuir no processo de escolha de genótipos responsivos ao cultivo *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, androgênese, citogenética, melhoramento genético.

ABSTRACT: Anther culture is a technique used to support plant breeding, and its success depends on the proper collection and developmental stage of donor plant spikes to ensure full in vitro development of microspores until the regeneration of new plants. This study aimed to assess the androgenic potential of the analyzed material by evaluating the effectiveness of a morphological marker at the time of collection and its relation to pro-embryoid production. The experiment was conducted at Embrapa Wheat – Passo Fundo/RS, in a greenhouse and in the Biotechnology Laboratory. Spikes from thirteen wheat genotypes and eight barley genotypes were collected from plants maintained under controlled conditions, based on morphology, specifically the distance from the last node to the flag leaf. In the laboratory, the spikes underwent cold and dark pre-treatment for 20 days, after which they were plated in Petri dishes containing FHGA culture medium. On the 15th day after plating, anthers were retrieved, and the frequency of pro-embryoid formation was recorded. For each sample, a cytological slide was prepared using the squash technique and 1% acetic carmine stain. The cells were analyzed under a light microscope to observe the presence of uninucleate microspores and pro-embryoid formation. For the wheat genotypes, the morphological marker was more effective compared to barley. However, pro-embryoid production was observed only in barley (in all genotypes), possibly due to wheat requiring further adjustments to the culture medium used. In conclusion, the genotypes responded differently, and the strategy of using morphological markers at the time of collection may contribute to identifying genotypes that are responsive to in vitro culture.

KEYWORDS: *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, androgenesis, cytogenetics, plant breeding.



RESUMEN: La cultura de anteras es una técnica utilizada como apoyo al mejoramiento genético, y su éxito depende de la recolección y del estadio adecuado de las espigas de las plantas donantes para el pleno desarrollo in vitro de los microsporas hasta la obtención de nuevas plantas. El objetivo del estudio fue verificar la capacidad androgenética del material analizado, determinando la eficacia del marcador morfológico en el momento de la recolección y su relación con la producción de proembriodes. El experimento se realizó en Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS, en invernadero y en el Laboratorio de Biotecnología. Se recolectaron espigas de trece genotipos de trigo y ocho de cebada, de plantas mantenidas en condiciones controladas y con base en la morfología, observando la distancia del último nudo a la hoja bandera. En el laboratorio, las espigas fueron sometidas a un pretratamiento en frío y oscuridad durante 20 días y, posteriormente, se colocaron en placas de Petri con medio de cultivo FHGA. Al 15º día después de la siembra, se recuperaron anteras y se observó la frecuencia de formación de proembriodes. Para cada muestra se preparó una lámina citológica mediante la técnica de *squash* y coloración con carmín acético al 1%. Las células fueron analizadas en microscopio óptico para observar la presencia de microsporas uninucleadas y la formación de proembriodes. Para los genotipos de trigo, el marcador morfológico fue más eficaz en comparación con la cebada. Sin embargo, la producción de proembriodes se observó solamente en la cebada (en todos los genotipos), posiblemente debido a que el trigo requiere mayores ajustes en el medio de cultivo utilizado. Al final, se observó que los genotipos respondieron de manera diferente y que la estrategia del uso de marcadores morfológicos en el momento de la recolección puede contribuir en el proceso de selección de genotipos con buena respuesta al cultivo in vitro.

PALABRAS CLAVE: *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, androgénesis, citogenética, mejoramiento genético



Artigo está licenciado sob forma de uma licença
Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional.

1. Introdução

A regeneração direta de embriões *in vitro*, a partir de micrósporos, foi feita pela primeira vez por Guha e Maheshwari em 1964, quando observaram um desvio da rota gametofítica para a esporofítica de grãos de pólen de *Datura innoxia*, originando plantas haploides. A estratégia das técnicas de



produção de plantas *in vitro* objetiva principalmente a obtenção de plantas duplo-haploides como um método mais rápido para se obter homozigotos recombinantes, apoiando o melhoramento genético vegetal. A vantagem é que há uma seleção mais fácil e rápida, economizando tempo, na identificação de genótipos com características superiores e, consequentemente, gerando antecipadamente novas linhas e variedades de plantas (Muranty *et al.*, 2002). De acordo com Coelho *et al.* (2018), a produção de plantas duplo-haploides em trigo pode ser realizada por métodos como hibridação intergenérica, cultura de anteras e cultura de micrósporos isolados, sendo esta última vantajosa por dispensar etapas como emasculação e polinização, além de favorecer a duplicação cromossômica espontânea.

Pelo processo tradicional de melhoramento genético, somente após oito a nove gerações obtêm-se uma planta homozigota e para tornar-se uma cultivar precisa ainda de dois a três anos de avaliações em campo, visando a finalização de todo o processo, para que os agricultores possam aproveitar os resultados obtidos (Moraes-Fernandes *et al.*, 2002). Comparativamente, a partir da cultura de anteras, uma nova planta origina-se de uma única célula, ou seja, os micrósporos uninucleados. Destaca-se a ocorrência de um sinal de entrada na rota espotofítica com a vacuolização da célula e o deslocamento do núcleo para perto da membrana celular do lado oposto ao poro (Grando e Moraes-Fernandes, 1997; Lannes *et al.*, 2004).

Para algumas espécies como a cevada, pode ocorrer a duplicação do genoma espontaneamente, ainda *in vitro*, potencializando ainda mais a obtenção de plantas duplo-haploides. Esta técnica é também ideal para experimentos de transformação genética, de genética molecular e de edição gênica, ficando evidente a potencialidade dessa ferramenta biotecnológica (Jähne e Lörz, 1995; Sayed *et al.*, 2002; Lannes *et al.*, 2004)

Em revisão de Mazzonato (2005), o tempo que a espiga permanece no frio no pré-tratamento de choque-térmico é essencial para o sucesso da



técnica, embora Ritala *et al.* (2001) afirmam que o tempo de duração do pré-tratamento a frio ser genótipo/dependente. Jähne e Lörz (1995) inferem que para trigo e cevada, baixas temperaturas (12 a 18 °C) durante o desenvolvimento das plantas aumentaria a resposta ao cultivo *in vitro*, *mas também com a combinação de choques osmóticos* causados por privação de carboidratos e nitrogênio (Islam e Tuteja, 2012). Conforme abordado por Castillo *et al.* (2000), Kasha *et al.* (2001), Mazzocato (2005) e Scagliusi (2014), outras influências sobre o resultado da técnica são o tipo de meio onde o material será cultivado, já que este é espécie/específico.

Em trigo, o sucesso da cultura de micrósporos está intimamente ligado ao genótipo do doador de micrósporos, além de condições fisiológicas, tratamentos de estresse e co-cultivo com ovários (Coelho *et al.*, 2018). Também, as taxas de indução de estruturas pró-embriônicas e regeneração de plantas não são relativamente altas, persistindo a existência de um grande número das plantas regeneradas serem albinas (Scagliusi, 2014). Isso pode ser explicado pelo fato de que o ciclo de desenvolvimento das células de micrósporos dentro das anteras ser assíncrono, sendo essencial selecionar espigas doadoras com o máximo de micrósporos embriogênicos para garantir o sucesso da técnica (Coelho *et al.*, 2018). Portanto, Orłowska *et al.* (2019) abordam que é o ajuste fino de todas as condições experimentais que induz os micrósporos a se dividirem, levando à formação de estruturas semelhantes a embriões, que eventualmente originam plantas.

Destaca-se, ainda, que o sucesso da técnica também está condicionado a qualidade das plantas doadoras, bem como às condições ambientais onde estas se desenvolveram, entre outros fatores físicos. Assim, para uma maior uniformidade nos resultados é indicado que as plantas doadoras permaneçam em condições controladas. Entretanto, a fase de coleta da espiga ainda não está bem consolidada, principalmente pelo fato de que, na maioria das vezes, quando se faz a coleta das mesmas, baseia-se na distância do último nó até o início da espigam, considerando como um



“marcador morfológico”. Nesse sentido, Coelho *et al.* (2018) enfatizam que, embora indicadores morfológicos auxiliem na estimativa da fase adequada para coleta das espigas, apenas a observação microscópica permite sua identificação correta, para ser identificado a fase celular adequada.

Verificando os avanços na última década, a indução de proembrióides, via cultivo de anteras em trigo e cevada, tem avançado consideravelmente pelo fato da combinação de tratamentos de estresse (frio, osmótico) com moduladores epigenéticos e ajustes no meio de cultura. Estudos recentes destacam que pré-tratamentos com manitol e o uso do inibidor de histona deacetilase trichostatin A (TSA) promovem reprogramação celular e alteram fortemente o panorama epigenético e de expressão gênica durante os estágios iniciais da embriogênese de micrósporos em trigo, aumentando a formação de estruturas proembrionárias (Liu *et al.*, 2022; Valero-Rubira *et al.*, 2024). Pesquisas realizadas por Pérez-Pérez *et al.* (2019) também demonstraram que tais tratamentos frequentemente provocam alterações na homeostase hormonal (em especial acúmulo de auxinas endógenas), que parecem ser essenciais para o compromisso do micrósporo com a via embrionária, um mecanismo bem documentado em cevada e corroborado por estudos transcricionais. Além disso, revisões e trabalhos metodológicos recentes, tanto em trigo como cevada, propõem estratégias práticas para contornar a elevada recalcitrância de determinadas linhagens, incluindo controle do crescimento das plantas-doadoras, pré-tratamentos de espiguetas/caules e combinações de estresses que melhoram a viabilidade e a responsividade dos micrósporos (Dubas *et al.*, 2024; Springer *et al.*, 2025). Nesse contexto, os objetivos desse trabalho foram avaliar genótipos de trigo e cevada quanto à capacidade androgenética, bem como analisar citologicamente o estágio de micrósporos uninucleados cultivados *in vitro*.



2. Metodologia

Para a realização da pesquisa foram utilizados 13 genótipos de trigo e oito de cevada (Tabela 1), sendo o Trigo BR 43 e a cevada BR 2, descritos na literatura como androgenéticos, utilizados como controle.

Tabela 1. Genótipos de trigo e cevada, com seus respectivos cruzamentos, usados nos experimentos.

TRIGO	
Genótipo	Cruzamento
BR 43	PF 833007/JACUI
CNT 1	CNT 1 PF 11-1000-62/BH 1146
FRONTANA	FRONTEIRA/MENTANA
TOROPI	FRONTANA/QUADERNA-A//PETIBLANCO 8
FRONTEIRA	POLYSSU/ALFREDO CHAVES 6-21
ANAHUAC 75	II 12300//LERMA ROJO 64/SIETE CERROS /3/ NORTENO 67
BR 18	D 6301/NAINARI 60/WEIQUE RED MACE/3/ CIANO*2/CHRIS
526002	TOROPI/ANAHUAC 75
526003	TRINTECINCO/ANAHUAC 75
526013	FRONTANA/BR 18
526006	FRONTEIRA/ANAHUAC 75
526004	CNT 1/BR 18
526011	BRS 179/BR 18
CEVADA	
Genótipo	Cruzamento
BR 2	SELEÇÃO EM I-1516
HARRINGTON	KLAGES/GAZELLE//BETZES/3/CENTENNIAL
PI 466395	ACESSO DE <i>Hordeum spontaneum</i> - COLEÇÃO USDA
BR 1	BINDER/OPAL//BALDER/KENIA
MN 804	MN 667/MARLEN
526051	BR 1/HARRINGTON
526052	PI 466395/HARRINGTON
526053	MN 804/HARRINGTON

Fonte: Elaborado pelos autores



Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia – áreas de cultura de tecidos e citogenética vegetal da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.

As sementes foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 50%, seguido de álcool 70% e água destilada e germinadas em papel germitest e colocadas para vernalizar durante três dias à temperatura de 5 °C. Após, foram levadas ao germinador (T° 25 °C), durante uma semana, até o transplante para baldes com terra, cada um contendo quatro plântulas, que permaneceram em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12h e temperaturas de 15 °C/luz e 8 °C/escuro, até o completo desenvolvimento das plantas e coleta de cinco espigas para cada genótipo. Para a verificação dos micrósporos uninucleados inflorescências jovens foram coletadas, sendo utilizados como marcadores morfológicos as distâncias, em centímetros, do último nó à folha bandeira e o comprimento da espiga.

Para cada espiga coletada, fez-se uma lâmina citológica com as três anteras de uma única flor da região mediana, a fim de selecionar aquelas que possuíam estágio apropriado para o cultivo *in vitro*. Essas foram cortadas, esmagadas levemente e coradas com carmim acético. Foram analisadas as primeiras 400 células por lâmina, identificando micrósporos uninucleado (estádio 1), pólen binucleado (estádio 2) e tétrades (estádio 3).

As espigas, após serem devidamente medidas e selecionadas citologicamente, foram colocadas em placas de petri contendo um pequeno pedaço de algodão umedecido com água destilada para manter a umidade durante o pré-tratamento. Este material permaneceu no frio (4-5 °C) e no escuro durante 20 dias, quando então as espigas receberam assepsia de álcool de 70% e as anteras medianas de cada flor foram plaqueadas em meio de cultura FHGA (Hunter, 1988) em câmara de fluxo laminar. Cada espiga foi plaqueada em uma placa de petri individual (anotando-se o número de anteras), permanecendo por trinta dias no escuro em uma câmara de



crescimento à temperatura de 21 °C. Após este período, as placas foram expostas à luz, cujo fotoperíodo foi de doze horas e temperatura de 21 °C.

No décimo quinto dia transcorrido do início da implantação do cultivo *in vitro* foram retiradas aleatoriamente (em câmara de fluxo laminar) 3 anteras do meio de cultura de cada placa, visando verificar o desenvolvimento das estruturas obtidas. Estas anteras permaneceram no fixador Carnoy por 24 horas, seguida da transferência para álcool 70% e mantidas a -20 °C. Para cada antera confeccionou-se uma lâmina, da qual foram analisadas as estruturas, fazendo-se uma varredura por toda a lâmina, sendo que apenas foram contabilizados os proembrióides, tanto multinucleares como multicelulares.

A análise estatística, referente à parte citogenética, foi realizada através da análise de Variância (ANOVA) e teste de Duncan, com nível de significância a 1%. A parte referente aos proembrióides foi realizada através das frequências dos mesmos.

3. Resultados e Discussões

Nos genótipos estudados, pode-se verificar, através da análise de variância em cevada, que o uso de marcadores morfológicos, como base para a coleta de espigas, buscando-se o estágio de micrósporo uninucleado (ideal para o sucesso da cultura de anteras *in vitro*), deve ser auxiliado por análise citológica. A análise de variância para todos os genótipos analisados de cevada foi de 0,30, sendo significativo para um nível de significância a 1% e o coeficiente de variação de 16,64. Já para trigo, esta análise forneceu um valor de 0,67, com coeficiente de variação de 12,24, demonstrando que nesta espécie não houve variação significativa, comparando-se todos os genótipos para o uso de marcador morfológico e o estágio apropriado de micrósporos uninucleados.

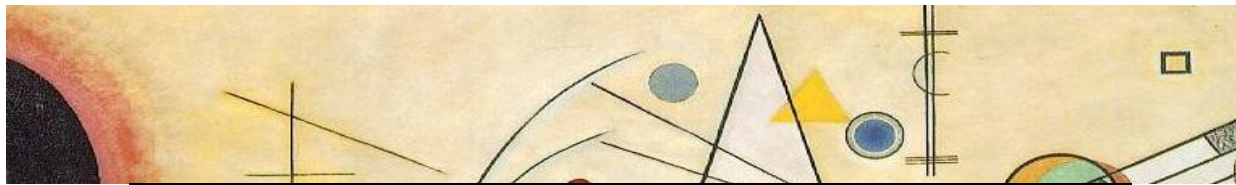


Contudo, no caso das análises individuais e por genótipo (intra-específicas) revelaram resultados diferentes, como pode ser visto na Tabela 2. Estes resultados indicam que a escolha das plantas doadoras para a cultura de anteras baseada exclusivamente por marcadores morfológicos (escolha da espiga baseada na distância do último nó do colmo e folha bandeira) é ineficaz. Já que em uma mesma espécie as distâncias que representam a fase de micrósporos uninucleados variam, inclusive na mesma planta. Em trigo, pode-se observar que em cerca de 50% dos genótipos analisados o marcador não pode ser utilizado com eficiência. Ressaltando que o próprio cultivar controle não possui um padrão de morfologia para que possa ser usado como base do desenvolvimento do gameta masculino. Para cevada os resultados das análises por genótipo foram semelhantes. Porém para o BR 1 o resultado foi altamente significativo na diferença das medidas do último nó à folha bandeira e para o estágio de micrósporo uninucleado.

Mazzocato (2005) ressalta que a cultivar BR 2 possui um desenvolvimento mais lento, confirmando que nem todos os genótipos de uma mesma espécie possuem desenvolvimento igual. Revers (1993) apud Mazzocato (2005) relata em seus resultados de comparação de marcadores morfológicos que encontrou diferenças entre o cultivar BR 2 e demais genótipos. Assman (1996) apud Mazzocato (2005) defende o uso de marcadores, porém também descreve que observou efeito do cultivar sobre tais. Por sua vez, Georg-Kraemer (2004) encontrou diferença no marcador morfológico de 2 cm até 14 cm, estando todas as espigas na fase de micrósporo uninucleado, ainda acrescenta que a coloração da espiga verde-clara indica época certa e verde-amarelada que o material passou do ponto.

Tabela 2. Análise de variância intra-específica relacionando a distância do último nó à folha bandeira com o estágio de micrósporo uninucleado.

TRIGO		CEVADA	
Genótipo	Média	Genótipo	Média
Anahuac 75	0,8752	BR 2	0,9772



CNT 1	0,7746	526053	0,9414
526011	0,6306	MN 804	0,8426
526003	0,5929	526051	0,6439
Frontana	0,5754	526052	0,3721*
526013	0,5283	PI 466395	0,3509*
526006	0,5225	Harrington	0.3447*
BR 43	0,4586	BR1	0,0123**
Toropi	0,4435*		
BR 18	0,3668*		
526002	0,3287*		
Fronteira	0,2884*		
526004	0,1095*		

* significativo a 1% ** altamente significativo a 1%

Fonte: Elaborado pelos autores

A Tabela 3 apresenta as análises referentes ao teste de Duncann. Para trigo, destacam-se os genótipos Fronteira, Anahuac 75, BR 18 e BR 43 e para cevada, os genótipos 526052, PI 466395 e Harrington, o que reforça a premissa da análise citológica ser usada na seleção assistida, para permitir maior sucesso na técnica.

Tabela 3. Relação das medidas de distâncias do último nó à folha bandeira como marcador morfológico para o estágio de micrósporo uninucleado em Trigo e cevada.

TRIGO			
Genótipo	Média		
Fronteira	28,32	A	
526006	23,30	B	
526011	23,12	B	C
526004	22,88	B	C
526003	22,84	B	C
526013	22,76	B	C
Toropi	22,57	B	C
526002	22,30	B	C
Frontana	21,00	C	D
Anahuac 75	20,22		D
BR 18	20,14		D
CNT 1	20,00	D	E



BR 43	18,14	E
CEVADA		
Genótipo	Média	
526052	22,86	A
PI 466395	21,68	A
BR 2	19,98	A B
BR 1	19,20	A B C
MN 804	19,12	A B C
526051	17,18	B C
526053	17,10	B C
Harrington	15,56	C

Medidas seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncann a 1% de significância.

Fonte: Elaborado pelos autores

Para trigo, não houve desenvolvimento de proembrióides. As lâminas confeccionadas com anteras no 15º dia de cultura *in vitro*, no escuro, continham apenas micrósporos uninucleados e/ou pólen binucleados. Isto não significa que esta espécie ou os genótipos testados não possuam capacidade androgenética, levando em conta que a cultivar BR 43 foi desenvolvida através desta técnica (Moraes-Fernandes *et al.*, 2002). Entretanto, Konieczny *et al.* (2003) mencionam que a indução da androgênese em trigo é fortemente controlada pelo genótipo e sua interação com os fatores ambientais.

Os micrósporos podem ser induzidos a mudar do desenvolvimento gametofítico para o esporofítico sob estresse, levando à formação de pró-embrióides. Martinez *et al.* (1994), em trabalho desenvolvido com centeio, relatam que pré-tratamento de frio de 4 a 8 dias e meio de indução Batata II, descrito por Chuang *et al.* (1978), resultou em alguns genótipos alta taxa de indução de embriões. Outros estudos descritos por Moeini e Sarrafi (1995), Chaudhary (2003) e Guzy-Wróbelska e Szarejko (2003), também mencionam que os dias de permanência do pré-tratamento a frio variaram de 2 a 7 e o meio de cultura de indução usado foi o meio Batata 2. Stival *et*



al. (2000) e Mazzocato (2005) abordam que há diferenças androgenéticas entre espécies diferentes e genótipos da mesma espécie bem como diferença entre genótipos quanto à resposta precoce das anteras na formação de estruturas embriogênicas por Mejza *et al.* (1993) utilizaram o meio FMN6 e Ziaudin *et al.* (1992) o meio BC1 modificado. Jähne and Lörz (1995), em revisão sobre o assunto destacam que a influência do frio sobre os resultados também é genótipo-dependente e com diferentes sucessos em trigo. A produção do trigo BR 43 através da técnica de cultura de anteras utilizou-se do meio batata II modificado (Moraes-Fernandes *et al.*, 2002).

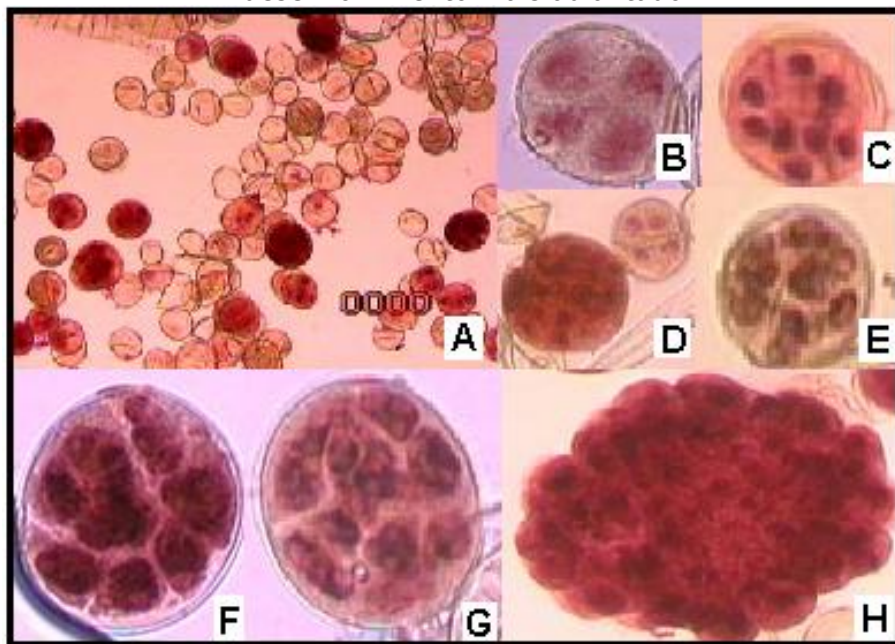
Contudo, os resultados obtidos no presente estudo podem ser explicados pela composição e tipo de meios utilizados nos experimentos, já que se sabe que um dos fatores determinantes da cultura de anteras constitui-se na especificidade entre meio de cultura e espécie. Konieczny *et al.* (2003), obtiveram sucesso na cultura de anteras de trigo usando o mesmo tipo de pré-tratamento, contudo permanecendo o material apenas entre 6 a 12 dias no frio, sendo que o meio de cultura usado foi C-17 modificado e com pH em 5,8. Ressaltando-se que em todos os cultivares por eles analisados não houve formação de calos antes de seis semanas de cultivo no meio de cultura. Os autores também confirmam que as células responsivas pela cultura de antera *in vitro* são os micrósporos uninucleados.

Quanto aos resultados obtidos em cevada, verificou-se uma desigualdade de desenvolvimento das estruturas embrionárias dentro da antera (Figura 1), ou seja, em uma única antera que continha micrósporos uninucleados na etapa de pré-seleção assistida obteve-se até o 15º dia de cultivo no escuro as seguintes estruturas: micrósporos uninucleados, pólen binucleados e estruturas embrionárias que continham 4 núcleos ou mais (em algumas destas estruturas já havia formação de divisão da parede celular e algumas delas encontravam-se já “estouradas” pela contínua divisão celular). Estes resultados também foram encontrados por Mazzocato (2005), onde micrósporos e pólen foram encontrados em todas as lâminas, em



todos os dias de coleta. A referida autora encontrou estruturas multinucleadas a partir do terceiro dia de cultivo, destacando-se multinucleados com oito e nove núcleos, bem como multicelulares com mais de 12 núcleos já no sexto dia de cultivo. Também a partir deste dia foi observado o rompimento das estruturas. A partir do nono dia, as estruturas embrionárias começam a aparecer com maior frequência, aumentando até 20 vezes o seu valor. Stival *et al.* (2000) observaram estruturas multicelulares aos 14 dias de cultivo, ressaltando que realizaram o preparo de lâminas semanalmente.

Figura 1. Estruturas celulares observadas no 15º dia de cultivo *in vitro* de cevada. (A) Estruturas encontradas em uma mesma antera; (B – E) proembriões multinucleares; (F – H) proembriões em desenvolvimento mais adiantado.



Fonte: Elaborada pelos autores.

No presente estudo, houve desigualdade entre a quantidade de proembriões encontrados em diferentes anteras da mesma espiga, confirmando que o desenvolvimento destas estruturas além de não seguir um padrão dentro da antera, possui um padrão menor ainda entre elas.



Resultados semelhantes também foram demonstrados em trigo por Konieczny *et al.* (2003) e em cevada por Mazzocato (2005), entre outros.

Com relação à capacidade androgenética, esta foi inferida apenas pela soma total de proembrióides de um mesmo genótipo dividida pelo número de lâminas analisadas. O resultado foi a média de proembrióides por lâmina.

A partir destes resultados verificou-se que a cultivar BR 2 (controle) foi o genótipo mais androgenético (Tabela 5), seguida por, 526052, 526053, 526051, MN 804, BR 1, Harrington e PI 466395.

Tabela 5. Genótipos responsivos à cultura de anteras quanto à formação de proembrióides obtidos no 15º dia *in vitro*.

Genótipo	Número médio de proembrióides por lâmina
BR 2	571,10
526052	361,06
526053	245,33
526051	227,00
MN 804	186,53
BR 1	168,50
Harrington	95,06
PI 466395	88,33

Fonte: Elaborado pelos autores

De acordo com estes resultados, há uma diferença de 482,77 células de proembrióides entre o genótipo mais e menos androgenético, confirmando assim, o fato da técnica ser genótipo-dependente.

Contudo, Konieczny *et al.* (2003) e Chaudhary (2003), abordam que uma menor indução de calo em cevada pode regenerar um maior número de plantas e uma maior taxa de indução de calo pode regenerar menos plantas, sendo que Mazzocato (2005) escolheu seu material de acordo com estas características.



Para trigo, como não houve formação de proembriões também não houve formação de calos e plantas. Em cevada, os resultados são apresentados na Tabela 6. O número de anteras na tabela representa aquelas que permaneceram no meio após a retirada do material do 15º dia de cultivo para a análise de proembriões. Destaca-se, entretanto, que foram descontadas as anteras eliminadas, uma vez que, em alguns casos, ocorreu contaminação na placa de Petri. Verificou-se, a partir destes resultados que cultivar BR 2 utilizado como controle, apresentou assincronia do desenvolvimento de calos e plântulas, embora este genótipo foi o que mais produziu proembriões.

Tabela 6. Quantificação de calos de cevada obtidos *in vitro*. Os genótipos estão em ordem decrescente do número de proembriões formados a partir da análise

Genótipo	Número de anteras	Regeneração de calos	
		Número	%
BR 2	117	87	74,35
526052	213	137	64,32
526053	136	26	19,11
526051	185	65	35,13
MN 804	134	0	0
BR 1	112	0	0
Harrington	116	35	30,17
PI 466395	124	10	8,06

Fonte: Elaborado pelos autores

Cabe ressaltar que embora muitos avanços já ocorreram para a melhoria dos processos *in vitro*, visando o cultivo de proembriões, a ampla variabilidade genotípica na resposta, a elevada incidência de plantas albinas e, frequentemente, o baixo rendimento final de plantas verdes ainda constituem barreiras significativas. Essas limitações refletem impactos genéticos marcantes — incluindo variação de capacidade combinatória entre genitores — e falhas em regular a biogênese de cloroplastos, ambos



dependentes do genótipo (Lantos *et al.* 2024). Portanto, avanços futuros dependem da otimização de pré-tratamentos e meios de cultura que minimizem a dependência genotípica e favoreçam a conversão de proembrióides em plantas verdes viáveis, mesmo em linhagens recalcitrantes, além de ter marcadores morfológicos na espiga para a seleção adequada das plantas doadoras das anteras.

4. Conclusão

A resposta à cultura de anteras é altamente genótipo-dependente, confirmando a importância da seleção criteriosa das plantas doadoras. Em trigo, o marcador morfológico se mostrou relativamente eficiente para identificar o estágio de micrósporos uninucleados, mas não houve indução de proembrióides, sugerindo que ajustes no meio de cultura e no tempo de pré-tratamento a frio, são fundamentais para otimizar a androgênese nessa espécie. Em contraste, os genótipos de cevada testados apresentaram desenvolvimento de proembrióides, destacando-se BR 2 com a maior frequência de estruturas embriogênicas e elevada capacidade androgenética. A variação intra e interespecífica observada reforça que a eficiência da técnica não pode ser baseada apenas em marcadores morfológicos, sendo imprescindível associar às análises citológicas para aumentar a precisão na seleção de espigas no estágio adequado, o que representa uma estratégia promissora para aumentar o sucesso da técnica e oferecer subsídios práticos para programas de melhoramento que utilizem a androgênese como ferramenta para a produção de linhagens duplo-haploides.

Referências

CASTILLO, A. M.; VALLÉS, M. P.; CISTUÉ, L. Comparison of anther and microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. **Euphytica**, v. 113, p. 1-8, 2000.



CHAUDHARY, H. K.; DHALIWAL, I.; SINGH, S.; SETHI, G. S. Genetics of androgenesis in winter and spring wheat genotypes. **Euphytica**, v. 132, p. 311-319, 2003.

COELHO, M. B.; SCAGLIUSI, S. M. M.; LIMA, M. I. P. M.; CONSOLI, L.; GRANDO, M. F. Androgenic response of wheat genotypes resistant to fusariosis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 53, n. 5, p. 575-582, 2018.

DUBAS, E.; KRZEWSKA, M.; SURÓWKA, E.; KOPEĆ, P.; SPRINGER, 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, p. 363, 2024.

GEORG-KRAEMER, J. E. **(1-3, 1-4)- β -glucanases na cevada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L.), atividade enzimática, obtenção de populações duplo-haplóides e regiões cromossômicas associadas**. 2004. Tese (Doutorado em Genética) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

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

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

GUZY-WRÓBELSKA, J.; SZAREJKO, I. Molecular and agronomic evaluation of wheat doubled haploid lines obtained through maize pollination and anther culture methods. **Plant Breeding**, v. 12, p. 305-313, 2003.

HUNTER, C. P. **Plant regeneration from microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.)**. PhD Thesis – Wye College, Ashford, Kent, London, 1988.

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

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



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

KONIECZNY, R.; CZAPLICKI, A. Z.; GOLCZYK, H.; PRZYWARA, L. Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 177-187, 2003.

LANNES, S. D.; ZIMMER, P. D.; OLIVEIRA, A. C. de; CARVALHO, F. I. F. de; VIEIRA, E. A.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M. de; KOOP, M. M.; FREITAS, F. A. de. Regeneração in vitro de anteras de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) e mapeamento de QTL associado. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1355-1362, 2004.

LANTOS, C.; MARKÓ, F.; MIHÁLY, R.; PAUK, J. Comparative analyses of green plantlet regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. **Agriculture**, v. 14, n. 9, p. 1440, 2024.

LIU, C.; SONG, G.; ZHAO, Y.; FANG, B.; LIU, Z.; REN, J.; FENG, H. Trichostatin A induced microspore embryogenesis and promoted plantlet regeneration in ornamental kale (*Brassica oleracea* var. acephala). **Horticulturae**, v. 8, n. 9, p. 790, 2022.

MARTINEZ, I.; BERNARD, M.; NICOLAS, P.; BERNAR, S. Study of androgenetic performance and molecular characterisation of a set of wheat-rye addition lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 82-990, 1994.

MAZZOCATO, A. C. **Cultura de anteras e embriogênese de genótipos selecionados de cevada (*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*)**. 2005. Dissertação (Doutorado em Botânica) – Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

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

MOIENI, A.; SARRAFI, A. Genetic analysis for haploid-regeneration responses of hexaploid-wheat anther cultures. **Plant Breeding**, v. 114, p. 247-249, 1995.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. de et al. Produção de linhagens duplo-haplóides e lançamento da cultivar Trigo BR 43 na Embrapa Trigo, através



de seleção simultânea para capacidade androgenética e caracteres agronômicos. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 119-134.

MURANTY, H.; SOURDILLE, P.; BERNARD, S.; ERNARD, M. Genetic characterization of spontaneous diploid androgenetic wheat and triticales plants. **Plant Breeding**, v. 121, p. 470-474, 2002.

ORŁOWSKA, R.; PACHOTA, K. A.; MACHCZYŃSKA, J.; NIEDZIELA, A.; MAKOWSKA, K.; ZIMNY, J.; BEDNAREK, P. T. Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 43, p. 8-15, 2019.

PÉREZ-PÉREZ, Y.; EL-TANTAWY, A. A.; SOLÍS, M. T.; RISUEÑO, M. C.; TESTILLANO, P. S. Stress-induced microspore embryogenesis requires endogenous auxin synthesis and polar transport in barley. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1200, 2019.

SAYED, H.; KAYYAL, H.; RAMSEY, L.; CECCARELI, S.; BAUM, M. Segregation distortion in doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) detected by simple sequence repeat (SSR) markers. **Euphytica**, v. 225, p. 265-272, 2002.

SCAGLIUSI, S. M. Establishing isolated microspore culture to produce doubled haploid plants in Brazilian wheat (*Triticum aestivum* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, p. 887-894, 2014.

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, p. 370, 2025.

RITALA, A.; MANNONEN, L.; OKSMAN-CALDENTY, K. M. Factors affecting the regeneration capacity of isolated barley microspores (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 403-407, 2001.

STIVAL, A. L. S. da; MORAES-FERNANDES, M. I.; FERREIRA, A. G. Ontogenic events in androgenesis of Brazilian barley genotypes. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, n. 2, p. 315-319, 2000.

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, p. 772, 2024.

ZIAUDDIN, A.; MARSOLAIS, A.; SIMION, E.; KASHA, K. J. Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenylacetic acid (PAA). **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 489-498, 1992.