

HIBRIDAÇÃO ARTIFICIAL DE PLANTAS

2ª Edição

Conforme a Nova
Reforma Ortográfica



ALUÍZIO BORÉM
EDITOR

ALUÍZIO BORÉM

Engenheiro-Agrônomo, M. S., Ph. D.

EDITOR

HIBRIDAÇÃO ARTIFICIAL DE PLANTAS

2ª edição, atualizada e ampliada



Universidade Federal de Viçosa
2009

Hibridação em Cevada

Euclydes Minella¹

A cevada, *Hordeum vulgare* L., foi uma das primeiras plantas domesticadas para consumo humano, sendo atualmente o mais antigo dentre os cereais cultivados. Originária do Oriente Médio, expandiu-se globalmente, tornando-se uma das espécies de maior distribuição geográfica.

A ampla adaptação ecológica, a utilidade como alimento humano e animal e a superioridade do seu malte para uso cervejeiro vêm mantendo a cevada entre os grãos mais produzidos ao longo dos séculos (POEHLMAN, 1985).

Cerca de 170 milhões de toneladas médias produzidas anualmente colocam a cevada na quarta posição na produção mundial de grãos (FAO, 1995). A maior parte é cultivada em regiões de clima marginal para a produção de milho, arroz e trigo. A produção está concentrada nas regiões temperadas da Europa, Ásia e América do Norte. Rússia, França, Canadá, Reino Unido, Estados Unidos, China, Alemanha, Dinamarca e Espanha são os maiores produtores. Na

¹ Eng.-Agr., Ph. D., pesquisador da Embrapa-Trigo, BR 285 Km 294, Caixa Postal 451, 99001-970 Passo Fundo, RS. E-mail: eminella@cnpt.embrapa.br

América do Sul, a produção é insignificante, menos de 1 % do total mundial.

Atualmente, é mais usada na alimentação animal: o grão é utilizado inteiro, quebrado, moído ou esmagado, e a planta como pastagem, feno ou silagem. O segundo maior uso é a produção de malte, que consome cerca 20 milhões de toneladas anualmente. Na alimentação humana é consumida *in natura*, malteada ou na forma de farinhas. É mais cultivada para consumo humano em regiões onde outros cereais não se desenvolvem bem, principalmente nas semi-áridas do norte da África, Oriente Médio e Ásia (Índia, Afeganistão, Coreia, China e Rússia), montanhosas da Ásia (Nepal, China), da África (Etiópia) e da América do Sul (Bolívia, Colômbia, Peru) e de latitudes extremas (Noruega, Suécia, Finlândia). Cerca de 5 % da produção mundial é aproveitado como semente.

No Brasil, é exclusiva a produção comercial de malte cervejeiro. A produção para outros fins nunca se consolidou por causa da falta de competitividade em relação a outros grãos, principalmente o milho. O cultivo está concentrado na região temperada, nos planaltos do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (MINELLA et al., 1996). Segundo dados da indústria, a produção doméstica, nos últimos cinco anos, representou entre 30 e 60% da capacidade das maltarias, estimada atualmente em 360.000 toneladas. O Brasil ocupa lugar de destaque entre os importadores de cevada e malte.

Desde sua domesticação, a cevada vem sendo alterada geneticamente, visando à adaptação a diferentes condições ambientais, sistemas de produção e usos do grão. A variabilidade genética (natural e induzida) acumulada ao longo da história tem permitido ao melhoramento o avanço necessário à manutenção da cultura na posição que ocupa no cenário mundial de produção de alimentos.

Na atualidade, o desenvolvimento de novos cultivares está baseado na seleção de populações híbridas segregantes

criadas por meio da hibridação artificial (cruzamentos). A hibridação, recurso essencial no melhoramento genético contemporâneo da cevada, é descrita e discutida neste capítulo.

Classificação Botânica

A cevada é uma planta da família das gramíneas, do gênero *Hordeum*, da tribo Triticeae. O gênero é composto por 32 espécies, incluindo diploides, tetraploides e hexaploides, com sete cromossomos basicamente (BOTHMER, 1991; BOTHMER et al., 1995).

Hordeum vulgare L., a única espécie cultivada do gênero, é diploide, com $2n=2x=14$ cromossomos, monoica, de reprodução sexual por autofecundação e propagação por semente. É constituída pelas subespécies *vulgare* e *spontaneum*. Todas as formas cultivadas estão classificadas em *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L.

Há dois tipos principais de cevada cultivada: as de duas e as de seis fileiras de grãos por espiga, representados pelas covariedades *vulgare* e *distichum*, respectivamente. Por sua vez, estas são compostas por diversas variedades botânicas, como *vulgare* e *hexastichum*, que representam as cevadas de seis fileiras de espigas laxas e compactas. Dentro desses tipos, as cevadas são ainda classificadas como de inverno ou de primavera, de acordo com a resposta à vernalização.

Hordeum vulgare ssp. *spontaneum* L., forma selvagem de duas fileiras, interfértil com ssp. *vulgare*, é reconhecida como a ancestral das cevadas domesticadas (BOTHMER et al., 1995).

Do ponto de vista de melhoramento, as espécies do gênero *Hordeum* formam três conjuntos gênicos afins, sendo *H. vulgare* e *H. spontaneum* o primário, *H. bulbosum* o

secundário, e as demais o terciário. Pertencendo ao pool primário, *ssp. spontaneum* vem sendo repetidamente utilizada em programas de melhoramento de longo prazo em andamento na Síria (ICARDA), Suécia e Inglaterra, como fonte de variabilidade para resistência a doenças (oídio, ferrugem, escaldadura) e pragas (pulgões), tolerância a estresses ambientais (frio, seca, salinidade) e qualidade (BOTHMER, 1996).

Depois de *H. spontaneum*, *H. bulbosum* é a espécie mais próxima da cultivada. Os híbridos de *H. vulgare* e *H. bulbosum* são estéreis na grande maioria, mostrando, entretanto, alto índice de pareamento de cromossomos na meiose. A espécie apresenta mecanismo de eliminação de seus cromossomos nos híbridos com a cultivada, utilizada rotineiramente como método de produção de haploides (CHEN; HAYES, 1989). Recentemente, genes de resistência ao oídio foram transferidos com sucesso (PICKERING et al., 1995), abrindo oportunidades para a utilização mais efetiva dessa espécie no melhoramento da cultivada.

Quase todas as espécies do conjunto gênico terciário podem ser cruzadas com a cultivada. Entretanto, o baixo grau de homologia dos genomas tem inviabilizado a utilização prática dessas espécies para melhoramento.

Características da Planta

A inflorescência da cevada é uma espiga terminal formada pela ráquis e pelo número variável de espiguetas. A espiga apresenta três espiguetas por nó, originárias, alternadamente, de lados opostos da ráquis. Cada espiguetas é formada por duas glumas e uma flor. As espiguetas laterais são estéreis nos tipos de duas fileiras e férteis nos de seis fileiras. O número de espiguetas por espiga varia de 15 a 30 e de 25 a 60 nas cevadas de duas e seis fileiras, respectivamente (REID; WIEBE, 1979). A flor é perfeita,

com três estames e o pistilo encobertos por duas glumelas, denominadas pálea e lema. A lema (externa) pode terminar em arista ou capuz. O pistilo é composto pelo ovário e um estigma bifurcado, de pilosidade variável. As duas lodículas, localizadas na base do ovário, servem para a abertura da espigueta. Os estames, formados pela antera e pelo filamento, têm origem na base do óvulo.

A cevada cultivada é monoica, reproduzindo-se sexualmente por autofecundação. A polinização cruzada ocorre em níveis inferiores a 1%. A deiscência das anteras (antese) acontece normalmente antes da abertura da flor e frequentemente antes da emergência da espiga (POPE, 1944), reduzindo as possibilidades de polinização cruzada. O grau de emergência da espiga antes da antese varia muito de acordo com o ambiente e com o cultivar. Temperaturas elevadas antes da floração antecipam a antese (HARLAN et al., 1943). As espigas das cevadas de seis fileiras normalmente emergem mais que as de duas fileiras. Em campo, a polinização é completada, às vezes, antes do aparecimento da ponta das aristas em algumas cevadas de duas fileiras. Em casa de vegetação e com temperaturas abaixo de 21 °C, a antese acontece após a emergência completa da espiga (STARLING, 1980). Com temperaturas elevadas, as espigas amadurecem com o pedúnculo e outras partes florais ainda imaturos, dificultando a hibridação artificial.

As flores da fileira central da espigueta da parte mediana da espiga são as primeiras a atingir a maturação. Do meio, amadurecem em direção à base e ponta da espiga. As localizadas na base e na ponta amadurecem até dois dias mais tarde. As laterais amadurecem na mesma ordem, porém mais tarde que as centrais. O pólen e o ovário amadurecem aproximadamente na mesma época. A polinização ocorre quando as anteras se rompem, liberando os grãos de pólen sobre o estigma. A germinação do pólen pode ocorrer

dentro de cinco minutos após sua chegada ao estigma (POPE, 1937).

Métodos de Hibridação

Cultivo das plantas

A produção de sementes por meio da hibridação artificial é mais eficiente quando obtida de plantas vigorosas e saudáveis. As plantas para cruzamentos podem ser cultivadas no campo, em casa de vegetação ou em câmaras de crescimento. Independentemente do local de plantio, o vigor das plantas está associado ao adequado manejo da umidade do solo, adubação, temperatura e luminosidade.

Sementes híbridas podem também ser obtidas por meio do cultivo de espigas destacadas da planta em água ou solução nutritiva (POPE, 1933; SUBRAHMANYAM; KASHA, 1973; CHEN; HAYES, 1989). O cultivo de espigas permite maior controle das condições ambientais, sendo, por isso, utilizado em vários programas de melhoramento (ANDERSON; REINBERGS, 1985).

No Brasil, a hibridação tem sido feita somente em plantas. O bloco de cruzamentos é plantado no outono, normalmente no campo e em telados, e, eventualmente, em casa de vegetação ou câmara de crescimento. O bloco de cruzamentos é composto, anualmente, por linhagens, cultivares e híbridos F_1 , em número variável, nos programas de melhoramento em atividade no País (Antarctica, Brahma e Embrapa Trigo).

Em Passo Fundo, RS (Embrapa Trigo), bloco de cruzamentos de 50 a 80 genótipos é plantado no campo ou em telado, em três ou quatro épocas, espaçadas de duas semanas, (a primeira, no campo, no início de maio). O plantio em telado, em baldes, é feito após a germinação obtida em cada época, no campo. As plantas do campo são

utilizadas como fonte de pólen (progenitores masculinos) e as do telado como progenitores femininos. Os cruzamentos são realizados de agosto a novembro. Chuvas e ventos fortes, frequentes na primavera da região, reduzem drasticamente a produção de sementes, inviabilizando a realização de cruzamentos no campo. Temperaturas elevadas nos meses de verão impedem a realização de cruzamentos em ambientes sem controle de temperatura.

Emasculação

De acordo com o modo natural de reprodução, a hibridação artificial da cevada exige a retirada das anteras (emasculação) das plantas do progenitor feminino antes da antese. Tesoura e pinça são as ferramentas básicas para a hibridação. Tesouras pequenas (lâmina de 3 cm) e pinças de 10 cm de comprimento e pontas pequenas, preferencialmente de aço inoxidável, são as mais indicadas (Figura 1).

A espiga está pronta para a emasculação dois dias antes da antese das flores do centro. Nesse estágio, as aristas são visíveis e as anteras apresentam coloração entre verde-claro e amarelo (STARLING, 1980). A emasculação pode ser realizada em qualquer hora do dia.

Antes da emasculação, a espiga é exposta por meio da remoção total ou parcial da bainha da folha-bandeira, acima do primeiro nó da ráquis. Na remoção parcial, a bainha é cortada imediatamente acima da ponta da espiga. Nesse caso, a bainha deve ser desenrolada e dobrada para baixo, na base da espiga. A bainha, recolocada após a emasculação, protege o pedúnculo e a espiga contra a dessecação. Na remoção total, a bainha é aberta e cortada na altura do primeiro nó da ráquis. Em seguida, as espiguetas laterais e as mal desenvolvidas da base e da ponta da espiga, bem como as aristas, são removidas. As espiguetas laterais e as mal desenvolvidas são removidas mesmo nas cevadas de duas fileiras, para evitar eventual formação de pólen viável.

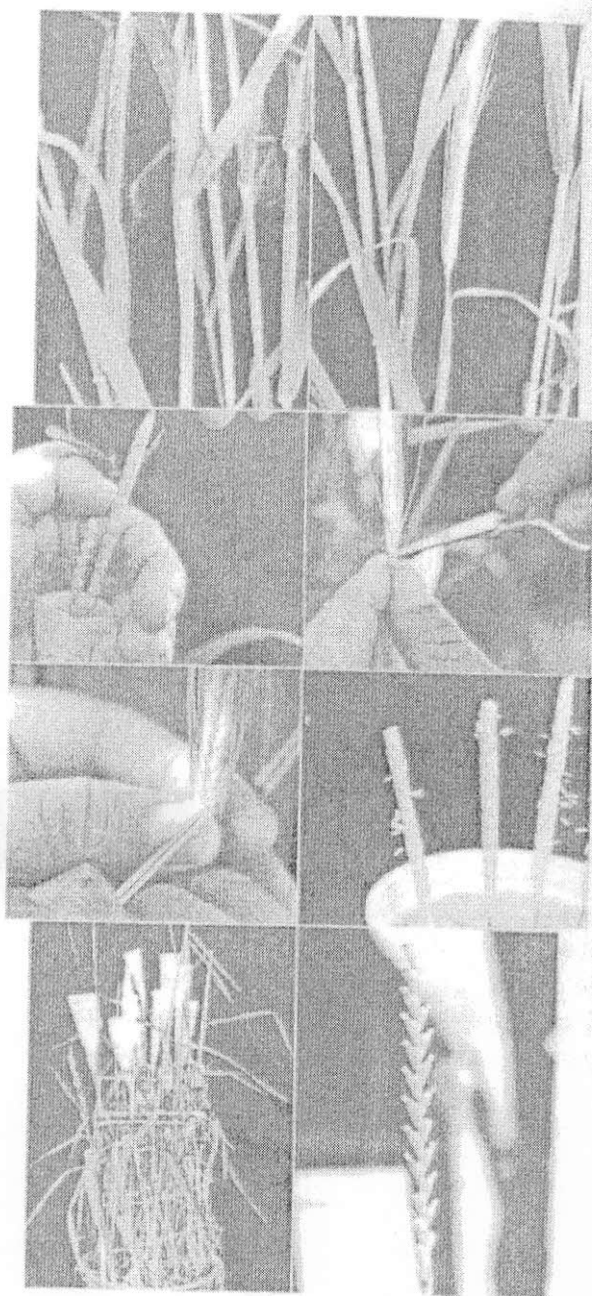


Figura 1 - Hibridação artificial de cevada.

As anteras são expostas por meio de incisão longitudinal no dorso da lema, com pinça, ou de corte transversal das espiguetas com tesoura. Por ser mais rápido, o corte transversal é mais usado. As anteras são então retiradas com a pinça, com cuidado para não danificar o estigma.

A emasculação com tesoura (WELLS; CAFFEY, 1956) pode reduzir ainda mais o tempo gasto na retirada das anteras. O corte da espigueta, removendo um terço da antera, inibe a produção de pólen viável, dispensando sua retirada. Quando as anteras estão suficientemente cortadas, a emasculação por esse método iguala-se à dos outros no grau de autofecundação (FOSTER, 1987).

A emasculação pode ser dispensada pelo uso de genes que conferem a macho-esterilidade. Muitos desses genes foram incorporados em material genético distinto, visando facilitar a hibridação da cevada (HOCKETT et al., 1968). Essa característica é especialmente útil em programas de melhoramento em que o retrocruzamento e os cruzamentos complexos (compostos) são utilizados rotineiramente. Nesse caso, o preparo para hibridação consiste apenas no corte das espiguetas, no isolamento e na identificação da espiga.

O número de espigas emasculadas por cruzamento varia de acordo com o tamanho de população desejado na geração F_2 . No Brasil, polinizam-se, em média, cinco espigas para a obtenção de F_2 de, no mínimo, 2.000 indivíduos.

Após a emasculação as espigas devem ser isoladas. Para isso, são cobertas com sacos de 15 x 4 cm, feitos de papel-manteiga, os mais usados no Brasil. O procedimento é finalizado pelo registro do número de parcela e da data da emasculação em etiqueta de papel pendurada ao colmo (Figura 1).

Polinização

Em geral, as flores estão prontas para a polinização no segundo dia após a emasculação. As espigas estarão prontas para a polinização quando a lema e a pálea estiverem separadas e as ramificações do estigma expostas. O estigma maduro é receptivo a qualquer hora do dia.

A deiscência das anteras e a polinização ocorrem naturalmente das primeiras horas até a metade da manhã, sendo este o período recomendado para a coleta e a aplicação do pólen, que fica escasso após o meio da tarde, principalmente durante períodos de altas temperaturas. Para a polinização, selecionam-se as espigas com grande número de anteras maduras (amarelas). Nessa fase, as espigas que já emergiram da bainha na maioria das cevadas, são colhidas, cortando o colmo na altura do último nó. Pouco antes da polinização, as espiguetas são cortadas transversalmente logo acima da ponta das anteras. Minutos mais tarde, as anteras deiscem e são naturalmente empurradas (extrusadas) para fora, pelo crescimento do filamento. A extrusão e a deiscência podem ser apressadas, colocando as espigas ao sol ou próximas de uma fonte de calor (STARLING, 1980).

Vários métodos podem ser usados na aplicação do pólen, e sua escolha depende da quantidade disponível, do número de espigas a serem polinizadas e de preferências individuais.

Uma das técnicas consiste na colheita de pólen, sobre papel-manteiga ou outro recipiente, e sua transferência para os estigmas com a pinça. Outro procedimento envolve a coleta de uma antera e sua transferência para a flor emasculada. As anteras individuais são rompidas sobre as bordas da lema e da pálea, deixando o pólen cair sobre o estigma. Nas espigas emasculadas por meio de incisão longitudinal, uma antera é introduzida em cada espiguetas emasculada. No método da aproximação (ROSENQUEST,

1927), espigas inteiras do progenitor masculino são ensacadas junto com a espiga emasculada. As espigas podem ser destacadas da planta, colocadas em tubo de plástico, ou outro recipiente com água, e amarradas junto com as do progenitor feminino. Pequenas batidas sobre o saco protetor, nos dias subsequentes, ajudam a dispersão do pólen. O procedimento pode ser feito também no campo. Por serem laboriosos e, ou, demorados, os métodos descritos são utilizados somente em situações especiais, como escassez de pólen.

O método mais rápido consiste em girar a espiga polinizadora, em posição invertida, sobre a emasculada (POPE, 1944). Enquanto uma mão circunda a emasculada, a outra gira, entre os dedos polegar e indicador, o pedúnculo da espiga polinizadora para a direita e para a esquerda. O rápido movimento da espiga ao redor da emasculada garante a dispersão do pólen.

Imediatamente após a polinização, as espigas são novamente ensacadas. O nome dos progenitores e a data de polinização são anotados na etiqueta de identificação.

Desenvolvimento, Colheita e Conservação da Semente

A ocorrência da fertilização pode ser verificada entre dois e quatro dias após a polinização. Os grãos produzidos atingem o comprimento máximo em uma semana e a maturação em cerca de 26 dias (STARLING, 1980; FOSTER, 1987).

Nos cruzamentos interespecíficos, de modo geral, o desenvolvimento do endosperma é deficiente, sendo a extração e o cultivo do embrião em meio de cultura necessários para a obtenção de semente.

Em condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos, os sacos devem ser removidos, o que pode ser feito

uma semana após a polinização. Nesse caso, as flores ainda abertas devem ser removidas para evitar polinização indesejável.

As espigas poderão ser colhidas quando o pedúnculo apresentar coloração amarela ou as sementes da ponta estiverem maduras. De modo geral, a maturação se completa cerca de 30 dias após a polinização. As espigas de cada cruzamento são amarradas juntas pelo pedúnculo ou colocadas em envelopes de papel e pastas para secar em lugar seco e com temperaturas abaixo de 38°C. Depois de secas, as espigas são trilhadas manualmente, para evitar dano mecânico. Dependendo do tempo entre a colheita e o plantio, as sementes podem ser guardadas em temperatura ambiente ou em câmaras refrigeradas. Quando usadas imediatamente, as sementes híbridas germinam mais uniformemente se submetidas a tratamentos de quebra de dormência. A manutenção da semente de três a cinco dias em refrigerador, antes do plantio, tem sido o tratamento mais usado com essa finalidade no Brasil.

Vários genes marcadores podem ser utilizados para detectar autofecundação na progênie híbrida. Os genes dominantes que controlam características morfológicas, como duas fileiras de grãos, lema mútica (sem arista), lema com capuz, arista lisa, ráquis pilosa, bainha pilosa, espiga laxa, ráquila longa e ráquila com pelos longos, e fisiológicas, como hábito de primavera, são facilmente observadas e as mais utilizadas na checagem rápida da ocorrência de autofecundação. Marcadores mais eficientes, como os enzimáticos (amilases, proteinases etc.) e moleculares (RLFP, RAPD, AFLP), também podem ser usados com essa finalidade, porém seu uso requer laboratório adequado.

Genes que se expressam na semente ou na planta antes do espigamento, ligados aos de macho-esterilidade, são extremamente úteis na hibridação. O germoplasma CBC 695, desenvolvido no Canadá (FEDAK et al., 1981), possui o gene *sex1*, estreitamente ligado ao gene *msg6*, permitindo a

identificação das plantas macho-estéreis antes do plantio. O gene *sex1* em homozigose causa um colapso do endosperma, produzindo um enrugamento (afundamento) característico e distinto do causado por estresses ambientais. Isso permite a seleção e o plantio das sementes produtoras de plantas macho-estéreis.

Fatores que Afetam a Hibridação

O sucesso da hibridação varia conforme a experiência pessoal, o vigor das plantas e as condições ambientais prevaletentes. Operadores experientes mutilam menos o estigma na emasculação e escolhem melhor o pólen. Em condições ambientais favoráveis e de abundância de pólen, pessoas experientes conseguem índices de fertilidade acima de 90%.

Estratégias que sincronizam o florescimento dos progenitores são as de maior impacto na eficiência da hibridação. O plantio em duas ou mais épocas e a manipulação da temperatura e do fotoperíodo em casa de vegetação/câmara de crescimento (altas temperaturas e dias longos aceleram a floração; baixas temperaturas e dias curtos atrasam-na) são os mais utilizados nos programas de hibridação.

Quando um dos progenitores floresce bem antes dos demais, os colmos espigados podem ser removidos, o que estimula o desenvolvimento de espigas nos perfilhos secundários. Além disso, a viabilidade do ovário e do pólen pode ser preservada por períodos superiores a 20 dias com temperaturas entre 3 e 5 °C (POPE, 1939).

Escalaonamento dos plantios (campo e telado) e sua condução em condições adequadas de umidade no solo, adubação e controle de doenças e pragas, utilizados pela Embrapa-Trigo, têm permitido nível satisfatório de sucesso nos cruzamentos planejados anualmente.

Referências

- ANDERSON, M. K.; REINBERGS, E. Barley breeding. In: RASMUSSEN, D. C. (Ed.) **Barley**. Madison-WI, America Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America Publishers, 1985.
- BOTHMER, R. von. The wild species of *Hordeum*, relationships and potential use for improvement of cultivated barley. In: SHEWRY, P. R. (Ed.) **Barley: genetics, molecular biology and biotechnology**. London-UK: CAB International, 1991.
- BOTHMER, R. von; JACOBSEN, N.; BADEN, C.; JORGENSEN, R. B.; LINDE-LAURSEN, I. **An ecogeographical study of the genus *Hordeum***. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools, 7. 2nd ed. Rome: IPGRI, 1995.
- BOTHMER, R. von. Conservation and use of wild relatives of barley. In: SCOLES, G.; ROSSNAGEL, B.; FAIRBAIRN, C. (Eds.) **Barley Genetics VII**. Saskatoon-SK, Proceedings 5th International Oat Conference and 7th International Barley Genetics Symposium, Invited Papers. Saskatoon-SK, University of Saskatchewan, University Press, 1996.
- CHEN, F. Q.; HAYES, P. M. A comparison of *Hordeum bulbosum*-mediated haploid production efficiency in barley using in vitro floret and tiller culture. **Theor. Appl. Genet.**, n. 77, p. 701-704, 1989.
- FAO. **Yearbook of production**. Rome: FAO, 1995.
- FEDAK, G.; KASHA, K. J.; REINBERGS, E. Presowing selection of genetic male sterile plants to facilitate hibridization in barley. In: ASHER, M. (Ed.) **Barley genetics IV**. Edinburgh-UK, Edinburgh-UK: Edinburgh University Press, 1981. Proceedings 4th International Barley Genetics Symposium.
- FOSTER, A. E. Barley. In: FEHR, W. R. (Ed.) **Principles of cultivar development**. Crop Species: New York-NY, Macmillan Publishing Company, 1987.
- HARLAN, H. V.; MARTINI, M. L.; STEVENS, H. The effect of temperature on seed set in barley crosses. **J. Am. Soc. Agron.** v. 35, p. 316-320, 1943.
- HOCKETT, E. A.; ESLICK, R. F.; REID, D. A.; WIEBE, G. A. Genetic male sterility in barley. II. Available spring and winter stocks. **Crop Sci.** v. 8, p. 754-755, 1968.
- MINELLA, E.; SILVA, M. S.; ARIAS, G.; **Potencial produtivo e características agrônômicas das cultivares de cevada cervejeira recomendadas para a região sul do Brasil**. Passo Fundo-RS: Embrapa Trigo, 1996. (Circular Técnica n. 8).

- PICKERING, R. A.; HILL, A. M.; MICHEL, M.; TIMMERMAN-VAUGHAN, G. M. The transfer of a powdery mildew resistant gene from *Hordeum bulbosum* L. to barley (*H. vulgare* L.) chromosome 2 (21). *Theor. Appl. Genet.*, v. 91, p. 1288-1292, 1995.
- POEHLMAN, J. M. Adaptation and distribution. In: RASMUSSEN D. C. (Ed.) *Barley*. Madison-WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America Publishers, 1985.
- POPE, M. N. A rapid method for making small grain hybrids. *J. Am. Soc. Agron.*, v. 25, p. 771-772, 1933.
- POPE, M. N. The time factor in pollen-tube growth and fertilization in barley. *J. Agric. Res.*, v. 54, 525-529, 1937.
- POPE, M. N. Viability of pollen and ovules of barley after cold storage. *J. Agric. Res.*, v. 59, p. 453-463, 1939.
- POPE, M. N. Some notes on techniques in barley breeding. *J. Hered.*, v. 35, p. 99-111, 1944.
- REID, D. A.; WIEBE, G. A. Taxonomy, botany, classification and world collection. In: *Barley: origin, botany, culture, winterhardiness, genetics, utilization, pests*. USDA, Agricultural Handbook n. 338, 1979.
- ROSENQUEST, C. D. An improved method of producing F₁ seeds of wheat and barley. *J. Am. Soc. Agron.*, v. 19, p. 968-971, 1927.
- STARLING, T. M. In: FEHR W. R.; MADLEY, M. H. (Eds.) *Hybridization of crop plants. Barley*. Madison-WI: American Society of Agronomy Inc, 1980.
- SUBRAHMANYAM, N. C.; KASHA, K. J. Feeding of detached tillers improves haploid production in barley. *Barley Genetics Newsl.*, v. 3, p. 62-65, 1973.
- WELLS, D. G.; CAFFEY, H. R. Scissor emasculation of wheat and barley. *Agron. J.*, v. 48, p. 496-499, 1956.