

## **OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA PRODUÇÃO DE PLANTAS DUPLO-HAPLOIDES DE TRIGO ATRAVÉS DA CULTURA DE MICRÓSPOROS ISOLADOS**

Sandra Mansur Scagliusi<sup>1</sup> e Francieli Fátima Cima<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pesquisadora, Centro Nacional de Pesquisa de Trigo - CNPT (Embrapa Trigo), Rodovia BR 285, km 294, CEP 99001-970, Passo Fundo - RS. E-mail: [sandra.scagliusi@embrapa.br](mailto:sandra.scagliusi@embrapa.br). <sup>2</sup>Doutoranda em Fitomelhoramento, UFPel Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas- RS.

No Brasil, o trigo ocupa destaque nos sistemas de produção da região Sul, sendo o cereal de inverno mais importante, cultivado principalmente nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, contribuindo juntos com 95% do total da safra nacional, atingindo entre cinco e seis milhões de toneladas ao ano (CONAB, 2013). Porém, tal produção ainda está aquém da necessidade nacional, sendo insuficiente para atender a demanda interna de aproximadamente 10 milhões de toneladas ao ano. Nesse contexto, visando atender o déficit existente entre demanda/produção, torna-se imperativo a existência de programas de melhoramento genético mais eficientes, com capacidade de formação e substituição de novas cultivares, com reposição periódica mais rápida e eficiente por outras de qualidade superior exibindo novos patamares de produção/produktividade e com características superiores de plantas (resistência a doenças e pragas) e de superior qualidade tecnológica. Assim, no melhoramento genético de plantas autógamas, utilizar de técnicas que permitam acelerar o desenvolvimento da formação de uma nova cultivar merece destaque. Buscando atingir este objetivo, a produção de plantas haploides sobressai-se como uma importante etapa dentro dos programas de melhoramento genético vegetal, auxiliando na diminuição do tempo de obtenção de uma nova cultivar. Em trigo, a cultura de micrósporos isolados (através da androgênese) tem sido utilizada para a obtenção de plantas haploides, tanto para dar apoio ao processo de formação de novas

cultivares como para estudos mais refinados, como a construção de populações homocigotas para mapeamento genético com marcas moleculares e até para fins de transgenia (Brew-Appiah et al., 2013). No entanto, esta técnica tem-se caracterizado como altamente genótipo-dependente e de apresentar altas taxas de produção de plantas albinas (Muñoz-Amatriaín et al., 2009). Assim, o objetivo deste trabalho foi melhorar esse tipo de protocolo via cultura *in vitro* de micrósporos isolados utilizando-se genótipos de trigo com diferentes respostas em relação à androgênese e à taxa de produção de plantas albinas. Para este estudo, os seguintes genótipos foram avaliados: a) Pavon 76 (controle responsivo à androgênese); b) Embrapa 27 (resposta androgenética desconhecida); c) linhagem segregante F3 “YC” x PF 070478 e d) plantas F<sub>1</sub> oriundas do cruzamento entre Toropi x BRS 194. Foram realizados quatro experimentos para extração e purificação das células de micrósporos, sendo o protocolo “padrão” conforme metodologia descrita por Eudes & Amundsen (2005), com algumas modificações, havendo variações nas etapas de pré-tratamento das espigas e no princípio ativo das soluções “promotoras” da androgênese. No primeiro experimento, designado como “padrão”, as espigas coletadas em fase apropriada foram incubadas no escuro a 4°C por um período de 21 dias ( $\pm 3$  dias). No segundo experimento, as anteras foram separadas das espiguetas e tratadas em três soluções de pré-tratamentos a 4°C: a) manitol (62 gL<sup>-1</sup>) + 15  $\mu$ M de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O); b) manitol (62 gL<sup>-1</sup>) e c) 15  $\mu$ M de sulfato de cobre. No terceiro experimento, foram testadas as mesmas três soluções de pré-tratamento do experimento anterior, com a diferença de que neste experimento, espiguetas inteiras foram pré-tratadas (e não somente as anteras). No quarto experimento, utilizou-se o pré-tratamento a frio (padrão) e houve uma modificação no meio de indução, sendo testados nove tratamentos: controle (meio de indução padrão NPB-99); sulfato de cobre (2,0  $\mu$ M e 4,0  $\mu$ M); prolina (10 mM); glutathione (2,0  $\mu$ M); cefotaxime (100 mgL<sup>-1</sup>); sulfato de cobre (2,0  $\mu$ M) + prolina (10 mM); sulfato de cobre (2,0  $\mu$ M) + glutathione (2,0  $\mu$ M); sulfato de cobre (2,0  $\mu$ M) + cefotaxime (100 mgL<sup>-1</sup>). Foi possível observar que a resposta à androgênese teve forte interação com os genótipos avaliados, em todos os

tratamentos aplicados, mantendo a característica de ser um método “genótipo-dependente”. No experimento “padrão” observou-se a formação de embriões e plantas verdes apenas no genótipo controle (Pavon 76), havendo ausência de resposta nos demais genótipos. Através dos resultados obtidos no experimento 2 (feitos com anteras isoladas) foi possível observar que o sistema escolhido para purificação das células de micrósporos (somente anteras) não foi tão eficiente para separar as células dos tecidos esporofíticos das anteras, impedindo a análise dos pré-tratamentos. Assim, ao utilizar as espiguetas inteiras para extração das células, no experimento 3, foi possível identificar que a solução de pré-tratamento contendo 15  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre foi a mais eficiente para desencadear a embriogênese dos micrósporos e regenerar plantas verdes em três dos quatro genótipos avaliados, com exceção da cultivar Embrapa 27. Essa cultivar não respondeu a nenhuma forma de pré-tratamento, exibindo um perfil altamente recalcitrante em relação à androgênese. Quando o meio de indução foi suplementado com 100  $\text{mgL}^{-1}$  de cefotaxime, no quarto experimento, esta alteração mostrou-se eficaz tanto para aumentar a formação de embriões como para a regeneração de plantas verdes. No entanto, o cruzamento entre Toropi X BRS 194, apesar de ser bastante responsivo à androgênese, produziu muitas plantas albinas, chegando a quase 75% das plantas regeneradas. O uso de sulfato de cobre no pré-tratamento e a suplementação com cefotaxime no meio de indução auxiliou a formação de embriões e a regeneração de plantas. Entretanto, estes efeitos benéficos não foram verificados em todos os cruzamentos. Assim, baseando-se nos resultados preliminarmente obtidos neste estudo, mais pesquisas serão necessárias visando à melhoria do protocolo descrito aqui, especialmente considerando que linhagens parentais são escolhidas com base em características agrônômicas, e não pela compatibilidade de uma determinada metodologia de produção de duplo-haploides (Snape et al., 1986; Henry et al., 1994). Outros experimentos estão em andamento abrangendo modificações nas etapas de pré-tratamento e na composição dos meios de cultura de indução e regeneração. Os resultados apresentados, embora feitos com poucos genótipos servirão como base para futuros estudos com a técnica e sua

aplicação dentro do programa de melhoramento genético de trigo. Um estudo mais abrangente para conhecer a resposta à androgênese frente a uma ampla coleção de germoplasma de trigo brasileiro é necessário.

### **Referências bibliográficas**

BREW-APPIAH, R.A.T., ANKRAH, N., LIU, W., KONZAK, C.F., VON WETTSTEIN, D., RUSTGI, S. Generation of Doubled Haploid Transgenic Wheat Lines by Microspore Transformation. **PLOS One**, v.8/11:1-13, 2013.

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

HENRY, Y., VAIN, P., de BUYSER, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, v.79:45-58, 1994.

MUÑOZ-AMATRIAÍN, M., SVENSSON, J.T., CASTILLO, A.M., CLOSE, T.J., VALLÉS, M.P. Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green versus albino plant production. **Functional & Integrative Genomics**, v.9:311–323, 2009.

SNAPE, J.W., de BUYSER, J., HENRY, Y. SIMPSON, E. A comparison of methods of haploid production in a cross of wheat, *Triticum aestivum*. **Journal of Plant Breeding**, v.96:320-330, 1986.