

Haplodiploidização e Identificação de Genótipos de Cevada com Capacidade Androgenética no Programa de Melhoramento da Embrapa Trigo

Brammer, S.¹; Fernandes, M.I.B. de M.¹; Minella, E.¹; Arias, G.¹; Só e Silva; M.¹, Iorczeski E.J.¹; Silva, A.L.S. da²; Pandolfi, V.³

Introdução

Na Embrapa Trigo, a viabilidade de emprego da cultura de anteras (**androgênese**) no melhoramento de trigo foi demonstrada em 1982, por meio do uso de germoplasma com capacidade androgenética e variabilidade para caracteres agronômicos importantes. Para a cevada, essa técnica foi introduzida em 1993. Os resultados obtidos foram animadores e justificam investir nessa tecnologia, a fim de auxiliar na superação dos desafios que limitam a adaptação quanto ao rendimento de grãos e à qualidade cervejeira de cevada nas condições de cultivo no Brasil. Na cultura de anteras, dois fatores salientam-se em importância. O **fisiológico**, que se refere aos pré-tratamentos, aos meios e às condições da cultura, à diferenciação e à sobrevivência das estruturas embrionárias e ao estágio de desenvolvimento do pólen, e o **genotípico**, que trata da capacidade androgenética, que permite a formação de embriões e a regeneração de plantas verdes *in vitro*.

Objetivos

Relatar e discutir alguns resultados relativos à complementação e ajustes da técnica de cultura de anteras de cevada para a obtenção de

¹ Pesquisador da Embrapa Trigo. Caixa Postal 451, 99001-970 Passo Fundo, RS. e-mail: sandra@cnpt.embrapa.br, mirene@cnpt.embrapa.br, eminella@cnpt.embrapa.br, arias@cnpt.embrapa.br, soesilva@cnpt.embrapa.br, edson@cnpt.embrapa.br.

² Doutoranda no Institut fuer Allgemeine Botanik, Hamburgo - Alemanha.

³ M.Sc. em Fitomelhoramento - Apoio Técnico PRONEX.

linhagens haplodiplóides, visando a identificar genótipos com capacidade androgenética associada a características agrônômicas importantes.

Metodologia

Espigas de cevada foram coletadas (na fase de pólen uninucleado-médio), esterilizadas em etanol 70 % e pré-tratadas a 4 °C em placas de Petri grandes com pouca quantidade de água, por 10 dias no escuro. As anteras provenientes de populações F₁, linhagens e cultivares, foram incubadas em meio de cultura de indução e incubadas no escuro a 25 °C por cerca de 30 dias. As estruturas embrionárias induzidas foram transferidas para o meio de regeneração e colocadas na presença de luz (12h/60 mE m-2s-1). As plantas verdes regeneradas foram transferidas para potes de plástico (500 ml) com vermiculita e aclimatadas em ambiente controlado. O nível de ploidia foi confirmado pela contagem de cromossomos em pontas de raiz. As plantas haplóides tiveram a duplicação de seus genomas através da imersão da parte radicular em solução de colchicina 0,25 % por 3-4 horas. A partir da colheita das espigas férteis, foi feita a identificação dos genótipos, considerados desta fase em diante como linhagens. O plantio para multiplicação foi realizado em telado e a avaliação em campo e/ou em condições controladas.

No período de 1993 a 1997, três diferentes meios de cultura foram testados: N6 (Chu, 1981) para indução das estruturas embrionárias, MS (Murashige & Skoog, 1962) e Batata 2 (Chuang, 1981) para regeneração. Em 1997, a partir da consultoria do dr. André Comeau (Agriculture Canada, Sainte-Foy, Quebec), um novo meio de cultura foi testado, visando a aumentar a eficiência da técnica. Comparou-se o meio de cultura FHGA (Comeau, comunicação pessoal) com o meio N6, comumente usado no laboratório.

* Mensagem de Andre Comeau. – Engenheiro-Agrônomo. Pesquisador do Agriculture Canada, Sainte-Foy, Quebec. Para a pesquisadora Sandra Patussi Brammer, Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS durante consultoria na Embrapa Trigo em novembro/dezembro de 1997.

Resultados

Em 1993, de 12.300 anteras cultivadas *in vitro*, 30 %, em média, foram responsivas no meio N6, e o número máximo de plantas obtidas foi de 8,26 plantas por 100 anteras cultivadas. Foram produzidos 357 genótipos haplodiplóides, dos quais 229 foram cultivados até a maturação e multiplicados. Em 1994, foram incubadas 16.800 anteras provenientes de 420 espigas. No total, 825 estruturas embrionárias foram obtidas no meio N6, das quais 493 (60,0 %) foram colocadas para regeneração no meio Batata 2 e 332 (40,0 %) no meio MS modificado. A conversão de estruturas embrionárias em plantas verdes viáveis foi de 5,0 %, havendo melhores resultados no meio Batata 2, que substituiu o meio MS nos anos seguintes. Em 1995, de 10.067 anteras incubadas no meio de indução N6, 993 (9,1 %) foram responsivas, regenerando 354 (3,4 %) plantas verdes. Em 1996, foram incubadas 18.342 anteras, e 1.739 (8,79 %) deram origem a 373 (2,08 %) plantas verdes. No ano de 1997, 480 anteras foram incubadas. Destas, 362 (5,11 %) foram responsivas, resultando em 112 plantas verdes (1,5 %). Em novembro deste mesmo ano, testou-se o meio FHGA gelificado com amido hidrolisado (30 g/l) ou com gelrite (2 g/l), ambos comparados com o meio N6. Os resultados revelaram que, das 12.547 anteras incubadas, as porcentagens de anteras responsivas foram de 19,68 % no meio N6 e de 23,45 % no meio FHGA (14,60 % gelificado com gelrite e 8,85 % com amido). A partir desses resultados, em 1998 usou-se somente o meio FHGA. Das 18.654 anteras incubadas, oriundas de 32 cruzamentos e 6 linhagens, 5.142 (22,5 %) foram responsivas, resultando em 908 genótipos haplodiplóides. A Tabela 1 apresenta a porcentagem de anteras responsivas nos melhores híbridos F_1 com relação aos meios N6 e FHGA.

Durante todo o período, a porcentagem de plantas albinas variou de zero a 10,72 %. A duplicação espontânea dos genomas ocorreu em 55 % das plantas verdes, tornando desnecessário o tratamento com colchicina.

Conclusões

A incorporação da técnica de haplodiploidização ao programa de melhoramento de cevada, na Embrapa Trigo, apresenta-se como excelente ferramenta para a necessidade de obtenção, em curto período de tempo, de valiosos germoplasmas. Até o momento, foram obtidos 2.209 genótipos androgenéticos de cevada, e os melhores meios foram o FHGA para a indução das estruturas embrionárias e o Batata 2 para a regeneração. Os testes preliminares em campo, das linhagens DHC (duplo-haplóides de cevada) obtidas, mostraram, após a multiplicação dos grãos, grande variabilidade para caracteres agrônômicos (ciclo, altura, tipo agrônômico), para reação a doenças fúngicas (mancha-em-rede, mancha marrom e ferrugem da folha) e para esterilidade causada por estresse ambiental. No ano de 1999, estão previstos ensaios em campo com cerca de 50 linhagens haplodiplóides, uma vez que estas apresentaram resultados animadores nas avaliações preliminares. Serão também multiplicadas as sementes provenientes dos genótipos obtidos em 1998, para avaliações no ano 2000.

Referências Bibliográficas

- CHU, C.-C. The N_6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, 1978, Peking. **Proceedings...** Boston: Pitman Advanced Publishing Program, 1981. p.43-50. (The Pitman International Series in Applied Biology).
- CHUANG, C.-C.; OUYANG, T.-W.; CHIA, H.; CHOU, S.-M.; CHING, C.-K. A set of potato media for wheat anther culture. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, 1978, Peking.. **Proceedings...** Boston: Pitman Advanced Publishing Program, 1981. p.51-56. (The Pitman International Series in Applied Biology).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

Tabela 1. Genótipos híbridos F₁ de cevada mais responsivos à cultura de anteras, no período de 1993 a 1998, na Embrapa Trigo

Genótipo/Cruzamento	% de anteras responsivas	Meio de cultura
PFC 9477/PFC 9205	18	N6
PFC 9477/PFC 9303	20	N6
CAPA/PFC 9202	24	N6
KLEIN/PFC 9216	29	N6
AF 279/PFC 9104	34	N6
PFC 85107/PFC 9104	37	N6
MN 668/PFC 9104	40	N6
BR 2/PFC 9104	45	N6
PFC 9112/PFC 88154	45	N6
PFC 9204/PFC9205//PFC 9463	52	N6
NYB 863-22/CEV 95081	40	FHGA
PFC 9213/Turingia	43	FHGA
PFC 8565/PFC 9213	44	FHGA
PFC 9213/Embrapa 128	50	FHGA
CEV 95076/Embrapa 128	52	FHGA
PFC 8565/Embrapa 129	56	FHGA
PFC 9213/Embrapa 127	57	FHGA
PFC 8631/BR 2	60	FHGA
PFC 8562/PFC 9213	66	FHGA
PFC 8565/BR 2	73	FHGA