

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Cultura de anteras e
embriogênese de genótipos
selecionados de cevada
(*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*)

Ana Cristina Mazzocato



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Botânica

Cultura de anteras e embriogênese de genótipos selecionados de cevada (*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*)

Ana Cristina Mazzocato

Bióloga pela UFSM

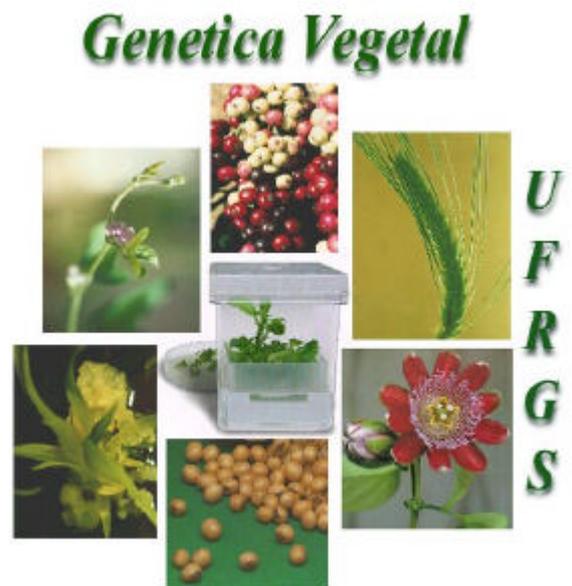
Mestre em Fitotecnia pelo PPG Agronomia - UFRGS

Tese submetida ao Programa
de Pós-Graduação em
Botânica como um dos
requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Ciências:
Botânica

Orientador: Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Co-orientadora: Profa. Dra. Helga Winge

Porto Alegre, 2005



Este trabalho foi integralmente desenvolvido no Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica e nos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais e Citogenética Vegetal do Departamento de Genética. Os órgãos financiadores foram a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Convênio C. C. Brahma - Maltaria Navegantes/ UFRGS; Convênio AmBev – Maltaria Navegantes/ UFRGS e FAPERGS.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, que sempre com muito amor me ensinaram a lutar muito por tudo o que sonhei, e que muitas vezes deixaram de realizar os seus próprios sonhos em função dos meus...

Sempre lembro do meu pai dizer: "Nada é fácil na vida, mas também nada é impossível para que não possamos realizar".

Obrigada aos meus grandes exemplos de vida: Severino e Ereni Mazzocato.



I sogni sono
come le conchiglie
che il mare
ha depositato sulla riva.

Bisogna raccoglierle
ed ascoltare
la loro voce

*Romano
Battaglia*

AURORABLU.IT

*Os sonhos são
como as conchas
que o mar
depositou sobre a areia.
É necessário recolhê-las
e escutar a sua voz.*

Romano Battaglia

SUMÁRIO

Agradecimentos	x
Resumo	xii
Abstract	xiv
Considerações Preliminares	1
1 – Introdução	2
1.1 – Caracterização da espécie e subespécies de cevada	3
1.2 – Importância econômica da cevada cultivada	6
1.3 – Melhoramento da cevada	7
1.4 – Produção de plantas haplóides via cultura de anteras	9
1.5 – Desenvolvimento do micrósporo e do grão de pólen	15
1.6 – Rotas alternativas do micrósporo e do grão de pólen	17
1.7 – Citologia dos micrósporos e grãos de pólen de cevada ...	20
1.8 – Histologia da antera	22
1.9 – Estudos histológicos em órgãos cultivados <i>in vitro</i>	24
Objetivos	27
2 – Material e Métodos	29
2.1 – Material	30
2.1.1 – Obtenção das linhagens selecionadas	30
2.2 – Métodos	31
2.2.1 – Cultura de anteras de cevada e 3 ^a geração de seleção	31
• Coleta de espigas para a cultura de anteras.....	32
• Pré-tratamento à baixa temperatura.....	35

•	Determinação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos e dos grãos de	35
•	Cultivo <i>in vitro</i> das anteras	36
a)	Meios de cultura	36
b)	Indução da embriogênese do micrósporo e do grão de pólen	36
c)	Exame das anteras em cultivo	40
•	Transferência de estruturas embriogênicas – Regeneração-I	42
	Regeneração-II	43
•	Transferência das plântulas verdes para vermiculita	43
•	Determinação do nível de ploidia das plantas verdes regeneradas	44
•	Transferência das plantas para recipientes com substrato	44
•	Análises estatísticas	45
2.2.2 –	Escolha das linhagens e espigas para as análises cito-e histológicas	46
2.2.3 –	Análises Citológicas	47
•	Análise estatística.....	50
2.2.4 –	Análises histológicas	51
•	Análises estatísticas.....	55
3 –	Resultados	58
3.1 –	Cultura de anteras de cevada	59
•	Etapa da coleta de espigas e determinação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos e grãos de	59
•	Etapa da indução de estruturas embriogênicas	60
•	Etapa de regeneração de plântulas verdes	65
•	Etapa de regeneração de plantas adultas	68
3.2 –	Análise citológica da cultivar MN-599 de cevada	73
3.3 –	Análise histológica e comparações pontuais com a análise citológica da cultivar MN-599 de cevada.....	89
3.4 –	Análise histológica das linhagens selecionadas de cevada	122
3.4.1 –	Linhagem S ₃ A23	122

3.4.2 – Linhagem S ₃ A22	130
3.4.3 – Linhagem S ₃ B63	137
3.5 – Análise comparativa das linhagens selecionadas e da cultivar MN-599.....	143
4 – Discussão	149
4.1 – Cultura de anteras de cevada	150
• Etapa da coleta de espigas e determinação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos/grãos de	150
• Etapa da indução da embriogênese.....	153
• Etapa da regeneração de plântulas verdes	159
• Etapa da regeneração de plantas adultas	162
4.2 – Análise citológica da cultivar MN-599 de cevada	165
4.3 – Análise histológica e comparações pontuais com a análise citológica da cultivar MN-599 de cevada	172
4.4 – Análise histológica de linhagens selecionadas (cultivares de cevada A-05 e BR-2)	184
• Linhagem S ₃ A23.....	184
• Linhagem S ₃ A22.....	186
• Linhagem S ₃ B63.....	188
4.5 – Análise comparativa das linhagens selecionadas e da cultivar MN-599	189
5 – Considerações Finais	197
6 – Trabalhos Futuros	202
7 – Referências Bibliográficas	209

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, por terem acreditado em mim. Ao Mariath por ter concordado em trabalhar com embriogênese em cevada, pela confiança e pela amizade, sem contar os momentos divertidos que passamos juntos. À Helga por sempre ter confiado em mim, pelo apoio imprescindível em retomar esse trabalho no doutorado, e também, pela amizade adquirida durante todos os anos de convivência.

Aos professores que contribuíram para a minha formação, pelos conhecimentos e incentivo para a realização desse trabalho. Gostaria também de agradecer ao prof. Jarenkow, Coordenador do PPG-Botânica, pela paciência e disponibilidade, e especialmente aos componentes da banca.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg) pelo apoio, amizade e companheirismo, especialmente às “corujas” que em muitas noites me acompanharam no lab: Alba, Bibi, Diana e Adriano. Todos foram (e ainda são!!!) especiais para mim: Karen, João, Jaque, Fredi, Ju, Clarice, Alexandra, Cecília, Rinaldo, Evelise, Rivete, Dani, Marco...

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT) e do Laboratório de Citogenética, ambos do Departamento de Genética. Agradecimento especial à Sílvia, Mozart, Eliana, Juliana e Eliane.

Aos meus colegas de curso pelos conhecimentos compartilhados e pelas palavras de carinho, tornando essa etapa muito mais agradável.

À professora Vera Gayeski e ao pessoal do Laboratório da *Drosophila*, Departamento de Genética, pela utilização do microscópio estereoscópico.

À minha amiga estatística Norma de Souza pela imprescindível disponibilidade e carinho dispensados nos momentos da análise estatística. Muito obrigada pela paciência!!!!

À Denise B. Ramos primeiramente pela nossa grande amizade adquirida durante os agradáveis dias de trabalho na Cito, e também, pela ajuda na realização da etapa da análise citológica.

À Lia R. Rodrigues pelas longas discussões sobre o assunto, tanto por telefone quanto pessoalmente, e também, pela amizade e incentivo.

À Angelita pela paciência, amizade e disponibilidade no auxílio da formatação da tese, sem contar com as inúmeras ajudas na bibliografia.

Aos funcionários da UFRGS, especialmente aos seguranças Alex e Marcelo, que sempre se disponibilizaram a me acompanhar nas “famosas escadarias”. Também, um agradecimento especial ao Sr. Astrogildo, segurança do Instituto de Informática, pela amizade adquirida. À Dilma pela correção das Referências Bibliográficas.

Aos funcionários do Bar do Ildo, pela amizade e paciência em me escutarem.

Às pessoas que me enviaram material para a qualificação: Elci Henz Franco e Juçara Paranhos, minhas amigas e orientadoras de Santa Maria, e ao Flávio. Agradeço também ao Prof. Arthur Fett-Neto pelas valiosas explicações e ao incentivo dos amigos nessa etapa, especialmente a Rose, Lia, e ao pessoal do laboratório. Agradecimento especial aos professores da banca: Maria Helena Zanettini, Paulo Luiz de Oliveira e Rinaldo Pires dos Santos, pelas

discussões, valiosas para o meu amadurecimento com relação ao assunto da tese.

Aos amigos: Diana, Carol, Adriano, Paulo, Anderson, Ednair e Elizete (o grupo "estrangeiro"), e a TODOS os demais amigos, que sem o apoio deles, essa tese teria sido mais difícil de ser realizada. Não poderia esquecer de agradecer à minha "mãe adotiva", Alba Lins, uma pessoa maravilhosa, que além de colega de laboratório se tornou mais do que uma amiga, uma verdadeira "mãe" para mim.

Aos meus pais, Severino e Ereni Mazzocato e meus irmãos, Ana Paula e Gustavo, que sempre com muito amor e paciência souberam lidar com esse momento delicado, tentando, como sempre, superar a minha grande ausência. Não tenho nem palavras..... Muito obrigada por tudo o que fizeram até hoje por mim!!!!

À minha família em geral, que teve paciência para entender a minha ausência. Obrigada pelo amor, pelas orações, pensamento positivo e por sempre acreditarem em mim.

Ao Flávio pelo amor, confiança, paciência e, principalmente, por me agüentar nos últimos momentos da tese... Quantas noites mal-dormidas! Ah! Não poderia esquecer de agradecer também pelos valiosos artigos enviados da UNICAMP.

À família Pavan, pelo amor, orações e força, fazendo com que eu já me sentisse inteiramente pertencente a essa família.

À Laize e Telmo, meus primos e amigos, que me deram força e uma grande ajuda com a bibliografia na USP.

À minha "nova família" Mazzocato, especialmente ao tio Bernardino, Lívia, Guilherme e Dudu; e aos italianos, meus grandes amigos virtuais: Gian Domenico, Elio e Giacomo. Ao tio Bernardino meu agradecimento especial, juntamente com a D. Cecília, por terem me proporcionado várias sextas-feiras agradáveis e acolhedoras, fazendo com que eu me sentisse em família, mesmo longe dos meus pais.

Aos meus amigos e colegas do curso de italiano, especialmente aos professores que foram solidários em relação aos meus atrasos em função da tese, e às minhas amigas, Maria e Marcelle, que sempre me acompanharam desde o início, me incentivando em todos os aspectos.

Ao pessoal do Yoga, especialmente ao professor André, amigo que me consolou em momentos difíceis e me ensinou a viver o presente, e às amigas Michele Poletto e Silma Rocha (Leni). À Leni também por ter me ajudado a entender melhor esse lado espiritual, me incentivando, consolando e fazendo com que eu acreditasse que as coisas acontecem no momento certo. Esse agradecimento é extensivo aos amigos Weldon, Terezinha, Bruna e Maria.

À família Mariath, sempre tão solidária e paciente comigo. Nunca vou esquecer aquela tarde do chá inglês.

Aos meus novos amigos..... Em especial à Darlise Brufatto (a Lise!!!), minha companheira de "tese", ao Marco Candolo, pela "assistência" no computador e pela nossa grande amizade, e ao Jonathan Gordon, grande amigo e incentivador.

À CAPES pela bolsa concedida.

Às agências financiadoras do projeto: CNPq, Fapergs, Convênio UFRGS/Maltaria Navegantes – AmBev.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização dessa tese.

RESUMO

A eficiência da técnica de cultura de anteras, em escala comercial, ainda pode ser considerada baixa quando medida em número de plantas duplo-haplóides férteis obtidas para cada antera estabelecida *in vitro*. Dessa forma, o presente trabalho é pioneiro no estudo detalhado da embriogênese *in vitro* do micrósporo e do grão de pólen de cevada (*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*). Com o objetivo de contribuir para o aperfeiçoamento da técnica de cultura de anteras foi analisada a embriogênese, com especial ênfase na etapa da indução, através de análises citológicas e histológicas de anteras cultivadas *in vitro*. Foram analisadas uma cultivar brasileira de cevada, em comparação com linhagens de duas outras cultivares brasileiras, que foram selecionadas, por seleção divergente para maior ou para menor resposta na indução da rota embriogênica e, respectivamente, para menor ou para maior capacidade de regenerar plântulas verdes. Somente foram estabelecidas em cultivo *in vitro* as anteras que apresentaram micrósporos e pólenes jovens, das linhagens selecionadas da cultivar A-05 (S₃A22 e S₃A23), e da cultivar BR-2(S₃B63 e, apenas na cultura de anteras, S₃B61), bem como da cultivar MN-599 (não-selecionada). Para as análises histológicas, foram fixadas, a cada dois dias, duas anteras, correspondentes a cada fileira da mesma espiga, após o início do cultivo *in vitro*. As anteras em cultivo e respectivas estruturas multicelulares foram fixadas em FAA 50%, desidratadas em série etílica e incluídas em hidroxietilmetacrilato. Os blocos de resina polimerizada foram seccionados longitudinalmente com 3 µm de espessura. Para as análises citológicas foram fixadas, de cada espiga recém-coletada, três espiguetas sendo uma da base, outra do meio e outra do ápice. Após o pré-tratamento à baixa temperatura (5 °C), porém antes do cultivo *in vitro*, foram fixadas três anteras (amostras utilizadas como controles). A cada três dias, durante o cultivo, três anteras foram fixadas (até 18 dias). As anteras em cultivo e estruturas multicelulares foram fixadas em Farmer e FAA 50%, transferidas após 24 horas para etanol 70%. Na cultura *in vitro* das anteras houve diferenças entre uma das linhagens da cultivar A-05 em relação a cultivar MN-599, na produção inicial de estruturas embriogênicas, diferença que desapareceu na produção total. Entretanto, houve diferenças na formação dos

embriões: a cv.MN-599 formou embriões bem diferenciados ao passo que a linhagem S₃A22 produziu um número aparentemente menor, sendo que os embriões não eram bem diferenciados. A linhagem S₃B63 não apresentou embriões até o final da análise histológica. Considerando que a amostra dessa linhagem, mantida em cultura, formou plantas verdes, pode-se propor que a formação de embriões deve ocorrer posteriormente ao desenvolvimento da cv.MN-599. Cabe destacar que houve diferenças significativas entre as cultivares A-05 e BR-2 quanto à regeneração de plântulas verdes. Esses resultados indicam ter havido maior eficiência da seleção em relação à etapa da regeneração. Com relação às categorias classificatórias dos micrósporos e grãos de pólen, constatou-se que desde o início da análise histológica (2^o dia de cultivo *in vitro*) até o final (34^o dia), foram observados micrósporos, o mesmo tendo sido observado na análise citológica. Os grãos de pólen multinucleados ocorreram praticamente em todo o período de cultivo *in vitro*, em ambas análises; não ocorrendo nos controles da citologia (antes do cultivo); os multinucleados foram observados a partir do 3^o dia, enquanto que os multicelulares a partir do 4^o dia de cultivo. As estruturas multicelulares foram observadas a partir do 8^o dia. A quantidade e o tamanho das estruturas multicelulares foram variáveis ao longo da análise histológica, sendo que do 14^o ao 20^o dia foram encontradas as de maiores dimensões, resultantes da proliferação celular por mitoses sucessivas. A partir do 22^o dia (cultivar MN-599), a ocorrência de estruturas multicelulares no interior dos lóculos da antera diminuiu, predominando o processo de proliferação externo às anteras. Para as linhagens, a partir do 18^o dia foram observadas estruturas multicelulares liberadas das anteras. A análise das estruturas multicelulares permitiu classificá-las em quatro categorias: 1. SFD: Sem forma definida; 2. MAC: meristema apical caulinar; 3. MAR: meristema apical radical embrionário adventício; e 4. Embriões. As estruturas amorfas apareceram em maior número, quando comparadas com as outras categorias. Em síntese: as linhagens selecionadas e a cultivar diferiram não apenas no tempo necessário para a formação dos embriões, mas também no desenvolvimento dos mesmos, que foi mais diferenciado na cultivar MN-599, porém sendo observados mais cedo na linhagem S₃A22 e S₃A23, do que na cultivar MN-599.

ABSTRACT

The efficiency of anther culture technique, on a commercial scale, can be considered low when the number of fertile double-haploid plants obtained from single anthers established *in vitro* is evaluated. The present work pioneers a detailed study of *in vitro* microspores and young pollen embryogenesis of barley (*Hordeum vulgare* L ssp. *vulgare*). Aiming for the improvement of anther culture technique, cytological and histological analyses of barley *in vitro* embryogenesis were made, with special emphasis on the induction stage. A Brazilian cultivar of barley (MN-599) was compared with strains of two other cultivars, previously selected, for three generations, for divergent responses to the induction process of *in vitro* culture, as well as to green plant regeneration, i.e. better response to induction and worse to green plant regeneration (strains S₃A22 and S₃A23 selected from cultivar A-05) or worse response to induction and better to green plant regeneration (S₃B63 and S₃B61 – the last one only analyzed for anther culture; both obtained from cv. BR-2). Only anthers with microspores and young pollen grains were cultured *in vitro*. For the histological analyses, two anthers from each row of the same spike were fixed, every two days after the beginning of *in vitro* culture. Anthers and respective multicellular structures were fixed in 50% FAA, dehydrated in ethylic series and included in hydroxyethylmetacrylate. The blocks of polymerized resin were longitudinally cut into 3µm thick sections. For the cytological analyses, three spikelets were fixed, one from the base, other from the middle and another from the top of each just collected spike. After the low temperature (5 °C) pretreatment, but before *in vitro* culture, three anthers (from the opposite row of each spike) were fixed. These two samples were used as controls. Every three days after the beginning of *in vitro* culture, three anthers were fixed – until the 18th day. Anthers and multicellular structures from *in vitro* culture were fixed in Farmer or 50% FAA and transferred to 70% ethanol after 24 hours. Differences were observed between *in vitro* cultivated anthers of one strain of cv A-05 and cultivar MN-599, in their initial production of embryogenic structures, but the total, final production did not differ. But differences were observed between cultivar MN-599 and strain S₃A22 in embryo formation: cv. MN-599 produced well-

differentiated embryos, but embryos of strain S₃A22, besides in smaller number, were less differentiated. No embryo was found in all histologically analyzed samples of strain S₃B63. However, considering that another sample of this same strain also cultivated *in vitro* generated green plants, one can propose that embryos formation does occur but later than in cv. MN-599, after 34 days in culture. One should emphasize that significant differences were found between the cultivars A-05 and BR-2 as for green plant generation. These results indicate that selection was more efficient for the plant regeneration step than for the induction phase. As for the results of *in vitro* culture of microspores and pollen grains, it was observed that, from the first sample of histological analyses (2nd day of *in vitro* culture) until the last one (34th day in culture), microspores were always present; the same was observed for the cytological analyses. Multinucleated pollen grains were observed at almost all analyzed samples; but they did not occur in the two controls of cytological analyses – i.e. before *in vitro* culture. Multinucleated grains were observed, in culture, from the 3rd day on. Multicellular were present *in vitro* culture from the 4th day on. Multicellular structures were first observed at 8th day. Multicellular structures varied in number and size at different samples of histological analysis, reaching the largest size from the 14th to the 20th day, as a result of cell proliferation due to successive mitoses. From the 22nd day on, in cultivar MN-599, there was a decrease in number of multicellular structures inside the anther loculi, but an increase and predominance of proliferation outside the anthers. As for the strains, from the 18th day on, multicellular structures liberated from the anthers were observed. The analyses of multicellular structures allowed to classify them in four classes: 1. SFD = without a defined shape; 2. MAC = shoot apical meristem; 3. MAR = adventitious embryony apical root meristem; and 4. Embryos. The largest class was that of amorphous structures, when compared with the remaining classes. Summarizing, it was shown that the selected strains and the non-selected cultivar differed, not only in time needed for embryos formation, but also in the degree of embryo differentiation; embryos of cultivar MN-599 were well-differentiated, what was not observed for strain S₃A22 and S₃A23; however these strains produced embryos earlier than the cultivar.

CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

A tese foi escrita na forma tradicional devido ao interesse em manter o registro dos detalhes das análises, bem como da ordem cronológica das etapas do trabalho, visando futuras pesquisas complementares. Para tanto, é importante ressaltar que para a posterior publicação dos artigos científicos o texto será reformatado de acordo com as normas da(s) revista(s). As estampas estão configuradas conforme a formatação da(s) revista(s) pretendida(s) para a publicação de cada etapa do trabalho, o que agilizará a publicação dos artigos resultantes da tese.

1 - INTRODUÇÃO



1.1 – Caracterização da espécie e subespécies de cevada

A cevada pertence à tribo *Triticeae* da família *Poaceae*. O gênero *Hordeum* é reconhecido como um grupo monofilético, sendo composto por 32 espécies, incluindo diplóides, tetraplóides e hexaplóides, com um número básico de sete cromossomos (Bothmer, 1991; Bothmer *et al.*, 1995). Essas espécies incluem formas anuais, perenes (constituem a maioria), autógamas e alógamas, que habitam a maior parte das áreas temperadas, nos hemisférios norte e sul, estendendo-se às áreas subtropicais na América do Sul (sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile), regiões árticas na América do Norte e Ásia Central. Algumas espécies ocorrem a mais de 4500 metros acima do nível do mar, nos Andes e Himalaia. A maior concentração de espécies encontra-se no sul da América do Sul, com 17 espécies nativas (Bothmer *et al.*, 1995).

A única espécie cultivada do gênero, *Hordeum vulgare* L., é diplóide com $2n=2x=14$ cromossomos, monóica, autógama e constituída por duas subespécies, *vulgare* e *spontaneum*. *Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare* inclui todas as formas cultivadas, enquanto a outra é constituída pelas cevadas selvagens, interférteis com as da ssp. *vulgare* (revisão em Minella, 1999). A subespécie *Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare* foi domesticada de raças selvagens de *Hordeum vulgare* L. ssp. *spontaneum*, não ocorrendo barreira reprodutiva entre elas.

A cevada cultivada é anual e de autopolinização. As inflorescências (espigas) são formadas por uma sucessão de espiguetas, que formam tríades ligadas ao nó da raque, de maneira oposta dística, em cada lado da raque (Figura 1). Nas cevadas com duas fileiras de espiguetas, as flores laterais de cada tríade de espiguetas são inférteis; na cevada de seis fileiras de espiguetas, todas as flores das tríades de espiguetas são férteis.

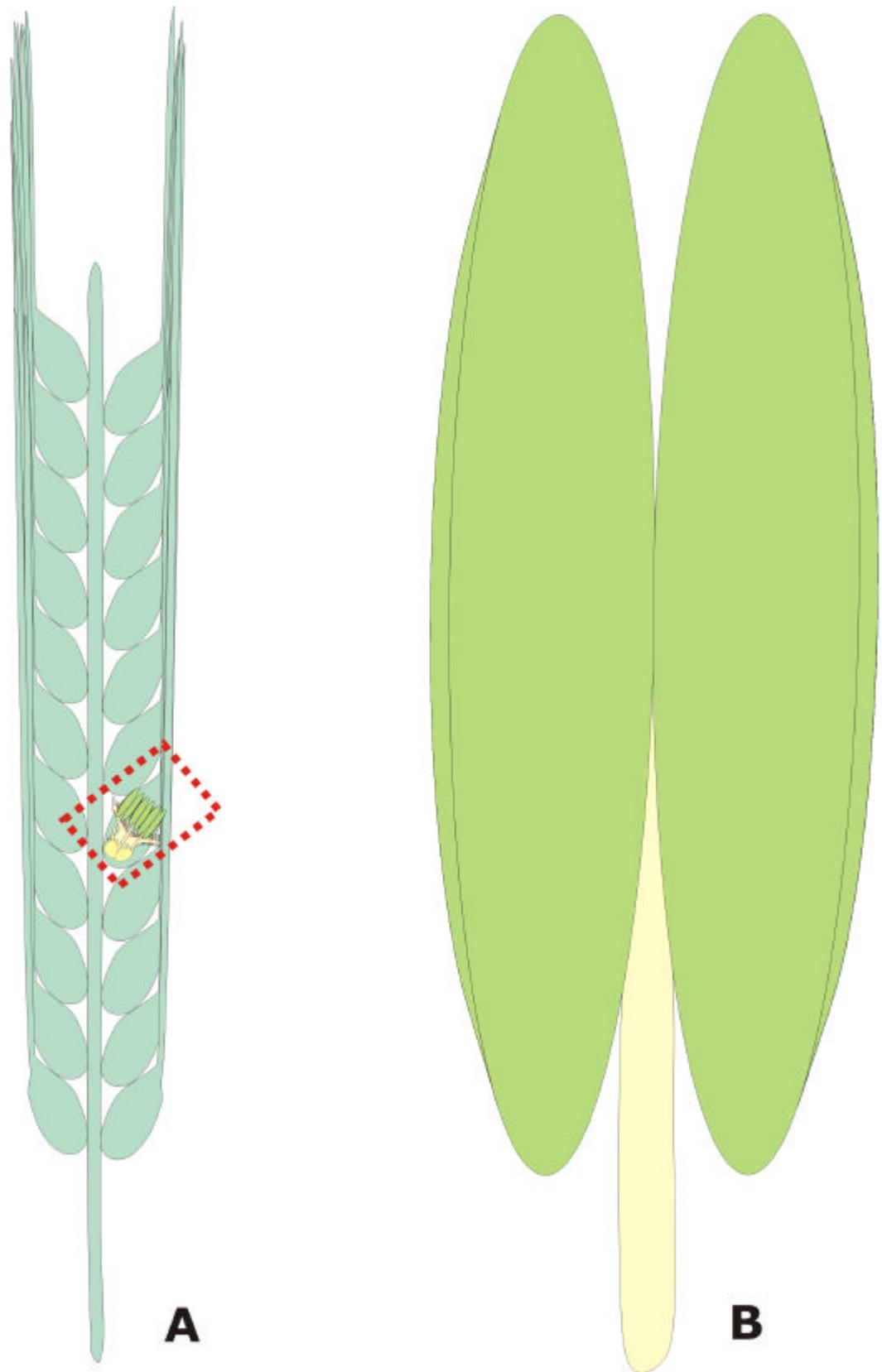


Figura 1 - A) Esquema simplificado de uma espiga de cevada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*), mostrando a posição das espiguetas férteis na raque da espiga. **B)** Antera em destaque.

As espiguetas consistem de lema e pálea, sendo esta tão longa quanto ou muito mais reduzida que o corpo da lema (Bothmer & Jacobsen, 1985).

Esta cultura é originária do Oriente próximo (Dunwell, 1986), onde foram encontradas evidências arqueológicas de cevadas de duas fileiras de espiguetas e grãos cobertos, de mais de 8000 anos atrás. Foi introduzida com sucesso nas Américas, no século XVI (Hancock, 1992).

Segundo Harlan (1976), todas as formas selvagens de *Hordeum* são espécies com espigas de duas fileiras de espiguetas. Sob domesticação, há mais de 8.000 anos, apareceram cevadas de seis fileiras de espiguetas, em que todas as três espiguetas, de cada nó, produzem grãos.

De acordo com Hancock (1992), entre as formas cultivadas há as que possuem seis fileiras ao invés de duas fileiras de espiguetas, são portadoras de uma única mutação recessiva (vv), podendo apresentar também um gene recessivo (n) que permite que as cascas dos grãos sejam facilmente removidas. A cevada de grão nu é mais aceitável como alimento humano, sendo essas cultivares as preferidas nas regiões onde a cevada faz parte da dieta alimentar (Harlan, 1976).

Este cereal é considerado uma cultura de estação fria, de ciclo de vida curto e de grande capacidade reprodutiva, sendo mais facilmente adaptado, que a maioria dos cereais, a grande amplitude de ambientes em função dessas características (Brown, 1983; Dunwell, 1986).

Apesar da cevada cultivada apresentar um grande potencial adaptativo, ela é extremamente sensível à presença de alumínio (Al^{3+}) no solo, o qual tem levado a uma severa limitação da produção dessa cultura no Brasil, onde níveis tóxicos do metal ocorrem em mais de 50% das áreas agriculturáveis (Olmos & Camargo, 1976).

1.2 - Importância econômica da cevada cultivada

A cevada foi uma das primeiras plantas domesticadas para a alimentação humana, sendo o cereal mais antigo em cultivo (revisão em Minella, 1999). É hoje a quinta maior cultura mundial e a quarta cultura entre os cereais (Hancock, 1992), com média anual de, aproximadamente, 170 milhões de toneladas (FAO, 1995), quantidade que vem sendo mantida (Minella, 1996). Em termos mundiais, seu uso principal é na alimentação animal, como grão forrageiro, pastagem, feno e silagem. O segundo maior uso é na produção de malte, consumindo cerca de 20 milhões de toneladas anualmente. A alimentação humana representa o terceiro maior uso, sendo consumida na forma integral, de malte ou de farinha (revisão em Minella, 1999). No Brasil, a quase totalidade da produção serve de matéria-prima para obtenção de malte para produção de cerveja.

Entretanto, a quantidade que é produzida no país é insuficiente para a demanda da indústria cervejeira, o que tem levado à importação do produto, sendo o Brasil considerado o segundo maior importador de malte do mundo (Minella, 1996). Em virtude de sua ampla adaptação ecológica, sua utilidade como alimento humano e animal e superioridade do seu malte para obtenção de cerveja, a cevada vem se mantendo entre os grãos mais produzidos desde os primórdios da agricultura (Poehlman, 1985).

No Brasil, desde o início, a produção comercial desse cereal tem sido quase exclusivamente para consumo na indústria cervejeira, que busca a melhora da qualidade do malte, o que inclui a exigência de baixas concentrações de proteínas nos grãos (não maior do que 10 a 12%), ao contrário da exigência para o consumo na alimentação, que deve ter alta porcentagem de proteína nos grãos de cevada. Mais recentemente, algumas instituições de pesquisa, especialmente o IAC

(Instituto Agronômico de Campinas), iniciaram melhoramento de cultivares de cevada para a alimentação (Castro *et al.*, 1995).

O melhoramento da qualidade nutricional da cevada vem recebendo grande atenção. Foram descobertos genes que influenciam a quantidade e a qualidade de proteína, pois a eficiência de conversão do grão e a sua digestibilidade para o animal são consideradas críticas. Ênfase maior está sendo dada à pesquisa em busca de resistência genética a diversos patógenos da cevada (Harlan, 1976).

A falta de competitividade com outros grãos, como por exemplo o milho, faz com que a produção da cevada para outros fins não seja consolidada (Minella, 1999).

1.3 - Melhoramento da cevada

Um dos aspectos de grande importância no melhoramento da cevada é o estudo da tolerância ao alumínio, já que a cevada é considerada extremamente sensível a esse metal, como citado anteriormente.

Echart (2001) detectou a existência de um único gene de tolerância ao Al^{3+} na cultivar de cevada FM-404, ligado ao marcador de RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), Xwg464 a 21,6cM de distância (cM: centimorgan: unidade de distância relativa entre genes ligados). O marcador de Al^{3+} encontra-se no braço longo do cromossomo 4 da cevada, confirmando a localização do gene de tolerância ao Al^{3+} neste cromossomo, realizada anteriormente por Kleinhofs *et al.* (1993). Com isso, pode ser realizado melhoramento assistido (com o uso de marcadores moleculares) para a obtenção de cultivares superiores, adaptadas aos nossos solos.

Um aspecto que dificulta o melhoramento da cevada é que a variabilidade do germoplasma é bastante restrita, pois a maior parte

das cultivares brasileiras é geneticamente semelhante por parentesco (Maris, 1992), o que também ocorre em nível mundial (Peeters, 1988; Luizzi & Castro, 1991). Como há necessidade de melhoramento contínuo das cultivares para adaptá-las a novas condições ambientais, inclusive de ocorrência de pragas e moléstias, essa séria limitação da variabilidade no germoplasma da cultura traz grandes dificuldades à obtenção de novas cultivares.

Uma das técnicas que vem auxiliando o melhoramento genético da cevada é a da cultura de anteras. Embora as principais instituições brasileiras que realizam melhoramento genético da cevada, utilizem técnicas de biotecnologia, como a cultura *in vitro* de anteras, esta técnica certamente necessita de aperfeiçoamento para aumentar sua eficiência, que ainda pode ser considerada baixa.

A cultura de anteras, uma das técnicas de grande utilidade para o melhoramento de gramíneas de autopolinização, como é o caso da cevada, envolve a cultura *in vitro* de anteras de plantas F₁ de cruzamentos controlados, com a conseqüente obtenção de plantas duplo-haplóides. Em cevada, a taxa de duplicação espontânea dos cromossomos, em geral, é superior a 50%. A principal vantagem dessa técnica é a redução do tempo para o lançamento de uma nova cultivar, principalmente devido ao grande aumento da eficiência na seleção de combinações genéticas desejadas, presentes nos micrósporos de plantas F₁ ou qualquer geração segregante de cruzamentos intercultivares. No método convencional de melhoramento, essas combinações são facilmente desfeitas com a segregação ao longo das numerosas gerações de seleção.

No Brasil o melhoramento da cevada vem sendo realizado no CNPT (Centro Nacional de Pesquisa de Trigo) – Embrapa (Passo Fundo – RS) por um grupo de pesquisadores que mantêm colaborações e contatos com outros grupos, como por exemplo, o IAPAR (Instituto Agrônomo Paranaense), a Maltaria Navegantes – AmBev (Companhia

de Bebidas das Américas), com a qual as equipes da UFRGS (Instituto de Biociências e Faculdade de Agronomia) colaboram, e a FAPA (Fundação Agronômica de Pesquisa do Paraná). Atualmente, são esses os grupos de pesquisa que estão trabalhando diretamente com o melhoramento da cevada cervejeira no Brasil. Em Campinas – SP, o IAC (Instituto Agronômico de Campinas) possui um grupo de pesquisadores dedicados ao melhoramento de cultivares de cevada para a alimentação (Castro *et al.*, 1995).

Dentre as formas de melhoramento existentes, podem ser citadas: melhoramento clássico (convencional), melhoramento a partir da produção de plantas haplóides e também envolvendo transferência de DNA exógeno.

Nesta tese será tratada somente a técnica da produção de haplóides via cultura de anteras.

1.4 – Produção de plantas haplóides via cultura de anteras

Haplóides (monoplóides) são organismos ou células que possuem somente um conjunto completo de cromossomos (n) ou um genoma (Snustad *et al.*, 1997).

Os organismos haplóides são desejáveis por duas razões: mutações induzidas são todas prontamente detectáveis e, por duplicação de seus cromossomos, com colchicina, por exemplo, obtêm-se diretamente indivíduos homocigotos para todos os genes (Nitsch & Nitsch, 1969).

Portanto, a produção de haplóides com novas combinações desejadas, em alta frequência, é de grande valor para melhoristas e geneticistas, por ser a forma mais rápida de avançar em linhagens

selecionadas para completar a homozigose e aumentar a eficiência da seleção (Snape & Simpson, 1981).

Os haplóides podem ocorrer espontaneamente na natureza ou serem induzidos experimentalmente, por várias técnicas, dentre as quais pode ser citada a cultura de anteras *in vitro* (Bajaj, 1983).

A técnica de cultura de anteras, basicamente, consiste em estimular, através do cultivo *in vitro*, em meio de cultura com composição química especial (que inclui sais minerais, vitaminas e fitorreguladores adequados), o micrósporo ou o grão de pólen jovem a dividir-se continuamente, formando calos embriogênicos ou embriões.

Dessa forma, a cultura de anteras apresenta-se como uma ferramenta alternativa em relação ao melhoramento genético convencional, permitindo o desvio da rota gametofítica (que forma o grão de pólen) para a esporofítica (onde um pólen jovem retoma as divisões mitóticas podendo formar um embrião).

Tanto micrósporos quanto gametófitos (grãos de pólen jovens) podem ser estabelecidos *in vitro* para indução da embriogênese. Os micrósporos geralmente ingressam na microgametogênese por meio de uma divisão celular típica (assimétrica) ou atípica (simétrica), como um passo inicial para a embriogênese. Nos gametófitos, a embriogênese pode partir de divisões da célula vegetativa, generativa ou de ambas (Pretová *et al.*, 1993).

O primeiro protocolo de cultura de anteras de cevada foi desenvolvido pelo pesquisador alemão D. Clapham (1971, 1973). Este pesquisador observou que os micrósporos davam origem a calos que regeneravam plantas numa frequência muito baixa e, em grande parte, albinas. Posteriormente, Foroughi-Wehr *et al.* (1976) trabalhando com diferentes variedades de cevada, em diferentes épocas do ano, verificaram que o genótipo e o estado fisiológico da planta doadora eram de grande importância para o sucesso do estabelecimento do cultivo *in vitro*.

A partir dos trabalhos pioneiros citados acima, a viabilidade da aplicação da cultura de anteras em cevada ficou evidente, sendo desenvolvidos numerosos estudos, inclusive no Brasil (Stival, 1995; Assmann, 1996; Assmann & Winge, 1996; Silva *et al.*, 1997 e 2000) no sentido de aumentar a eficiência da técnica. Na Figura 2 é apresentado um esquema das etapas da cultura de anteras de cevada *in vitro* (Assmann, 1996).

Embora atualmente existam protocolos de cultura de anteras estabelecidos para a cevada, o processo da embriogênese do micrósporo e do grão de pólen ainda não está adequadamente elucidado, limitando o controle das respostas das anteras cultivadas *in vitro*, principalmente no que diz respeito à eficiência da regeneração de plantas verdes.

Esse processo permite a formação de uma planta haplóide (Raghavan, 1987) ou duplo-haplóide (Croughan, 1995) a partir de um micrósporo ou de um grão de pólen imaturo.

A cultura de anteras já foi empregada para a obtenção de calos, embrióides e plantas em mais de 247 espécies, 88 gêneros e 34 famílias. Entretanto, a pesquisa referente ao desenvolvimento de técnicas eficientes de cultivo *in vitro* de anteras restringe-se a algumas espécies de interesse comercial, como é o caso do fumo, do trigo, da cevada, do milho etc. (Peters *et al.*, 1999).

McKone & Halpern (2003) definem a androgênese como um modo de reprodução em que a progênie possui material genético nuclear oriundo somente do genitor masculino. Esses autores relatam que o referido processo foi demonstrado *in vivo* em três tipos de organismos: *Corbicula* (Corbiculidae, Bivalvia, Mollusca) e *Bacillus* (Insecta, ordem Phasmatoptera), do reino animal e *Cupressus dupreziana*, uma espécie vegetal lenhosa.

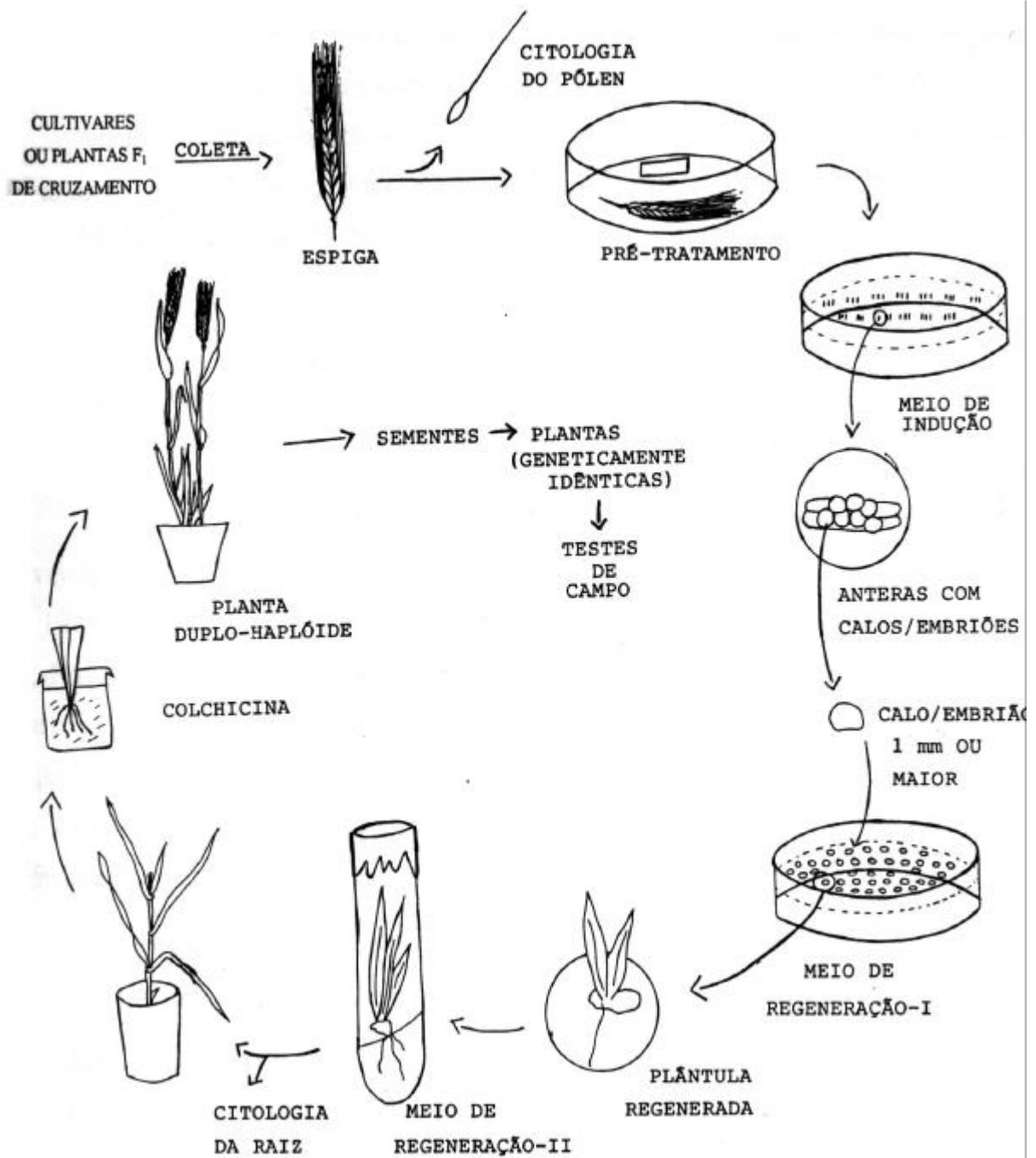


Figura 2 – Esquema das etapas da cultura de anteras de cevada *in vitro* (Assmann, 1996).

A “embriogênese do micrósporo”, “embriogênese do pólen” ou “embriogênese haplóide” (Raghavan, 1987) é o processo pelo qual micrósporos ou grãos de pólen imaturos até o estágio bicelular mudam irreversivelmente o padrão de desenvolvimento gametofítico para o esporofítico, originando plantas maduras com número cromossômico gamético (Góralski *et al.*, 1999).

Portanto, a partir do termo encontrado em maior número de citações na literatura para descrever esse evento, “androgênese”, decidiu-se utilizar um termo mais apropriado, onde estariam representados tanto os micrósporos como os grãos de pólen jovens, já que a separação de uma fase e outra é muito tênue, ainda mais quando se faz o cultivo das anteras *in vitro*. Por esse motivo são encontrados vários trabalhos na literatura onde há confusões em reconhecer e discernir a geração esporofítica da gametofítica. Desse ponto em diante será abordada a “androgênese” como “embriogênese do micrósporo e do grão de pólen”.

A embriogênese do micrósporo e do grão de pólen foi primeiramente demonstrada por Guha e Maheshwari (1964, 1966) em cultura de anteras de *Datura innoxia*, em que foram produzidas plantas haplóides.

Há duas técnicas para a produção de plantas haplóides: cultura de anteras e cultura de micrósporos e/ou grãos de pólen isolados. No momento em que se estiver realizando cultivo *in vitro* de micrósporos, podemos estar incluindo grãos de pólen imaturos, uma vez que há variação nos estádios de desenvolvimento dentro da mesma antera e principalmente entre as anteras da mesma espiga.

Nos últimos anos, a cultura de micrósporos e de grãos de pólen imaturos isolados vem despertando grande interesse da maioria dos pesquisadores por se tratar de uma técnica mais eficiente com relação à cultura de anteras. Os embriões formados certamente terão uma única origem, ao contrário da cultura de anteras que, em algumas espécies,

ocorre proliferação de origem esporofítica (Rodrigues *et al.*, 2004). Rodrigues *et al.* (2005) relatam que para a soja, *Glycine max* (L.) Merrill, os embriões obtidos tiveram origem unicelular, a partir da epiderme e da camada média, ou multicelular, do conectivo da antera. Em cevada, vários trabalhos já foram realizados mostrando a eficiência da técnica de cultivo de micrósporos isolados (Kasha *et al.*, 2001a; Kasha *et al.*, 2001b; Ritala *et al.*, 2001), inclusive no caso de genótipos considerados recalcitrantes (Li & Devaux, 2001).

Com relação à cultura de anteras de cevada, numerosos trabalhos foram realizados nesse sentido, com cultivares de primavera e de inverno, principalmente nas do hemisfério norte, entre os quais podem ser citados: Dale (1975); Dunwell *et al.* (1987) e Hoekstra *et al.* (1992).

No Brasil, como em outros países, trabalhos foram realizados visando o estabelecimento de procedimentos que aumentem a eficiência da técnica de cultura de anteras de cultivares de cevada, podendo ser citados os de Stival (1995), Assmann (1996), Assmann & Winge (1996), Mazzocato *et al.* (1998), Silva *et al.* (1997; 2000).

A resposta da embriogênese do micrósporo e do pólen é afetada por vários fatores, como a vitalidade das plantas doadoras, por ser um fator fundamental para a obtenção de bons resultados na cultura de anteras (Hoekstra *et al.*, 1992). Outro fator importante para a obtenção de respostas positivas em cultura de anteras é o tempo de duração do pré-tratamento, principalmente à baixa temperatura (Huang & Sunderland, 1982).

A composição do meio de cultura afeta de modo relevante a resposta da embriogênese. Além disso, diversos trabalhos têm mostrado interação entre o meio de cultura (composição) e o genótipo das plantas (cultivares) (Olsen, 1987; Hoekstra, 1992; Assmann, 1996; Assmann & Winge, 1996).

Ainda, Szarejko & Kasha (1991) relataram que a baixa eficiência da regeneração de plantas verdes, o albinismo e o forte efeito genético atuando sobre as respostas do material *in vitro*, são os maiores problemas para a cultura de anteras de cevada.

1.5 – Desenvolvimento do micrósporo e do grão de pólen

As flores são compostas por três principais conjuntos de órgãos apendiculares: o perianto (apêndices externos de proteção e, ou, atração de polinizadores), o androceu e o gineceu (Mariath *et al.*, 2003).

Em decorrência do assunto da tese, será abordado somente o caso do androceu.

O androceu compreende o conjunto de estames da flor. Os estames estão, freqüentemente, diferenciados em antera e filete. Em geral, os estames têm como principal função, a produção de esporos (andrósporos, ou também, micrósporos) (Mariath *et al.*, 2003).

A rota esporofítica, como o nome sugere, formará esporos (micrósporos) no final do processo, sendo, portanto, conhecida também como androsporogênese ou microsporogênese. As células-mãe de micrósporos ($2n$) são formadas durante o desenvolvimento dos estratos parietais da antera, mais precisamente pelo tecido esporogênico.

Durante o início da prófase meiótica ocorre um depósito de calose entre a plasmalema das células-mãe e a parede original dessas células. É importante enfatizar que, mesmo com esse depósito, ainda é mantida a comunicação celular, pois conexões citoplasmáticas atravessam a calose. Antes de ocorrer a meiose II, as conexões desaparecem resultando no isolamento das tétrades dentro do lóculo da antera (Mariath *et al.*, 2003).

Após, a parede de calose é dissolvida, ocorrendo a liberação de quatro micrósporos (n) a partir de cada tétrade.

O micrósporo possui um conjunto completo de informações genéticas que pode ser estimulado a expressar-se de diferentes maneiras, seguindo a rota gametofítica (desenvolvimento usual) ou a rota da embriogênese do micrósporo ou do pólen, chamada de rota alternativa.

Segundo Knox (1984), o micrósporo é o resultado da reprodução do esporófito, possuindo apenas um núcleo haplóide não-polarizado sendo que a partir da sua vacuolação, e conseqüente entrada na rota gametofítica, já é considerado um grão de pólen (ou gametófito).

A maioria dos autores menciona micrósporo como pólen e vice-versa. O micrósporo (ou andrósporo) é o resultado da esporogênese. Após sua liberação da tétrade e início da vacuolação - que pode ser o primeiro sinal morfogenético do início da gametogênese masculina - ocorre uma divisão mitótica assimétrica dando origem ao grão de pólen (ou andrófito) bicelular. As duas células do grão de pólen são a célula vegetativa (ou sifonogênica), maior e, a célula generativa (ou gametogênica), menor. Essas duas células, mesmo sendo estrutural e funcionalmente diferentes, possuem o mesmo conteúdo genético.

Portanto, quando for referido na literatura "pólen" ou "grão de pólen", o autor pode estar querendo referir-se ao micrósporo.

Posteriormente, a célula generativa divide-se formando duas células gaméticas, momento em que o andrófito é tricelular, ou seja, possui uma célula vegetativa e duas gaméticas. Segundo Raghavan (1987), em algumas plantas, especialmente em gramíneas, esta divisão é completada no grão de pólen ainda dentro da antera, mas segundo Mariath *et al.* (2003) em 70% das angiospermas estudadas, a planta gametofítica liberada (andrófito ou grão de pólen) apresenta-se bicelular, constituída pelas células vegetativa e generativa.

1.6 – Rotas alternativas do micrósporo e do grão de pólen

Na formação dos grãos de pólen, em seu processo usual, logo após a meiose, o micrósporo sofre uma divisão mitótica assimétrica, dando origem ao grão de pólen com duas células de dimensões desiguais, a célula generativa e a célula vegetativa. Normalmente a primeira das duas células divide-se novamente formando os gametas masculinos: um que fecundará a oosfera e o outro, a célula-média (Bhandari, 1984). Segundo Raghavan (1987), a divisão assimétrica inicial desencadeia uma série de eventos bioquímicos diferentes nas duas células filhas, determinando que sigam rotas de diferenciação divergentes e tenham destinos diferentes.

Entretanto, muitas angiospermas, em especial as gramíneas, podem seguir programas alternativos com divisões continuadas que conduzem à formação de estruturas embriogênicas, que podem, se cultivadas em meio adequado, gerar plântulas verdes, haplóides. O cultivo *in vitro* de anteras ou micrósporos e/ou grãos de pólen isolados, utilizando meio de cultura com composição adequada, atua como estímulo para iniciar uma rota alternativa de eventos. Pré-tratamento com baixas temperaturas, antes das anteras de cevada serem estabelecidas em meio de indução, tem sido relatado como essencial ao ingresso em rota alternativa (Wilson *et al.*, 1978). Outros tipos de pré-tratamento também são utilizados, como por exemplo, o manitol, e também, altas temperaturas aplicadas em anteras de dicotiledôneas.

Na literatura, são relatadas quatro rotas principais de desenvolvimento de embriões a partir de micrósporos e grãos de pólen (Figura 3), sendo aqui descritas segundo Sunderland & Dunwell (1974) e Bhojwani & Razdan (1983):

ROTA I ⇒ o micrósporo sofre uma divisão simétrica cujas duas células-filhas idênticas, com características do tipo vegetativo, contribuem para o desenvolvimento do esporófito haplóide.

ROTA II ⇒ nessa rota, a primeira divisão mitótica e a diferenciação são as usuais. Porém, a célula generativa não é funcional e degenera rapidamente ou após uma ou duas divisões. Apenas a célula vegetativa participa da formação do embrião. Esse modo de desenvolvimento foi relatado para várias espécies, por diversos autores, como por exemplo, em cevada por Clapham (1971), sendo posteriormente confirmado por Sunderland *et al.* (1979).

ROTA III ⇒ nessa rota, a primeira divisão mitótica e a diferenciação das duas células resultantes é a usual. Contudo, nesse caso, a embriogênese se dá somente com a contribuição da célula generativa.

ROTA IV ⇒ a primeira divisão é assimétrica e ambas as células, vegetativa e generativa, continuam a dividir-se e participam do desenvolvimento do embrião.

Independentemente do padrão inicial de segmentação, tendo ingressado na rota embriogênica, o pólen ou micrósporo sofre divisões tornando-se multicelular (Bhojwani & Razdan, 1983) e resultando, futuramente, em uma planta.

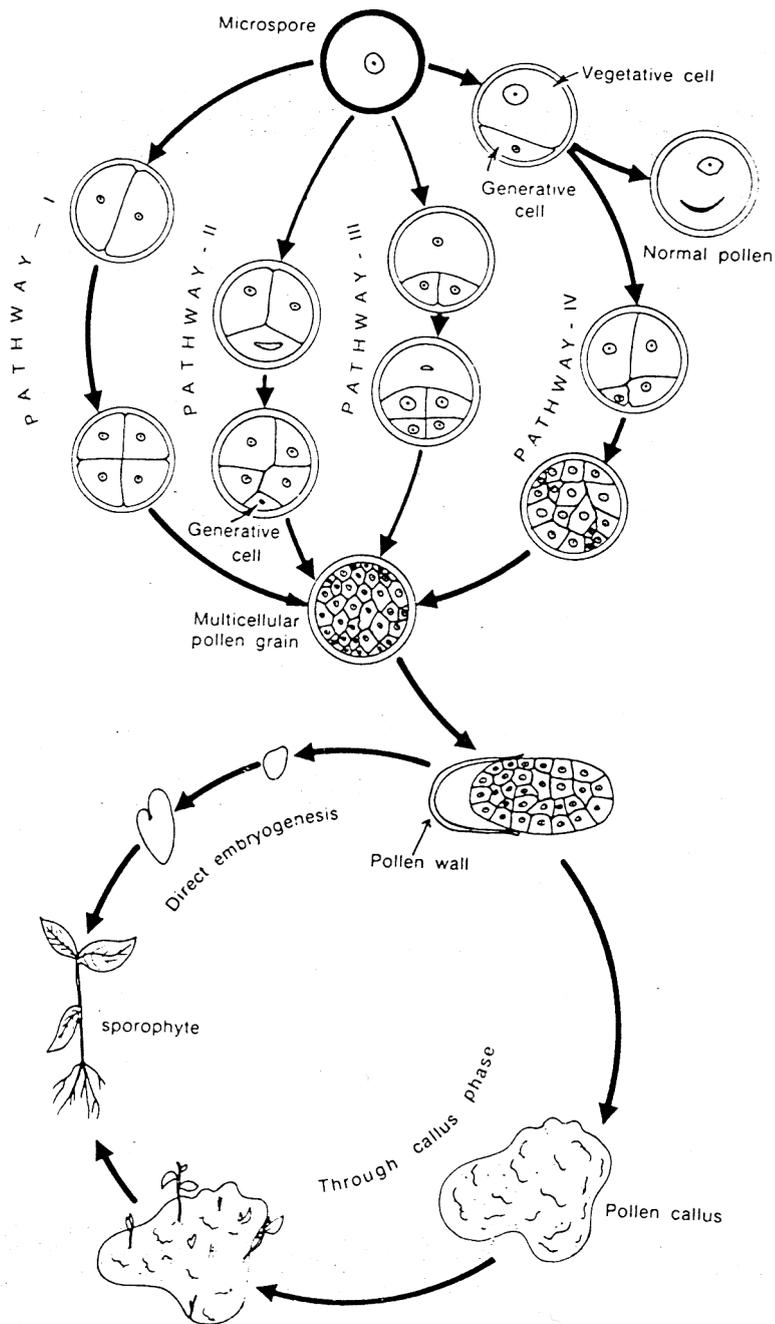


Figura 3 - Esquema das principais rotas do desenvolvimento do micrósporo e do grão de pólen *in vitro*, mostrando a embriogênese direta e a indireta, sendo que a última passa pela fase de calo antes de formar a planta (Bhojwani & Razdan, 1983).

Além da existência documentada de quatro rotas de segmentação do micrósporo e do grão de pólen, anteriormente relatadas, sabe-se atualmente que existem várias rotas de diferenciação que podem ser derivadas das quatro anteriormente descritas, resultando em vários padrões de diferenciação, como no caso proposto para cevada por Chen *et al.* (1984). Na verdade, devido aos poucos estudos na área da embriologia vegetal, não se tem confirmação de quantas rotas são possíveis e quais delas são efetivamente embriogênicas.

Os primeiros estudos para investigar a origem dos embriões haplóides mostraram que, em *Nicotiana* e *Datura*, dentre a população de grãos de pólen de uma antera, alguns possuíam dois núcleos idênticos devido à divisão simétrica, sendo estes potencialmente embriogênicos (Norreel, 1970). Desde então, vários trabalhos têm mostrado uma correlação entre a frequência da primeira divisão simétrica e a frequência de embriões haplóides, sugerindo que esse tipo de mitose seria um sinal reconhecido pela célula para ativar o programa esporofítico (Grando & Moraes-Fernandes, 1997).

Ainda com relação à Figura 3, na segunda parte, é mostrada a embriogênese direta e a indireta, sendo que a última passa pela fase de calo antes de formar uma plântula. Essa etapa de diferenciação é importante para a obtenção de plantas haplóides ou duplo-haplóides.

1.7 - Citologia dos micrósporos e grãos de pólen de cevada

Assim como em outras espécies vegetais, por exemplo, *Glycine max* (Kaltchuk-Santos *et al.*, 1993) e *Nicotiana tabacum* L. (Horner & Street, 1978; Heberle-Bors, 1982), também foi registrada em cevada (Dale, 1975; Roberts-Oehlschlager & Dunwell, 1991) a ocorrência de dimorfismo do micrósporo e andrófita (grão de pólen). São descritas

subpopulações de grãos de pólen, conhecidos como “pólen-p” ou “pólen-s”, caracterizados por serem pequenos, corarem pouco e apresentarem retardo no desenvolvimento, sendo a primeira mitose simétrica (Dale, 1975).

Embora a frequência desses grãos varie com o genótipo, com as condições ambientais de desenvolvimento e com a aplicação de gametocidas na meiose, a frequência de “pólen-p” em cevada é menor que 2%. Essa observação foi realizada por R. E. Jenkins (1987), da Universidade de East Anglia – Inglaterra, em sua tese de doutorado. De forma semelhante, Roberts-Oehlschlager & Dunwell (1991) encontraram grãos de pólen multicelulares de aproximadamente oito células numa frequência entre 5-6% do total da população de grãos de pólen de cevada, com o mesmo genótipo e crescidos sob condições similares aos do trabalho citado anteriormente.

O comportamento dos grãos de “pólen-p”, especialmente a sua divisão mitótica simétrica, levou vários autores a sugerirem que esses grãos dariam origem aos embriões haplóides obtidos em cultura.

Roberts-Oehlschlager & Dunwell (1991) analisaram, por microscopia eletrônica de varredura, os eventos iniciais da embriogênese em anteras de cevada cultivadas *in vitro*, confirmando indicações de outros autores de que os grãos de “pólen-p” localizavam-se na parte central das lojas, e não em contato com o tapete, explicando assim a forma sempre arredondada e seu tamanho menor, por deficiência de nutrição. Por outro lado, esses autores observaram que a maioria dos grãos que formaram unidades multicelulares – as estruturas (potencialmente) embriogênicas – eram grãos que estavam em contato com o tapete, e não apenas os “pólen-p”. Os referidos autores, no entanto, parecem apoiar a sugestão de Dunwell (1985) de que mesmo que os grãos de “pólen-p” não sejam os únicos potencialmente embriogênicos, eles poderiam servir como marcadores do potencial embriogênico da espiga.

Nesse sentido, Binarova *et al.* (1997) demonstraram que tanto os micrósporos quanto os grãos de pólen típicos originaram esporófitos androgenéticos *in vitro*.

Atualmente, são encontrados poucos registros sobre “pólen-p” na literatura e, quando observados nas análises, os mesmos são descritos como ocorrendo em baixa frequência, como é o caso da cevada (Ramos, 2003). Talvez, isso se deva ao fato de que, quando são realizadas análises conjuntas, cito- e histológicas, seja minimizado o possível “erro” na interpretação dos tipos morfológicos de micrósporos e grãos de pólen observados no decorrer das análises.

1.8 – Histologia da antera

Numerosos estudos desse órgão já foram e vêm sendo realizados, como por exemplo, Oliveira & Mariath (2001) que estudaram o desenvolvimento da antera e pólen *in vivo* em *Anacardium occidentale* L. Estudos como esse são necessários para que se conheça a anatomia da antera e para possibilitar posteriores análises aplicadas em espécies de interesse agrônomo e comercial, como nesse caso, onde o estudo realizado foi utilizado como base para programas de biotecnologia em *A. occidentale*.

Como não foram encontradas descrições na literatura do desenvolvimento da antera de cevada *in vivo*, optou-se por utilizar o padrão histológico das monocotiledôneas, que é o caso da cevada, exemplificado aqui pela *Oryza sativa* L., o arroz.

Raghavan (1988) descreve o desenvolvimento da antera de arroz desde os estádios iniciais, relatando que esse órgão possui uma forma cilíndrica a ovóide. Em seção transversal observou que a antera consiste de uma massa de células meristemáticas circundada por uma camada bem definida de células isodiamétricas, constituindo a epiderme. Células

da camada subdérmica, localizadas nas regiões dos lobos da antera em formação, dividem-se periclinalmente dando origem a célula parietal primária em direção à periferia da antera e iniciais esporogênicas em direção ao interior. A camada parietal primária se divide periclinalmente formando o estrato parietal secundário externo e o secundário interno. A camada parietal secundária interna divide-se e produz a camada média e o tapete, enquanto que a externa forma o endotécio.

Com o estabelecimento dos estratos parietais, as iniciais esporogênicas sofrem duas divisões mitóticas ortogonais para formar quatro células cada, constituindo o tecido arquesporial ou tecido esporogênico. É estimado que cada um dos quatro lobos de uma antera de arroz contenha aproximadamente 60 microsporócitos. A antera, posteriormente, sofre uma expansão radial e um alongamento, separando os microsporócitos em posições características nas quatro lojas. Deposições subseqüentes de calose ocorrem na parede radial dos microsporócitos e nos lados voltado para o tapete. Os microsporócitos completam a divisão meiótica rapidamente, mas pode ser observada a formação de parede celular no final da meiose I e outra é formada em cada díade no final da meiose II, caracterizando o tipo sucessivo de citocinese de formação das tétrades (Raghavan, 1988). Os eventos posteriores já foram descritos em item anterior (maiores detalhes ver item 1.5).

O filete, haste que liga a antera ao receptáculo e parte constituinte do estame, possui um único feixe vascular em, aproximadamente, 95% das angiospermas (Wilson, 1942). Em mono- e dicotiledôneas é, freqüentemente, anficrival ou ainda colateral com floema, geralmente envolvendo o xilema numa extensão considerável (também chamado de feixe hemianficrival) (Schmid, 1976).

1.9 - Estudos histológicos em órgãos cultivados *in vitro*

Métodos histológicos têm contribuído significativamente para o conhecimento dos efeitos do cultivo *in vitro* sobre os processos de desenvolvimento de micrósporos. Um bom estudo histológico baseado em mudanças anatômicas e histoquímicas fornece informações sobre os processos celulares, além de mostrarem indícios que permitem que sejam formuladas hipóteses para trabalhos futuros (Yeung, 1999).

Estudando a capacidade embriogênica de híbridos entre cultivares e linhagens brasileiras de cevada, F₁ de 11 cruzamentos, Stival (1995) e Silva *et al.* (2000) realizaram análises citológica e histológica de micrósporos, a partir de amostras semanais até o 25^o dia de cultivo *in vitro*. As estruturas embriogênicas foram observadas ao final do primeiro mês. Os autores confirmaram a existência de um padrão esporofítico de desenvolvimento, através de mitoses subseqüentes que levaram à formação de grãos de pólen multicelulares, em um primeiro momento e, logo a seguir, à formação de embriões ou de massas celulares desorganizadas (calos). A análise histológica confirmou a presença de embriões típicos, identificando estruturas que fazem parte de um embrião convencional, como por exemplo, o escutelo, o coleóptilo, a coleorriza e os meristemas apical caulinar e da raiz (Silva *et al.*, 2000).

Também em cevada, Maraschin *et al.* (2003 a, b) agregaram técnicas moleculares e de imunolocalização à tradicional histologia, demonstrando pela técnica de TUNEL (terminal deoxytransferase [TdT]-mediated dUTP-X nick end labeling) a apoptose, ou morte celular programada (PCD), em alguns micrósporos e na epiderme das anteras pré-tratadas durante quatro dias com solução de manitol. A partir de seções transversais da antera, foi realizada a imunolocalização das isoformas da proteína dimérica 14-3-3, altamente conservada,

envolvida no controle da apoptose, entre outras funções celulares. Sob microscopia óptica, os autores verificaram que após o pré-tratamento das anteras a imunolocalização foi restrita aos micrósporos, indicando a entrada, na rota embriogênica, pois essas proteínas possuem uma correlação com a diferenciação dos tecidos na embriogênese.

Em estudo subsequente, Maraschin *et al.* (2005) demonstraram o desenvolvimento da embriogênese de grãos de pólen isolados, através da microscopia óptica, confocal e microscopia eletrônica de transmissão. A partir da observação detalhada da morfologia dos grãos de pólen, verificaram que só são capazes de formar ELSs (estruturas tipo embrião, embrióides, "embryo-like structures") aqueles grãos de pólen que seguiram as divisões mitóticas, formaram estruturas multicelulares (MCSs) e foram capazes de liberar as ELSs rompendo a esporoderme.

Devido à escassez de abordagens histológicas em estudos sobre a embriogênese de micrósporos e grãos de pólen, decidiu-se relatar alguns trabalhos com esse enfoque, mas a partir de material obtido através da embriogênese somática. As analogias entre os processos embriogênicos são importantes para as comparações no item discussão do presente trabalho.

Estudos histológicos de embriões somáticos de diferentes espécies, realizados por vários pesquisadores, descreveram duas prováveis origens para os embriões: unicelular (Jones & Rost, 1989) ou multicelular (Taylor & Vasil, 1995).

O primeiro trabalho sobre as evidências detalhadas da embriogênese somática em cevada foi realizado por Ryschka *et al.* (1991), estudando paralelamente o trigo. Foram realizadas análises histológicas e citológicas, por microscopia eletrônica de varredura, obtendo-se três rotas de formação dos embrióides: células únicas da face abaxial da epiderme do escutelo dividiram-se periclinamente dando origem a um pró-embrióide bipolar; camada subdérmica possuindo células únicas com alta atividade de divisão resultando na

formação de dois ou mais pró-embriões, e algumas células expandidas do meristema pró-vascular do escutelo iniciaram pró-embriões com maior ou menor desenvolvimento.

Estudando os eventos morfológicos nos estádios iniciais da indução de calos de cevada, Oka *et al.* (1995) realizaram uma comparação histológica entre os explantes de embriões maduros e imaturos durante o início da formação do calo e a morfogênese. Observaram que a origem dos calos regenerados de embriões imaturos e maduros foi, respectivamente, do escutelo e da folha ou base foliar.

Nonohay *et al.* (1999), com o objetivo de analisar a origem dos embriões somáticos em cevada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*), realizaram estudos histológicos em escutelos de embriões imaturos cultivados *in vitro*. Verificaram que o local de origem do embrião somático (SSEO) poderia originar-se de uma célula superficial de um calo, possivelmente com origem unicelular, ou de células epidérmicas e subdérmicas de um calo, indicando uma origem multicelular. Rotas alternativas de formação do embrião somático e de aglomerados de embriões foram sugeridas.

No caso da soja, foram realizados estudos por Kaltchuk-Santos *et al.*, (1997) para verificar a origem dos embriões obtidos na cultura *in vitro*. Os autores relataram a ocorrência de um embrião "androgenético", identificado a partir de seções histológicas. Como já citado anteriormente, em estudo posterior, Rodrigues *et al.* (2005) verificou que os embriões de soja obtidos *in vitro* possuíam origem somática, oriundos dos estratos da antera.

Nesse sentido, os estudos histológicos, especialmente quando acompanhados de citológicos, são importantes na medida em que podem propiciar a análise das etapas de todo o processo de desenvolvimento, desde as alterações no desenvolvimento usual dos micrósporos e grãos de pólen e a origem dos embriões, até a formação da planta, permitindo um melhor entendimento da embriogênese do

micrósporo e do grão de pólen em plantas, no caso específico desse estudo, em cevada.

OBJETIVOS

Este trabalho, que fez parte de um projeto mais amplo, "Genética, cultura de tecidos e transferência de DNA em plantas: gênero *Hordeum*", e tendo em vista as considerações anteriores, propôs-se a:

- Analisar a embriogênese, em especial a etapa da indução da rota embriogênica, em genótipos selecionados de cevada;
- Comparar o processo de indução da embriogênese, através de análises citológicas e histológicas de anteras cultivadas *in vitro*, de linhagens selecionadas através da seleção divergente para a alta ou para baixa resposta na indução da rota embriogênica, em comparação com a cultivar não-selecionada;
- Analisar e quantificar o tempo necessário para o surgimento de cada tipo morfológico do processo de embriogênese do micrósporo e do grão de pólen imaturo através de estudos citológicos de anteras fixadas a cada três dias após o início do cultivo *in vitro*.

*“O que você pensa, você cria;
O que você sente, você atrai;
O que você acredita, você conquista.”*

2 - MATERIAL E MÉTODOS



2.1 – Material

Foram utilizadas sementes de linhagens selecionadas a partir de cultivares brasileiras de cevada, *Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*, recomendadas para plantio na região sul do Brasil. As linhagens e a cultivar analisadas foram as seguintes:

Linhagens S₃A22 e S₃A23 ⇨ selecionadas a partir de sementes da cultivar A-05, obtida pela então Companhia Antártica Paulista, hoje integrante da AmBev (Companhia de Bebidas das Américas). Foram selecionadas para alta frequência de indução de embriogênese do micrósporo e do grão de pólen e baixa frequência de regeneração de plantas (plantas verdes);

Linhagens S₃B61 e S₃B63 ⇨ selecionadas a partir de sementes da cultivar BR-2, desenvolvida pela Embrapa – CNPT (Centro Nacional de Pesquisa do Trigo). Foram selecionadas a baixa frequência de indução de embriogênese do micrósporo e do grão de pólen, porém alta eficiência de regeneração de plantas verdes;

Cultivar MN-599 ⇨ semente geneticamente pura obtida pela Maltaria Navegantes, hoje integrante da AmBev. Não foi selecionada. As sementes foram cedidas pela Embrapa – CNPT, do Banco de Sementes de Cevada.

2.1.1 - Obtenção das linhagens selecionadas

As quatro linhagens de cevada utilizadas no presente trabalho fizeram parte de um programa de seleção divergente quanto às suas respostas na indução da embriogênese do micrósporo e do grão de pólen e regeneração de plantas verdes. A hoje Dra. Eliana M. Assmann, então integrante de nossa equipe, realizou as duas primeiras gerações de seleção (S₁ e S₂) em numerosas linhagens de seleção que, na geração S₂, já puderam ser diferenciadas em suas respostas (dados

não-publicados). A terceira geração de seleção foi realizada por Mazzocato (1997) como será apresentado no item 2.2.1, a seguir.

Com base nos resultados obtidos em seu Mestrado, Assmann (1996) iniciou uma pesquisa de seleção divergente nas respostas embriogênicas, na indução e na regeneração, de plantas de duas cultivares de cevada, BR-2 e A-05. Essas plantas e sua descendência originaram linhagens. Ao final de duas gerações de seleção foram escolhidas as linhagens da cultivar A-05 que produziram, na cultura de anteras, elevada resposta na fase de indução de estruturas embriogênicas, porém baixa regeneração de plantas, especialmente plantas verdes. Por outro lado, a cultivar BR-2 foi submetida a uma seleção no sentido inverso, isto é: baixa indução, porém alta eficiência na regeneração de plantas verdes. A cultivar MN-599, como no trabalho original de Assmann apresentou respostas intermediárias, tanto na indução como na regeneração de plantas verdes, não foi selecionada, portanto, não foram obtidas linhagens a partir dela.

2.2 – Métodos

2.2.1 – Cultura de Anteras de Cevada e 3^a Geração de Seleção

Durante o período de setembro de 1996 a fevereiro de 1998, foram obtidos dados, por Mazzocato, A.C., sobre a cultura de anteras das quatro linhagens e da cultivar de *Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*, no projeto "Estudos sobre a androgênese em anteras de cevada, *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*, cultivadas *in vitro*" sob a orientação da Profa. Dra. Helga Winge do Departamento de Genética – UFRGS.

As quatro linhagens (S₂A22 e S₂A23; S₂B61 e S₂B63) selecionadas por Assmann, por duas gerações, juntamente com a cultivar não-

selecionada MN-599 foram submetidas à cultura de anteras para mais uma geração de seleção e a conseqüente avaliação e escolha do material para os estudos citológicos e histológicos do processo da embriogênese do micrósporo e do pólen em cevada.

As linhagens e a cultivar (que aqui denominaremos de genótipos) utilizadas no trabalho foram de cevada com espigas de duas fileiras. Somente entraram na cultura *in vitro* as espigas que apresentaram micrósporos no estágio uninucleado inicial (UI) até grãos de pólen no estágio uninucleado final (UT).

Com base nos resultados da cultura de anteras (Mazzocato *et al.*, 1998), foi realizada a terceira geração de seleção divergente, *in vitro*, das linhagens sob seleção. A terceira geração de seleção, como descrito a seguir, seguiu o mesmo método utilizado anteriormente por Assmann (dados não-publicados).

Foi realizada a seleção das linhagens da cultivar A-05 (gerando as linhagens S₃A22 e S₃A23) que produziram, na cultura de anteras, elevada resposta na fase de indução de estruturas embriogênicas, porém baixa regeneração de plantas verdes. Por outro lado, as linhagens da cultivar BR-2 foram submetidas a uma seleção no sentido inverso, isto é: baixa indução, porém alta eficiência na regeneração, originando as linhagens S₃B61 e S₃B63. Foram ainda submetidas à cultura, anteras de plantas não-selecionadas da cultivar MN-599, como controle.

Coleta das espigas para a cultura de anteras

As espigas foram coletadas, preferencialmente, no mesmo estágio de desenvolvimento, para que as anteras apresentassem micrósporos e grãos de pólen no estágio adequado para o cultivo *in vitro*, ou seja, entre uninucleado inicial e final, avaliado através dos seguintes marcadores morfológicos das plantas (Revers, 1993):

- distância interlígulas \Rightarrow distância (cm) entre a lígula da folha bandeira e a da folha imediatamente abaixo no mesmo afilho (Figura 4).
- comprimento das aristas emergentes \Rightarrow parte visível das aristas da espiga, na maior parte ainda completamente cobertas pela bainha da folha bandeira.
- altura do afilho \Rightarrow distância (cm) entre o nó na base do qual sai a primeira coroa de raízes e a lígula da folha bandeira, no ápice.

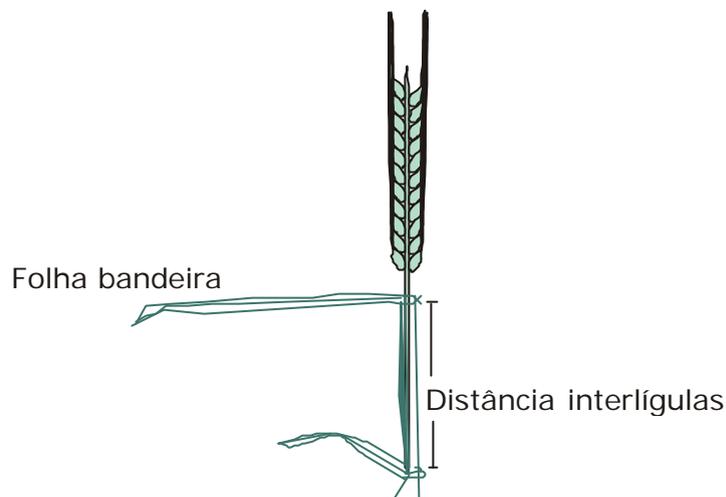


Figura 4 – Esquema de como se realiza a medida do marcador morfológico, distância interlígulas, com a representação da folha bandeira de cevada. No momento da coleta, a espiga não tinha emergido. A espiga foi representada, nessa representação esquemática para um melhor entendimento da medida.

No momento da coleta, cada afilho foi identificado, com etiqueta, de acordo com o número da planta e com o número de ordem de seu desenvolvimento. Também foi realizada a medida da altura de cada afilho. Após, as espigas foram cortadas e transportadas para o laboratório em becker com água.

Antes da remoção das folhas que envolvem as espigas, em câmara de fluxo laminar horizontal, cada espiga foi desinfetada com aerossol de etanol 96%, e também foi realizada a medida das aristas se

não-emergidas. De cada espiga foram fixadas em Farmer (3:1 - etanol absoluto : ácido acético glacial) (Johansen, 1940), três espiguetas: da base (B), meio (M) e ápice (A), do mesmo lado (lado 1) da espiga (Figura 5) para a determinação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos e grãos de pólen (utilizadas também como controle inicial, controle zero – C0. Ver item 2.2.3 – Análises Citológicas e Figura 6 – esquema 1: Fixação antes da cultura).

As folhas foram então retiradas, juntamente com cerca de dois terços do comprimento da parte superior das aristas. Cada espiga foi então colocada numa placa de petri (9 cm de diâmetro) contendo uma tira de papel filtro estéril embebida em água destilada também estéril, para evitar o ressecamento da espiga (Huang & Sunderland, 1982).

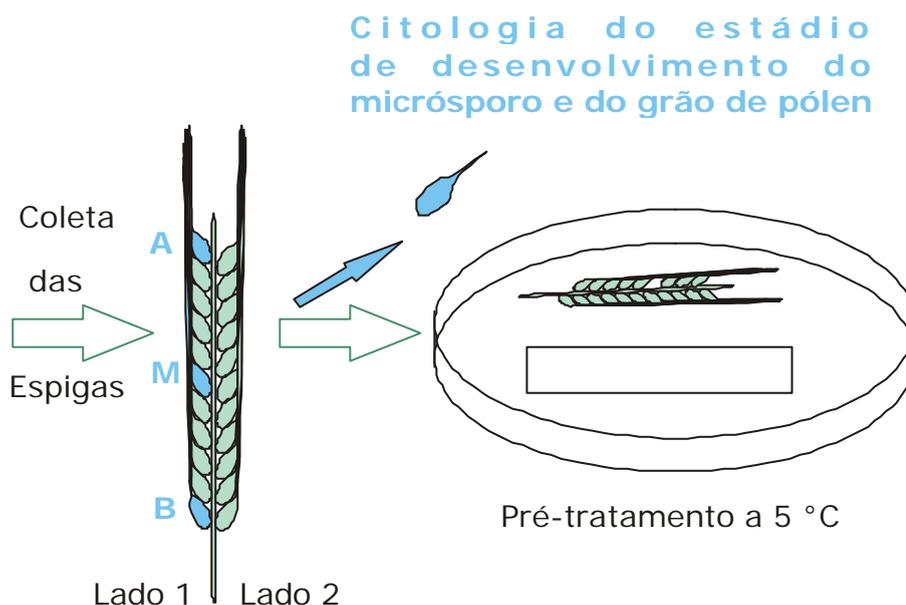


Figura 5 – Esquema do pré-tratamento à baixa temperatura de espigas, coleta e fixação das espiguetas para a determinação citológica do estágio de desenvolvimento do micrósporo e do grão de pólen (controle zero - C0). Placa de petri com uma tira de papel filtro úmido e espiga sem as três espiguetas que foram antes retiradas para a fixação e análise. Local vazio das espiguetas marcado em azul, do lado 1 da espiga: **A – ápice; M – meio; B – base.**

Pré-tratamento à baixa temperatura

As placas de petri com as espigas desinfetadas externamente foram seladas com tiras de PVC e colocadas em caixas de papelão, onde permaneceram no escuro, em câmara fria a 5 °C por 10 dias, segundo protocolo de Assmann (1996).

Determinação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos e dos grãos de pólen

Enquanto as espigas eram submetidas ao pré-tratamento à baixa temperatura, uma antera de cada uma das três espiguetas fixadas (A, M ou B) foi analisada citologicamente.

As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico para a determinação dos estádios dos micrósporos e grãos de pólen de cada espiga submetida ao pré-tratamento. Para a confecção de cada lâmina, uma antera teve uma extremidade cortada e os micrósporos e grãos de pólen forçados a sair, com auxílio de uma lanceta, sendo corados com carmim propiônico 0,6%.

As outras duas anteras de cada espiguetas foram estocadas para posterior análise citológica detalhada, constituindo o controle zero (C0), ou seja, espigas recém-coletadas e sem qualquer tratamento (Ver item 2.2.3 – Análises Citológicas).

Todas as espigas que apresentaram anteras no intervalo de desenvolvimento dos micrósporos e grãos de pólen entre uninucleado inicial (UI) e final (UT), foram utilizadas para o cultivo *in vitro*. O restante das espigas, ou seja, aquelas que apresentaram alta frequência de grãos de pólen em estádios de desenvolvimento mais avançados que UT (a partir da primeira divisão), foram eliminadas da amostra.

O estágio de uninucleado inicial (UI) é caracterizado por apresentar um núcleo central. O uninucleado médio (UM) apresenta um

núcleo mais lateral e o uninucleado final (UT), como sendo um grão de pólen, apresenta vacuolação e um núcleo compacto localizado no pólo oposto ao poro. O micrósporo (UI) e o grão de pólen (UT) serão apresentados (em fotos) no subitem dos Resultados: 3.3 - Análise Histológica da cultivar MN-599 de Cevada, Figura 17 A e B, respectivamente.

Cultivo *in vitro* das anteras

a) Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados durante todo o trabalho foram aqueles que, entre os testados por Assmann (1996), modificados de Hoekstra *et al.* (1992) mostraram ser os mais eficientes para as cultivares brasileiras [Tabela 1].

O preparo dos meios foi realizado a partir de soluções estoque, sendo os mesmos autoclavados a 1,5 atm, a 127 °C de temperatura, durante 15 minutos sendo, posteriormente, distribuídos em placas de petri (meios de indução I-3 e regeneração-I) ou tubos de ensaio (meio de regeneração-II).

b) Indução da embriogênese do micrósporo e do grão de pólen

Do material submetido ao pré-tratamento de frio e analisado citologicamente quanto ao estágio de desenvolvimento dos micrósporos e dos grãos de pólen, 3.870 anteras, de 67 espigas com micrósporos nos estádios uninucleado inicial a final foram estabelecidas no meio de

Tabela 1 – Composição dos meios de cultura usados para indução, regeneração-I e regeneração-II

Reagentes	Indução [I-3] (mgL ⁻¹)	Regeneração-I [RI-3] (mgL ⁻¹)	Regeneração-II [RII-3] (mgL ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	165	165	165
KNO ₃	1750	1900	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	450	440	440
MgSO ₄ .H ₂ O	350	370	370
KH ₂ PO ₄	200	170	170
FeNa ₂ .EDTA	40	40	40
H ₃ BO ₄	5	6,2	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	15	22,3	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	13,4	11,7	11,7
KI	0,75	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CuSo ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Ácido Nicotínico	1	1	1
Piridoxina.HCl	1	1	1
Tiamina.HCl	1	1	1
Glutamina	750	750	750
Mio-inositol	100	100	100
Ácido Pantotênico	1	-	-
Cloreto de Colina	1	-	-
L-Ácido Ascórbico	2	-	-
Vitamina B12	0,02	-	-
Riboflavina	0,2	-	-
Ácido Fólico	0,4	-	-
Biotina	0,01	-	-
Colecalciferol	0,01	-	-
Ácido p-Amino-benzóico	0,02	-	-
Caseína Hidrolisada	1000	-	-
Maltose	30000	17000	10000
Agarose	6000	6000	8000
Sacarose	-	-	-
ANA	2	0,5	-
Cinetina	0,5	2	-

indução I-3 (Assmann, 1996). Inicialmente, cada espiga foi desinfetada em tubo de ensaio com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 3-4% com adição de Tween 20% (1 gota/100 mL), durante 10 minutos, seguida de três lavagens com água destilada estéril. O excesso de água das espigas foi retirado com papel filtro estéril.

Antes das anteras serem plaqueadas, uma espiguetas do meio (M), uma antera da base (B) e uma antera do ápice (A) [do lado 2 da espiga], foram fixadas em Farmer (ver item 2.2.2 – Análises Citológicas) [Figura 7 – esquema 1: Fixação antes da cultura *in vitro*].

Esse material fixado, obtido de todas as espigas que entraram em cultivo *in vitro* foi utilizado como controle 1 (C1).

As anteras das demais espiguetas foram cuidadosamente excisadas com pinça de ponta fina (n^o 5) e colocadas em placa de petri (9 cm de diâmetro) contendo cerca de 30 mL de meio de indução, sendo as anteras dispostas em linhas paralelas, ficando as três anteras da mesma flor mais próximas entre si e mais afastadas das anteras das flores vizinhas. Foram deixados espaços livres para representar as espiguetas e anteras coletadas e fixadas nas etapas anteriores (controles C0 e C1) (ver Figura 7 – esquema 2).

As placas com as anteras em meio de indução foram vedadas com Parafilm e mantidas a 25 °C, no escuro durante o período da indução.

O delineamento do trabalho envolveu, basicamente, três abordagens, sendo que a partir desse momento será importante serem ressaltados os seguintes detalhes (Figura 6):

1^a abordagem) Cultura de Anteras de plantas da geração S₂ ⇒ Todas as espigas estabelecidas no meio de indução seguiram até o final da cultura, ou seja, além da fase de indução, passaram pelas fases de regeneração-I e II. Esta etapa, como nos demais casos, incluiu os controles zero e 1 (C0 e C1) para os quais foram fixadas anteras e espiguetas antes da cultura *in vitro*. As plântulas produzidas na

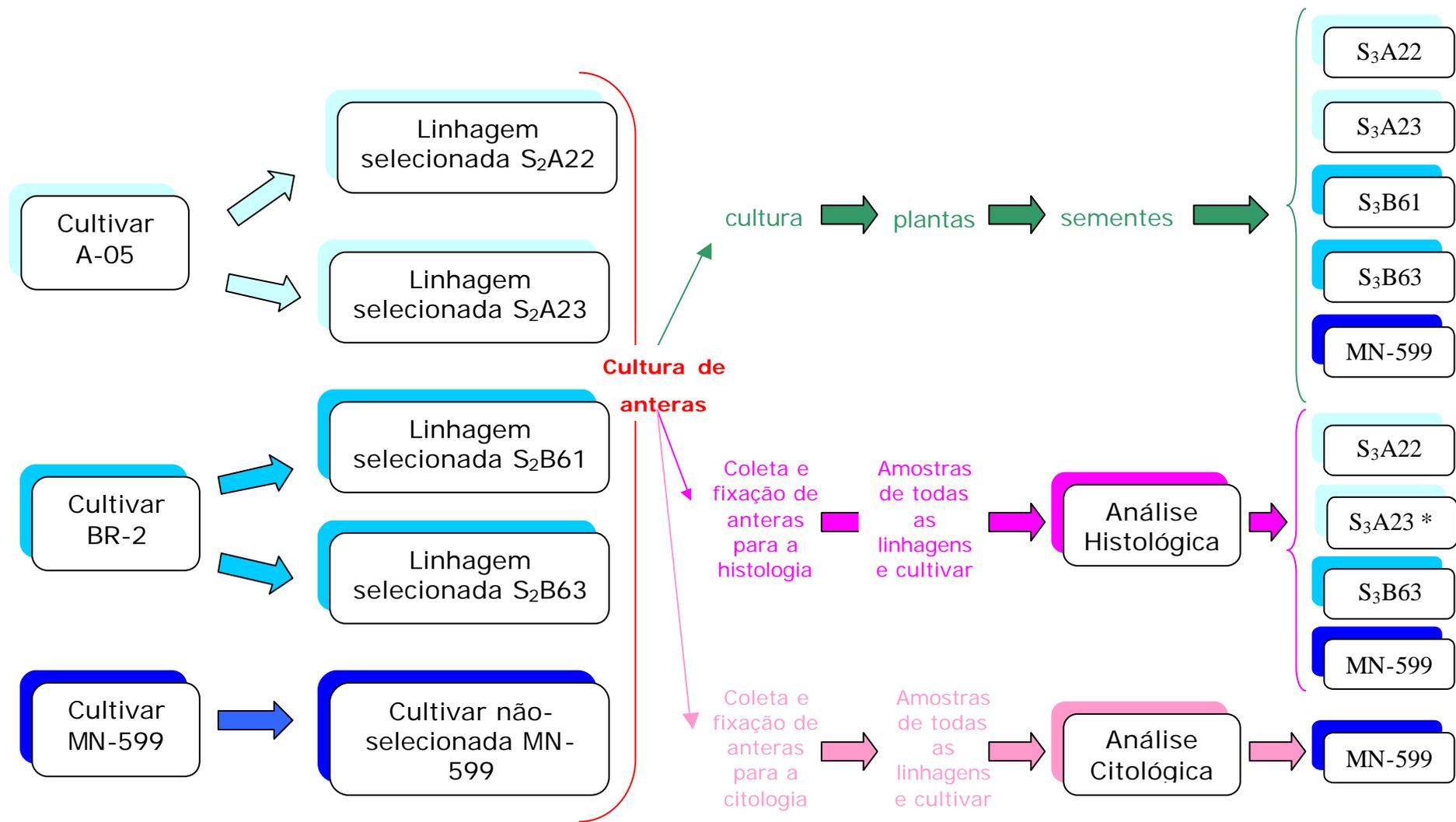


Figura 6 – Resumo das etapas do trabalho. Duas gerações de seleção para: maior resposta na indução (⇨); maior resposta na regeneração de plantas verdes (⇨). As cores representam as etapas: verde – 1ª etapa; rosa claro – 2ª etapa; e rosa – 3ª etapa. *: analisada até 22 dias.

regeneração foram cultivadas, em casa de vegetação, para produção de sementes representantes da terceira geração selecionada (S₃). Observação: espigas e/ou anteras contaminadas durante a cultura foram eliminadas;

2^a abordagem) Coleta e fixação de anteras para análise citológica ⇒ A análise citológica (“Blocos” – ver figura 7 – esquema 3) foi realizada na espiga M088 da cultivar MN-599, escolhida pelo número de anteras semelhante a cada coleta realizada (a cada três dias) [ver Tabela 2].

3^a abordagem) Coleta e fixação de anteras para análises histológicas ⇒ A análise histológica (“Especiais” – ver tabelas 3 e 4) foi realizada nas espigas A090 (linhagem S₃A22), B069 (linhagem S₃B63) e M094 (cultivar MN-599). As espigas representam plantas que foram escolhidas com base nas respostas nas fases de indução e regeneração de plantas verdes.

Com base nos detalhes descritos anteriormente, a partir desse momento quando forem referidos: exame das anteras, transferência de estruturas, ou seja, todos os aspectos relacionados às fases da cultura de anteras, estar-se-á reportando somente à 1^a abordagem ⇒ Cultura de anteras até a produção de plantas, pois nas outras duas abordagens não foram realizadas porque as anteras foram utilizadas para as análises.

a) Exame das anteras em cultivo

Para as análises histológicas, as anteras foram coletadas e fixadas, a cada dois dias após o início do cultivo *in vitro*, e para as análises citológicas, a cada três dias (Figura 7 – esquema 3) [Detalhadas nos itens 2.2.3 e 2.2.4].

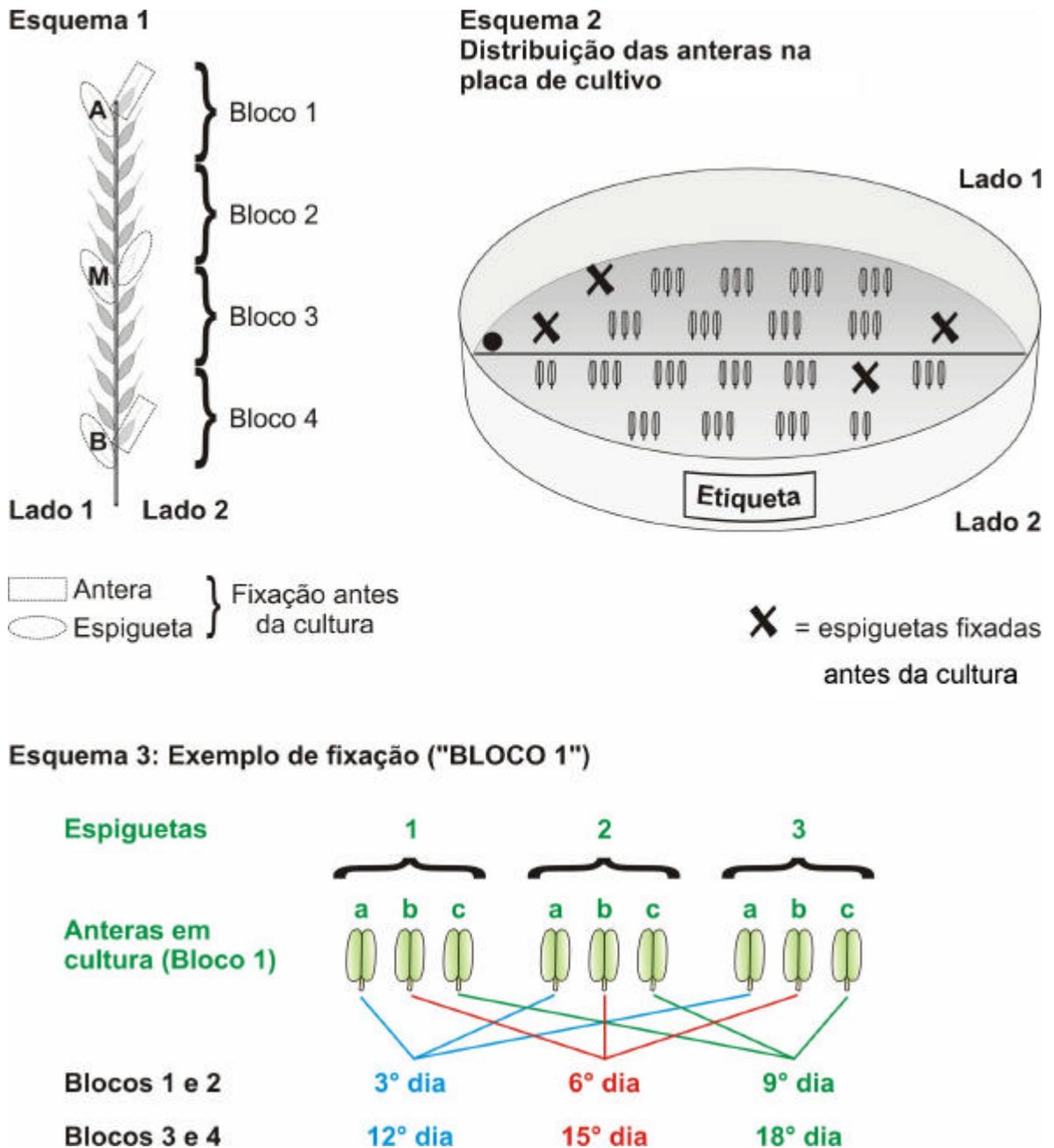


Figura 7 – Esquema de fixação de espiguetas e anteras antes do cultivo *in vitro* (1), da distribuição das anteras na placa de cultivo (2) e exemplo da seqüência de fixação das anteras em cultivo (3) no esquema de "BLOCOS".

Aos sete dias de indução foi contado o número de anteras estabelecidas *in vitro*, sendo também verificada a presença ou não de contaminação.

Aos 21 dias foi feita a contagem do número de anteras responsivas, ou seja: com estruturas embriogênicas liberadas no meio de cultura, bem como o número de estruturas embriogênicas com 1 mm ou mais de diâmetro. Essa contagem aos 21 dias permitiu avaliar diferenças na velocidade de resposta entre as linhagens e cultivar. Nesse mesmo período também foi verificada a presença ou não de contaminação.

Transferência de estruturas embriogênicas – Regeneração-I

As estruturas embriogênicas formadas foram transferidas, a cada 10 dias, a partir dos 28 dias até os 68 dias para placas de petri contendo meio de regeneração-I (RI-3) (Assmann, 1996). As estruturas embriogênicas formadas de 1 mm ou maiores, apresentam o tamanho mínimo ideal para que tenham capacidade de regenerar plântulas, segundo Olsen (1987) e Szarejko & Kasha (1991). Após cada transferência das estruturas, as placas foram novamente vedadas com filme PVC aderente e mantidas em ambiente controlado (25 ± 1 °C fotoperíodo de 16 horas $\sim 25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Foram realizados exames das placas a cada 10 dias, até os 68 dias, sendo registrados o número de anteras responsivas, o número de estruturas embriogênicas formadas, contaminações por fungos e/ou bactérias, e formação de plântulas.

O exame final, antes da eliminação das placas de indução, foi realizado aos 78 dias de cultura *in vitro*. Foi, então, registrado o número de anteras não-responsivas, de anteras responsivas e de anteras muito responsivas, de acordo com a produção de estruturas obtidas. Essa contagem foi importante para verificar a existência de correlação entre o número de anteras com grande resposta (com muitas estruturas

embriogênicas produzidas) e o número total de estruturas embriogênicas produzidas.

No momento da eliminação das placas, foi realizada uma avaliação das mesmas, segundo o aspecto geral, crescimento das estruturas e formação de folhas e/ou raízes das plântulas.

Regeneração-II

As plântulas verdes obtidas, da regeneração das estruturas embriogênicas, foram individualmente transferidas para tubos de ensaio com meio de regeneração-II (RII-3) (Assmann, 1996), sem reguladores de crescimento. Foram mantidas a 25 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz para posterior desenvolvimento. Eventuais plantas albinas foram registradas e eliminadas.

Transferência das plântulas verdes para vermiculita

Quando as plântulas apresentaram raízes e parte aérea bem desenvolvidas, foram transferidas para recipientes plásticos (250 mL) com vermiculita e solução nutritiva (Solução estoque: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 4,2 g; K_2HPO_4 – 1,4 g; KNO_3 – 5,8 g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 8,5 g). Em cada recipiente plástico foram colocados dois canudos de polietileno, para dar apoio ao filme de PVC, que cobriu o recipiente, dando assim mais espaço para a plântula crescer e manter úmido o ambiente da mesma. O filme de PVC foi mantido por sete dias sendo que, a partir do terceiro dia, começaram a ser feitos furos no mesmo até a sua completa retirada, no sétimo dia, permitindo a gradual adaptação da plântula ao ambiente mais seco da câmara de cultura. As plântulas foram mantidas em câmaras B.O.D. (Demanda Biológica de Oxigênio) a 25 °C para aclimação e posteriormente transferidas para a casa de vegetação.

Determinação do nível de ploidia das plantas verdes regeneradas

Foram coletadas pontas de raízes de 219 plantas verdes regeneradas, que foram pré-tratadas com PDB (para-diclorobenzeno) durante 24 horas a 4 °C, lavadas em água destilada e após, fixadas em Farmer em temperatura ambiente durante 24 horas. Após esse período, o material fixado foi transferido para álcool 70% e estocado em geladeira (4 °C) para posterior análise do nível de ploidia.

As raízes coletadas foram hidrolisadas em HCl 1N a 60 °C. A confecção de cada lâmina foi realizada a partir de uma (ou mais) ponta(s) de raiz(es) da mesma planta, sendo seccionada(s) em várias partes com auxílio de agulha histológica e bisturi. As seções obtidas foram coradas com carmim propiônico 0,6%, espalhadas sobre a lâmina, e cuidadosamente cobertas com a lamínula, evitando a formação de bolhas. As lâminas foram seladas e analisadas em microscópio óptico, sendo contado o número de cromossomos de cada célula em metáfase, por planta.

Transferência das plantas para recipientes com substrato

Após a coleta de pontas de raízes, as plantas foram transferidas para recipientes de polietileno preto, contendo solo compostado como substrato, e mantidas no telado.

Na época do florescimento foram separadas as plantas que possuíam espiga(s) com semente(s), sendo estas protegidas por um recipiente de papel até o amadurecimento das sementes. As sementes maduras foram coletadas, devidamente identificadas e armazenadas, representando o resultado da terceira geração de seleção divergente.

Análises Estatísticas

Todos os resultados obtidos foram tabulados utilizando o programa Excel. Os arquivos foram organizados por tipo de dados obtidos e de acordo com a análise estatística a ser utilizada.

Os resultados envolvendo dados quantitativos foram analisados pela Estatística Descritiva (média, mediana, desvio padrão, etc) e pelo Teste Não-Paramétrico de Kruskal-Wallis (Análise de Variância Não-Paramétrica). O programa utilizado foi o SPSS (Statistical Package for Social Science), versão 12.0 em nível de significância de 5%. Foi utilizado o teste DMS (diferença mínima significativa) de comparações múltiplas para verificar diferenças existentes na análise de variância.

Para essas análises, foram previamente retiradas das amostras (banco de dados) as espigas de plantas de cevada que foram eliminadas por contaminação por fungos ou bactérias até o final da etapa da indução (I-3), ou seja, até os 68 dias.

A unidade experimental foi a espiga, definida para cada cultivar e linhagem.

Foram realizadas, em cada etapa do trabalho, as seguintes análises:

1. ETAPA DE INDUÇÃO DE ESTRUTURAS EMBRIOGÊNICAS – Foram realizadas análises de variância não-paramétrica para verificar se houve diferenças entre as linhagens selecionadas, entre si e com a cultivar MN-599 não-selecionada, quanto ao:

a) Número de anteras responsivas aos 21 dias de indução: em proporção de anteras responsivas em relação ao total de anteras que foram estabelecidas em meio de indução);

b) Número de estruturas embriogênicas aos 28 dias de indução, com tamanho ≥ 1 mm, que puderam ser transferidas para o meio de regeneração-I. Foi utilizada a proporção de estruturas formadas por antera plaqueada x 100;

c) Número total de estruturas formadas, número de estruturas/antera e número de estruturas formadas por espiga e por antera.

2. ETAPA DE REGENERAÇÃO DE PLÂNTULAS VERDES – Foi igualmente utilizada a análise de variância não-paramétrica, para verificar se houve diferença entre as linhagens/cultivar na capacidade de regeneração de plântulas verdes, em proporção ao número de estruturas embriogênicas transferidas para o meio de regeneração-I. Também foi analisado o número total de estruturas transferidas para RI, acompanhadas e analisadas até o final da regeneração, ou seja, até a determinação do número de plantas férteis/número de plantas adultas.

2.2.2 – Escolha das linhagens e espigas para as análises cito- e histológicas

Para as análises cito- e histológicas, foi escolhida uma espiga de cada genótipo selecionado, com base nas respostas divergentes na indução e na regeneração, obtidas na cultura de anteras. Das linhagens escolhidas, uma espiga de cada linhagem selecionada e duas espigas da cultivar não-selecionada foram escolhidas para as referidas análises (ver Tabelas 2 e 4):

- * cultivar A-05 – linhagem **S₃A22** – espiga A090 (“especiais”);
linhagem **S₃A23** – espiga A053 (“especiais”);

- * cultivar BR-2 – linhagem **S₃B63** – espiga B069 (“especiais”);
- * cultivar MN-599 não-selecionada – espigas M094 (“especiais”) e M088 (“blocos”).

A partir da seleção das linhagens e das espigas, foram realizadas as análises cito- e histológicas. A análise citológica foi realizada somente na cultivar MN-599, planta M088, que serviu como controle por ser a cultivar não-selecionada.

Tabela 2 (material fixado “BLOCOS”) ⇒ **Citologia**.

Tabela 4 (material fixado “ESPECIAIS”) ⇒ **Histologia**.

2.2.3 – Análises Citológicas

Durante o cultivo *in vitro* das anteras, foi fixado material para o estudo detalhado do processo de indução da embriogênese para cada uma das quatro linhagens selecionadas (S₃A22 e S₃A23; S₃B61 e S₃B63), e para a cultivar não-selecionada (MN-599), para as análises cito- e histológicas. O esquema completo para a análise citológica foi delineado da seguinte forma:

a) Material fixado em Farmer [(3:1 - etanol absoluto : ácido acético glacial) e após 24 horas, transferido para álcool 70% e estocado em refrigerador] antes da cultura de anteras (ver Figura 7; Esquema 1):

a₁) Três espiguetas (de uma das duas fileiras – lado 1), respectivamente, da base (B), do meio (M) e do ápice (A), foram fixadas antes do pré-tratamento a baixa temperatura (5 °C, 10 dias), totalizando nove anteras/espiga. Uma antera de cada espiguetas foi analisada na etapa do cultivo de anteras *in vitro*, para a determinação

dos estádios dos micrósporos para decidir sobre a entrada ou não da espiga em cultura. As outras duas anteras de cada espiguetas foram analisadas posteriormente para a comparação com as anteras submetidas ao pré-tratamento de frio.

a₂) Espiguetas e anteras (lado 2 da espiga), fixadas após o pré-tratamento a baixa temperatura (5 °C, 10 dias), no momento das anteras serem plaqueadas, do seguinte modo: uma espiguetas do meio (M), uma antera da base (B) e uma antera do ápice (A), totalizando cinco anteras/espiga, para avaliar se houve ou não avanço no desenvolvimento dos micrósporos e dos grãos de pólen das espigas que entraram em cultura, durante os 10 dias a 5 °C.

a₃) As demais anteras da espiga entraram em cultura.

b) De cada espiga que entrou na cultura, foram fixadas anteras em eppendorfs com FAA 50% (Johansen, 1940) [álcool etílico absoluto 50%, formaldeído 40% e ácido acético glacial (90 : 5 : 5), e após 24 horas, transferido para álcool 70%] em grupos de duas a quatro, segundo o esquema descrito a seguir:

Três anteras por linhagem/cultivar fixadas a cada três dias, de acordo com os Esquemas 1 e 3 da Figura 7, até 18 dias de cultivo *in vitro* (em regra, foram fixadas três anteras de cada bloco e de cada lado a cada três dias). No total foram fixadas 900 anteras, com 60 anteras/linhagem em média ["BLOCOS"]. As anteras (juntamente com suas estruturas internas ou liberadas do interior do lóculo) foram fixadas em eppendorfs com FAA 50% (Johansen, 1940) em grupos (duas a quatro anteras) separadamente por bloco e por lado. Ver Figura 7; Esquemas 1, 2 e 3, Tabela 2.

As análises citológicas das anteras cultivadas *in vitro* foram realizadas a partir de material obtido em etapa anterior (ver Tabela 2), como citado anteriormente, fixado em FAA 50% (Johansen, 1940)

[álcool etílico absoluto 50%, formaldeído 40% e ácido acético glacial (90 : 5 : 5)], transferido para álcool 70% após 24 horas e mantido em câmara fria (5 °C).

As oito amostras foram constituídas por dois controles – antes do cultivo *in vitro* (**C0**, antes do pré-tratamento de baixa temperatura, e **C1**, após o pré-tratamento, porém antes da cultura *in vitro*) e seis amostras obtidas após o início do cultivo *in vitro*, coletadas a cada 3 dias (Exp3 até Exp18).

As anteras, em lâmina histológica com uma gota de carmim propiônico a 0,6%, foram cortadas em uma das extremidades e os micrósporos/grãos de pólen forçados a sair, por uma leve pressão com auxílio de uma lanceta. As lâminas foram montadas e vedadas com luto (breu e cera de abelha).

Tabela 2 - Número total de anteras fixadas a cada três dias, até o 18º dia após o início do cultivo *in vitro* ("BLOCOS"). A barra azul indica a espiga escolhida para as análises citológicas da cultivar

Linhagem	Espiga	Data da indução	Dias após a indução					
			3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia	18º dia
S ₃ A22	A105	11.10.96	12	13	13	10	11	11
S ₃ A22	A111	12.10.96	8	9	9	9	10	10
S ₃ A23	A022	01.10.96	13	14	14	8	9	9
S ₃ A23	A079	08.10.96	9	10	10	12	7	7
S ₃ A23	A081	08.10.96	9	10	10	7	8	7
S ₃ B61	B039	03.10.96	10	11	11	8	9	9
S ₃ B61	B040	03.10.96	12	-	26	8	10	10
S ₃ B61	B042	03.10.96	10	-	22	5	6	6
S ₃ B61	B043	03.10.96	11	-	24	10	10	10
S ₃ B63	B061	04.10.96	10	11	11	11	10	10
S ₃ B63	B066	05.10.96	8	9	9	8	9	9
S ₃ B63	B067	05.10.96	10	11	11	8	9	9
MN-599	M051	04.10.96	6	7	7	9	9	9
MN-599	M052	04.10.96	6	6	4	5	3	4
MN-599	M088	08.10.96	10	11	10	8	8	8
MN-599	M124	17.10.96	10	11	11	9	10	10

Os micrósporos e grãos de pólen foram analisados em microscópio Zeiss® Axioplan quanto às porcentagens de micrósporos, grãos de pólen binucleados, bicelulares, trinucleados, tricolares, multinucleados, multicelulares, presença e número de estruturas embriogênicas e “pólen-p”. Foi analisada também a ocorrência ou não de divisão simétrica, tanto nos “grãos de pólen-p”, como nos outros grãos.

Das lâminas selecionadas, foram obtidas fotomicrografias do material através dos microscópios Zeiss® Axioplan, Olympus® BX 41, e Leica® DM R, utilizando câmara digital Nikon® Coolpix 990 acoplada ao microscópio DM R Leica®.

A barra azul indica o material analisado. O material disponível, que não foi escolhido para o presente estudo, poderá complementar trabalhos futuros.

Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram tabulados utilizando o programa Excel. Os arquivos foram organizados de acordo com a análise estatística a ser realizada.

Após a análise citológica do material, foi montada uma tabela com os resultados gerais, que geraram os gráficos da análise do desenvolvimento dos micrósporos e grãos de pólen, porcentagem de anteras responsivas e número médio de estruturas por antera responsiva observadas por amostra a cada três dias.

Foram confeccionados gráficos com a porcentagem de todos os tipos celulares observados nas amostras controles (C0 e C1) e nas amostras coletadas a cada três dias (Exp3 a Exp18).

2.2.4 – Análises Histológicas

De cada espiga que entrou na cultura, foram fixadas anteras isoladas em eppendorfs com FAA 50% (Johansen, 1940), segundo esquema descrito a seguir:

Quatro anteras por linhagem/cultivar fixadas a cada dois dias, até 34 dias em cultivo *in vitro*, totalizando 346 anteras amostradas até o início da formação de estruturas embriogênicas, em média, com 50 ou mais anteras/cultivar ["ESPECIAIS"]. As anteras isoladas (juntamente com suas estruturas embriogênicas liberadas ou não do interior do lóculo) foram fixadas separadamente, de acordo com o lado de origem da espiga, em eppendorfs com FAA. Ver Figura 7; Esquemas 1 e 2, e Tabela 3.

As anteras de cevada, juntamente com as suas estruturas internas ou liberadas do interior do lóculo, coletadas das placas de petri com meio de cultura, foram fixadas individualmente em eppendorfs (ver Tabela 3) com FAA 50% (Johansen, 1940) ⇒ álcool etílico absoluto 50%, formaldeído 40% e ácido acético glacial (90 : 5 : 5), e após 24 horas, transferidas para álcool 70% e mantidas a 5 °C em câmara fria até análise.

Para o processamento do material, as anteras (com suas estruturas embriogênicas internas) bem como as estruturas embriogênicas isoladas foram desidratadas em série etílica. Após, foram tratadas com três passagens em etanol absoluto : clorofórmio ⇒ 3 : 1; 1 : 3 e 1 : 1, e novamente transferidas para etanol absoluto. Posteriormente, foram pré-infiltradas (com uma gota de fucsina básica para melhor visualização do material), infiltradas e incluídas em hidroxietilmetacrilato (Historesina-Jung) para montagem dos blocos. Os mesmos foram colados em suportes metálicos ou de madeira, dependendo do tamanho do bloco. Após, foram realizadas seções

Tabela 3 - Esquema para a obtenção das anteras "ESPECIAIS": Exemplo da espiga A090 (S₃A22). Cada antera fixada (individualmente em eppendorf) está identificada pelo lado da espiga, pela espigueta (n^o) e pela posição da antera na placa de cultivo (letra)

Dia da fixação	Anteras fixadas	
	Lado 1	Lado 2
2	3a e 9a	6a e 12 ^a
4	4a e 10a	1b e 13b
6	5a e 11a	2a e 8 ^a
8	6a e 12a	3a e 9 ^a
10	2a e 8a	4a e 10 a
12	6b e 12b	5a e 11 ^a
14	3b e 9b	6b e 12b
16	4b e 10b	5b e 13c
18	5b e 11b	2b e 8b
20	6c e 12c	3b e 9b
22	5c e 11c	4b e 10b
24	2b e 8b	5c e 11b
26	3c e 9c	6c e 12c
28	4c e 10c	1c e 11c
30	2c e 8c	2c e 10c
32	-	3c e 9c
34	-	4c e 8c

longitudinais de 3 µm de espessura em micrótomo de rotação MICROM Zeiss®.

Para a coloração do material foi utilizado o corante Azul de Toluidina O, a 0,05%, pH 4,4 (O'Brien & McCully, 1981).

Na tabela 4 encontra-se o material disponível para a análise das anteras do grupo de "ESPECIAIS". Note a linhagem S₃A23 que não foi escolhida para a análise, mas que acabou sendo analisada até aos 22 dias de cultivo, por ter sido o primeiro material a ser trabalhado, ou

Tabela 4 – Relação do material disponível no grupo das anteras “ESPECIAIS”. Em cada dia indicado foram fixadas quatro anteras (duas anteras de cada lado da espiga). Barras azuis identificam as espigas analisadas histologicamente

Linhagem	Espiga	Data da Indução	Dias após a indução																	
			2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
S ₃ A22	A090	09.10.96	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2 *	2 *	2 *	-	-
S ₃ A23	A053	04.10.96	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2 *	2 *	2 *	2 *
S ₃ B61	B056	04.10.96	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2 *	2 *	2 *	-	-
S ₃ B63	B069	05.10.96	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2 *	2 *	2 *	-	-	-	-	-	-
MN-599	M050	03.10.96	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M094	09.10.96	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2 *	2 *	2 *	2 *	-	-

* = anteras fixadas oriundas do mesmo lado da espiga (lado 2).

seja, as anteras foram utilizadas como treinamento para a realização das lâminas, mas em vista dos bons resultados obtidos decidiu-se pela sua inclusão no estudo.

As lâminas utilizadas para observação ao microscópio óptico e para a realização de fotomicrografias foram montadas com óleo de imersão. A análise das lâminas foi realizada em microscópios de campo claro Olympus® BX 41 e Dialux 20 EB Leitz®, ambos providos de câmara fotográfica analógica. Os cortes selecionados também foram fotomicrografados pela câmara digital Nikon® Coolpix 990 acoplada ao microscópio DM R Leica®. Nesse mesmo microscópio também foram analisadas lâminas em contraste interferencial (DIC) para destacar nuances das estruturas internas das células, principalmente para melhor observação dos núcleos. Também foi utilizada a microscopia de epifluorescência, com os seguintes fluorocromos:

- auramina O ⇒ para evidenciar a esporopolenina (Vithanage & Knox, 1979); Filtro de excitação de 450 – 490 nm.
- calcoflúor (White, M2R – Sigma ®) 0,01% em solução aquosa ⇒ para evidenciar a constituição celulósica da parede celular (Pacini *et al.*, 1999). Filtro de excitação de 350 – 390 nm.

Os testes histoquímicos foram realizados da mesma forma que os fluorocromos, colocando-se uma gota do material sobre o corte histológico e a seguir, colocando a lamínula sobre o mesmo. Foram utilizados:

- Iugol (solução aquosa de iodo e iodeto de potássio) Sass, 1951 ⇒ para evidenciar amido;

- coomassie brilliant blue R-250 – 0,25% em solução acética 7%
⇒ para identificar proteínas totais (Southworth, 1973). CI (color index): 42660.

Foi utilizada a microscopia de polarização para a confirmação da presença de amido no material analisado, no microscópio DM R Leica®.

Após todos os procedimentos, também foram realizadas fotomicrografias dos resultados evidenciados.

As imagens selecionadas foram processadas no programa Adobe Photoshop CS e as estampas montadas no programa Corel Draw 11.0. As lâminas produzidas durante o trabalho serão registradas e mantidas no Laminário do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da UFRGS.

Para fins comparativos foi realizada uma análise pontual de embriões maduros e de anteras, ambos obtidos *in vivo*. Esse material seguiu o mesmo procedimento histológico descrito anteriormente.

Análises Estatísticas

Os critérios de classificação de cada antera foram definidos a partir do menor ou maior número de ocorrências dos tipos celulares analisados e observados.

Foram montadas tabelas de presença (+) e ausência (-) com os tipos morfológicos analisados, para cada cultivar e linhagens analisadas. Para que a análise pudesse ser realizada, foram atribuídos os valores zero (0, -, ausência) e um (1, +, presença).

A variável número de estruturas embriogênicas (ELs) foi subdividida em quatro variáveis para a análise: sem forma, MAC

(estruturas com meristema apical caulinar), MAR (estruturas com meristema apical radical adventício embrionário) e embriões.

A partir do agrupamento dos resultados da análise qualitativa realizada, foram feitos os testes de X^2 (qui-quadrado) para as ELSs e o não-paramétrico de Kruskal-Wallis (análise de variância não-paramétrica). Foi utilizado o programa SPSS (Statistical Package for Social Science), versão 12.0 em nível de significância de 5%. Foi utilizado o teste DMS (diferença mínima significativa) de comparações múltiplas para verificar diferenças existentes nos resultados, através de análise de variância.

A coleta e análise do material a cada dois dias foram necessárias para que fossem obtidos resultados mais representativos e seguros com relação à embriogênese da cevada.

*“Em algum lugar além do arco-íris,
os céus são mais azuis e os sonhos que
você ousa sonhar realmente
acontecerão”.*

3 - RESULTADOS



3.1 - CULTURA DE ANTERAS DE CEVADA

Etapa da coleta de espigas e determinação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos e grãos de pólen (Tabela 5)

Através dos marcadores morfológicos utilizados no momento da coleta das espigas (distância interlígulas, altura dos afilhos e comprimento das aristas), foi possível otimizar a coleta das mesmas, evitando a coleta de um número elevado de espigas com micrósporos e grãos de pólen em estágio inadequado para a obtenção de respostas efetivas da androgênese *in vitro*.

O cálculo do estágio médio de desenvolvimento dos micrósporos e grãos de pólen de cada espiga coletada foi feito com base nas modas observadas em uma antera de cada uma das três espiguetas analisadas citologicamente. Para a realização do referido cálculo, foram atribuídos valores (ver Tabela 5) para a moda dos estádios observados em cada espiguetas. Dessa forma, o estágio médio de cada espiga foi igual à média aritmética dos valores atribuídos às modas das três espiguetas. Foram analisadas citologicamente 144 espigas, num total de 432 anteras. Das espigas analisadas, somente 99 entraram em cultura, ou seja, somente aquelas que possuíram a maioria de micrósporos e grãos de pólen em estágio adequado para o cultivo *in vitro* (entre UI e UT).

Em relação ao comprimento das aristas emergentes, as mesmas foram observadas na cultivar BR-2, em 11 espigas coletadas, sendo oito da linhagem S₃B61 e três da S₃B63 (desta última somente uma espiga não entrou no cultivo *in vitro*). Na cultivar MN-599, as aristas emergentes foram observadas somente, em uma das espigas coletadas. Apesar da pequena medida (3 mm), a espiga foi descartada porque já tinha ultrapassado o estágio ideal para o cultivo *in vitro*.

Tabela 5 – Valores atribuídos a cada estágio de desenvolvimento dos micrósporos e grãos de pólen, caracterizando a moda por espiguetas

Valores atribuídos	Estádios de desenvolvimento dos micrósporos e grãos de pólen
0	Muito jovem (antes de Célula-mãe-de-micrósporo)
1	Célula-mãe-de-micrósporo
2	Tétrade
3	Tétrade/ Uninucleado Inicial
4	Uninucleado Inicial
5	Uninucleado Inicial/ Uninucleado Médio
6	Uninucleado Médio
7	Uninucleado Médio/ Uninucleado Final
8	Uninucleado Final
9	Uninucleado Final/ 1ª Divisão Mitótica
10	1ª Divisão Mitótica
11	1ª Divisão Mitótica/ Binucleado Inicial
12	Binucleado Inicial
13	Binucleado Inicial/ Binucleado Médio
14	Binucleado Médio
15	Binucleado Médio/ Binucleado Final
16	Binucleado Final
17	Binucleado Final/ 2ª Divisão Mitótica
18	2ª Divisão Mitótica
19	2ª Divisão Mitótica/ Trinucleado
20	Trinucleado
99	Não-computado (perdido, estéril ou vazio)

Etapa da Indução de Estruturas Embriogênicas (Tabela 6)

Das 99 espigas cultivadas *in vitro*, nove delas foram eliminadas pois apresentaram contaminação na etapa inicial da indução (primeiros dias de cultivo), ou seja, a eliminação foi realizada antes das anteras produzirem alguma estrutura embriogênica e portanto, não foram contabilizadas na produção total. Foram fixadas anteras de 21 espigas no total (para análises cito- e histológicas), restando apenas 67 espigas para o cultivo *in vitro* (1ª abordagem), sendo que somente 53 foram

mantidas, sem contaminação, até o final da indução. A partir das 67 espigas foram cultivadas *in vitro* 3.870 anteras (mantidas *in vitro* até o final da indução: 3.039 anteras), que formaram, no total, 73.759 estruturas embriogênicas.

A cultivar A-05 foi mais eficiente na produção de estruturas embriogênicas (a linhagem S₃A22 com produção em maior número que a S₃A23), sendo seguida pela cultivar BR-2 (a linhagem S₃B61 com maior número que a S₃B63) e por último, a cultivar MN-599 (não-selecionada). Essas diferenças não foram comprovadas pela análise estatística, embora exista uma tendência quando comparamos a probabilidade do teste ($p = 0,084$) e o nível de significância adotado de 5% (Tabela 6). O mesmo foi verificado para a variável "número total de estruturas formadas" (produção total), não havendo diferença estatisticamente significativa (Tabela 6).

Com relação ao número de estruturas formadas/espiga (Tabela 6), pode ser observada, através do desvio padrão (dp), uma grande variação na produção das mesmas. Na linhagem S₃A23 a variação foi ainda maior, ou seja, o desvio padrão excedeu o valor da média. Isso pode ter sido devido à variabilidade entre espigas, pois algumas espigas dessa linhagem não produziram nenhuma estrutura embriogênica a partir de suas anteras cultivadas *in vitro* (ver Figura 8 A). O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis também não revelou diferença significativa com relação aos genótipos para a variável analisada, embora, novamente, tenha havido uma tendência à significância ($p = 0,073$) (Tabela 6).

A Tabela 6 sintetiza os resultados obtidos na etapa de indução da cultura de anteras. As barras azuis indicam as duas linhagens selecionadas que mostraram respostas mais divergentes na indução, além de uma cultivar não-selecionada, que forneceram material para o trabalho de tese (análises citológicas e histológicas).

Tabela 6 - Cultura de anteras de cultivar e linhagens selecionadas de cevada. Resultados da indução em anteras cultivadas *in vitro*. As barras azuis indicam as linhagens selecionadas com respostas divergentes, além da cultivar não-selecionada, que forneceram material para o trabalho de tese. \bar{x} = média; dp = desvio padrão

Cultivar	Linhagem	Não-contaminadas						Produção Total* ¹			
		Nº de espigas	Nº de anteras	Nº estruturas formadas* ²	Estruturas formadas/espiga* ³			Estruturas formadas/ antera	Nº total de espigas	Nº total de anteras	Nº total de estruturas formadas* ⁴
					\bar{x}	\pm	dp				
A-05	S ₃ A22	11	625	19.515	1.774,09	\pm 1.179,42	31,22	12	679	20.274	
	S ₃ A23	11	606	9.857	896,09	\pm 1.162,83	16,27	14	816	13.964	
BR-2	S ₃ B61	14	822	15.889	1.134,93	\pm 787,07	19,33	18	1.063	20.188	
	S ₃ B63	10	607	11.966	1.196,60	\pm 750,69	19,71	14	833	13.240	
MN-599	-	7	379	3.974	567,71	\pm 666,69	10,49	9	479	6.093	
Totais: 3	4	53	3.039	61.201	1.154,74	\pm 986,59	20,14	67	3.870	73.759	

*¹ Incluindo as espigas que produziram estruturas antes da contaminação.

Para ser considerado significativo, p deve ser \leq a 0,05

Teste de Kruskal-Wallis: *² p = 0,084

*³ p = 0,073

*⁴ p = 0,116

Quanto ao número de anteras responsivas aos 21 dias de indução, verificaram-se que os resultados, analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, indicaram não haver diferenças significativas entre os genótipos analisados. As médias obtidas para cada genótipo foram: S₃A22: 0,75%; S₃A23: 0,47%; S₃B61: 0,50%; S₃B63: 0,56% e MN-599: 0,31%. Deve ser ressaltado que o resultado apresentou uma tendência à significância apresentando um $p = 0,053$.

Foi realizado também o teste de Kruskal-Wallis para a variável "estruturas formadas aos 28 dias/anteras x 100", para verificar a intensidade de resposta rápida. Os resultados foram significativos ($p = 0,017$), indicando que há diferenças entre os genótipos para a resposta precoce das anteras na formação de estruturas embriogênicas (28 dias = data da primeira transferência de estruturas para o meio de regeneração-I [R-I]). As médias obtidas para cada genótipo foram: S₃A22: 0,25%; S₃A23: 0,16%; S₃B61: 0,13%; S₃B63: 0,15% e MN-599: 0,06%.

Através do teste de comparações múltiplas de Duncan, verificou-se que os genótipos mais extremos foram: S₃A22 com maior resposta e MN-599 com menor resposta, ou seja, os dois genótipos formaram grupos diferentes. A linhagem S₃A23 teve a segunda maior resposta, seguida da S₃B63 e S₃B61.

Os resultados da análise estatística descritiva estão apresentados na tabela 7, com as médias, desvio padrão e limites inferior e superior para cada variável analisada.

Tabela 7 – Resultados da Análise Estatística Descritiva para a etapa de indução das estruturas embriogênicas.

\bar{x} = média; dp = desvio padrão

Genótipos	Espiga (N)	Anteras/Espiga (não-contaminadas)				Total de estruturas formadas até 68 dias (não-contaminadas)				Estruturas/Antera (não-contaminadas)				Total de estruturas em RI			
		\bar{x}	\pm	dp	(Limites)	\bar{x}	\pm	dp	(Limites)	\bar{x}	\pm	dp	(Limites)	\bar{x}	\pm	dp	(Limites)
S ₃ A22	11	56,82		11,92	(40-73)	1774,09		1179,42	(34-3659)	29,45		17,67	(1-52)	634,36		677,06	(0-2325)
S ₃ A23	11	55,09		14,30	(34-73)	896,09		1162,83	(0-3299)	14,83		17,33	(0-45)	264,00		470,97	(0-1453)
S ₃ B61	14	58,71		5,14	(52-70)	1134,93		787,07	(2-2034)	19,34		13,70	(0-37)	454,00		474,88	(0-1305)
S ₃ B63	10	60,70		6,24	(49-70)	1196,60		750,69	(0-2525)	19,54		12,12	(0-41)	600,70		495,87	(0-1568)
MN-599	7	54,14		9,60	(43-67)	567,71		666,69	(1-1771)	9,52		9,93	(0-28)	507,14		598,06	(0-1521)
TOTAL	53	57,34		9,79	(34-73)	1154,74		986,59	(0-3659)	19,24		15,50	(0-52)	486,70		537,55	(0-2325)

Etapa de Regeneração de Plântulas Verdes (Tabelas 8 e 9)

Os resultados da análise estatística descritiva estão apresentados na tabela 8, com as médias, desvio padrão e limites inferior e superior para as variáveis “número de plântulas verdes formadas” e “número de plântulas verdes/estrutura em RI”.

Tabela 8 – Resultados da análise estatística descritiva para a etapa de regeneração de plantas verdes formadas. \bar{x} = média; dp = desvio padrão

Genótipos	Espiga (N)	Nº de plântulas verdes formadas			Nº de plântulas verdes/estrutura em RI		
		\bar{X}	\pm dp	(Limites)	\bar{X}	\pm dp	(Limites)
S ₃ A22	11	2,00	1,73	(1-4)	0,13	0,41	(0,9-0,17)
S ₃ A23	11	1,00	0,00	(1-1)	0,12	0,09	(0,6-0,22)
S ₃ B61	14	12,87	10,58	(1-36)	3,40	3,06	(0,63-9,86)
S ₃ B63	10	19,91	15,20	(2-56)	3,80	3,23	(0,88-12,81)
MN-599	7	11,25	15,80	(1-37)	1,26	0,96	(0,22-3,11)
TOTAL	53	12,77	13,37	(1-56)	2,59	2,86	(0,6-12,81)

Na Tabela 9 são apresentadas informações mais detalhadas sobre as respostas dos genótipos relativos à regeneração de plântulas. Com relação ao número de estruturas embriogênicas transferidas para o meio de regeneração-I (RI), o teste de Kruskal-Wallis mostrou que não há diferenças significativas entre os genótipos, pois possuem valores semelhantes no número de estruturas transferidas. Pode ser feito um destaque, somente, para a linhagem S₃B61, com 1.570 estruturas, com o mais alto número de estruturas transferidas para RI, mesmo em comparação com a linhagem S₃A22.

Tabela 9 – Cultura de anteras de cultivar e linhagens de cevada. Resultados da regeneração de plântulas (produção total)

Cultivar	Linhagem	Nº total de estruturas transferidas para RI * ¹	Nº total estruturas transferidas RI/nº anteras	Nº total de plântulas verdes formadas * ²	Nº de plântulas verdes/estrutura em RIx100 * ³	Nº plântulas albinas * ³	Nº de plântulas albinas/ estrutura em RI x 100 * ³	Proporção plântulas albinas: verdes formadas* ³
A-05	S ₃ A22	6.978	10,28	7	0,10	43	0,62	6,1:1
	S ₃ A23	5.605	6,87	3	0,05	37	0,66	12,3:1
BR-2	S ₃ B61	8.548	8,04	193	2,26	785	9,18	4,1:1
	S ₃ B63	6.756	8,11	219	3,24	531	7,86	2,4:1
MN-599	-	5.669	11,84	90	1,59	138	2,43	1,5:1
3	4	33.556	8,67	512	1,53	1.534	4,57	3,0:1

Para ser considerado significativo, p deve ser ≤ a 0,05

Teste de Kruskal-Wallis: *¹ p = 0,232

*² p = 0,009

*³ p = < 0,001

Utilizando o mesmo tipo de análise estatística, foi verificado que o número total de plântulas verdes formadas por genótipo (Tabela 9), foi significativo ($p = 0,009$). Pode-se destacar as duas linhagens da cultivar A-05, que produziram um número baixíssimo de plântulas verdes (Figura 8 F), mesmo tendo produzido um bom número de estruturas embriogênicas que foram transferidas para RI. Por outro lado, as duas linhagens da cultivar BR-2 tiveram a maior produção de plântulas verdes (Figura 8 F). Na Figura 8 F podem ser visualizadas essas diferenças: na região central da Figura, as duas maiores fileiras de plantas são da cultivar BR-2 (respectivamente, da esquerda para a direita: linhagens S₃B61 e S₃B63). No canto esquerdo da figura, está a cultivar A-05: a primeira fileira de plantas (quatro plantas) é da linhagem S₃A22 e a segunda (duas plantas) é da S₃A23. Por último, no canto direito, está a cultivar MN-599, com duas pequenas fileiras de plantas.

A análise não-paramétrica (teste de Kruskal-Wallis) da variável número de plântulas verdes formadas/estrutura em RI X 100, revelou diferenças significativas ($p < 0,001$) entre as duas linhagens da cultivar A-05 por um lado, com as duas linhagens da BR-2 (que não diferiram entre si). A cultivar MN-599 mostrou-se intermediária, sem diferir das duas outras cultivares (Tabela 9).

Da mesma forma, o número de plântulas albinas formadas, bem como o número de plântulas albinas/estrutura em RI X 100 (Tabela 9) também foi significativo ($p < 0,001$), mostrando que as duas linhagens da cultivar BR-2 tiveram uma alta produção de plântulas albinas, bem como proporção de plântulas albinas por estrutura embriogênica transferida para RI. A cultivar MN-599 mostrou-se mais uma vez intermediária em relação às outras duas cultivares. As duas linhagens da cultivar A-05 apresentaram os menores valores para cada uma das referidas variáveis, com valores próximos entre elas.

Com relação à proporção de plântulas albinas : plântulas verdes formadas, verificou-se novamente que o teste de Kruskal-Wallis mostrou significância ($p < 0,001$), para cada genótipo analisado ($p < 0,001$). A cultivar MN-599 mostrou ter a menor proporção, seguida da cultivar BR-2, com suas duas linhagens, e por último, a cultivar A-05 com suas duas linhagens analisadas. Dessa última cultivar, a linhagem S₃A23 apresentou a maior proporção de plântulas albinas, maior até (o dobro) do que a linhagem S₃A22.

Etapa de Regeneração de Plantas Adultas (Tabela 10)

O número de plântulas verdes transferidas para o meio de regeneração-II (RII) apresentou bastante variação entre as cultivares (Tabela 10). A cultivar A-05 produziu o menor número, nas suas duas linhagens. A cultivar MN-599 foi intermediária e por último, as duas linhagens da cultivar BR-2, com destaque para a linhagem S₃B61, com 167 plântulas transferidas. A partir dessas plântulas, foram transferidas para recipientes de polietileno (copos) somente 152 plantas dessa linhagem, que novamente teve o maior número de plântulas transferidas para recipientes de polietileno. O mesmo número de plântulas não pôde ser mantido por problemas de regeneração pois, para a transferência das mesmas para recipientes de polietileno, é necessário um bom desenvolvimento das raízes e da parte aérea. Houve também, perda de algumas plântulas pelo não desenvolvimento no meio de regeneração – II (RII), ocasionando a morte das mesmas, ou também pela contaminação e/ou por um aumento inesperado (temporário) da temperatura câmara de crescimento. As duas únicas linhagens que mantiveram o número de plântulas foram S₃A22 e S₃A23, da cultivar A-05. Esse mesmo número foi mantido até a transferência das plantas para recipientes com solo.

Tabela 10 – Cultura de anteras em cultivar e linhagens de cevada. Resultados da regeneração de plantas adultas

Cultivar	Linhagem	Nº plântulas verdes transferidas p/ RII	Nº plântulas verdes em recipientes de polietileno	Nº de plântulas verdes em recipientes/nº de plântulas em RII	Nº plântulas verdes transferidas p/ recipientes com solo	% diplóides	Nº plantas adultas em recipientes com solo*	Nº plantas adultas em recipientes com solo/nº de plântulas em recipientes de polietileno	Nº de plantas que formaram espigas		Nº de plantas férteis/nº plantas adultas
									Total	Com grãos	
A-05	S ₃ A22	7	7	1,00	7	75,00	6	0,86	3	2	0,33
	S ₃ A23	3	3	1,00	3	0,00	3	1,00	-	-	0,00
BR-2	S ₃ B61	167	152	0,91	96	54,69	92	0,61	43	30	0,33
	S ₃ B63	149	129	0,87	97	58,33	93	0,72	54	34	0,37
MN-599	-	90	63	0,70	27	71,43	21	0,33	2	2	0,10
3	4	416	354	0,85	230	58,07	215	0,61	102	68	0,32

* = plantas sobreviventes (com ou sem a formação de espiga)

Para as outras duas linhagens (cultivar BR-2) e para a cultivar MN-599 o número de plantas foi reduzido, sendo que no caso da MN-599 o número inicial de plântulas em RII era de 90 e no momento da transferência para recipientes com solo restaram apenas 27 plântulas. Esse decréscimo pode ser atribuído a problemas técnicos e/ou fisiológicos das plântulas, como comentado anteriormente.

Com relação ao nível de ploidia das plantas verdes regeneradas (Tabela 10), a análise de pontas de raízes de 219 plantas indicou que 58,1% das plantas apresentaram $2n=14$ cromossomos, sendo, portanto duplo-haplóides espontâneos (Figura 8 H). Portanto, 41,9% das plantas analisadas eram haplóides (Figura 8 G).

Na tabela 10 pode-se observar que o número de plantas adultas mantidas em recipientes com solo (plantas sobreviventes com ou sem a formação de espigas) também foi diferente do número inicial transferido para RII, com exceção da linhagem S₃A23 que manteve o mesmo número. A linhagem S₃A22 teve o número reduzido de sete (n^o de plantas transferidas para sacos) para seis. As outras duas linhagens e a cultivar MN-599 também tiveram pouca perda do número de plantas entre as transferências.

O número de plantas adultas que formaram espigas foi reduzido (Tabela 10), principalmente aquelas contabilizadas para na categoria "espigas com grão" (plantas férteis). A linhagem S₃A23, já apresentava um número muito reduzido de plântulas obtidas, não produziu nenhuma planta que tenha formado espiga(s). A linhagem S₃A22 apresentou somente três plantas que produziram espigas, sendo que dessas, somente duas com grãos cheios (férteis). A produção também foi muito pequena na cultivar MN-599, com apenas duas plantas com espigas com grãos cheios. A resposta das duas linhagens da cultivar BR-2 foi semelhante entre si, mesmo a S₃B61 tendo produzido inicialmente um maior número de plântulas verdes; no final, a linhagem S₃B63 superou esse valor, formando 54 plantas com espigas, sendo que dessas, 34

apresentaram grãos cheios. Já a S₃B61 produziu 43 plantas com espigas, sendo que 30 delas possuíam grãos cheios.

A quantidade, calculada para cada genótipo, da proporção de plantas férteis (que produziram grãos) em relação ao número de plantas adultas, foi baixa (Tabela 10), sendo muito semelhante nas linhagens S₃A22, S₃B61 e S₃B63. Para a linhagem S₃A23 não foi possível realizar o cálculo, uma vez que a mesma não produziu plantas com espigas. A cultivar MN-599 teve produção mais baixa que essas linhagens. A linhagem S₃A23 não produziu plantas com espigas.

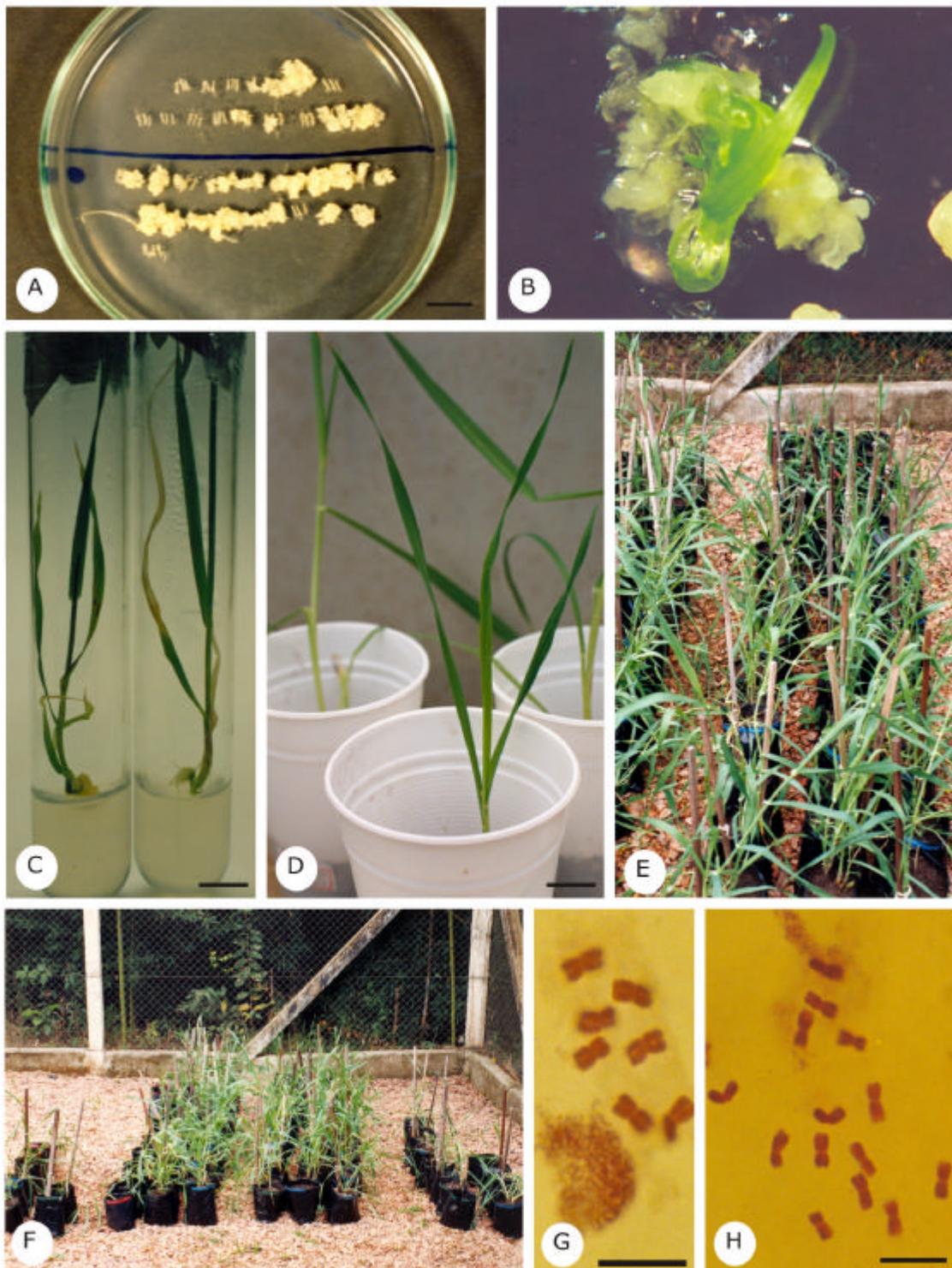


Figura 8- Seqüência das etapas da cultura de anteras de cevada. A - Anteras estabelecidas em meio de indução (I-3); **B** - Estruturas embriogênicas em meio de regeneração-I (RI-3), com plântulas em formação; **C** - Plântulas em meio de regeneração-II (RII-3); **D** - Plântulas em recipientes de polietileno, obtidas em cultivo *in vitro*; **E** - Plantas em recipientes com solo, em telado, obtidas *in vitro*; **F** - Plantas das cultivares (da esquerda para a direita) **A-05**: linhagens S₃A22 e S₃A23, **BR-2**: S₃B61 e S₃B63, e **MN-599**; **G** - n=7 cromossomos: haplóide; **H** - 2n=14 cromossomos: duplo-haplóide espontâneo. **Escalas: A, C e D:** 1 cm; **G e H:** 10 µm.

3.2 - ANÁLISE CITOLÓGICA DA CULTIVAR MN-599 DE CEVADA

Foram realizadas análises citológicas de todas as anteras das diferentes amostras da espiga M088 (cultivar MN-599). No total, foram analisadas 62 anteras, classificados 11.913 micrósporos e grãos de pólen, contadas e medidas 217 estruturas embriogênicas.

Na Tabela 11 é apresentada uma síntese dos resultados, com o total, a média e os limites, menor e maior, do número de micrósporos e grãos de pólen em cada categoria e amostra analisada.

A análise das amostras **C0**, antes do pré-tratamento à baixa temperatura, e **C1**, após o pré-tratamento, porém antes da cultura *in vitro*) e de outras anteras coletadas após o início do cultivo *in vitro* (Exp3 até Exp18) a cada 3 dias, revelou os principais resultados (ver Figuras 9 a 11):

Micrósporos foram observados em todas as amostras, havendo um decréscimo de quase 99%, na amostra C0, para cerca de 40% ou pouco menos nas demais amostras (Figura 9 B). Da mesma forma, os grãos de pólen binucleados também foram observados em todas as amostras, com um pico em C1, decrescendo até em torno de 10% (Figura 9 C). Entretanto, os bicelulares não foram observados em C0 e C1 (controles), estando presentes, em porcentagens crescentes, de 0,05%, na Exp3, até 18,84%, na Exp18 (Figura 9 E). Os bicelulares simétricos somente foram observados a partir do Exp6 (Figura 9 F), sempre em porcentagens baixas.

Com relação aos grãos de pólen trinucleados, pode-se observar na Figura 9 G que foi encontrado somente um caso de trinucleado normal (0,09%) na amostra C0. No outro controle, C1, não foi observado nenhum trinucleado. Nas outras amostras apareceram trinucleados simétricos, a partir da Exp3. Somente parte desses trinucleados simétricos corou (Figura 9 H); no caso da amostra Exp12 nenhum dos poucos trinucleados simétricos coraram, o que também ocorreu na amostra C0. Na Figura 12 A pode-se observar um trinucleado aos três dias de cultivo *in vitro* com deslocamento anormal da esporoderme.

Os grãos de pólen tricolulares (Figura 9 I) apareceram na C1, na frequência de 0,88%, sendo todos tricolulares normais (não-simétricos). A partir da Exp3 (0,18%), os tricolulares não-simétricos apresentaram uma frequência crescente até a Exp15 (23,81%). Na Exp18 houve um decréscimo da frequência para 14,90%. A análise dos resultados das amostras da Exp.18, permite sugerir que esse decréscimo possa ser devido ao fato de essa amostra de anteras ter envolvido menor porcentagem de anteras responsivas (Figura 10), ou que os micrósporos/grãos de pólen das anteras responsivas talvez estivessem em estádios um pouco mais atrasados ao entrarem na cultura *in vitro*. Os tricolulares simétricos (Figura 9 J) foram observados somente nas amostras Experimentais, a partir da Exp6 até o final (Exp18), sempre em baixa frequência.

Na Figura 9 L, pode-se observar que os grãos de pólen multinucleados somente foram detectados a partir da amostra Exp3 em porcentagens variáveis, evidenciando o possível início da formação de estruturas embriogênicas. Fazendo-se a comparação das Figuras 9 L e 9 M, podemos verificar que a porcentagem da Exp9 da primeira Figura (1,42%) é um pouco maior do que a segunda (1,34%). A diferença encontrada deve-se a uma baixa frequência, nesta amostra, de multinucleado com núcleos diferentes (0,08%). Nas Figuras 12 B e C podem ser observados grãos de pólen multinucleados aos seis dias de

cultivo *in vitro* com oito e nove núcleos, respectivamente. O pólen da Figura 12 C está ao lado de um micrósporo plasmolisado, provavelmente uninucleado, mostrando que nem todos os micrósporos e grãos de pólen da mesma amostra estão no mesmo estágio de desenvolvimento e também, que nem todos os micrósporos e grãos de pólen são competentes para ingressarem na rota da embriogênese do micrósporo e do pólen.

Grãos de pólen multinucleados e/ou multicelulares aos seis dias de cultivo *in vitro* também podem ser observados nas Figuras 13 A-D. Nas Figuras 13 A e B podem ser observados pedaços de anteras com grãos de pólen multinucleados. Na Figura 13 A pode-se observar uma antera seccionada na região proximal (em relação ao filete) com muitos grãos de pólen multinucleados. Alguns grãos de pólen multinucleados podem ser observados na Figura 13 B, onde a antera também foi seccionada, mas na região distal (em relação ao filete), mostrando uma maior concentração de multinucleados na região proximal. A Figura 13 C mostra um detalhe dos multinucleados na região proximal da antera, mostrando também que são encontrados micrósporos vazios e uninucleados. Um grão de pólen multicelular com mais de 12 núcleos pode ser observado na Figura 13 D.

O resultado geral da ocorrência/freqüência dos tipos multicelulares pode ser observado nas Figuras 9 N e 9 O. Esse tipo celular somente apareceu a partir da amostra Exp6, ou seja, após seis dias em cultivo. Comparando as Figuras 9 N e 9 O, observa-se que a grande maioria dos micrósporos e grãos de pólen multinucleados corou com carmim propiônico; a exceção foi a amostra Exp12, com cerca de metade não corada. Nas Figuras 12 D-F, podem ser observados grãos de pólen multicelulares, evidenciando até mesmo divisões cromossômicas mitóticas e o rompimento parcial da esporoderme para uma possível posterior formação de estrutura embriogênica. Os estádios de desenvolvimento dos grãos de pólen multicelulares aos nove dias de

cultivo *in vitro* podem ser observados nas Figuras 14 A e B. A Figura 14 A mostra um grão de pólen multinucleado com esporoderme parcialmente rompida e a Figura 14 B mostra outro grão de pólen multicelular, com dois núcleos extravasados através da esporoderme parcialmente rompida.

Como já comentado, estruturas embriogênicas foram observadas, em porcentagens crescentes (Figura 11), a partir da amostra Exp9. Em média, foram obtidas 1,0 estrutura/antera responsiva, na amostra Exp9, chegando a 20,8 estruturas/antera responsiva na Exp18. Os resultados mostram uma clara tendência de aumento, tanto no número de anteras responsivas (Figuras 10 e 11), ou seja, aquelas anteras que produziram estruturas multicelulares (potencialmente embriogênicas) após sofrerem deiscência *in vitro*, como no número médio de estruturas embriogênicas por antera responsiva, ao longo do tempo de cultivo no meio de regeneração-I. Assim, a partir da Exp9, o número médio de estruturas, por antera responsiva, cresceu significativamente, aumentando mais de 20 vezes.

As estruturas embriogênicas multicelulares formadas aos nove dias de cultivo *in vitro* podem ser observadas na Figura 14 C-E. Nas Figuras 15 A-E são mostradas estruturas embriogênicas multicelulares observadas aos 12 dias de cultivo *in vitro* (A-C) e aos 15 dias (D-F). A Figura 16 mostra uma estrutura embriogênica multicelular obtida aos 15 dias de cultivo *in vitro*.

O "Pólen-p" ocorreu em baixíssima frequência, tendo sido detectado somente nas amostras Experimentais, da Exp6 a Exp18 (Figura 9 A). A maior frequência foi observada na amostra Exp15 (0,53%). Na Figura 13 E pode ser observado um "Pólen-p" com esporoderme anormal, parecendo estar plasmolisado. O pequeno tamanho observado nesse tipo celular pode ser comparado com outro grão de pólen, como por exemplo o da Figura 12 A.

Na tabela 12 é apresentada uma síntese dos resultados obtidos na análise citológica realizada na cultivar MN-599 de cevada.

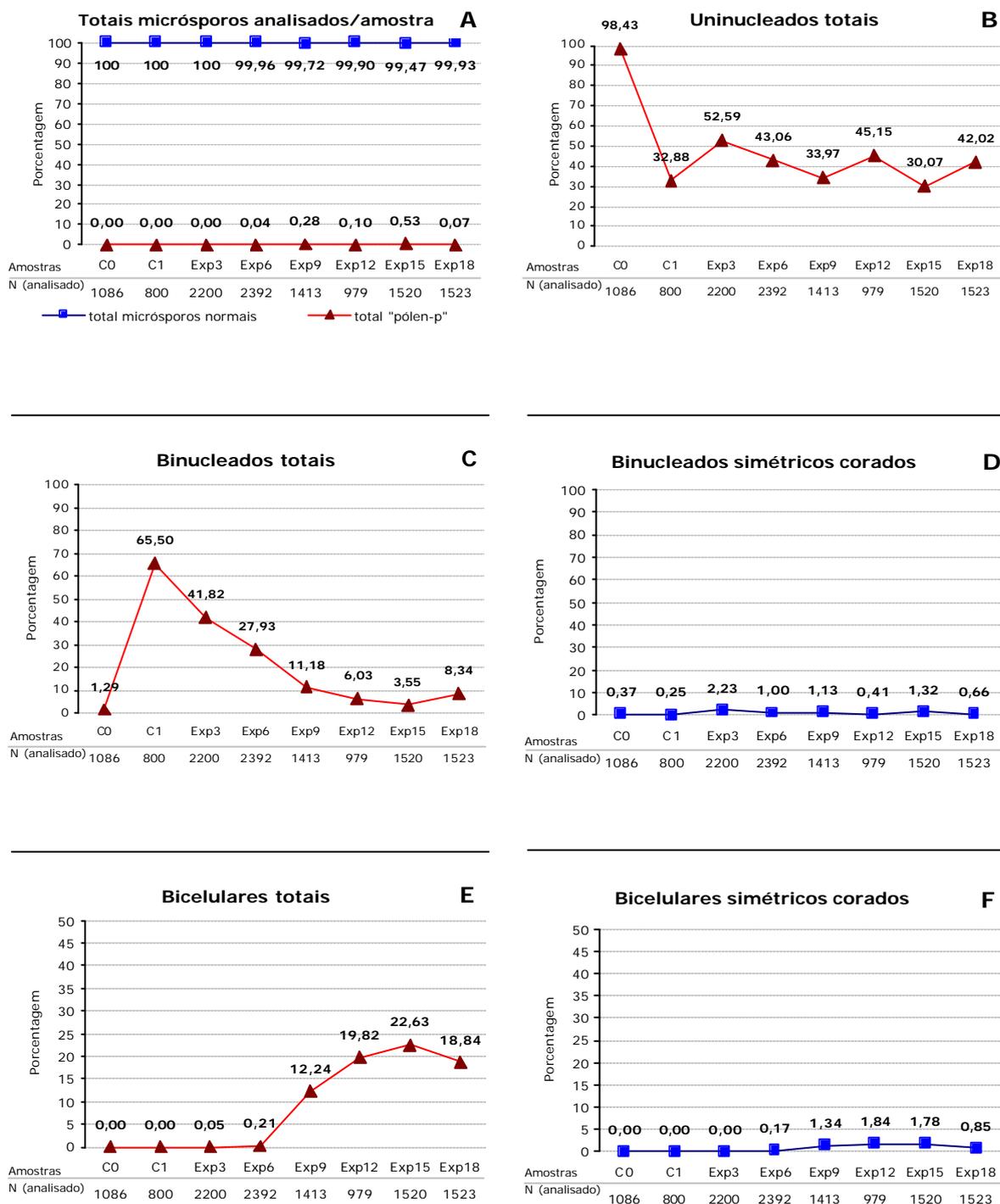


Figura 9 – Análise de micrósporos e grãos de pólen nas amostras: a cada três dias.: C0 = Controle zero (antes do pré-tratamento à baixa temperatura); C1 = Controle 1 (após 10 dias de pré-tratamento, antes do cultivo *in vitro*); Exp (= Experimental) 3 até 18 dias de cultivo *in vitro*. A – F : Porcentagens de cada tipo morfológico observado por amostra. A: Micrósporos e “pólen-p”; B: Total de micrósporos/grãos de pólen uninucleados; C: Grãos de pólen binucleados; D: Grãos de pólen binucleados simétricos corados; E: Grãos de pólen bicelulares; F: Grãos de pólen bicelulares simétricos corados.

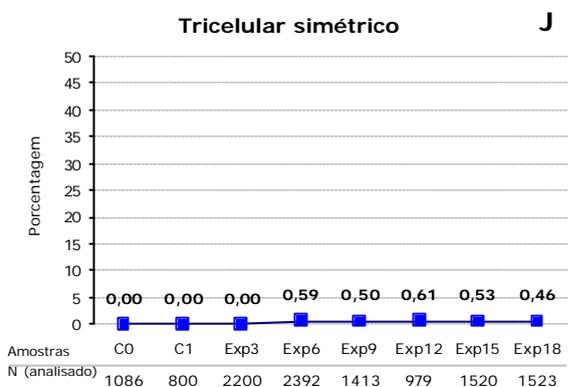
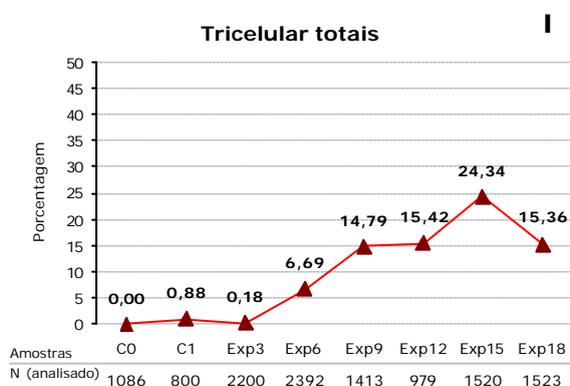
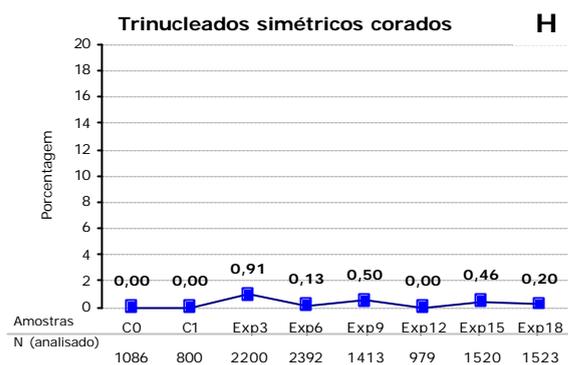
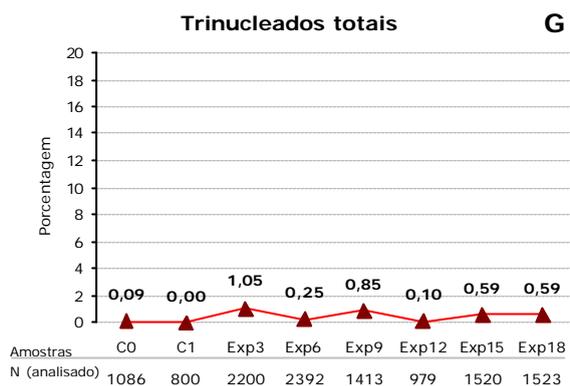


Figura 9 – Análise de grãos de pólen... (cont.) – **G – J** : Porcentagens de cada tipo morfológico observado por amostra. **G**: Total de trinucleados; **H**: Trinucleados simétricos corados; **I**: Total de tricelulares; **J**: Tricelulares simétricos.

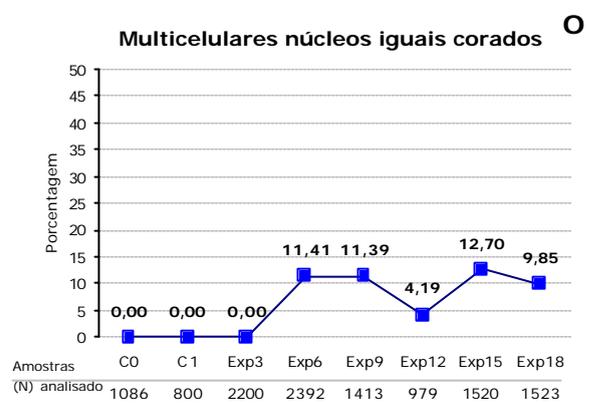
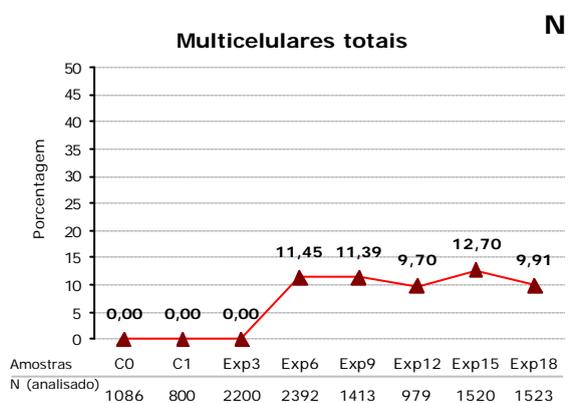
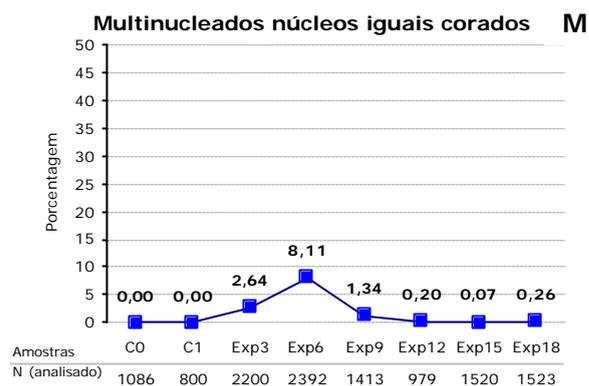
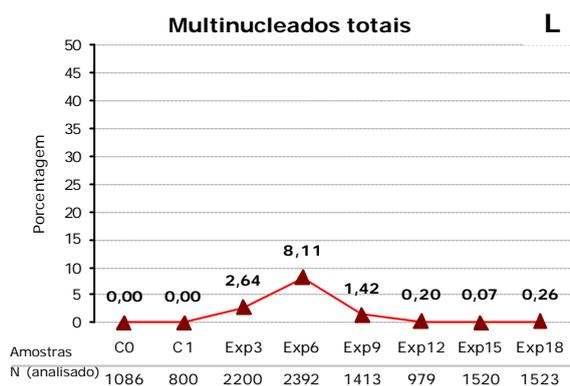


Figura 9 – Análise de grãos de pólen... (cont.) - **L - O**: Porcentagens de cada tipo morfológico observado por amostra. **L**: Total de grãos de pólen multinucleados; **M**: Grãos de pólen multinucleados com núcleos iguais e corados; **N**: Total de grãos de pólen multicelulares; **O**: Grãos de pólen multicelulares com núcleos iguais e corados.

Porcentagem de anteras responsivas

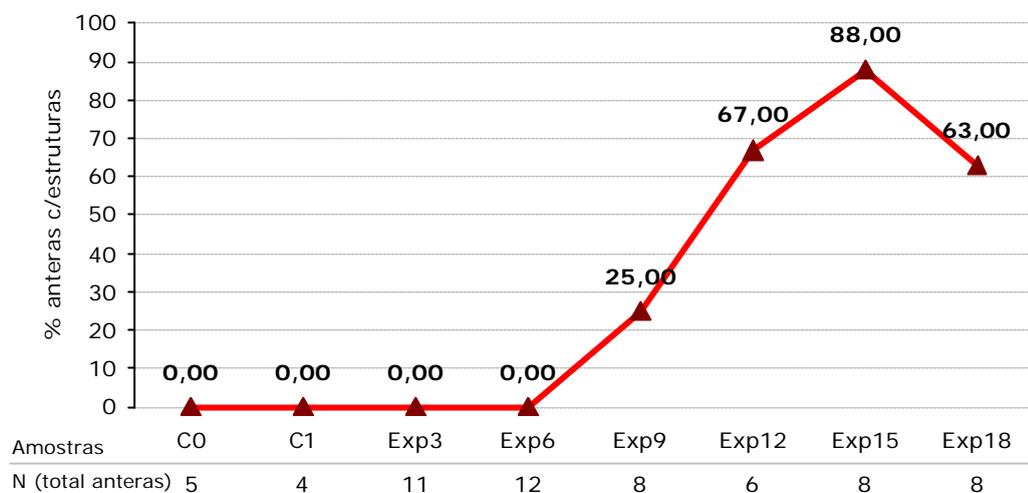


Figura 10 – Porcentagem de anteras responsivas observadas por amostra: C0, C1 e Exp.

Nº médio de estruturas por antera responsiva

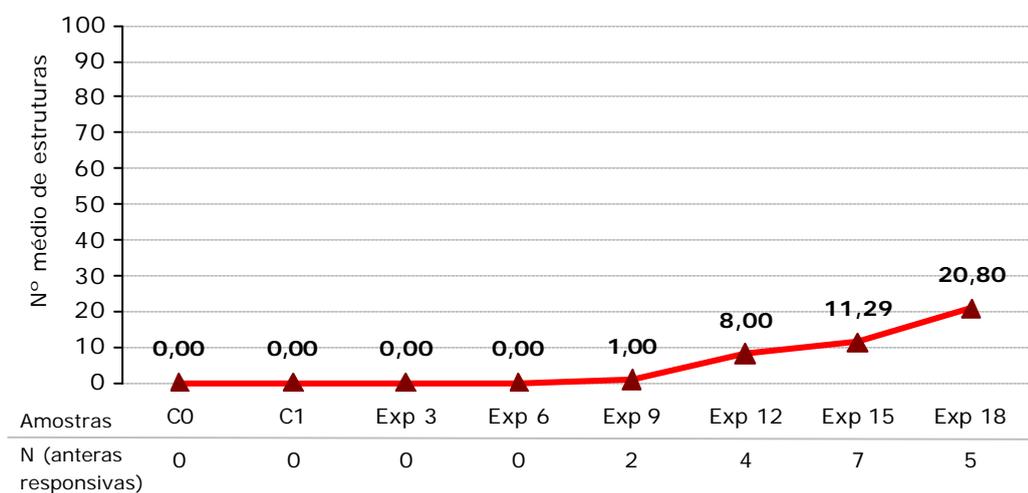


Figura 11 – Número médio de estruturas por antera responsiva observado por amostra: C0, C1 e Exp.

Tabela 12 - Síntese dos resultados da análise citológica da cultivar MN-599, quanto à ocorrência das categorias classificatórias de micrósporos e grãos de pólen. A cor verde representa a presença da categoria no dia de observação, a amarela, presença de anteras responsivas e estruturas (ELsS), e a branca, ausência

Classificação	Dias: -10: início do pré-tratamento; 0: início do cultivo <i>in vitro</i>							
	-10	0	3	6	9	12	15	18
Micrósporos totais	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Binucleados totais	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Binucl. simétricos corados	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Binucl. assimétricos corados	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Bicelulares totais	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Bicel. sim. corados	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Bicel. assim. corado	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Trinucleados totais	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Trinucl. sim. corado	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Trinucl. assim. corado	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Tricelulares totais	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Tricel. simétrico	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Tricel. assim.	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Pólen multi...	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Pólen multinucleado	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Pólen multinucleado núcleos iguais corado	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Pólen multicel.	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Pólen multicel. núcleos iguais corado	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Anteras responsivas	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Estruturas (ELsS)	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo

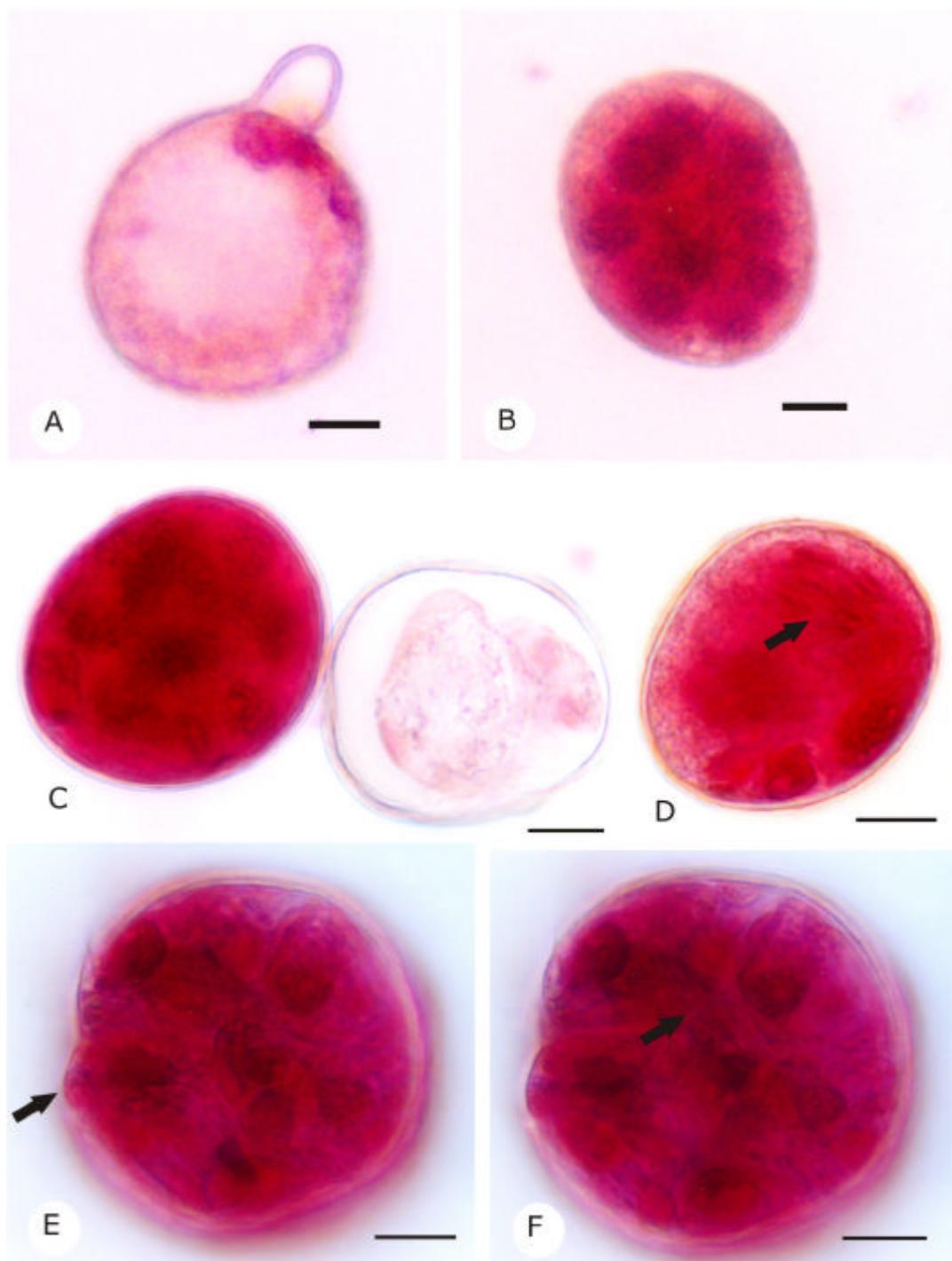


Figura 12 - Estádios de desenvolvimento dos grãos de pólen *in vitro*. A - Três dias de cultivo *in vitro*. B - F - Seis dias de cultivo *in vitro*. A - Grão de pólen trinucleado com deslocamento anormal da esporoderme. B - Grão de pólen multinucleado com mais de oito núcleos. C - Grão de pólen multinucleado com nove núcleos ao lado de um micrósporo plasmolisado. D - Grão de pólen plasmolisado. E - Grão de pólen multicelular com divisão cromossômica mitótica (seta). F - Grão de pólen multicelular com esporoderme parcialmente rompida (seta). G - O mesmo grão de pólen multicelular da Figura E, mostrando a divisão cromossômica mitótica (seta). Escalas: 10 μm .

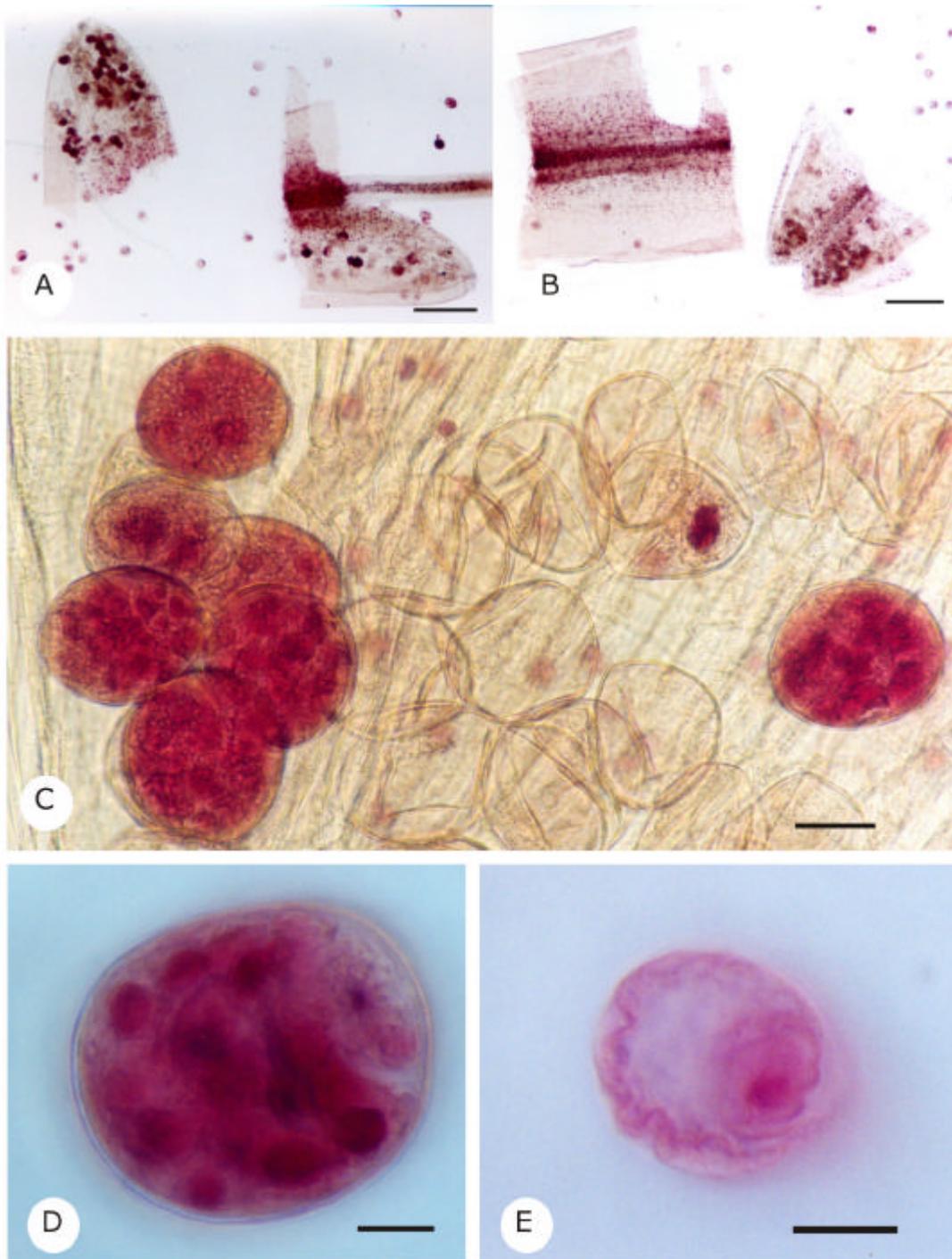


Figura 13 - Estádios de desenvolvimento dos grãos de pólen após seis dias de cultivo *in vitro*. **A** - Pedacos da antera na região proximal (em relação ao filete) com muitos grãos de pólen multinucleados. **B** - Pedacos da antera na região distal (em relação ao filete) com alguns grãos de pólen multinucleados. **C** - Detalhe dos multinucleados na região proximal da antera. **D** - Grão de pólen multicelular com mais de 12 núcleos. **E** - "Pólen-p" com esporoderme anormal. **Escala:** **A e B** - 250 μm ; **C** - 25 μm ; **D e E** - 10 μm .

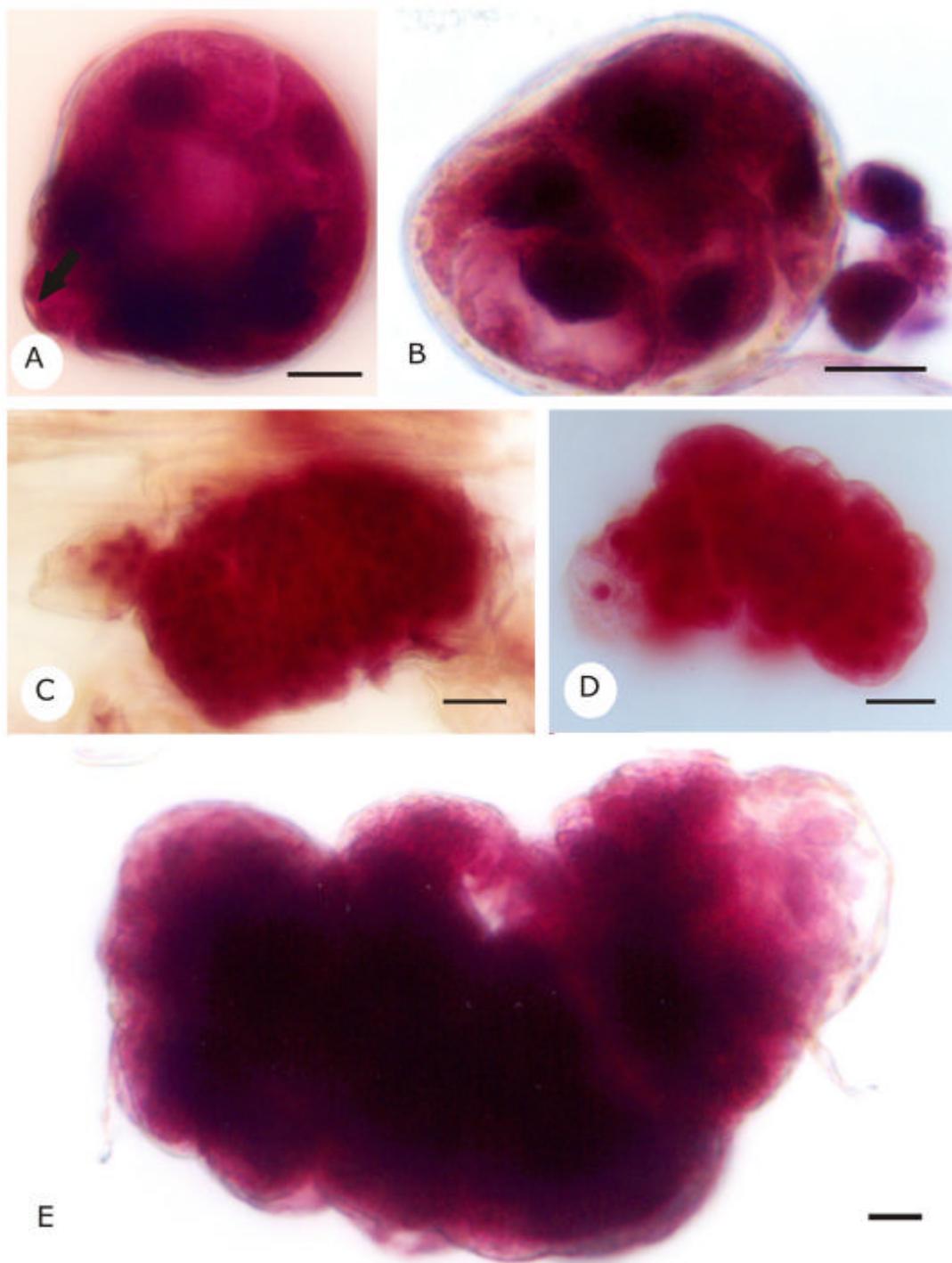


Figura 14 - Estádios de desenvolvimento dos grãos de pólen e estruturas multicelulares aos nove dias de cultivo *in vitro*. A - Grão de pólen multinucleado com esporoderme parcialmente rompida (seta). B - Grão de pólen multicelular com núcleos extravasados e esporoderme parcialmente rompida. C - E - Estruturas multicelulares já liberadas dos grãos de pólen. Escalas: A, B e E - 10 μm ; C e D - 25 μm .

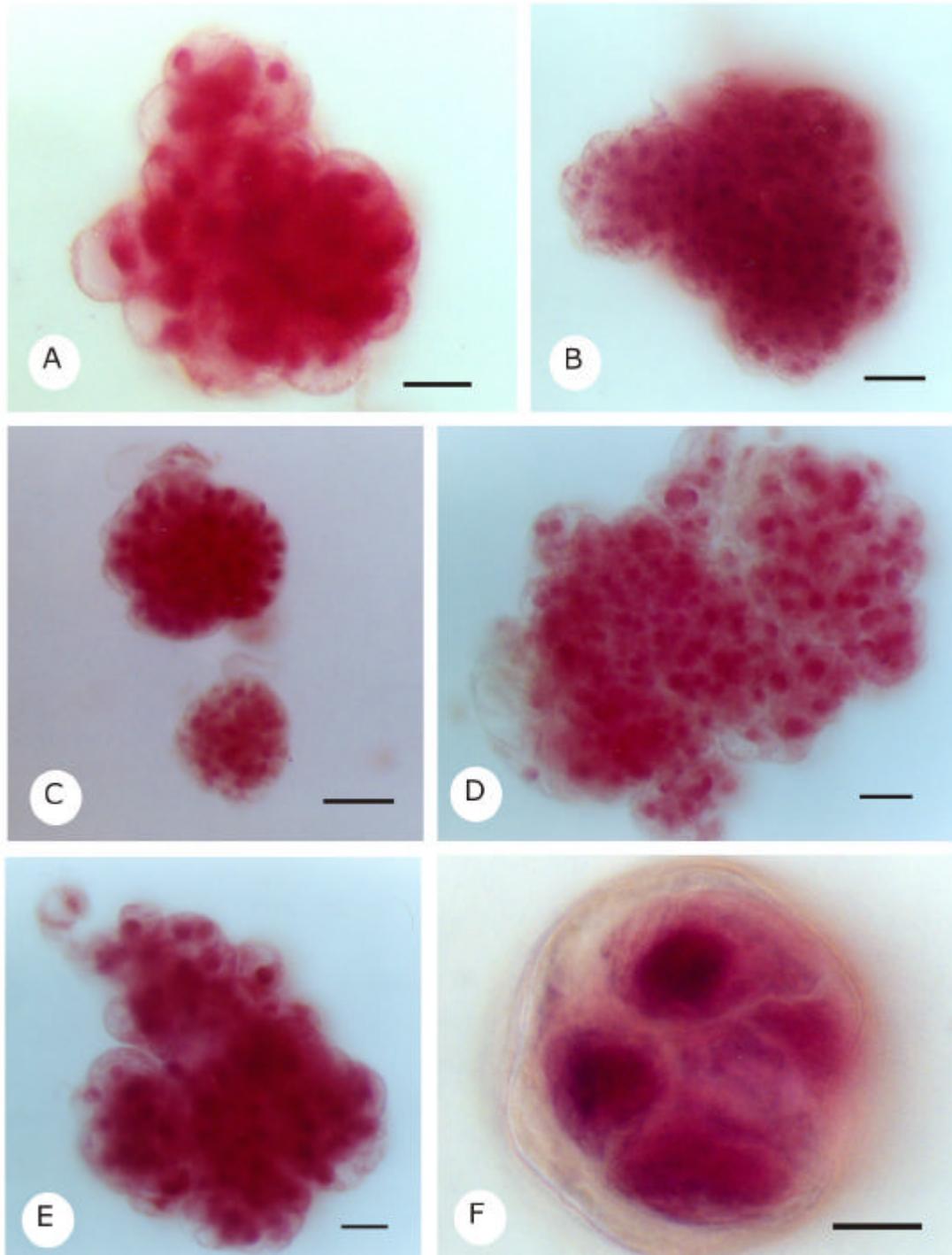


Figura 15 - Estádios de desenvolvimento de estruturas embriogênicas e grão de pólen *in vitro*. A - C - 12 dias de cultivo *in vitro*. D - F - 15 dias de cultivo *in vitro*. A - E - Estruturas embriogênicas multicelulares. F - Grão de pólen multicelular. Escalas: A, B, D e E: 25 μm ; C: 50 μm ; F: 10 μm .



Figura 16 - Estrutura embriogênica multicelular obtida aos 15 dias de cultivo *in vitro*. Escala: 50 μ m.

3.3 - ANÁLISE HISTOLÓGICA E COMPARAÇÕES PONTUAIS COM A ANÁLISE CITOLÓGICA DA CULTIVAR MN-599 DE CEVADA

Nesse item são feitas comparações das seções histológicas, destacando pontualmente equivalências com a citologia, especialmente nas etapas iniciais do desenvolvimento.

Das quatro anteras de cada amostra analisada, nem todas tiveram o mesmo comportamento *in vitro*. Em cada amostra e em cada antera, foi observada grande variação nas respostas ao cultivo *in vitro*. Foram encontradas anteras plasmolizadas, anteras sem formação de grãos de pólen, dependendo do tempo de cultura, com grãos de pólen multinucleados ou multicelulares que posteriormente poderiam (ou não) formar estruturas embriogênicas, anteras com alta ou baixa produção de estruturas, e anteras com alta produção de estruturas. No decorrer da descrição dos tipos morfológicos, também foi verificado o comportamento de cada antera com relação à sua resposta diferencial na formação dos tipos celulares observados.

As análises histológicas das anteras da cultivar MN-599, estabelecidas *in vitro* nos estádios uninucleados inicial a final (Figuras 17 A e B, respectivamente), mostraram que as mesmas possuem apenas duas camadas celulares, representadas por epiderme e endotécio (Figura 17 C).

O micrósporo UI foi analisado de uma antera antes dela ser submetida ao pré-tratamento a 5 °C (Controle zero - C0) e o grão de pólen UT foi analisado após a respectiva antera passar pelo pré-tratamento (Controle 1 - C1), mas antes do cultivo *in vitro*. Na Figura 17, podem ser observados micrósporos e grãos de pólen em diferentes estádios de desenvolvimento. O micrósporo da Figura 17 A é do tipo uninucleado inicial (UI), estando ainda na rota esporofítica. Por outro

lado, na Figura 17 B pode ser observado um grão de pólen (andrófito) jovem, uninucleado final (UT), segundo Sunderland (1974). O núcleo está comprimido em direção oposta ao poro pelo vacúolo, mostrando o sinal (vacuolação) para a entrada na rota gametofítica, razão pela qual esse tipo celular é classificado como grão de pólen jovem.

Com relação aos micrósporos e grãos de pólen analisados histologicamente até aos 34 dias de cultivo, foram encontrados, aos dois dias de cultura *in vitro* alguns tipos celulares que podem ser comparados com aqueles analisados citologicamente. No 2^o dia já ocorreu a primeira divisão mitótica simétrica (Figura 18 A), quando também foram observados micrósporos, bem como rompidos e degenerados (Figura 17 C), e também, grãos de pólen binucleados (Figura 18 B).

A partir desse período, todos os tipos celulares já comentados, citados no período específico em que foram detectados pela primeira vez, não serão mais citados, salvo em comentários pontuais e/ou em legendas de figuras.

Aos quatro dias, também foram observados grãos de pólen binucleados (Figuras 18 C e D), bem como grãos de pólen bicelulares (Figura 18 F), multinucleados e multicelulares (Figura 20 A-F). A seqüência de desenvolvimento desses multinucleados e multicelulares da Figura 20 A, pode ser acompanhada na Figura 21 A-F, para uma melhor interpretação dos resultados e conseqüente compreensão da ontogenia, através das diferentes seções. Na divisão simétrica pôde ser observada uma parede bem definida (Figura 18 F). Observou-se uma celularização dos micrósporos, a partir desse período, no sentido de ingressarem na rota da embriogênese do micrósporo e do grão de pólen (esporofítica) e formarem ELSs ("embryo-like structures" - estruturas embriogênicas, embrióides) com maior rapidez.

As ocorrências do 2º e 4º dia foram comparáveis às do 3º dia relatadas anteriormente para a análise citológica (Figuras 17 D e 18 E), com exceção dos trinucleados (Figura 19 D), que somente foram observados pela análise histológica no 6º dia de cultivo (Figuras 19 E e F). Ainda no 3º dia, na análise citológica, pôde ser verificada a presença de binucleados (Figura 19 A) assimétricos, evidenciando as duas células, generativa e vegetativa, classe que, como antes referido (item 3.2), esteve presente em todas as amostras, desde a coleta das espigas até a 18 dias após o cultivo, embora em frequências variáveis. Foi detectada também a presença do tipo simétrico (Figura 19 C), cujas duas células têm a mesma forma e tamanho, o que também pode ser observado na Figura 19 B (nove dias de cultura).

Aos seis dias começaram a ocorrer rompimentos e extravasamento de materiais celulares, incluindo núcleos e nucléolos, de grãos de pólen multinucleados e multicelulares rompidos (Figura 22 D). Nesse período, também começaram a surgir grãos de pólen multinucleados (Figura 22 E) e multicelulares (Figura 22 D) intensamente corados, podendo ser apontados como os precursores das ELSs, evidenciando que no 6º dia os grãos de pólen estavam na rota da embriogênese (Figura 23 B). Em cada antera, durante o cultivo *in vitro*, há grande variabilidade nas respostas dos micrósporos e dos grãos de pólen, enquanto alguns encaminham-se para a rota embriogênica, em regra, a maioria segue caminhos alternativos. Assim, nesta amostra, foi constatada a presença de grãos de pólen em primeira divisão e binucleados. O tipo bicelular aparece também com dois núcleos extravasados. Os trinucleados (Figura 19 E) foram observados a partir desse período na análise histológica, sendo que na análise citológica foram observados a partir do 3º dia de cultivo. Na Figura 19 F, pode ser observado um grão de pólen trinucleado celularizando, com uma parede mais evidente do que a outra. Nesse período também pôde ser observada divisão celular (Figura 22 C) e uma metáfase com provável

origem de fusão nuclear (Figura 22 F), devido ao grande número de cromossomos, indicando sua proveniência de dois núcleos. Observou-se ainda, grão de pólen em processo de divisão celular assíncronica, apresentando uma metáfase e uma anáfase em segundo ciclo mitótico, além de material nuclear extravasado (Figura 23 A).

A partir do 8º dia foram observadas, além das formas já descritas, estruturas multicelulares não-diferenciadas, ainda com poucas células e sem qualquer indício de organização para a posterior formação de um embrião ou de um órgão.

Aos 10 dias, constatou-se a formação de estruturas multicelulares ainda com esporoderme não totalmente rompida (Figura 23 C e D). A partir de 10 dias, as estruturas tendem a crescer em tamanho e em número. Foram observados também pólenes rompidos, liberando uma estrutura bicelular (Figura 23 E). A partir da análise de seções seriadas, pôde-se verificar que as estruturas foram formadas a partir de um grão de pólen multinucleado. Os grãos de pólen multinucleados e multicelulares extremamente corados (Figura 23 F) poderiam ser considerados "potencialmente embriogênicos", pois a análise de cortes seriados mostrou que esse tipo morfológico desencadeou a formação das estruturas embriogênicas. Na Figura 24 A, pode ser observado um grão de pólen multicelular extravasando material, inclusive núcleo. Somente numa antera, houve registro de ocorrência de tipos celulares.

Aos 12 dias também foram detectadas estruturas multicelulares. A partir de então, observou-se também um maior número de grãos de pólen multinucleados e multicelulares rompidos e com material celular extravasado. Na Figura 24 B podem ser observados um grão de pólen multicelular e um micrósporo plasmolizado com material extravasado. Uma estrutura multicelular com ativas divisões mitóticas pode ser observada na Figura 24 C, originada, provavelmente, de material extravasado. Isso pode ser melhor visualizado na Figura 24 D, onde o mesmo evento dá origem a uma estrutura multicelular.

Micrósporos ou grãos de pólen com material extravasado foram encontrados com grande frequência aos 14 dias de cultivo *in vitro* (especialmente na região proximal da antera em relação ao filete), e também, vários micrósporos e grãos de pólen intensamente corados, observados inicialmente no sexto dia. Isso pode ser demonstrado na Figura 24 E, onde um grão de pólen multicelular extravasou dois núcleos e ainda mostrou ser intensamente corado. Uma estrutura multicelular jovem em plena atividade mitótica pode ser observada na Figura 24 F, onde a esporoderme está parcialmente rompida. Ainda nesse período foram observadas estruturas multicelulares mais volumosas com as mesmas características anteriormente descritas, e localizadas preferencialmente na região proximal da antera (Figura 25 A). A Figura 25 B mostra dois tipos celulares: um grão de pólen bicelular, aparentemente com divisão simétrica e parede celular bem evidenciada e, um multicelular rompido, com dois núcleos extravasados na região proximal da antera.

Nos 16 dias de cultivo *in vitro*, os resultados foram semelhantes aos 14 dias, embora as estruturas multicelulares pareçam mais definidas, estruturadas e maiores (Figura 25 C).

Aos 18 dias, foram encontradas muitas estruturas multicelulares nos lóculos das anteras. Na Figura 25 D, pode ser observada a formação de estruturas multicelulares iniciais, com três células cada uma. Estrutura multicelular maior pode ser observada na Figura 25 E, e um detalhe da mesma, demonstrando atividade mitótica, na Figura 25 F. Nessa imagem verificam-se as dimensões avantajadas das células embriogênicas e seus núcleos muito ativos, com vacúolos nucleolares evidentes.

No 20^o dia de cultivo *in vitro* também foram encontradas muitas estruturas multicelulares (Figura 26 A), embora em uma das anteras analisadas tenham sido verificados apenas grãos de pólen multinucleados.

Aos 22 dias foram detectados vários multicelulares, inclusive aqueles rompidos com material celular extravasado, e também outros tipos celulares anteriormente citados. Na Figura 26 B, pode ser observado um grão de pólen bicelular com uma célula generativa e uma célula vegetativa com dois núcleos. Foram observadas estruturas de diferentes tamanhos, por exemplo: 50, 141 e 258 μm . Na Figura 26 C, pode ser observada uma seção tangencial a uma estrutura jovem, com poucas células, vista em seção mediana na Figura 26 D. Uma das anteras analisadas apresentou um maior número de grãos de pólen multicelulares e estruturas multicelulares pequenas localizados na região proximal da antera, próxima ao filete. Na região distal, próximo à região mediana da antera, foram encontradas estruturas multicelulares com maior tamanho. Observação semelhante foi relatada na análise citológica (ver Figuras 13 A e B).

A atividade celular está bem caracterizada pela presença de várias divisões celulares, evidenciadas por placas metafásicas, inclusive com os sete cromossomos típicos da espécie ($n = 7$ cromossomos) e núcleos em interfase com 1 a 4 nucléolos, demonstrando elevada atividade metabólica das estruturas cultivadas *in vitro* (Figuras 26 E, F). Em todos os tipos morfológicos analisados (de micrósporos até estruturas multicelulares) o amido está presente como substância de reserva, porém não desviando o plano da luz sob microscópio de polarização (Figura 27 A-F). Na Figura 28 A pode ser observada a epiderme com células de tamanho avantajado e/ou em processo de divisão celular peri- ou anticlinal, configurando-se como uma inicial pró-embriônica cuja seqüência de desenvolvimento passa por um estágio semelhante a dos pró-embriões zigóticos (Figuras 28 B e 30 A).

A partir do 22º dia de cultivo *in vitro* também foram observadas estruturas embriogênicas formando-se externas à antera, proliferadas no meio de cultura, evidenciadas na Figura 29 A. Na Figura 29 B e C é detalhada a morfologia de algumas estruturas, e na Figura 29 D o

padrão histológico de uma delas.

Aos 24 dias foram encontradas estruturas preferencialmente na região proximal da antera, sendo observadas duas internas e outras duas externas ao lóculo. Em outra antera analisada, foram verificados vários micrósporos, mas nenhum deles seguiu a rota da embriogênese. Ambas anteras tinham o aspecto "colapsado", com muitos micrósporos plasmolizados. Na Figura 29 E é destacada a morfologia da antera e de algumas estruturas embriogênicas analisadas após 24 dias de cultivo *in vitro*. Quanto à análise das estruturas externas à antera, pôde-se observar que muitas delas eram constituídas por um tecido fundamental com epiderme diferenciada, uni ou pluriestratificada, sem forma definida. O parênquima apresentava amido como substância de reserva e regiões pró-vasculares com diferenciação de elementos traqueais com paredes secundárias, com espessamento helicoidais (Figura 30 B e C). Nessa fase, contagens do número de cromossomos em placas metafásicas evidenciaram a presença de número diplóide de cromossomos.

Em alguns casos a estrutura já apresentava o equivalente a um cotilédone com vascularização (Figura 31 B), cuja morfologia externa é evidenciada na Figura 31 A. Foram observados os primórdios foliares e ápice caulinar de um embrião (Figura 31 B, C e D). Em outros (Figura 32 A), foi possível constatar a presença de ápices de raízes embrionárias adventícias (Figura 32 B), com meristema apical organizado com centro quiescente com derivadas da protoderme e meristema fundamental, bem como derivadas da coifa (Figura 32 C). Em determinadas estruturas a epiderme apresenta a formação de iniciais pró-embriônicas, configurando o desenvolvimento de um embrião sobre outro (Figura 32 D e E). Também ocorrem, eventualmente, tricomas de presença mais freqüente aos 30 dias de cultivo. Algumas estruturas apresentaram a formação de apenas um dos ápices, destacados na Tabela 13 pela ocorrência de três ELSs com

MAC e duas com MAR. Essas estruturas embriogênicas não atingiram o padrão de desenvolvimento das ELSs anteriormente descritas, como por exemplo a da Figura 31. Outras estruturas, que geralmente seriam classificadas como embriões, quando analisadas histologicamente não apresentaram qualquer evidência desse grau de desenvolvimento (Figura 33 A-C).

Aos 26 dias foram observadas poucas estruturas. Na Figura 33 D e E são apresentadas as estruturas embriogênicas e a antera, sob estéreo microscopia.

Aos 30 dias, como também no 28^o, não foram observadas estruturas internas. Entretanto, aos 30 dias foram identificadas anteras com até 40 estruturas liberadas ao meio. Numa das anteras, uma dentre as oito estruturas presentes, apresentava epiderme com pró-embriões (Figura 34 A), semelhante ao que foi mostrado na Figura 32 D e E aos 24 dias. Uma outra estrutura apresentou formação de MAR (Figura 34 C) e MAC (Figura 34 B e C). Na região do nó cotiledonar, vários cordões pró-vasculares podem ser observados, irradiando vascularização para a região escutelar. Em outra, a epiderme pluriestratificada apresentou tricomas (Figura 34 D). Na Figura 35 A (marcada com *) é destacada a morfologia de outra estrutura, cuja organização interna demonstra a presença de raízes embrionárias adventícias (Figuras 35 C e D), cujo ápice meristemático evidencia, claramente, o conjunto de iniciais e suas derivadas, formadoras da protoderme, do meristema fundamental e do meristema pró-vascular (Figura 35 E). A diferenciação de uma coleorriza é evidente na Figura 35 F. A região do meristema apical caulinar (não demonstrada) possui uma organização em três camadas - C1, C2 e C3 (Figura 35 B). Ainda, foram observadas estruturas apresentando apenas um dos ápices, como é o caso da estrutura destacada na Figura 35 A (seta), onde pode ser observado um primórdio foliar. Na análise histológica não foi identificada a conexão com o eixo embrionário, apenas a presença de

epiderme, meristema fundamental e vários cordões pró-vasculares. Em outras estruturas, porém, foram observados MAR (geralmente em início de desenvolvimento).

No 32^o dia, como também aos 22, houve grande ocorrência de material celular extravasado. Foram observadas estruturas internas e externas à antera. Na análise das estruturas externas, além de serem observadas os tipos amorfos, foi constatada uma estrutura apresentando MAR (Tabela 13).

As anteras analisadas após 34 dias de cultivo apresentaram muitos micrósporos e muitos núcleos extravasados, além de outros tipos celulares, semelhante aos outros períodos da análise. Esses tipos celulares ocorreram ao longo de todo o período de análise, a partir do seu primeiro período de ocorrência. Nenhuma estrutura multicelular foi observada.

Na tabela 12 é apresentado uma síntese da análise histológica da cultivar MN-599 através do registro de presença (+) e ausência (-) para as diferentes categorias de variantes morfológicas encontradas durante a análise, desde micrósporos, grãos de pólen, até estruturas multicelulares e ELSs. As cores verde e amarela foram utilizadas apenas para destaque.

Tabela 13 - Síntese da análise histológica da cultivar MN-599 através do registro de presença (+) e ausência (-) para as categorias classificatórias de micrósporos e grãos de pólen. A cor verde representa a presença (+) da categoria no dia de observação e a amarela, presença de ELSs externas, com seus respectivos números de ocorrência

Cv.	Classificação	Dias																	
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	
MN-599	Micrósporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	1ª mitose	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Binucleado	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
	Bicelular	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	
	Trinucleado	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Multinucleados	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
	Multinucleados/Multicelulares rompidos, material celular extravasado	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Multicelulares	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Estruturas Multicelulares	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
	N° de ELSs (embrióides) externas	sem forma											18	28	2		42	2	
		MAC												3			2		
		MAR												2			3	1	
		Bipolares												2			3		

**ANÁLISE SERIAL DOS MICRÓSPOROS E DOS
GRÃOS DE PÓLEN OBTIDOS *IN VITRO***

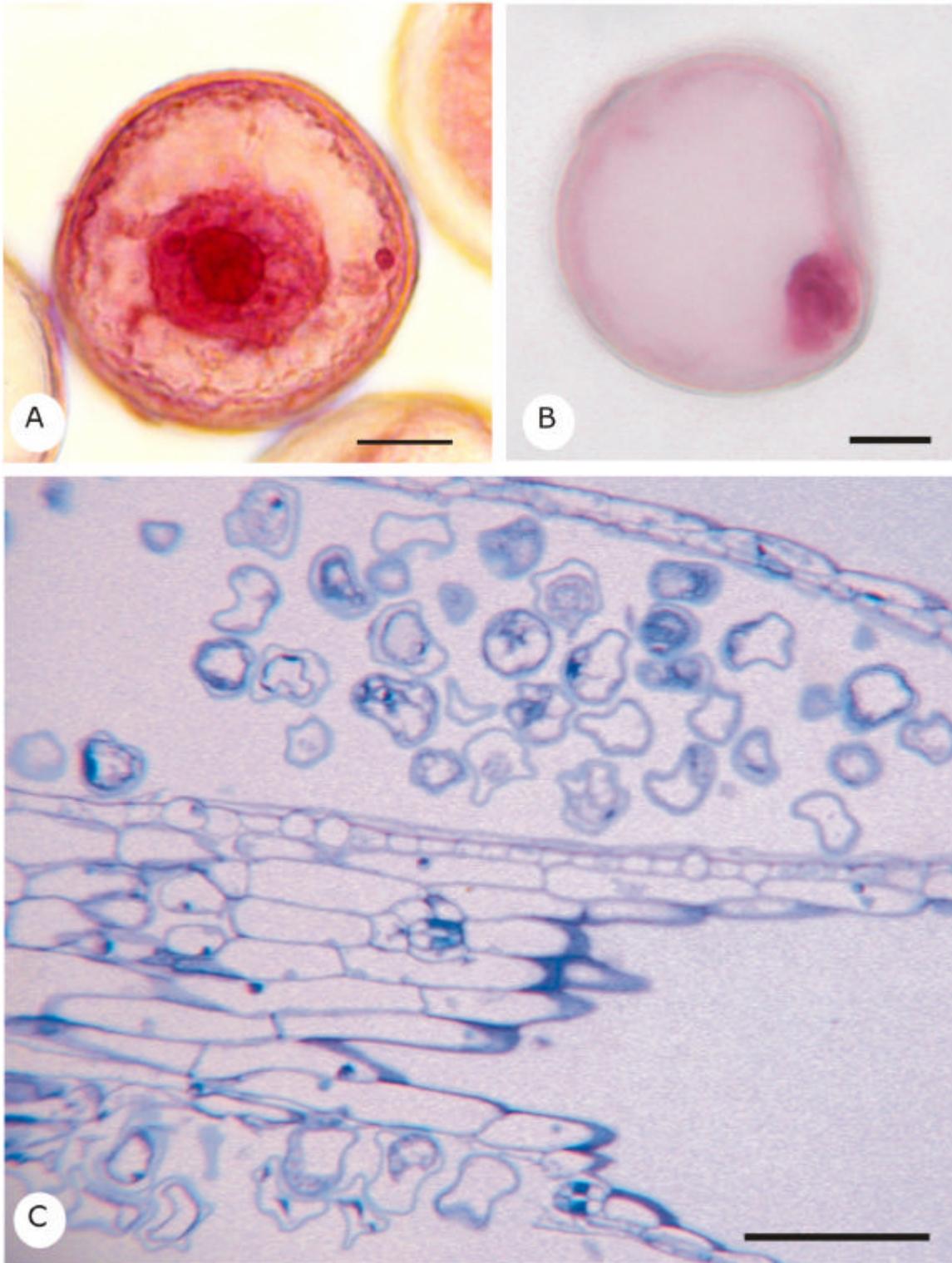


Figura 17 - Micrósporos e grãos de pólen de cevada antes e após o cultivo *in vitro* de anteras da cultivar MN-599. A - Micrósporo antes do pré-tratamento = C0. B: Grão de pólen jovem após pré-tratamento = C1; o grande vacúolo indica o início da rota gametofítica. C: Vista geral de uma antera cultivada *in vitro* durante 2 dias e seccionada longitudinalmente (3 μm). Escalas: A e B - 10 μm . C- 100 μm .

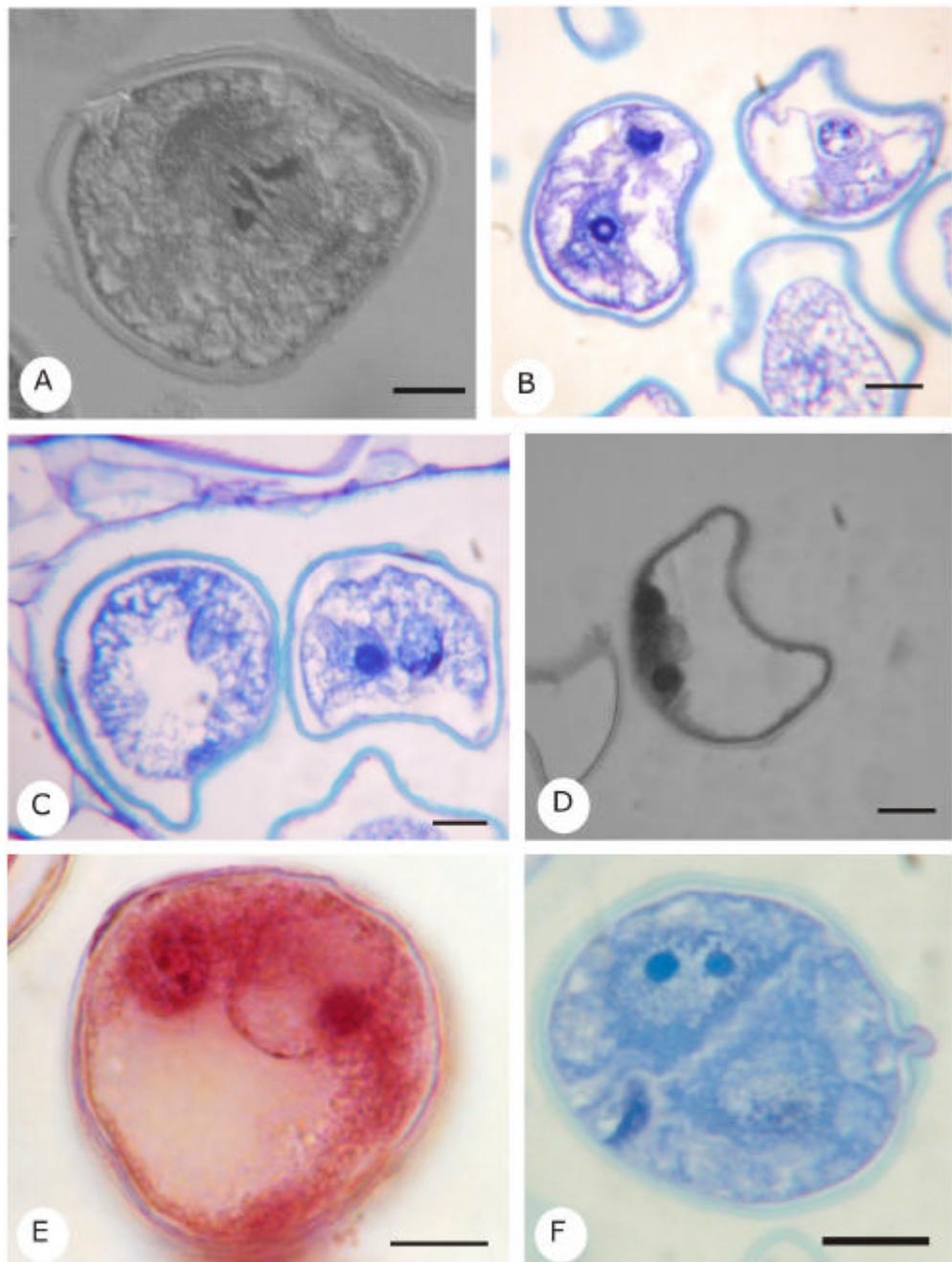


Figura 18 - Grãos de pólen de cevada da cultivar MN-599 cultivados *in vitro* durante dois, três e quatro dias. Figuras A-D e F: Seções (3 μm) longitudinais de anteras cultivadas *in vitro*. Figura E: Análise citológica. A: Primeira divisão celular simétrica aos dois dias de cultivo. **B:** Binucleado assimétrico e uninucleados aos dois dias de cultivo. **C:** Binucleado assimétrico e uninucleado com amido aos quatro dias de cultivo. **D:** Binucleado simétrico com forma irregular aos quatro dias de cultivo. **E:** Binucleado assimétrico com grande vacúolo aos três dias de cultivo, analisado citologicamente. **F:** Bicelular simétrico com um dos núcleos com dois nucléolos aos quatro dias de cultivo. **Escala:** 10 μm .

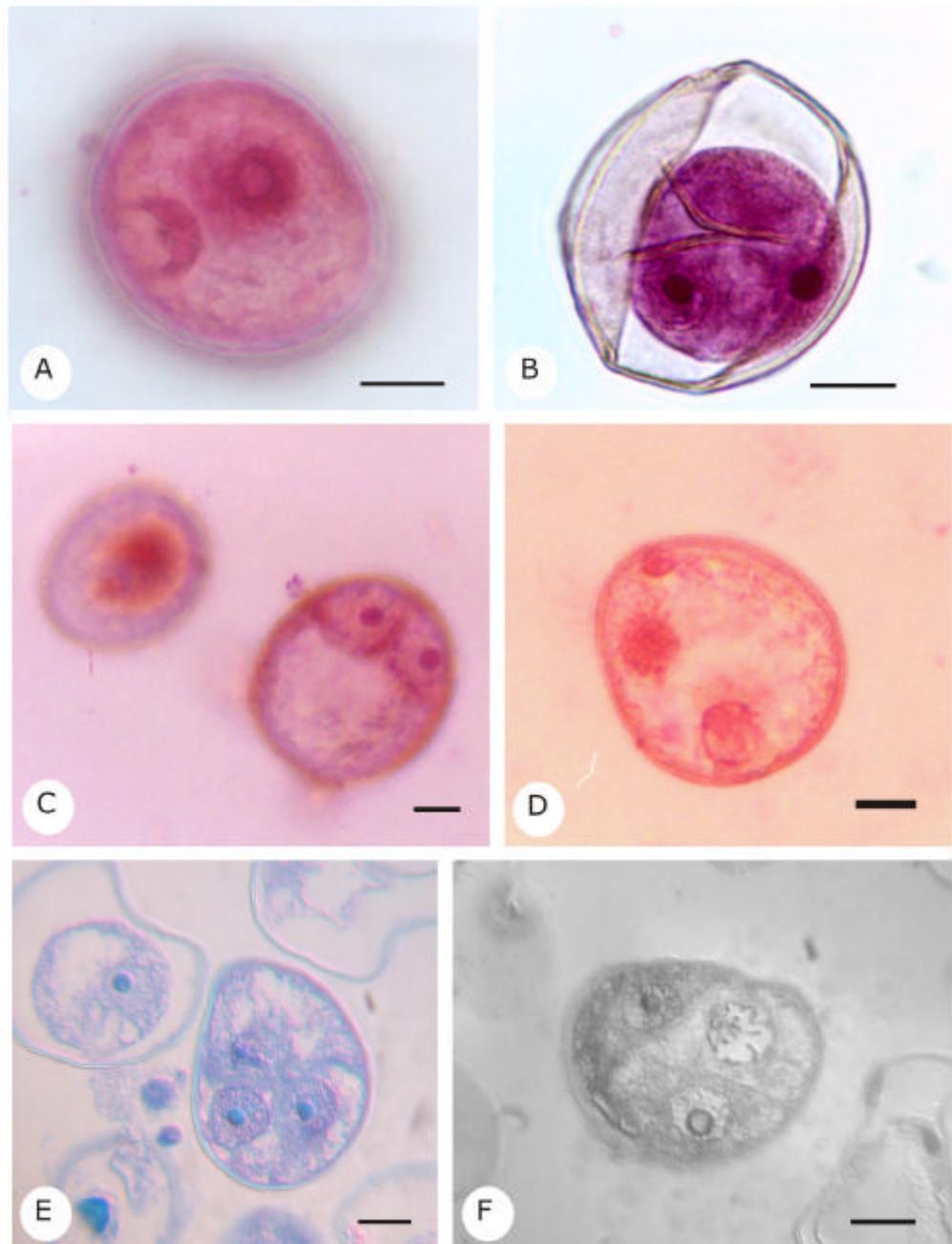


Figura 19 - Grãos de pólen de cevada da cultivar MN-599 cultivados *in vitro* durante três, seis e nove dias. Figuras A-D: Análise citológica; Figuras E-F: Seções (3 µm) longitudinais de anteras cultivadas *in vitro*. A: Binucleado assimétrico aos três dias de cultivo, analisado citologicamente. B: Binucleado simétrico aos nove dias de cultivo. C: Bicelular simétrico aos três dias de cultivo. D: Trinucleado aos três dias de cultivo. E: Trinucleado aos seis dias de cultivo. F: Trinucleado ocorrendo citocinese. Escalas: 10 µm.

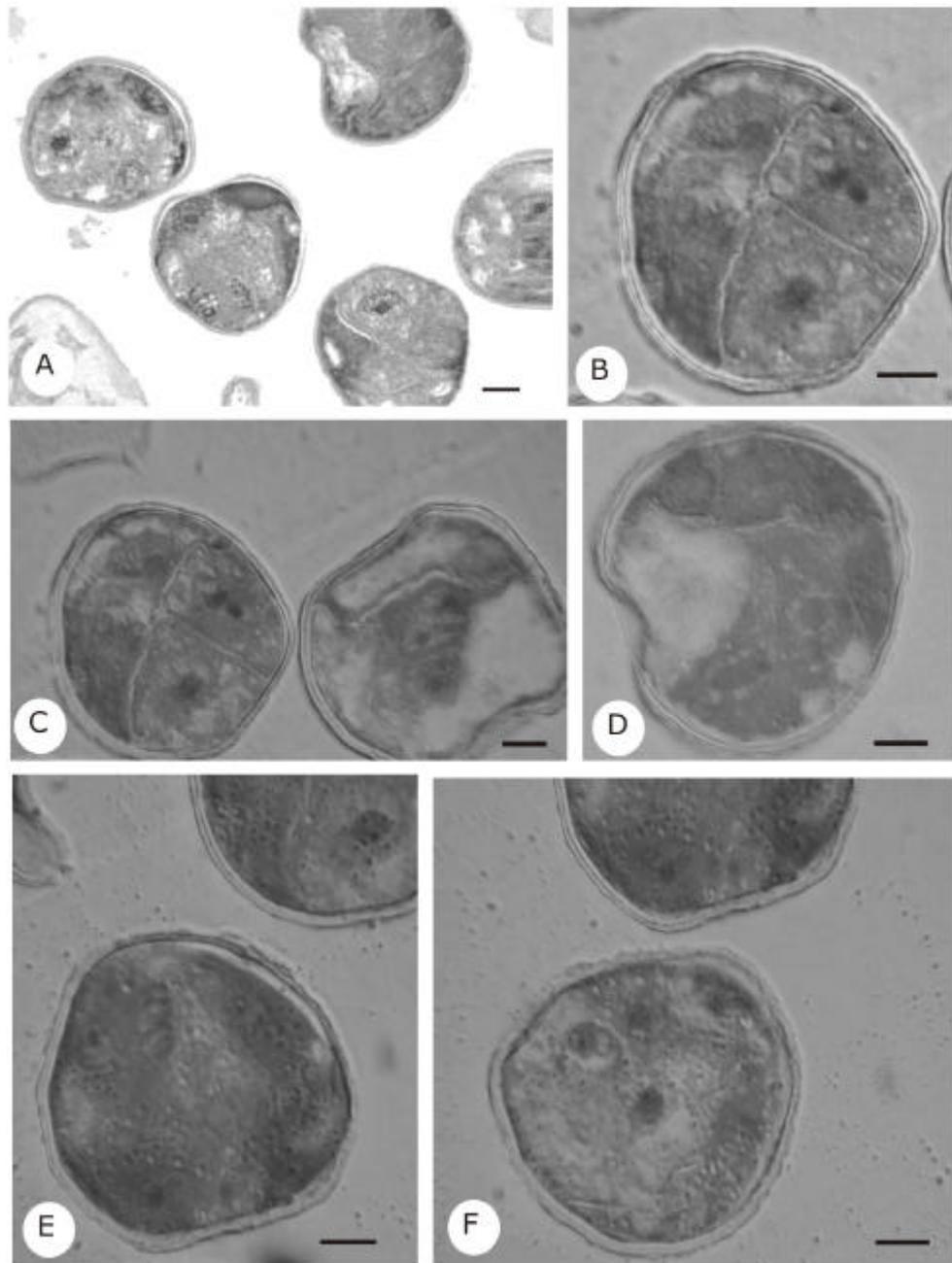


Figura 20 - Grãos de pólen de cevada da cultivar MN-599 cultivados *in vitro* durante quatro dias. Seções ($3\ \mu\text{m}$) longitudinais de anteras cultivadas *in vitro* observadas em contraste interferencial (DIC). A: Multinucleados e multicelulares. B-F: Detalhe dos multicelulares. Escalas: $10\ \mu\text{m}$.

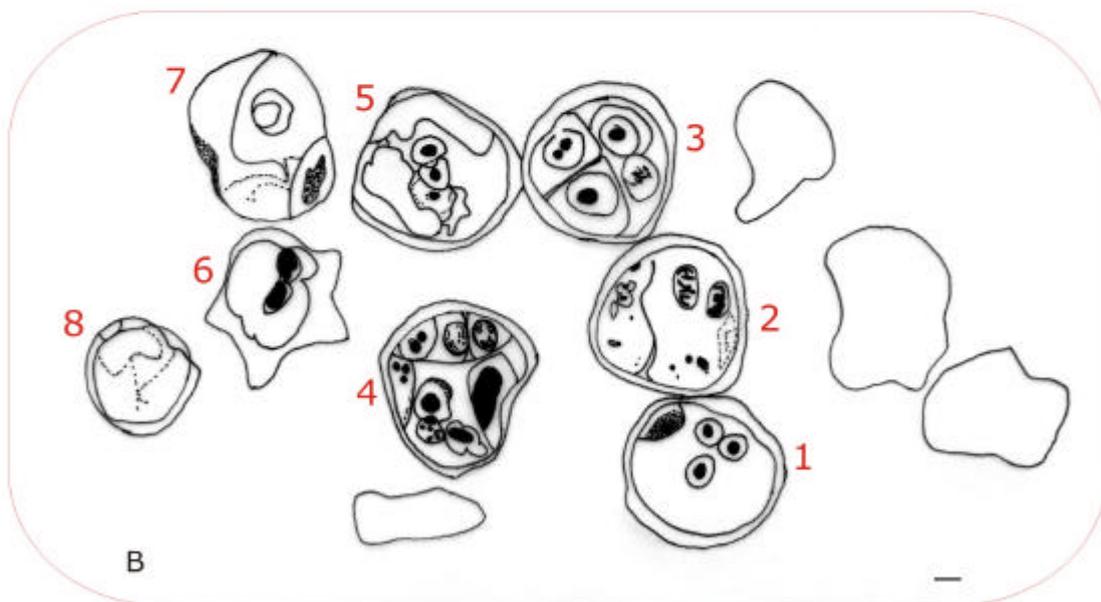
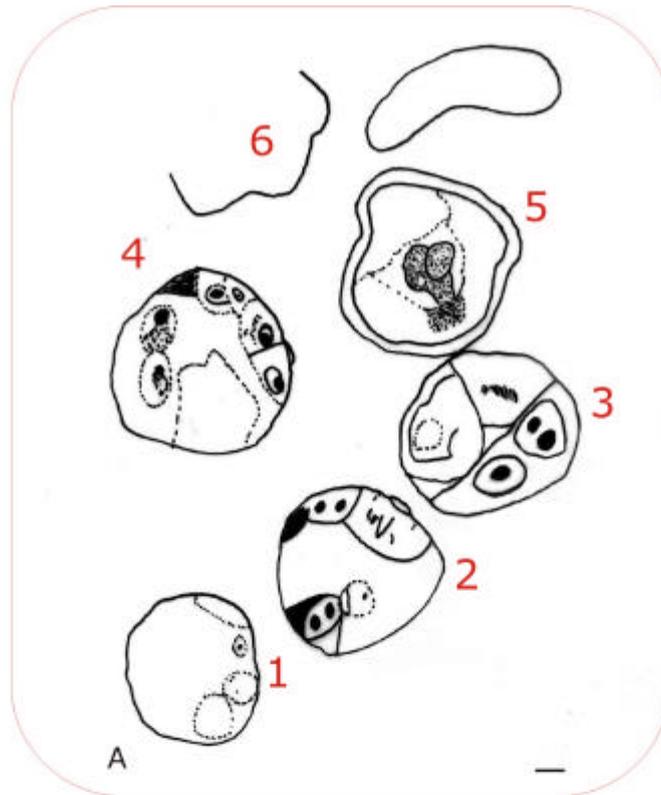


Figura 21 - Seqüência do desenvolvimento dos micrósporos e dos grãos de pólen, cultivados *in vitro* durante 4 dias, a partir da análise de seções histológicas seriadas. Cultivar MN-599. A - Seqüência 1, seção 1. B - Seqüência 2, seção 2. Escalas = 10 μ m.

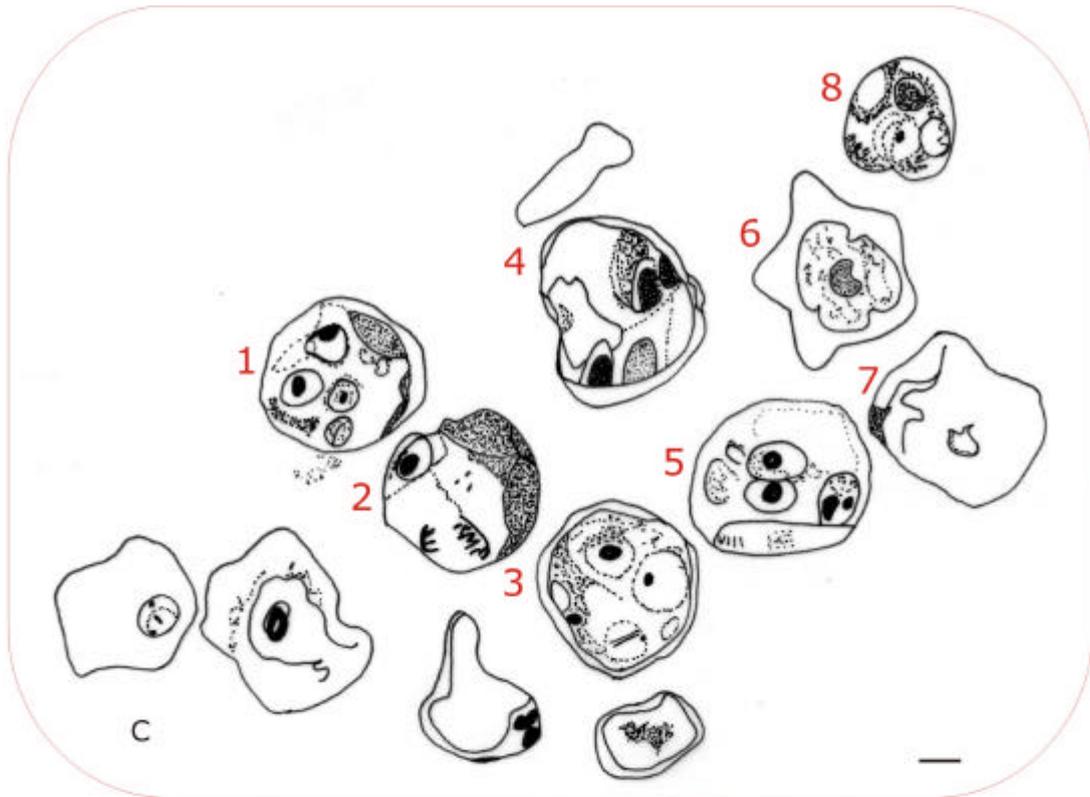


Figura 21 - Seqüência do desenvolvimento... (cont.). **C** - Seqüência 3, seção 3. **D** - Seqüência 4, seção 4. Escalas = 10 μ m.

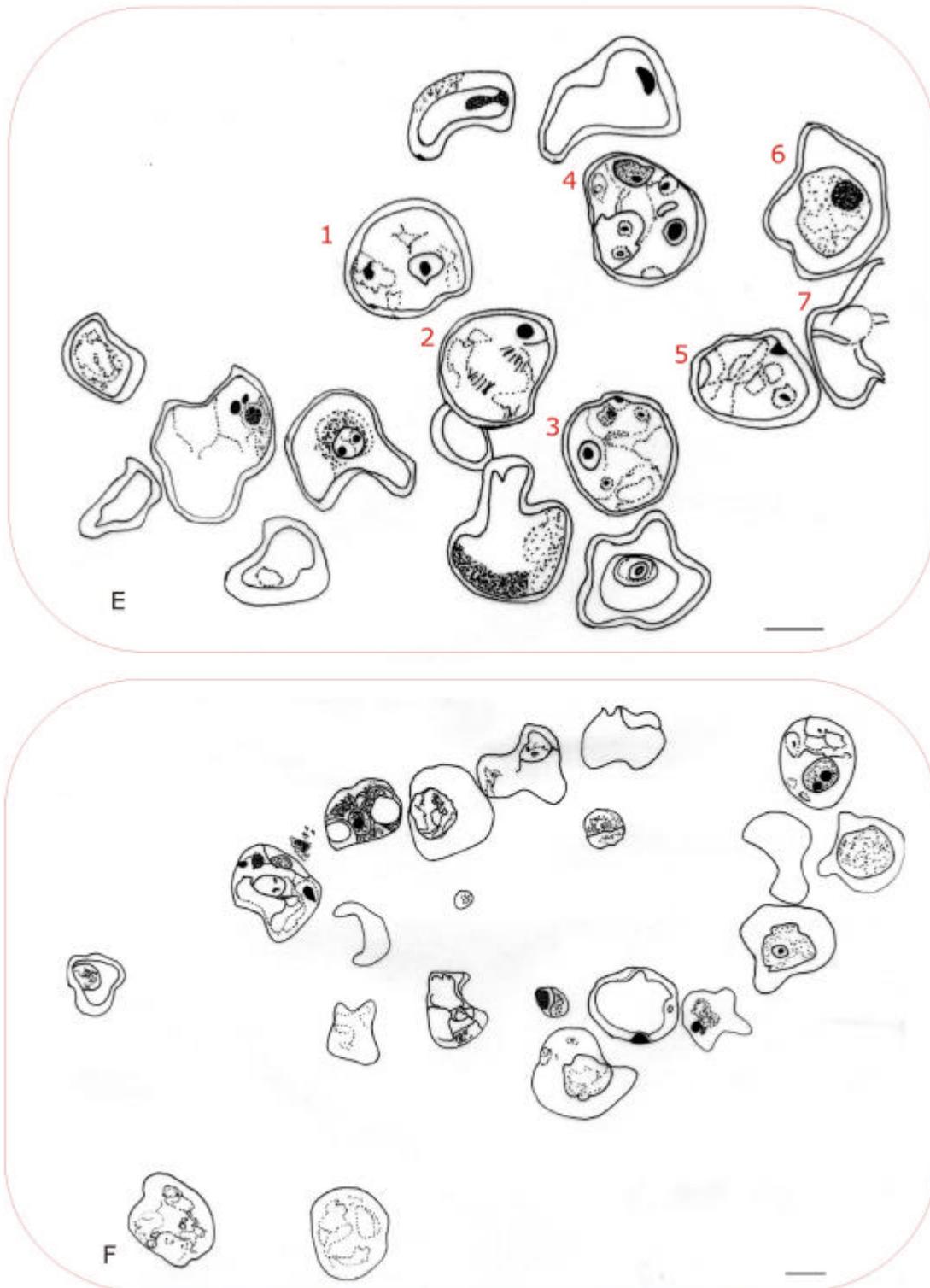


Figura 21 - Seqüência do desenvolvimento... (Cont.). **E** - Seqüência 5, seção 5. **F** - Seqüência 6, seção 8. As seqüências 6 e 7 foram perdidas. **Escala**s = 30 μ m.

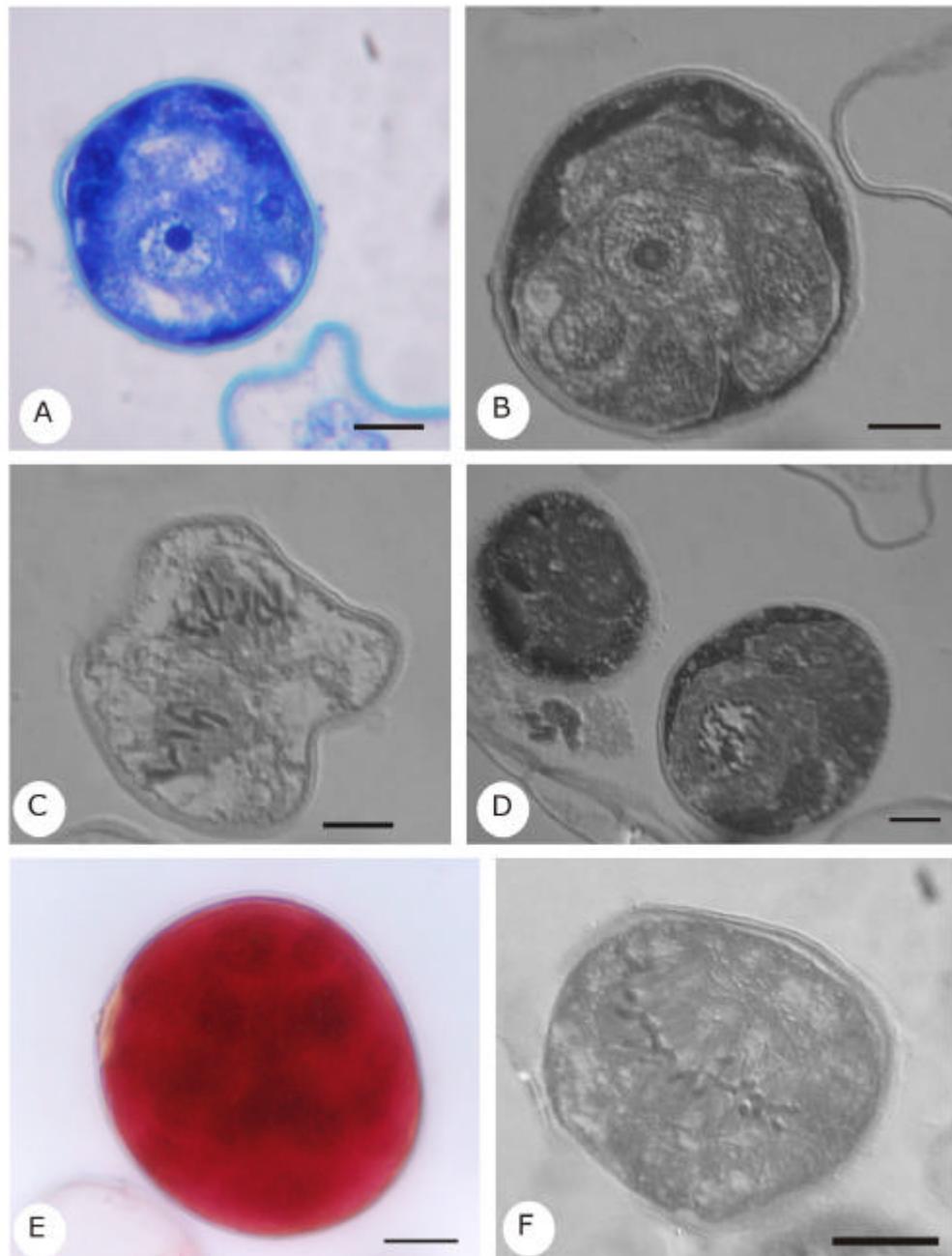


Figura 22 - Grãos de pólen de cevada da cultivar MN-599 cultivados *in vitro* durante seis dias. Figuras A-D e F: Seções (3 μm) longitudinais de anteras cultivadas *in vitro*. Figura E: Análise citológica. A-B: Multinucleados. C: Divisão celular. D: Multinucleados com dois núcleos extravasados. E: Multinucleado com 20 núcleos. F: Grão de pólen com provável fusão nuclear, devido ao maior número de cromossomos observado. Escalas: 10 μm .

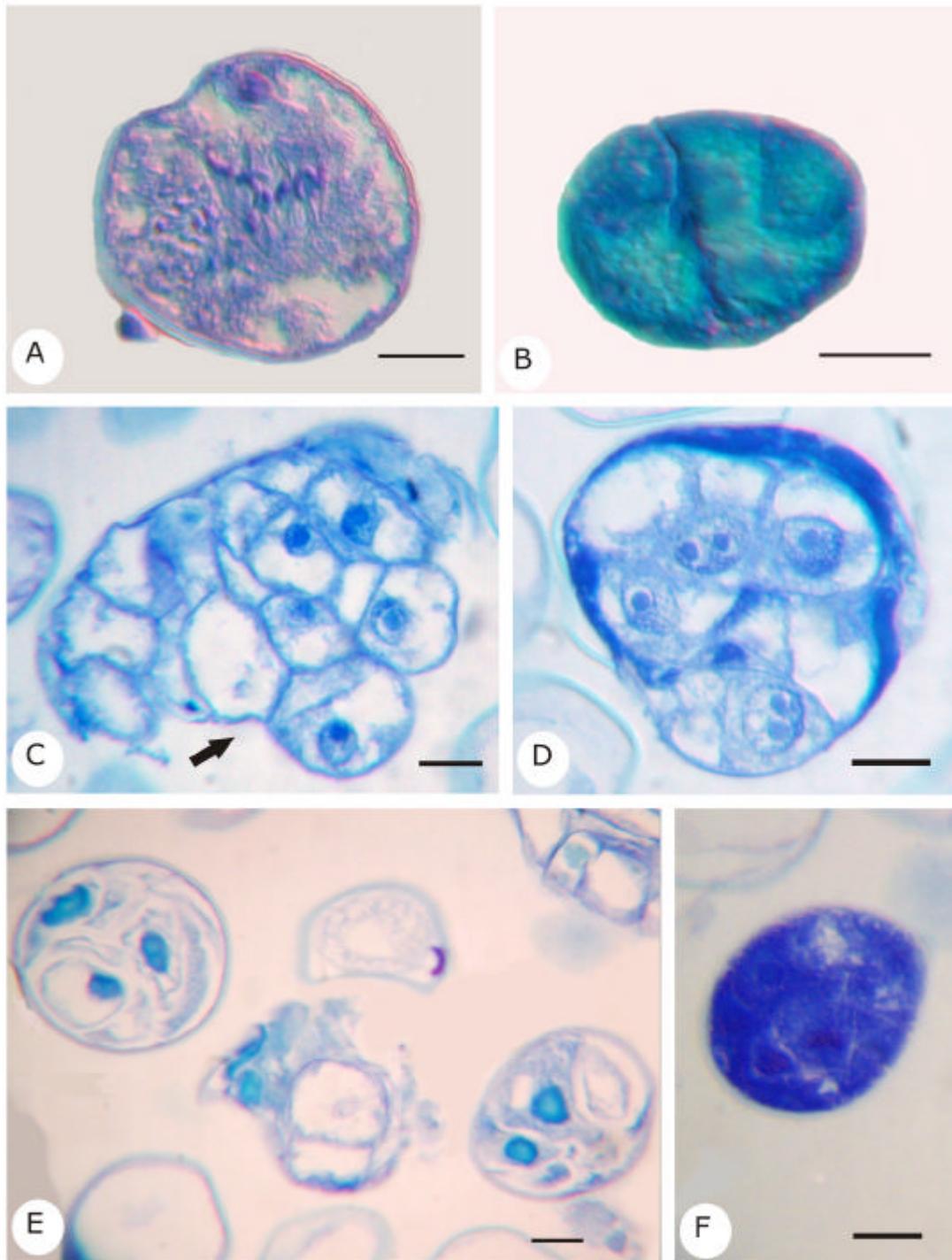


Figura 23 - Grãos de pólen e estruturas embriogênicas aos 6 (A e B) e 10 dias (C-F) de cultivo *in vitro*. A - Divisão celular assíncrona em um grão de pólen. B - Grão de pólen multicelular, entrando na rota embriogênica. C - Estrutura multicelular em desenvolvimento com esporoderme parcialmente rompida (seta). D - Estrutura multicelular em estágio inicial de desenvolvimento, ainda com esporoderme. E - Grãos de pólen multicelulares, um deles está rompido, apresentando estrutura bicelular. F - Grão de pólen multicelular intensamente corado. Escalas: 10 μ m.

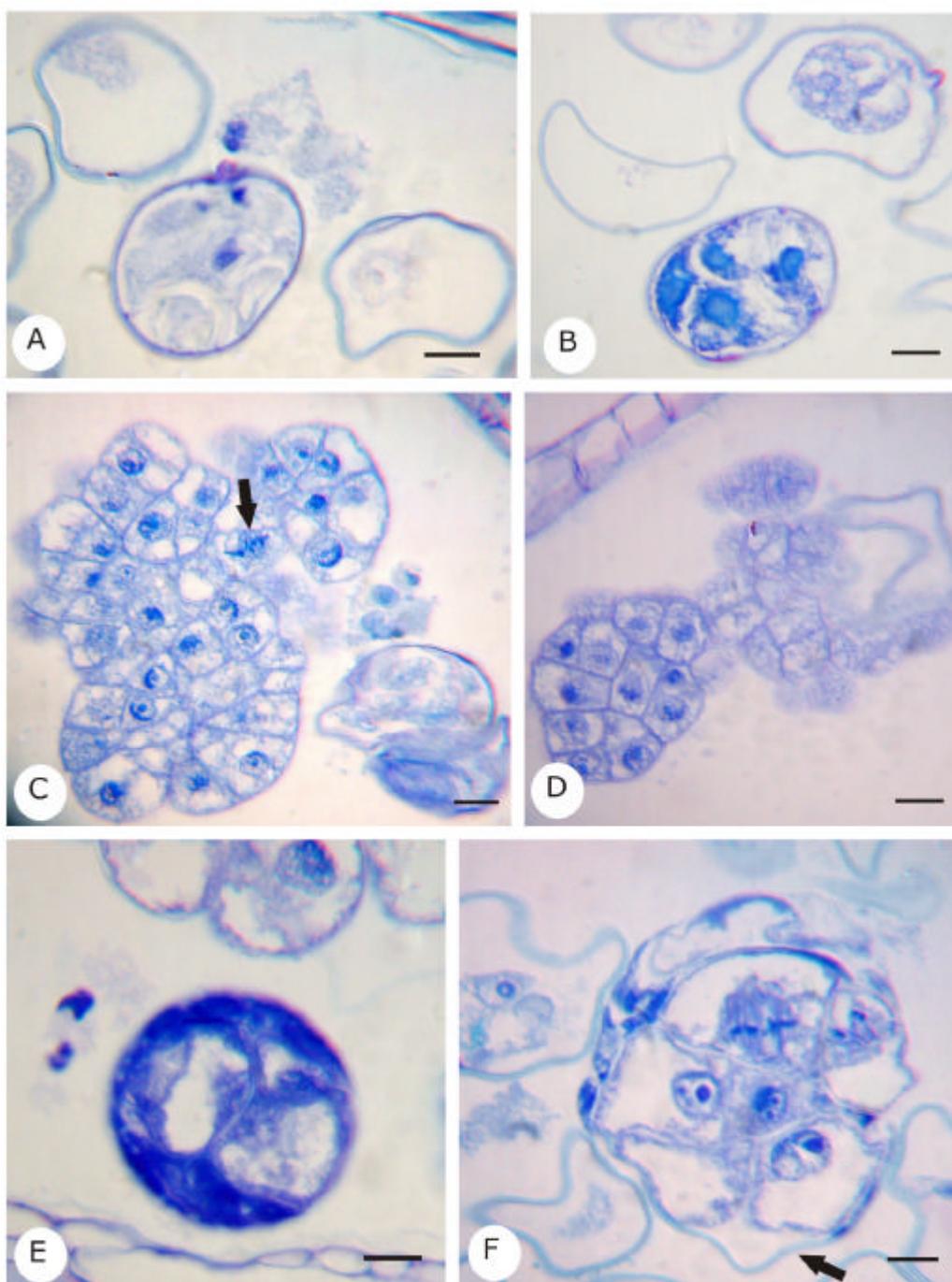


Figura 24 - Grãos de pólen e estruturas embriogênicas aos 10 (A), 12 (B-D) e 14 dias (E e F) de cultivo *in vitro*. A - Grão de pólen multicelular com material extravasado. B - Grão de pólen multicelular e um micrósporo plasmolizado com material extravasado. C - Estrutura multicelular com divisão mitótica (seta). D - Estrutura multicelular em desenvolvimento sendo liberada da esporoderme. E - Grão de pólen multicelular intensamente corado, com dois núcleos extravasados. F - Estrutura multicelular no início do desenvolvimento, apresentando ainda a esporoderme (seta). Escalas: 10 μ m.

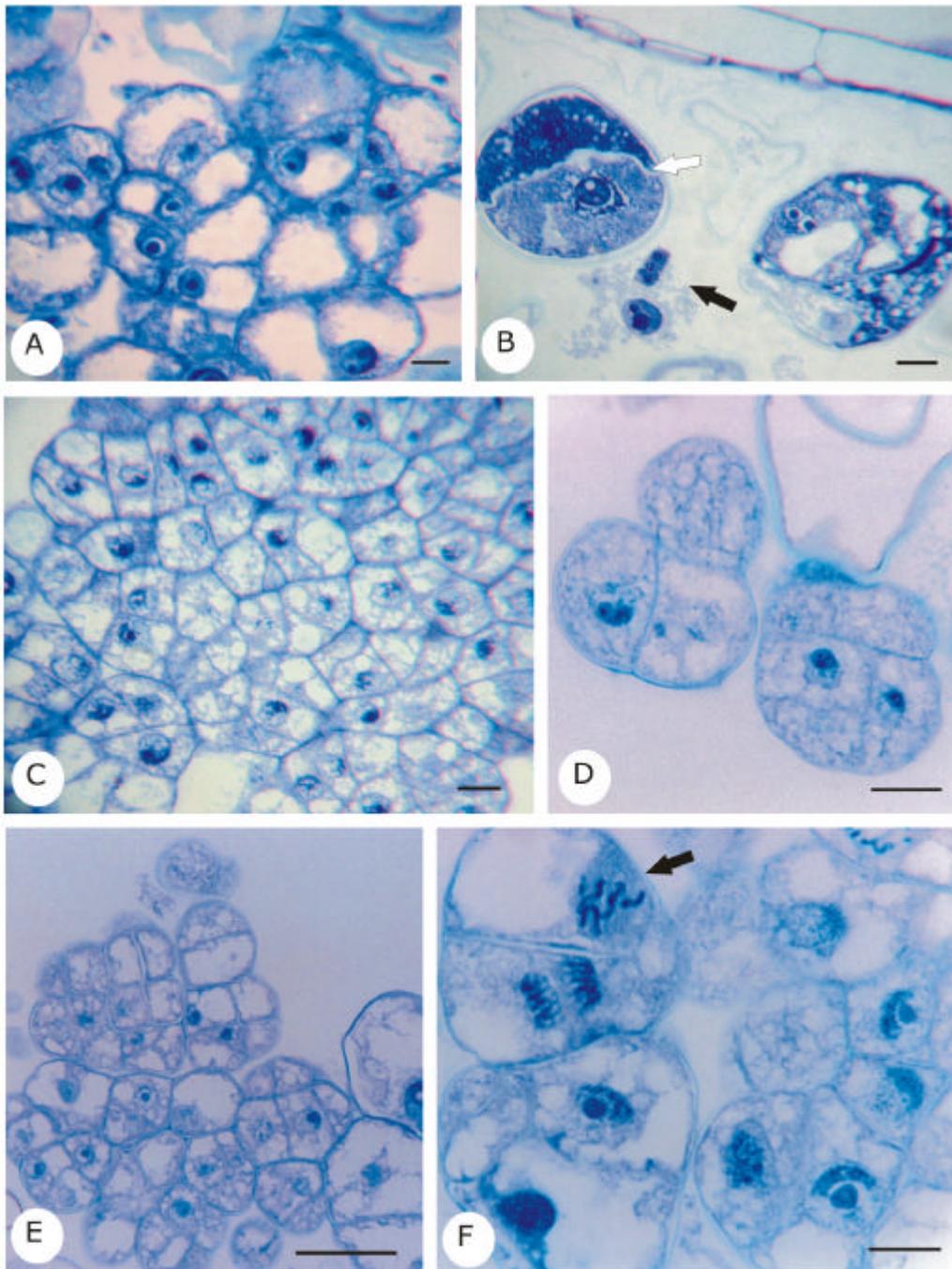


Figura 25 - Grãos de pólen e estruturas embriogênicas aos 14 (A e B), 16 (C) e 18 dias (D e F) de cultivo *in vitro*. A - Estrutura multicelular com células volumosas. B - Grão de pólen bicelular com parede evidenciada (seta branca), e um multicelular rompido com dois núcleos extravasados (seta preta). C- Estrutura multicelular. D - Estruturas embriogênicas em início de desenvolvimento, apresentando somente três células. E - Estrutura multicelular. F - Detalhe da figura E, mostrando divisões mitóticas (seta). Escalas: 10 μm .

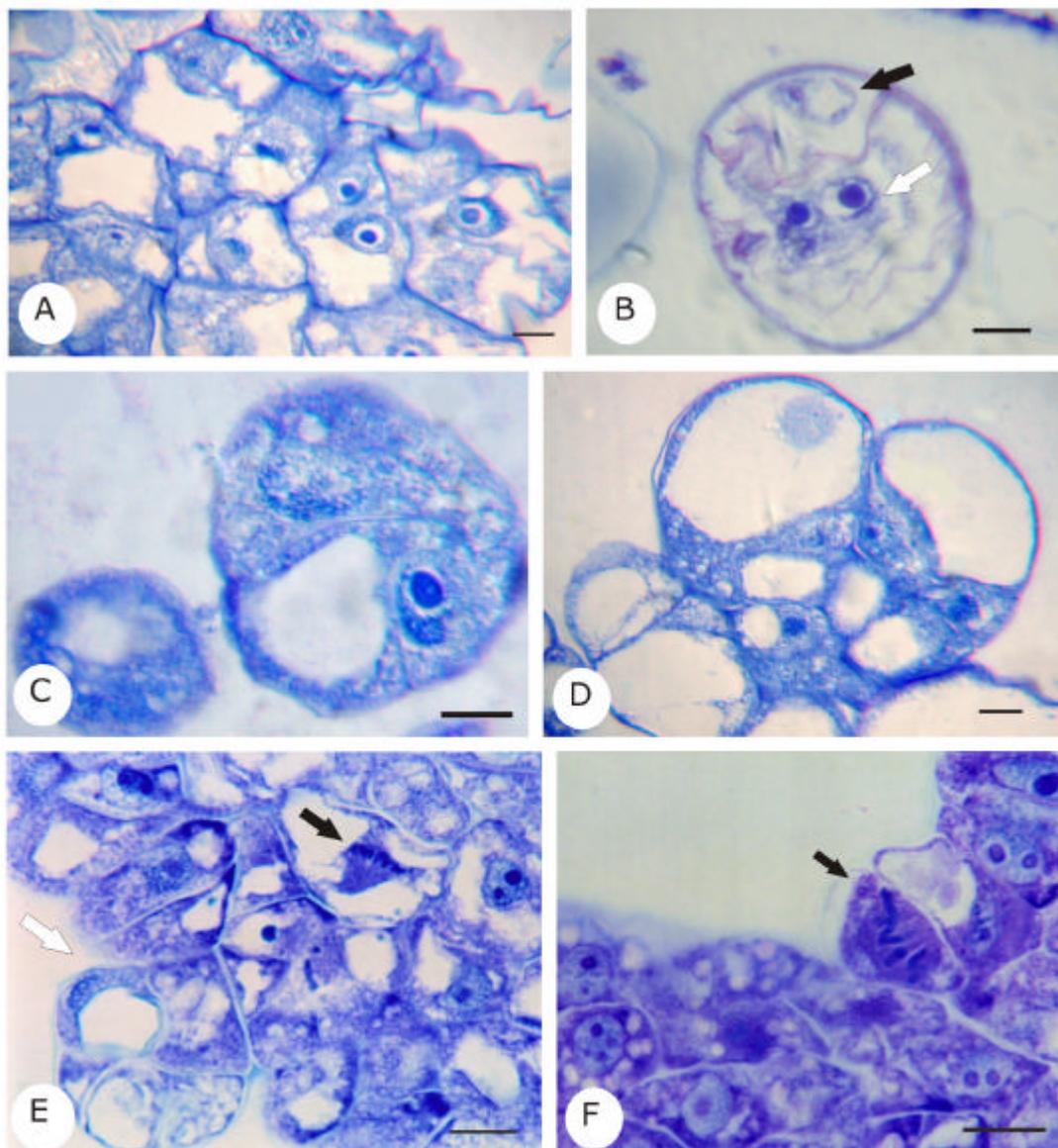


Figura 26 - Grãos de pólen e estruturas embriogênicas aos 20 (A) e 22 dias (B-F) de cultivo *in vitro*. **A** - Estrutura embriogênica. **B** - Grão de pólen bicelular, com célula generativa (seta preta) e célula vegetativa com dois núcleos (seta branca). **C** - Estrutura embriogênica jovem, em seção tangencial. **D** - Estrutura da Figura C em seção mediana. **E** - Epiderme apresentando estruturas semelhantes a pró-embriões (seta branca) e uma placa metafásica (seta preta) com $n=7$ cromossomos. **F** - Epiderme com placa metafásica (seta) e células com núcleos evidentes. **Escala:** 10 μm .

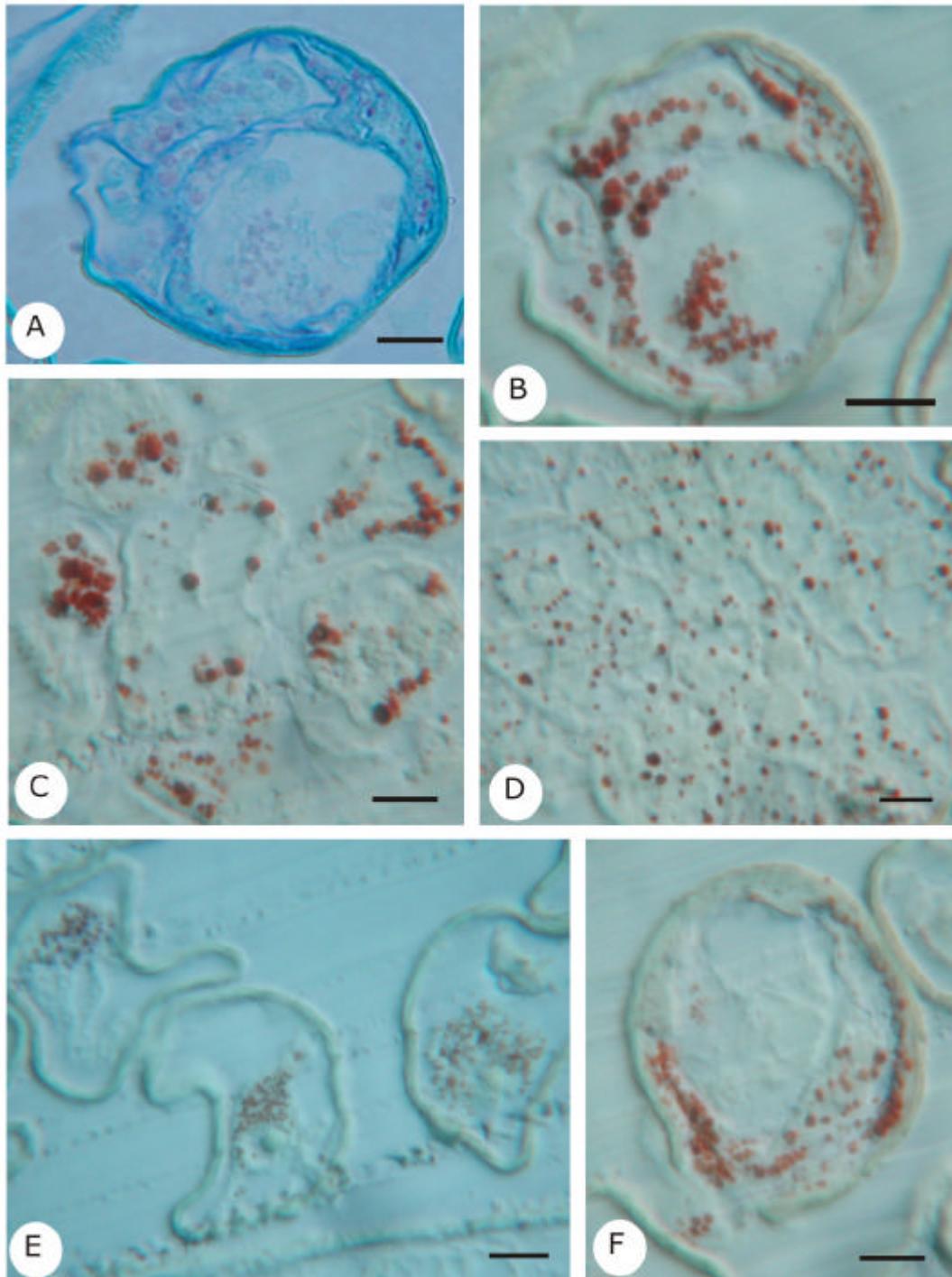


Figura 27 - Teste do lugol realizado em micrósporos, grãos de pólen e estruturas embriogênicas da cultivar MN-599, aos 20 dias, observados em DIC (contraste interferencial). A - Grão de pólen corado com Azul de toluidina. B - O mesmo grão de pólen mostrado em A, onde foi realizado o teste do lugol, evidenciando amido em toda a região do pólen. C e D - Estruturas evidenciando amido. E - Micrósporos evidenciando amido somente na região nuclear. F - Grão de pólen com grande quantidade de amido. Escalas: 10 µm.

**ANÁLISE SERIAL DAS ESTRUTURAS
EMBRIOGÊNICAS OBTIDAS *IN VITRO***

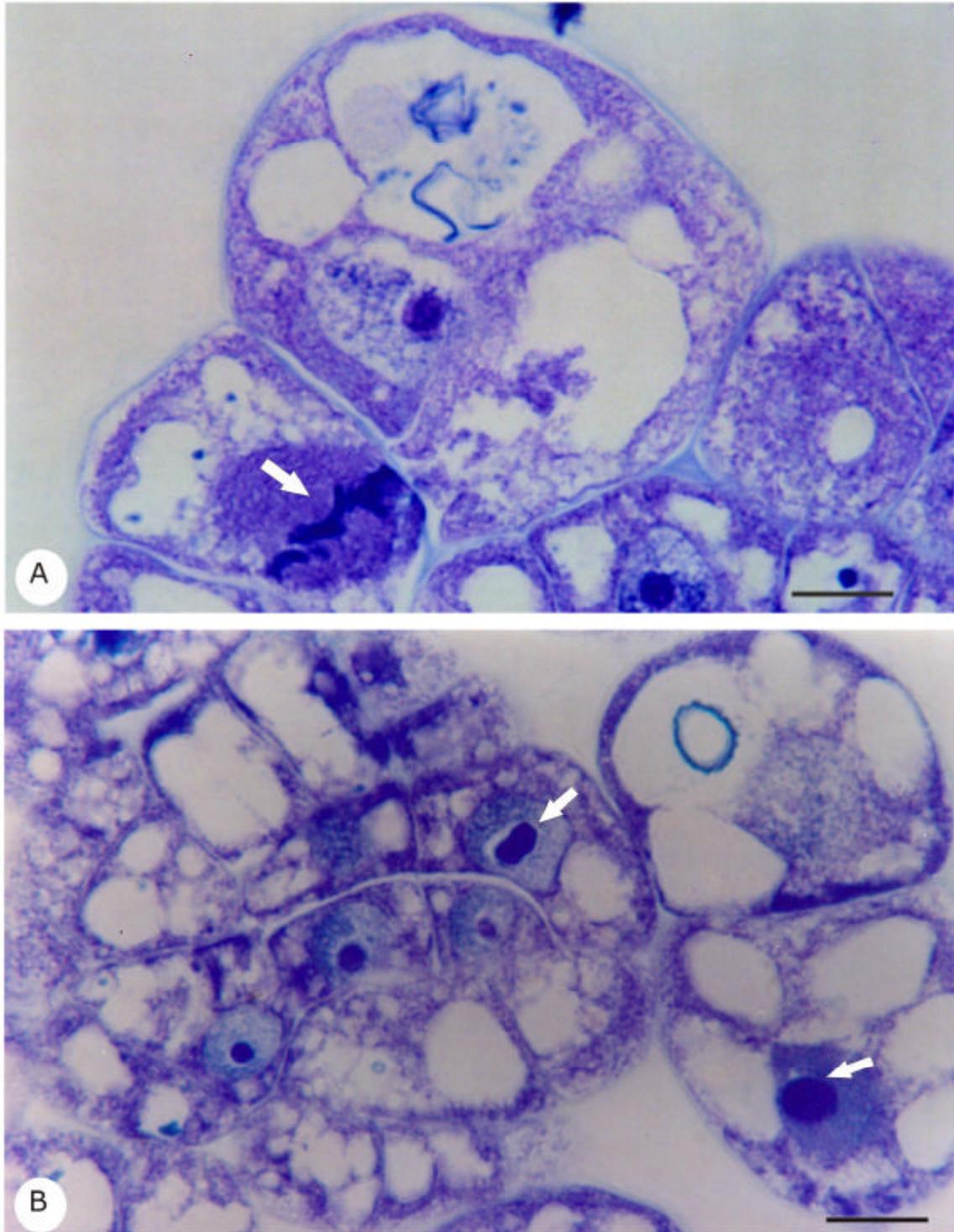


Figura 28 - Estruturas embriogênicas aos 22 dias de cultivo *in vitro*. **A** - Detalhe da epiderme com células iniciais pró-embriônicas, apresentando metáfase (seta). **B** - Estrutura embriogênica semelhante a um pró-embrião com células volumosas e núcleos evidentes, demonstrando nucléolos extremamente ativos (setas). **Escala:** 10 μm .

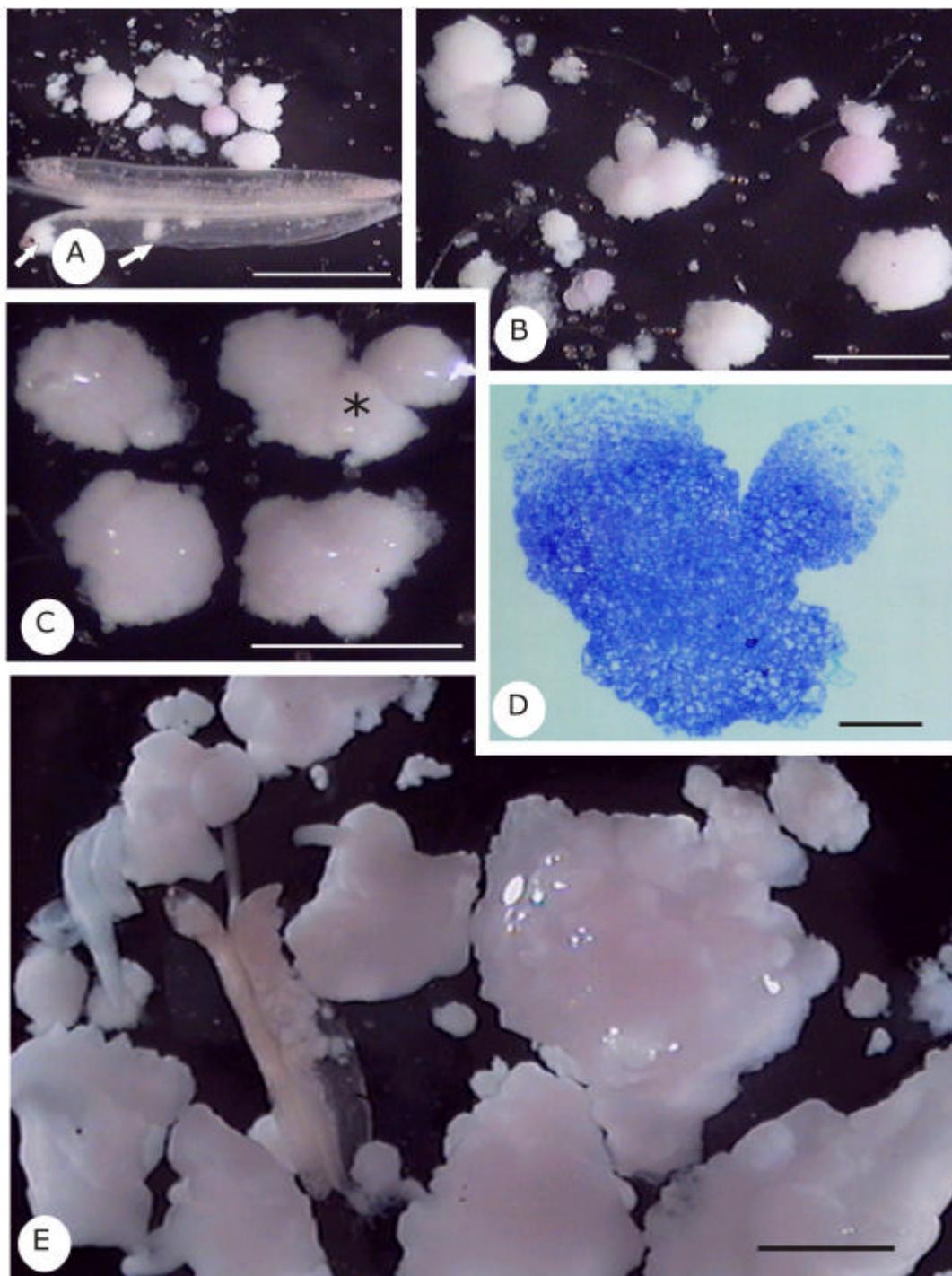


Figura 29- Anteras e estruturas embriogênicas aos 22 (A - D) e 24 dias (E) de cultivo *in vitro*. A - Antera com estruturas embriogênicas, internas (setas) e externas. B - Estruturas embriogênicas e grãos de pólen espalhados. C - Estruturas embriogênicas em detalhe. D - Seção histológica da estrutura marcada em C com *, apresentando forma trilobada, mas nenhuma diferenciação em órgão ou vascularização. E - Antera com estruturas internas e algumas estruturas externas formadas. Escalas: A e E - 1 cm; B e C - 0,5 cm; D - 100 μ m.

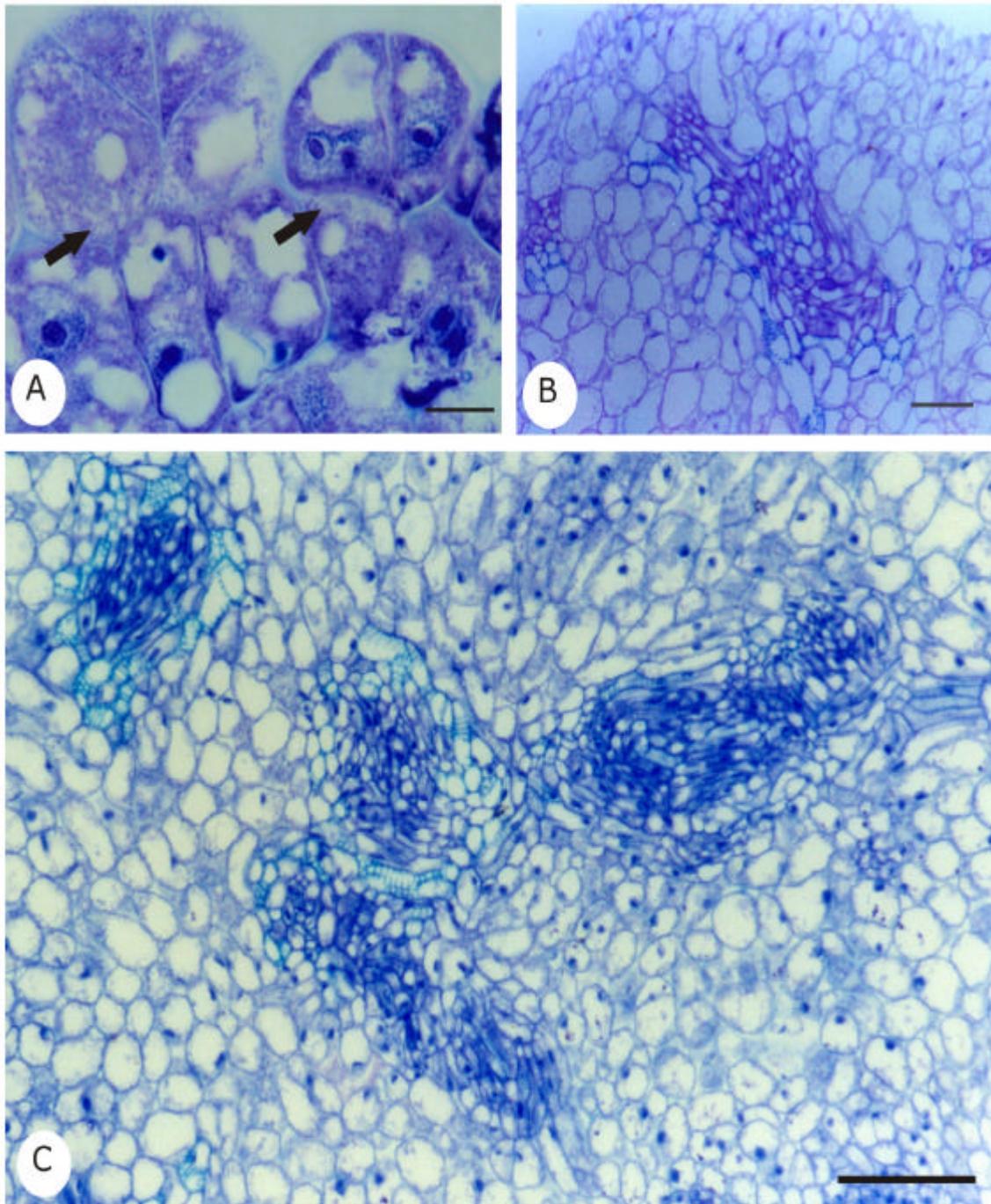


Figura 30 - Estruturas embriogênicas observadas aos 22 e 24 dias de cultivo *in vitro*. **A:** Estrutura aos 22 dias; **B e C:** Estrutura aos 24 dias. **A** - Estrutura apresentando epiderme com núcleos evidentes e pró-embriões (setas). **B e C** - Estrutura apresentando vascularização. **Escala:** **A:** 10 μm ; **B:** 50 μm ; **C:** 100 μm .

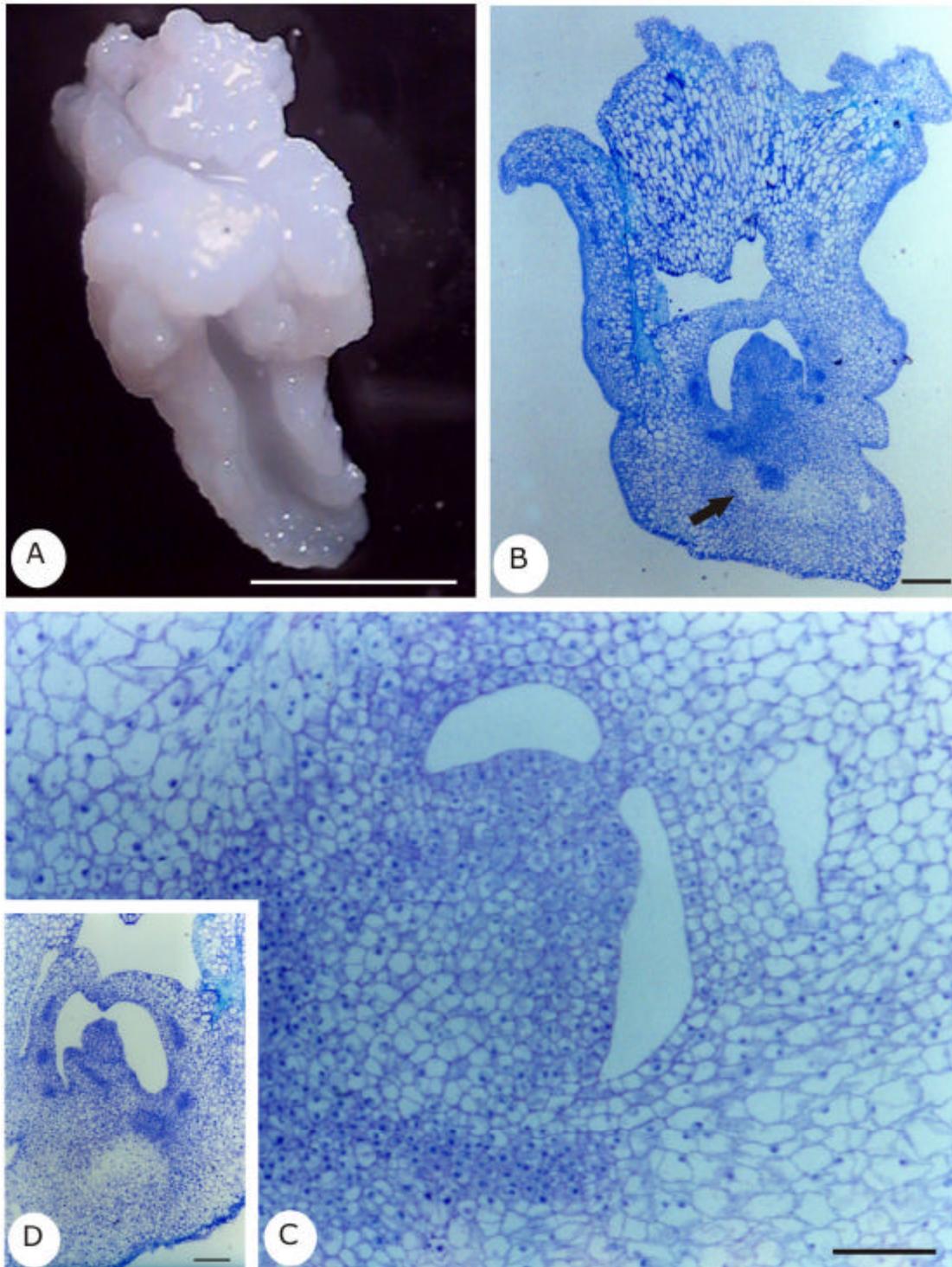


Figura 31 - Estruturas embriogênicas observadas aos 24 dias de cultivo *in vitro*. **A** - Morfologia de uma estrutura. **B** - Seção histológica da estrutura anterior, mostrando um embrião com meristema apical caulinar (MAC) bem evidente e meristema apical radical embrionário adventício (MAR) em desenvolvimento (seta). **C** - Embrião **D** - Detalhe do MAC do mesmo embrião em seção mais próxima da região mediana do ápice caulinar. **Escala:** **A:** 1 cm; **B:** 150 μm ; **C:** 50 μm ; **D:** 100 μm .

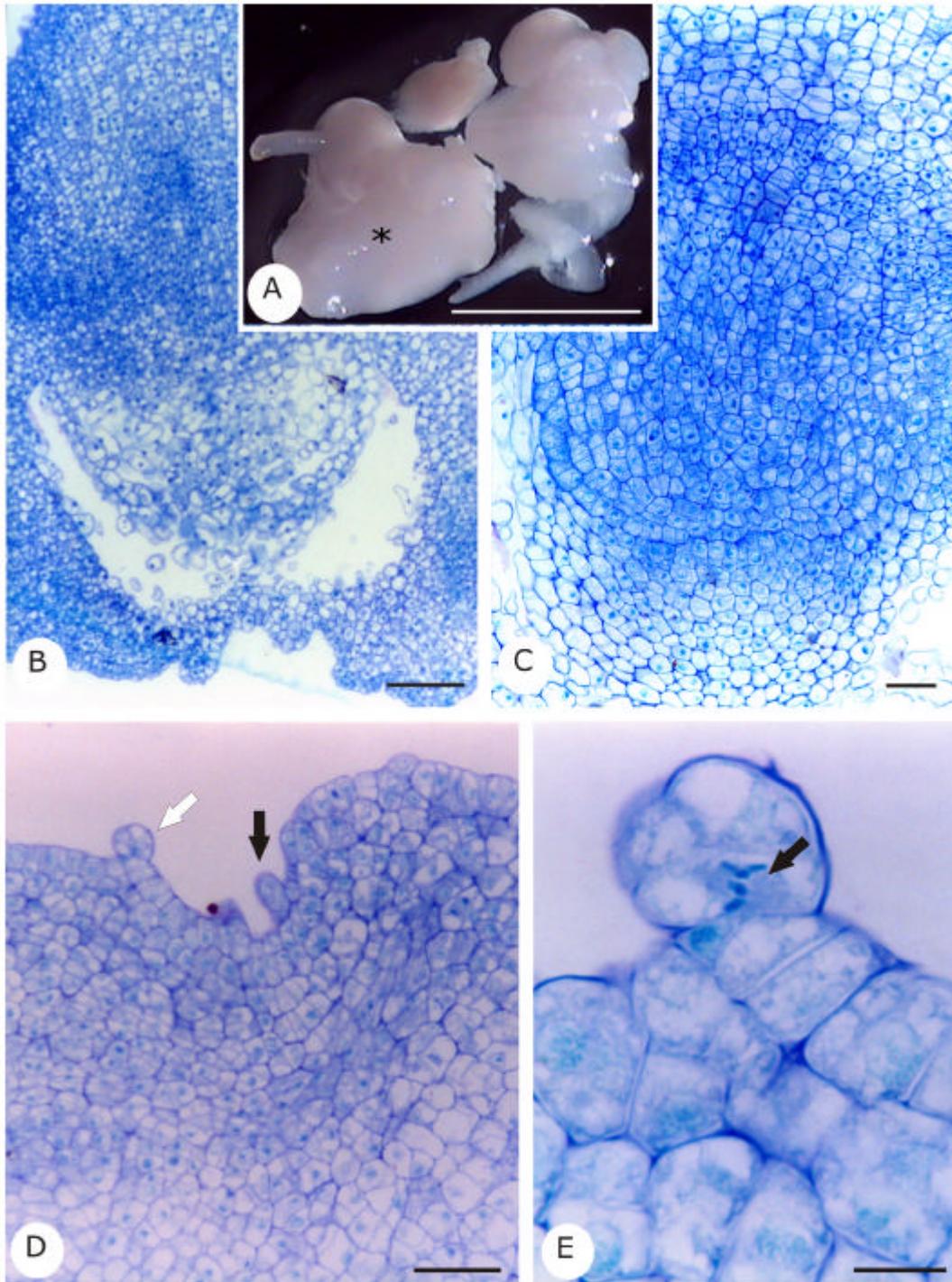


Figura 32- Estruturas embriogênicas aos 24 dias de cultivo *in vitro*. **A** - Morfologia das estruturas embriogênicas. **B** e **C** - Seções histológicas da estrutura marcada com * em **A**, mostrando a formação de raiz. **D** - Estrutura apresentando epiderme com células iniciais pró-embriônicas (setas). **E** - Detalhe das células iniciais pró-embriônicas destacadas em **D** com seta branca, evidenciando os cromossomos (seta). **Escala:** **A** - 0,5 cm; **B** - 100 μ m; **C** e **D**: 50 μ m; **E**: 10 μ m.

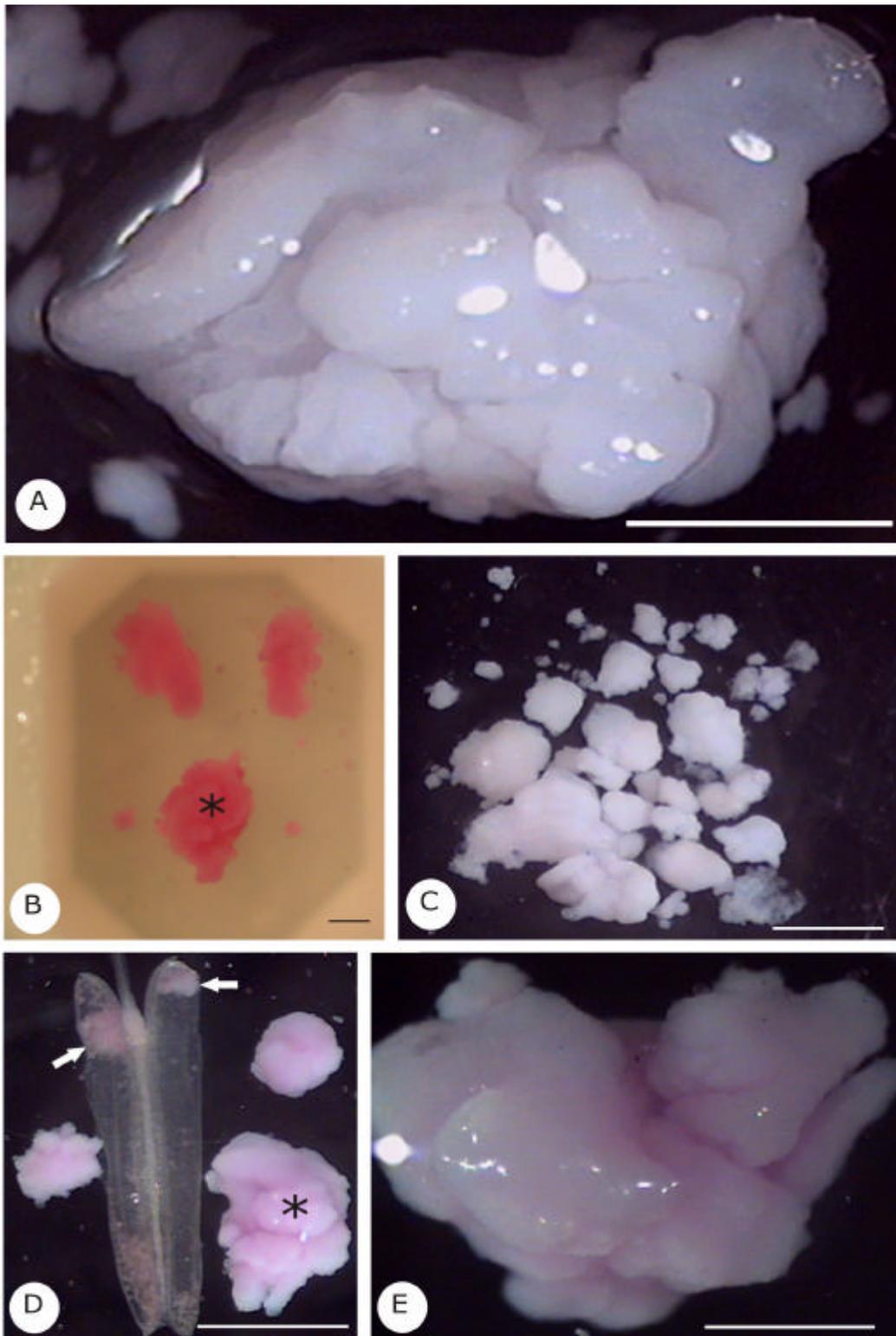


Figura 33 - Estruturas embriogênicas e antera aos 24 (A-D) e 26 (E e F) dias de cultivo *in vitro*. A - Estrutura aparentemente embriogênica. B - Estruturas embriogênicas emblocadas em historresina. Estrutura marcada com * é a mesma da Figura A. C - Estuturas de menor tamanho quando comparadas às anteriores. D - Antera com estruturas internas (setas) e externas. E - Detalhe da estrutura marcada com * na Figura D. Escalas: 1 cm.

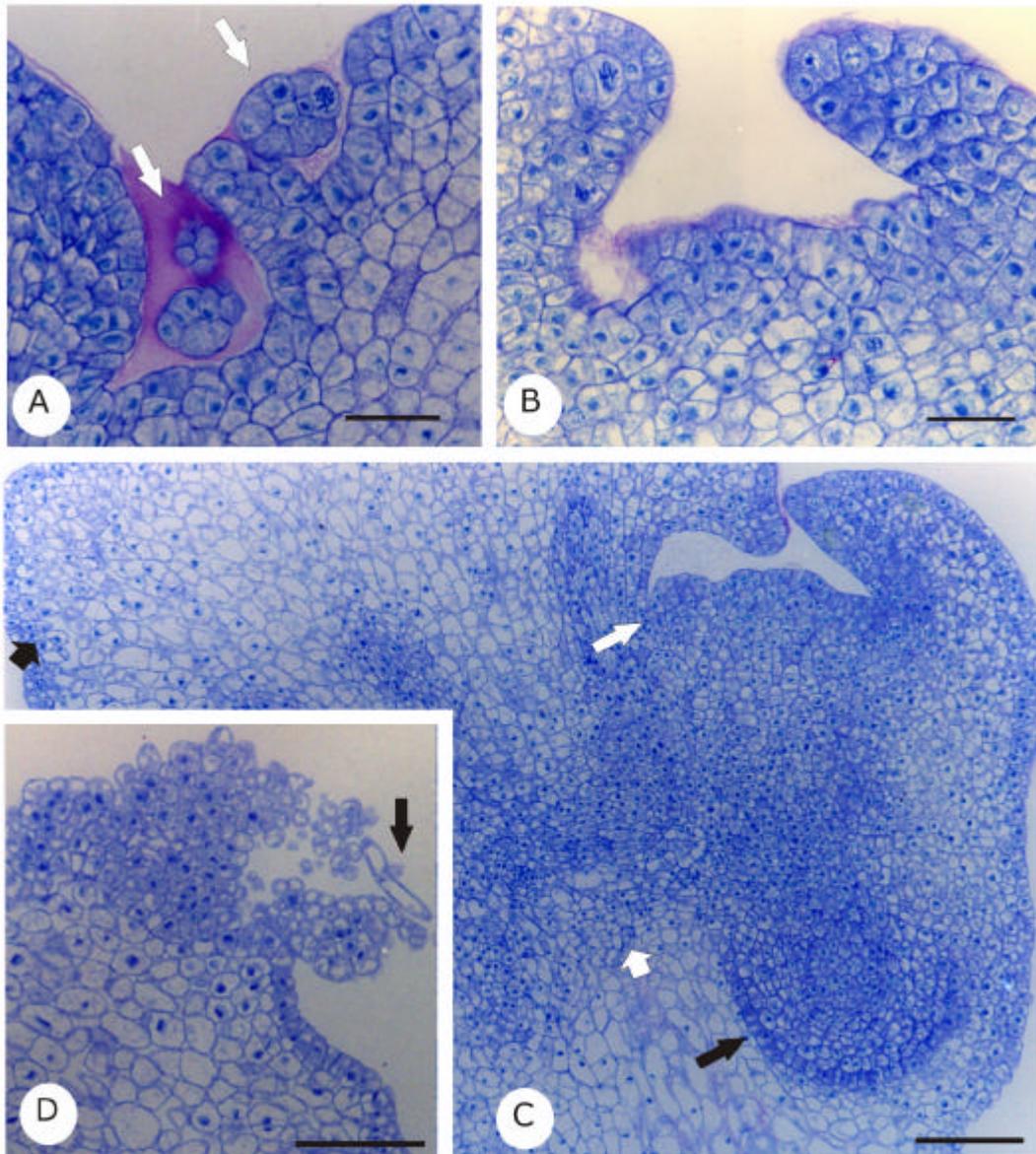


Figura 34 - Estruturas embriogênicas aos 30 dias de cultivo *in vitro*. **A** - Epiderme com pró-embriões (seta). **B** - Detalhe do MAC. **C** - Embrião com MAR (seta preta) e MAC (seta branca), apresentando escutelo muito desenvolvido (seta preta menor) com cordões pró-vasculares (seta branca menor). **D** - Estrutura apresentando epiderme pluriestratificada com a presença de um tricoma (seta). **Escala:** **A** - 50 μm ; **B** - 30 μm ; **C e D** - 100 μm .

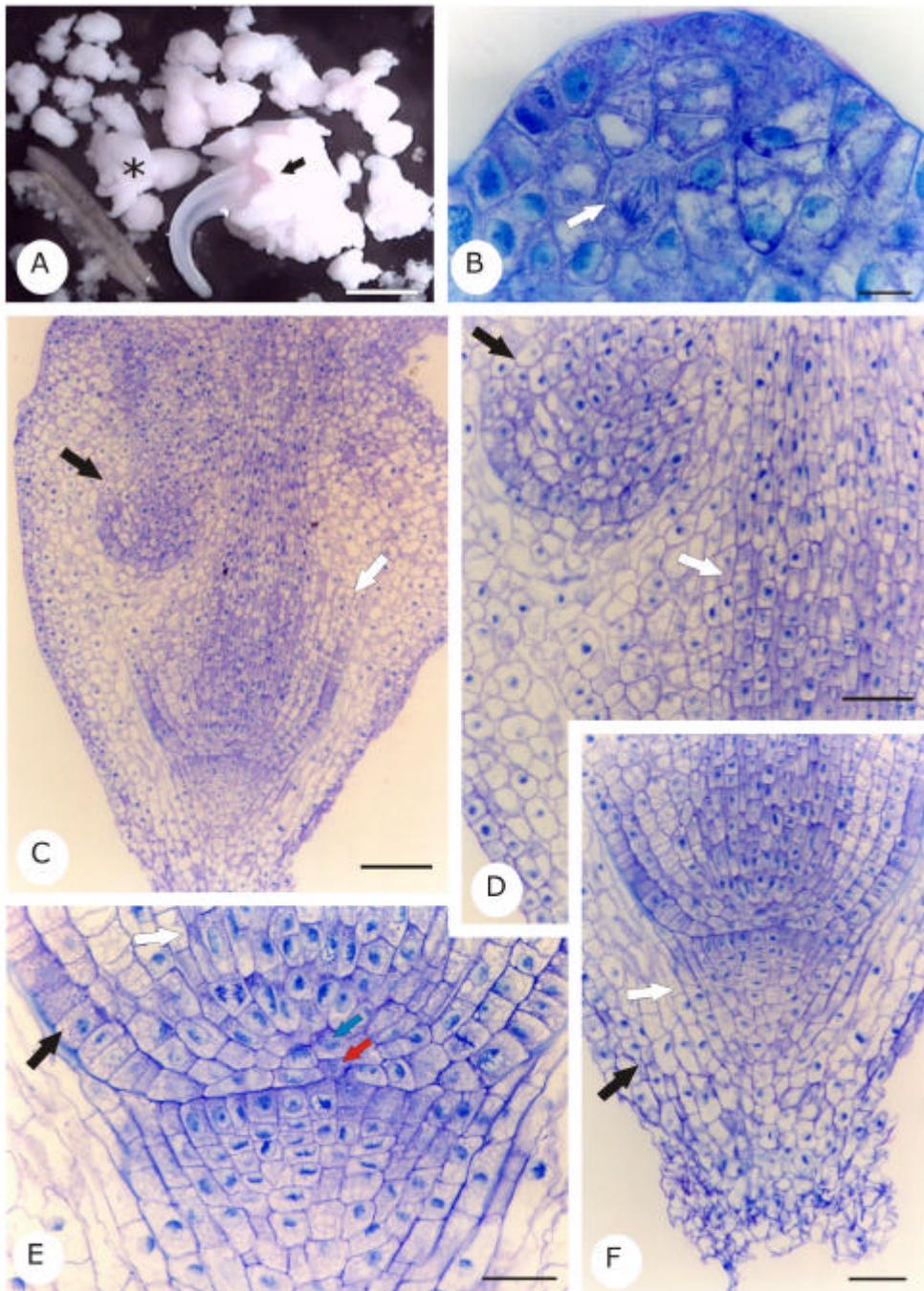


Figura 35 - Antera e estruturas embriogênicas aos 30 dias de cultivo *in vitro*. **A** - Antera com estruturas embriogênicas internas e externas. Estrutura (seta) apresentando primórdio foliar. Outra estrutura marcada com * é vista na seqüência de fotomicrografias de suas seções. **B** - Organização do MAC em três camadas. **C** - Raízes embrionárias adventícias (setas). **D** - Detalhe da figura C com destaque para uma raiz embrionária adventícia (seta preta) e para o meristema pró-vascular de outra (seta branca). **E** - Detalhe evidenciando a protoderme (seta preta), o meristema pró-vascular (seta branca) e o grupo de células iniciais (seta vermelha) e as derivadas (seta azul). **F** - Detalhe da coifa (seta branca) e da coleorriza (seta preta). **Escala:** **A** - 1 cm; **B** - 10 μm ; **C** - 100 μm ; **D** e **F** - 50 μm ; **E** - 30 μm .

3.4 - ANÁLISES HISTOLÓGICAS DAS LINHAGENS SELECIONADAS (CULTIVARES DE CEVADA A-05 E BR-2)

No item anterior, 3.3, foi realizada a descrição da cultivar não-selecionada MN-599, que serviu de controle na comparação com as linhagens selecionadas das cultivares A-05 (S₃A23 e S₃A22) e BR-2 (S₃B63).

Como os tipos celulares se repetem ao longo dos períodos de análise, serão citadas apenas as ocorrências relevantes e aquelas em que esses tipos foram observados pela primeira vez. Para maiores detalhes, ver Tabelas 14, 15 e 16.

3.4.1 – Linhagem S₃A23

No 2^o dia foram observados micrósporos e grão de pólen trinucleado (Figura 36 A), semelhante a um pólen típico, com dois núcleos menores (generativos) e um maior (vegetativo), com nucléolos bem evidentes. Os micrósporos foram observados ao longo de todo o período da análise.

No 4^o dia, além dos tipos celulares observados no 2^o dia, observou-se grão de pólen binucleado (Figura 36 B) com dois núcleos aparentemente do tipo vegetativo. Também foi observado grão de pólen multinucleado (Figura 36 C).

Já no 6^o dia, além dos tipos celulares observados, encontraram-se grãos de pólen multicelulares (Figura 36 D).

Uma estrutura multicelular de seis células com esporoderme (Figura 36 E) foi observada no 8^o dia, além de multinucleados rompidos com material extravasado. Com base na análise da Figura 36 E verifica-

se a estrutura com seis células, as quais apresentam-se volumosas e vacuoladas, com núcleos e nucléolos bem evidentes.

No 10^o dia foram observadas as mesmas ocorrências do 8^o.

Aos 12 dias de cultivo *in vitro* observou-se grão de pólen em primeira mitose simétrica em final de anáfase (Figura 36 F). A Figura 37 A mostra um grão de pólen multinucleado e na Figura 37 C pode ser visualizado um multinucleado em processo de citocinese. Na Figura 37 B é possível visualizar um pólen multicelular com material extravasado. Uma parte de uma estrutura multicelular pode ser observada na Figura 37 D, apresentando células volumosas e vacuoladas, com núcleos e nucléolos evidentes. Uma visão geral da antera com multicelulares e estruturas embriogênicas no lóculo da mesma pode ser observada na Figura 38 A. A Figura 38 B mostra um pólen multicelular com vários núcleos extravasados, sugerindo a formação de estruturas multicelulares. Ainda nessa figura, observa-se a esporoderme ainda parcialmente presente junto à estrutura.

No 14^o dia pôde-se observar uma estrutura multicelular com a presença de esporoderme. Algumas estruturas multicelulares foram observadas no interior do lóculo da antera (Figura 38 C), apresentando células volumosas e vacuoladas. Pode ser observado um grão de pólen multicelular extravasado e um micrósporo intensamente corado contendo muitos grãos de amido, visualizado em detalhe na Figura 38 D.

A partir do 16^o dia, não foram verificadas variações significativas com relação aos tipos morfológicos analisados. Porém, foram constatados avanços no desenvolvimento das estruturas embriogênicas multicelulares. Isso pode ser visualizado na Figura 37 E, onde uma estrutura apresenta poucas células, em início de diferenciação. Um embrião em desenvolvimento é observado na Figura 37 F.

Foram encontrados embriões aos 18 dias de cultivo. Alguns deles apresentaram somente meristema radical embrionário adventício

(Figura 38 E), outros, caulinar (Figura 38 F), ou ambos (Figura 39 A e B, mostrando apenas o ápice caulinar). Com relação à análise das estruturas embriogênicas externas, foram analisadas individualmente somente as dos 18 dias. Foram encontrados embriões em desenvolvimento com evidentes zonas primordiais: raiz em início de desenvolvimento, meristema pró-vascular, meristema fundamental e protoderme, semelhante ao embrião convencional (Figura 39 A). Foi observada a presença de amido principalmente na região da raiz. Na Figura 38 E pode ser observada uma estrutura amorfa, com células centrais dispostas aparentemente para a formação de raiz. Uma estrutura embriogênica apresentando meristema apical caulinar (MAC) pode ser observada na Figura 38 F, onde podem ser visualizados o escutelo, o coleóptilo e os primórdios foliares, estruturas típicas de um embrião de monocotiledônea. Na Figura 39 A observa-se um embrião em desenvolvimento, como descrito anteriormente. Um detalhe do meristema apical caulinar é mostrado na Figura 39 B. Os núcleos e nucléolos apresentam-se evidentes.

Aos 20 dias foram observadas as mesmas ocorrências dos 18 dias (Figura 39 C-G), exceto a presença de embriões. Nessa fase, eventualmente foram encontrados aglomerados de estruturas multicelulares, na região proximal da antera. Um detalhe desse lóculo com alta concentração de material pode ser observado na Figura 39 D, caracterizado por um conjunto de células volumosas e vacuoladas em ativo processo de divisão celular (Figura 39 E). Uma outra estrutura multicelular, em menor grau de diferenciação, pode ser observada na Figura 39 F, com as mesmas características que a anterior.

Na tabela 14 é apresentada uma síntese da análise histológica na espiga A053, da cultivar A-05 e linhagem selecionada S₃A23.

Tabela 14 - Síntese da análise histológica da cultivar A-05, linhagem S₃A23, através do registro de presença (+) e ausência (-) para as categorias classificatórias de micrósporos e grãos de pólen. A cor verde representa a presença (+) da categoria no dia de observação e a amarela, presença de ELSs externas, com seus respectivos números de ocorrência

Linhagem	Classificação		Dias										
			2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
S ₃ A23 cv. A-05	Micrósporos		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1ª mitose		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Binucleado		-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Bicelular		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Trinucleado		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Multinucleados		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Multinucleados/Multicelulares rompidos, material celular extravasado		-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
	Multicelulares		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Estruturas Multicelulares		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	N° de ELSs (embriões) externas		sem forma									1	
MAC											1		
MAR													
Bipolares												1	

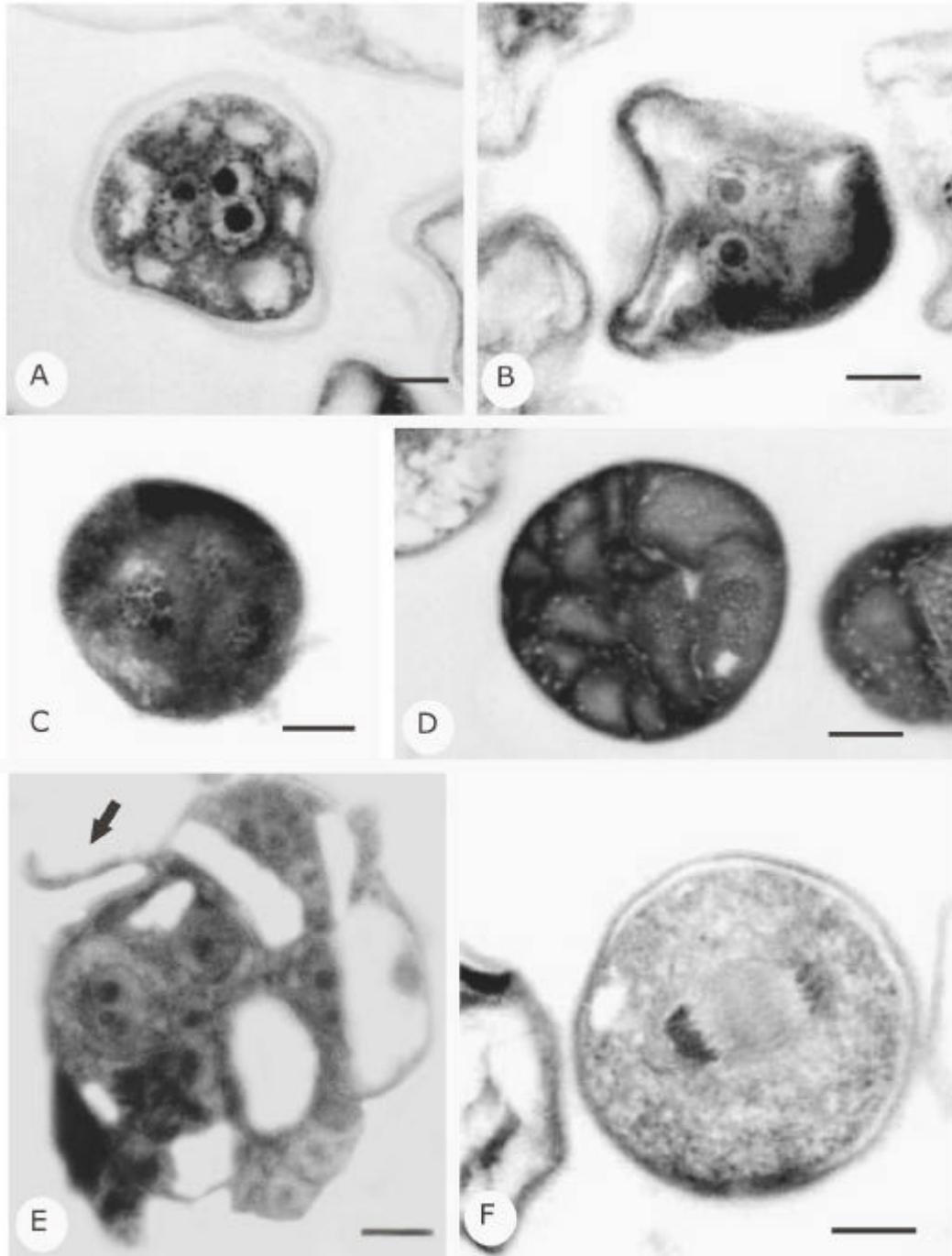


Figura 36 - Grãos de pólen e estruturas embriogênicas obtidos *in vitro*. **A** - Grão de pólen trinucleado aos 2 dias de cultivo *in vitro*. **B** - Grão de pólen binucleado aos 4 dias, apresentando dois núcleos aparentemente do tipo vegetativo. **C** - Multinucleado observado aos 4 dias. **D** - Multicelular aos 6 dias, mostrando várias células, com delimitação de parede celular. Alguns autores consideram essa fase como estrutura embriogênica. **E** - Estrutura embriogênica com seis células e esporoderme parcialmente rompida (seta), aos 8 dias. **F** - Primeira mitose simétrica, em final de anáfase. **Escala:** 10 μm .

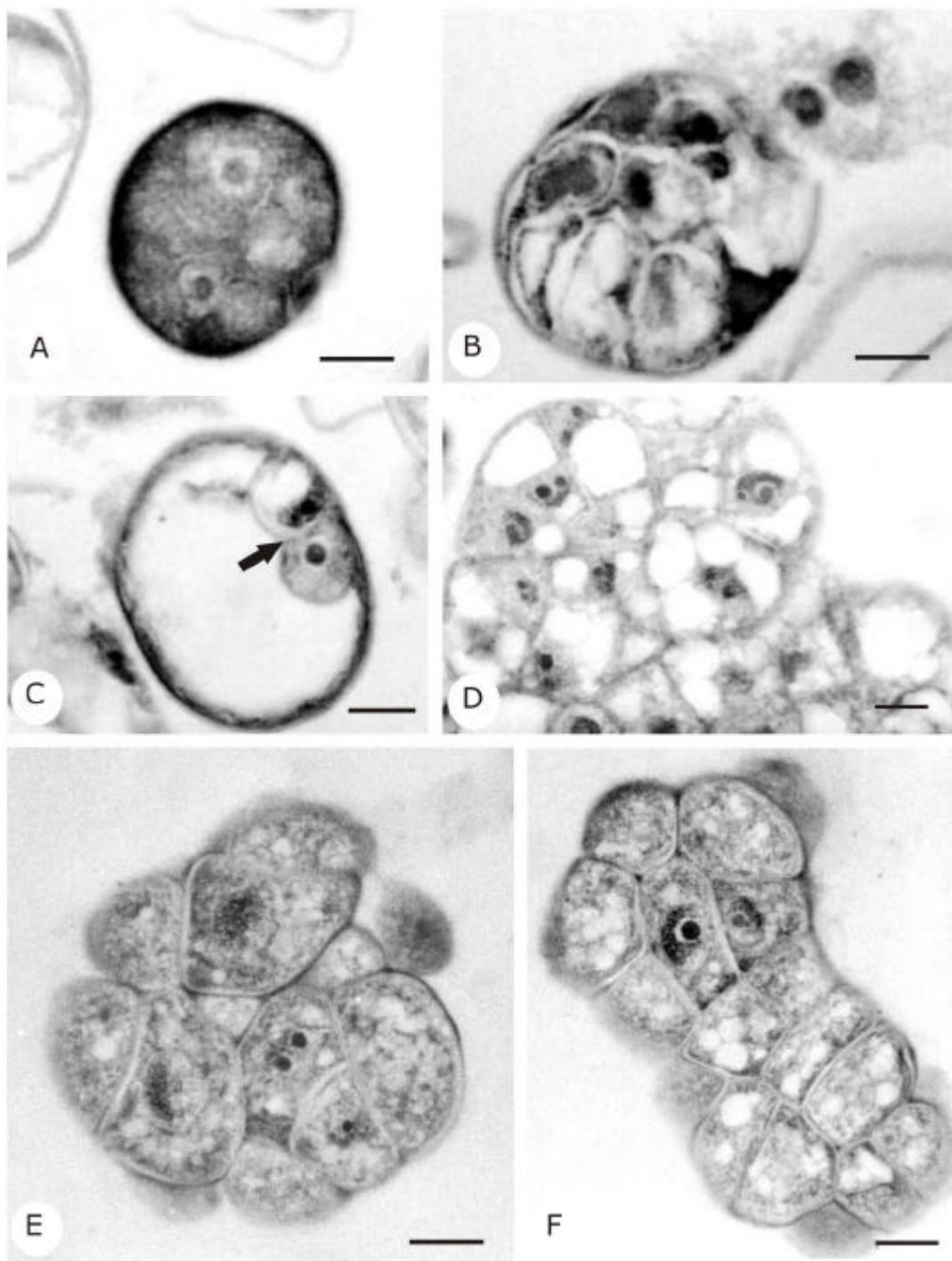


Figura 37 - Grãos de pólen e estruturas embriogênicas aos 12 (A-D) e 16 dias (E e F). A - Grão de pólen multinucleado. B - Multicelular com material extravasado. C - Multinucleado em processo de citocinese (seta). D - Uma parte de uma estrutura multicelular, apresentando células volumosas e vacuoladas. E - Estrutura multicelular apresentando poucas células. F - Embrião em desenvolvimento. Escalas: 10 μ m.

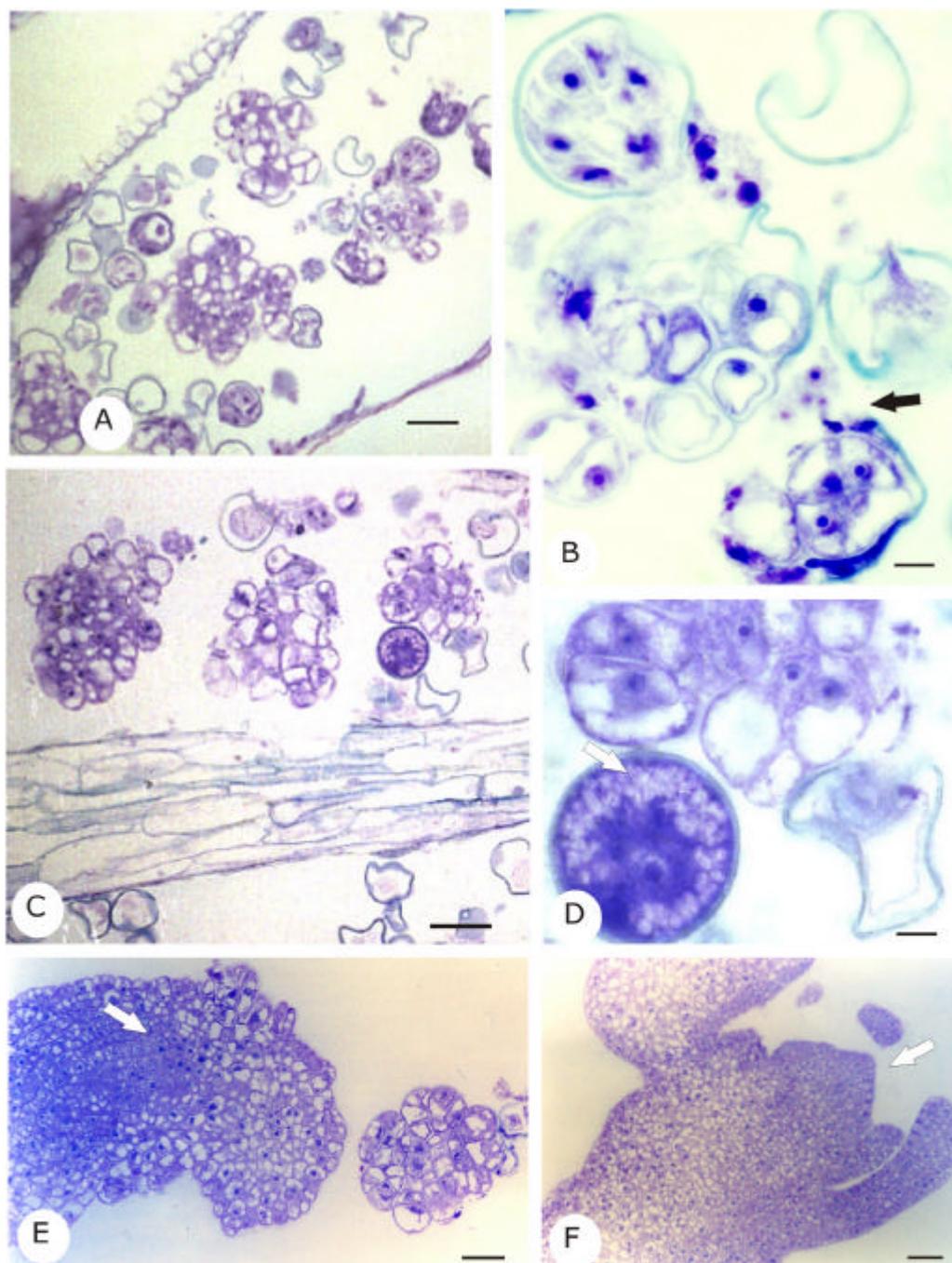


Figura 38 - Grãos de pólen e estruturas embriogênicas aos 12 (A e B), 14 (C e D) e 18 (E e F) dias. A - Visão geral da antera com multicelulares e estruturas embriogênicas no lóculo. B - Pólen multicelular extravasado com estrutura multicelular em início de formação e um outro multicelular com esporoderme parcialmente rompida (seta). C - Estruturas multicelulares no interior do lóculo da antera. D - Detalhe da figura anterior evidenciando um micrósporo intensamente corado cotendo grande quantidade de amido (seta). E e F - Estruturas embriogênicas externas ao lóculo. E - Estrutura amorfa, apresentando células organizadas para a provável formação de raiz (seta). F - Estrutura embriogênica apresentando MAC (seta). Escalas: A, C, E e F - 50 μ m. B e D - 10 μ m.

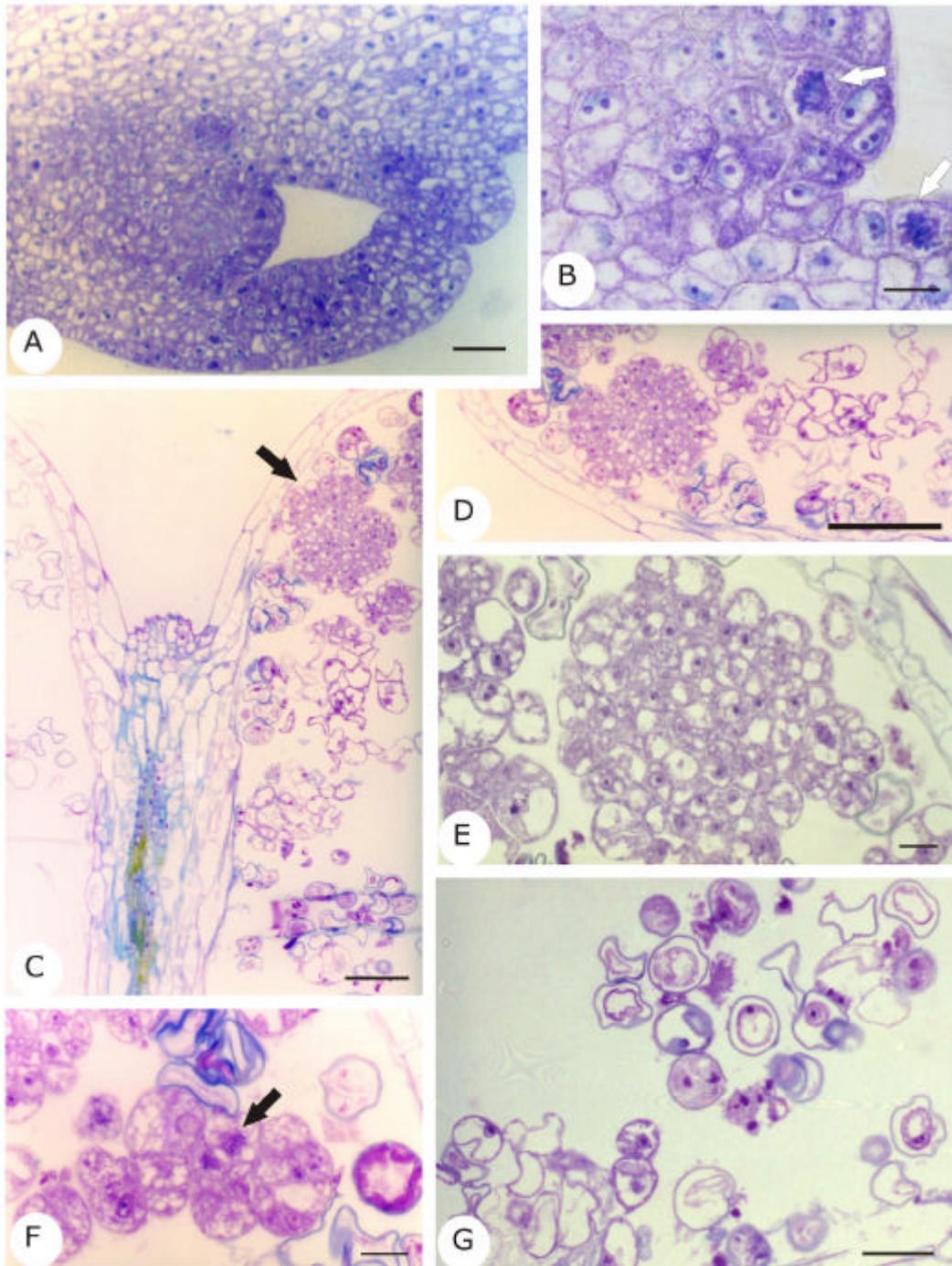


Figura 39 - Estruturas embriogênicas e grãos de pólen aos 18 (A e B) e 20 dias (C-G). A e B - Estruturas embriogênicas externas ao lóculo. A - Embrião em desenvolvimento semelhante ao embrião zigótico. B - Detalhe da figura anterior evidenciando o MAC, com divisões cromossômicas (setas). C - Visão geral da antera com estruturas multicelulares no interior do lóculo (seta). D - Detalhe da figura anterior, evidenciando a estrutura. E - Estrutura multicelular em detalhe. F - Estrutura multicelular em início de formação, com destaque para uma metáfase (seta). G - Alguns tipos celulares encontrados durante a análise. **Escala:** A, C, D e G = 50 μ m. B = 10 μ m. E e F = 25 μ m.

3.4.2 – Linhagem S₃A22

Aos dois dias de cultivo *in vitro* foram observados grãos de pólen em primeira divisão, binucleados, núcleos extravasados, micrósporos e grãos de pólen degenerados.

Das quatro anteras analisadas no 4^o dia, três delas apresentaram micrósporos e grãos de pólen degenerados, binucleados, trinucleados e grãos de pólen multicelulares intensamente corados.

Como os tipos celulares se repetem ao longo dos períodos de análise, serão citadas apenas aquelas em que o tipo celular foi observado pela primeira vez e as ocorrências relevantes. Para maiores detalhes, ver Tabela 15.

Aos seis dias foram observados grãos de pólen multicelulares com núcleos extravasados, bem como multinucleados em início de celularização, com aproximadamente 14 núcleos, com uma quantidade considerável de amido. Foi realizado o teste do lugol nesses grãos de pólen confirmando a presença de amido (Figuras 40 e 41). Houve indícios de fusão nuclear em um grão de pólen binucleado. Foram constatados grão de pólen multicelular apresentando células com núcleo do tipo generativo, e um binucleado aparentemente simétrico apresentando núcleos do tipo vegetativo. Um multinucleado com núcleos diferentes podendo ter os tipos vegetativo e generativo, também apresentou material celular extravasado. Ainda, foram constatados mitose simétrica apresentando 14 cromossomos e pólen multicelular com núcleos semelhantes, com uma célula maior do que as outras, possuindo também, aproximadamente 14 cromossomos.

Aos oito dias foram observadas pela primeira vez estruturas multicelulares, grãos de pólen multicelulares com esporoderme rompida e estruturas multicelulares apresentando esporoderme, ambos localizados preferencialmente na região proximal da antera.

Aos 12 dias foram encontrados dois grãos de pólen binucleados aparentemente simétricos e não-corados, e da mesma forma que aos 10 dias, foram constatados também multicelulares parecendo estar formando estrutura embriogênica, com esporoderme parcialmente rompida. Também foram evidenciadas estruturas multicelulares e grande quantidade de material celular extravasado na antera, além de grão de pólen multicelular com núcleos do tipo vegetativo/generativo.

No 14^o dia foram observadas estruturas semelhantes à pró-embriões, como observado na linhagem S₃A23 aos 16 dias. Foi constatada uma estrutura em desenvolvimento ainda dentro da esporoderme, com quatro células com maior grau de diferenciação, vacuoladas e com núcleos evidentes, bem como estrutura multicelular com esporoderme parcialmente rompida, possuindo quatro a cinco núcleos.

Aos 18 dias foram encontradas estruturas internas e externas à antera. Das estruturas externas analisadas, uma delas apresentou cordões pró-vasculares. Outra, apenas um dos ápices, o MAC. Foi observado um embrião. As estruturas internas se apresentaram em início de desenvolvimento.

Aos 20 dias foram encontrados pelo menos seis grãos de pólen multicelulares, e também, estruturas internas e externas ao lóculo. Uma das estruturas multicelulares já apresentava cordões pró-vasculares. Também foram observadas estruturas com esporoderme.

Aos 22 dias, além dos tipos celulares descritos anteriormente, foi encontrada uma antera colapsada, bem como suas estruturas. Foi constatada apenas uma estrutura externa à antera.

No 24^o dia de cultivo foram observadas quatro estruturas internas, bem como algumas estruturas de tamanho muito reduzido. As estruturas apresentaram amido, epiderme e tecido parenquimático. Numa delas, foram constatados cordões pró-vasculares.

Nesse período foram analisadas separadamente as estruturas externas à antera, onde, a partir de uma das anteras, aproximadamente 13 estruturas eram sem forma definida (SFD), duas delas com elementos traqueais; duas colapsadas e duas apresentando raiz em diferenciação. Em outra antera, também foram observadas estruturas SFD, uma delas com elementos traqueais. Algumas estruturas colapsadas. Duas estruturas apresentaram-se semelhantes ao embrião zigótico, com escutelo, MAC e MAR. Os embriões apresentaram raiz em diferenciação. Outra antera apresentou a maioria das 32 estruturas SFD com zonas de diferenciação. Oito estruturas foram observadas e classificadas como SFD com elementos traqueais. Uma das estruturas com elementos traqueais apresentou tricomas. Foram observadas algumas estruturas colapsadas.

Aos 26 dias uma das anteras apresentou-se colapsada. Foram observados muitos micrósporos e alguns degenerados, e também, multicelulares e multicelulares extravasados. Houve o registro de início de formação de estrutura multicelular, com sete células. Em outra antera, foram observados muitos micrósporos, a maioria degenerados. Foram encontrados aproximadamente nove grãos de pólen multicelulares, e uma estrutura em desenvolvimento, apresentando nove células vacuoladas. A maioria dessas estruturas foi classificada como SFD.

No 28^o dia de cultivo foram observados muitos micrósporos, a maioria degenerados, grãos de pólen multicelulares, e início de formação de estruturas. As estruturas multicelulares colapsadas ou não apresentavam-se como um conjunto de células parenquimáticas com diferenciação de elementos traqueais e tricomas originados da epiderme das mesmas. Em alguns casos, ocorre a diferenciação de raiz e parte aérea, semelhante a um embrião.

Aos 30 dias foram observadas três estruturas externas, com meristema fundamental e protoderme. Uma dessas estruturas

apresentou protoderme com células mais volumosas e vacuoladas, quando comparada às outras, assemelhando-se a um embrião. Foi observada também vascularização, bem como grão de pólen multicelular de tamanho aproximado de 18 μm .

No 32^o dia de cultivo foram observadas sete estruturas com elementos traqueais, sendo uma delas colapsada. Uma outra estrutura apresentou diferenciação de raiz. Também foram observados tricomas.

Aos 34 dias de cultivo foi observada numa das anteras, muitas estruturas multicelulares, ocupando quase todo o lóculo com esse material. Todas as estruturas foram classificadas como SFD, com zonas de diferenciação, pois apresentavam uma organização para a vascularização e também para a formação de parte aérea. Em outra antera, duas estruturas apresentaram elementos traqueais, e duas com zonas de diferenciação de raiz, sendo ambas consideradas como já apresentando um ápice radical. Uma outra estrutura apresentou tricoma, bem como a presença de muitos feixes vasculares.

Nessa linhagem foi observada uma considerável quantidade de material colapsado. Isso pode ser devido à fixação do material, ou durante a estocagem dos "ependorfs", onde o fixador pode ter evaporado. Dessa forma, tanto as anteras quanto as estruturas podem ter ficado desidratadas.

Na tabela 15 pode ser observada uma síntese da análise histológica na espiga A090. As lacunas ao longo dos dias de análise, especialmente nas primeiras categorias citadas: 1^a mitose, binucleado, bicelular e trinucleado, podem ser explicados pela hipótese de que talvez ocorram em períodos de curta duração e/ou baixa frequência. Como a análise foi realizada a partir de coletas a cada dois dias, esse intervalo de tempo poderia ser suficiente para que os estádios iniciais não fossem mais observados.

Tabela 15 - Síntese da análise histológica da cultivar A-05, linhagem S₃A22, através do registro de presença (+) e ausência (-) para as categorias classificatórias de micrósporos e grãos de pólen. A cor verde representa a presença (+) da categoria no dia de observação e a amarela, presença de ELSs externas, com seus respectivos números de ocorrência

Linha-gem	Classificação	Dias																	
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	
S ₃ A22	Micrósporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	1ª mitose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Binucleado	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Bicelular	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Trinucleado	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Multinucleados	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	Multinucleados/Multicelulares rompidos, material celular extravasado	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-		
cv.	Multicelulares	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
A-05	Estruturas Multicelulares	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	Nº de ELSs (embrióides) externas	sem forma									1	4	1	162	21	30	49	32	21
		MAC									1								
		MAR																	
Bipolares										1			2		1				

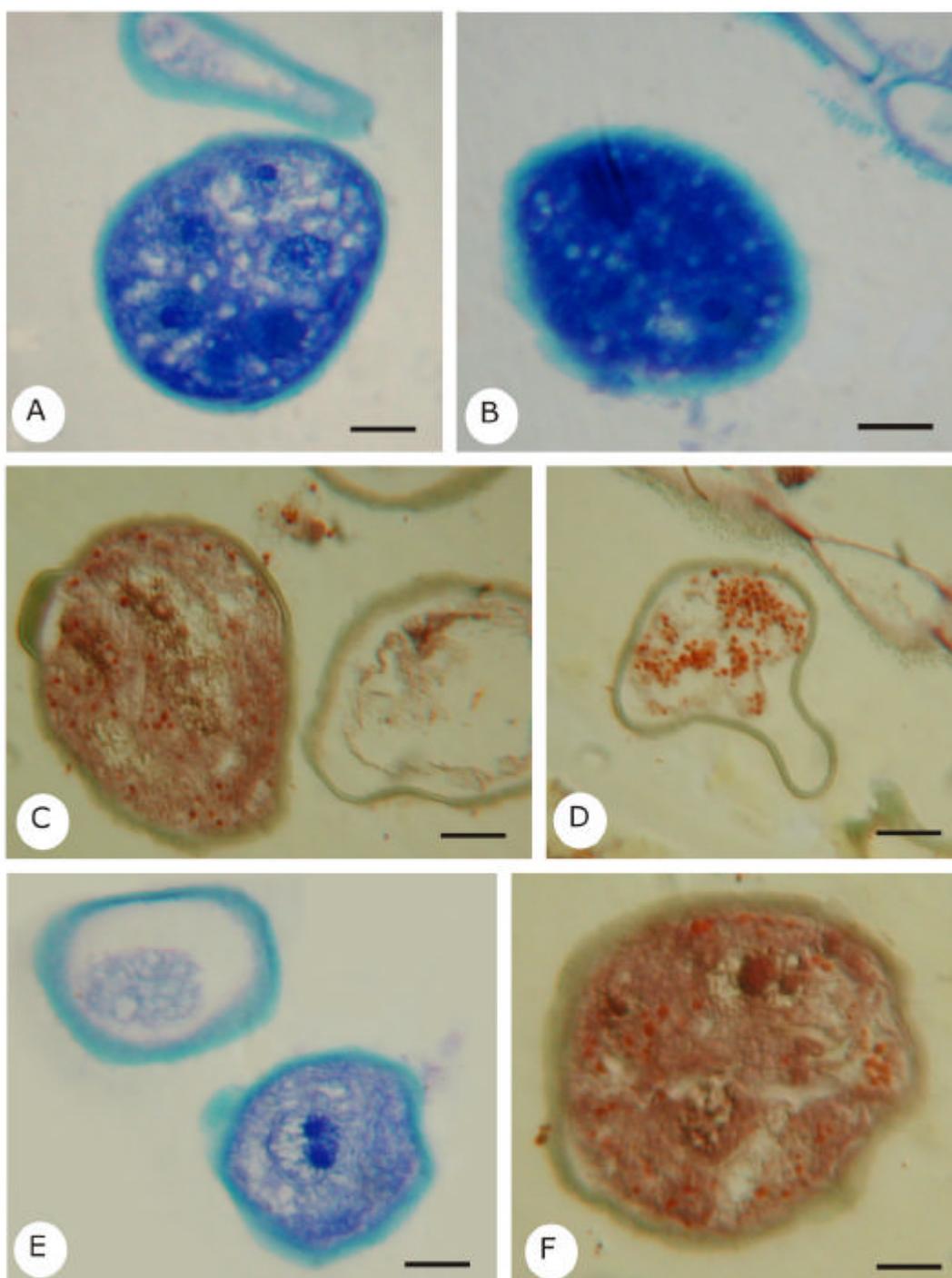


Figura 40 - Grãos de pólen e micrósporos da linhagem S3A22 aos 6 dias de cultivo *in vitro*. A e B - Grãos de pólen multinucleados apresentando amido, corados com azul de toluidina. C, D e F - Grãos de pólen multinucleados com reação positiva ao teste do lugol, observados em DIC (contraste interferencial) demonstrando amido. E - Micrósporos. Nota-se a esporoderme bem evidenciada com a coloração de azul de toluidina. No grão de pólen são observados dois nucléolos. **Escala: 10 μ m.**

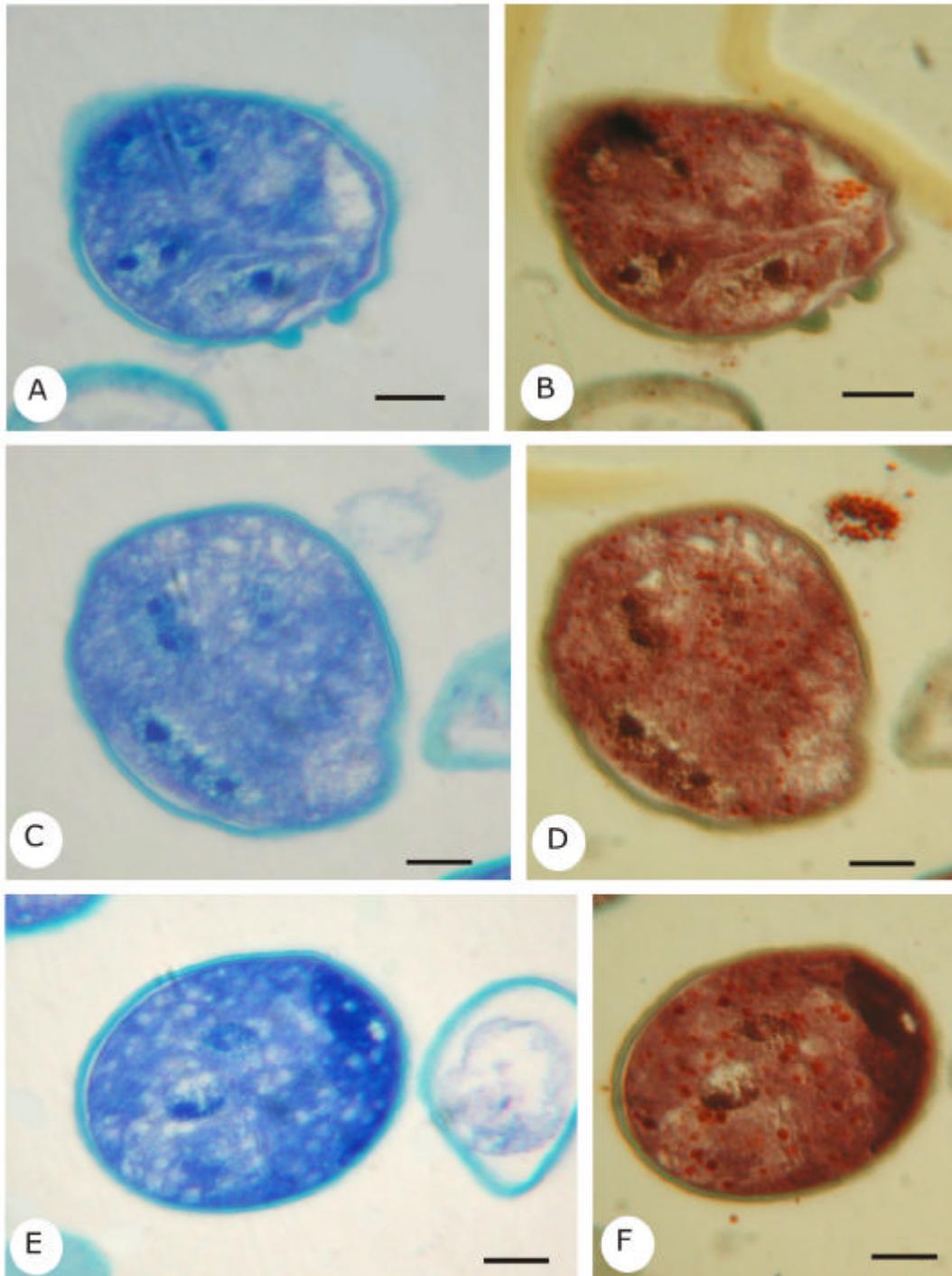


Figura 41 - Grãos de pólen da linhagem S3A22 aos 6 dias de cultivo *in vitro*. A, C e E - Grãos de pólen multinucleados apresentando amido, corados com azul de toluidina. B, D e F - Grãos de pólen correspondentes, com reação positiva ao teste do lugol, observados em DIC (contraste interferencial) demonstrando amido. Escalas: 10 μ m.

3.4.3 – Linhagem S₃B63

Aos dois dias foram observadas, nas quatro anteras analisadas, somente alguns micrósporos degenerados e muitos grãos de pólen, mas sem classificação precisa dos estádios em que se encontravam.

No quarto dia foram observados grãos de pólen binucleados simétricos e assimétricos. Houve a ocorrência de trinucleados iniciando a citocinese, e da primeira mitose, visualizada na fase de metáfase. Também foram observados multinucleados com quatro e seis núcleos, segunda mitose, multicelulares com quatro a seis células, e multicelulares e multinucleados com material celular extravasado.

Aos seis dias foram observados aproximadamente 24 multicelulares. Foram constatados também muitos micrósporos e grãos de pólen degenerados.

Aos oito dias foram visualizadas três anteras colapsadas. Em todas elas foram observados multicelulares. Foram encontradas estruturas multicelulares e também, estrutura ainda com fragmentos de esporoderme.

Aos 10 dias foram observados grãos de pólen multicelulares com aproximadamente 12 µm, e estruturas multicelulares com 12 e 20 µm.

Aos 12 dias foram encontrados multicelulares com parede celular bem definida e estruturas multicelulares com esporoderme rompida.

Aos 14 dias foram observados multicelulares rompidos com material extravasado e um pró-embrião.

Aos 16 e 18 dias não foram encontrados resultados diferentes dos já anteriormente descritos.

Aos 20 dias foi observada uma antera com estruturas externas, com primórdio de diferenciação de raiz. Foram encontradas várias estruturas ainda dentro da antera, aproximadamente cinco. Em outra antera, foram visualizados poucos micrósporos e também micrósporos e/ou grãos de pólen degenerados, com sua parede de esporopolenina evidenciada pela fluorescência da auramina (Figura 43 A). Com relação

às estruturas externas analisadas, verificaram-se quatro estruturas multicelulares sem forma definida (SFD).

Observação realizada aos 22 dias de cultivo foi semelhante a anterior, com relação às anteras e ao material celular colapsados, onde também foram observados núcleos extravasados.

Aos 24 dias foram observados muitos micrósporos em uma das anteras, mas todos degenerados. Na antera colapsada, uma das estruturas externas era semelhante a um embrião, com início de diferenciação de raiz. Essas estruturas com início de diferenciação de raiz foram classificadas como SFD, pelo fato de ainda não ser encontrado um tecido completamente organizado (estrutura semelhante pode ser observada na Figura 42 B). Em outra antera foram encontrados pelo menos 13 multicelulares e estruturas internas, com células parenquimáticas volumosas.

Aos 26 dias foram encontrados muitos micrósporos degenerados e três estruturas internas. Foram observados também, sete grãos de pólen multicelulares. Outra antera se apresentou colapsada, onde foram encontradas pelo menos 10 estruturas também colapsadas, sendo que duas delas apresentaram raiz em diferenciação (Figura 42 A e B), sendo classificadas como SFD com zonas de diferenciação.

Aos 28 dias foi observada uma antera colapsada com muitos micrósporos degenerados, parecendo ter também alguns grãos de pólen multicelulares. Foi observada somente uma estrutura interna. Em outra antera foram encontradas estruturas externas apresentando epiderme, células volumosas e vacuoladas. Uma das estruturas externas apresentou cordões pró-vasculares, constatando-se desenvolvimento inicial de raiz. Outras estruturas apresentaram elementos traqueais. Na Figura 43 B e C pode ser visualizado o resultado da microscopia de epifluorescência de estruturas embriogênicas aos 28 dias. Foi utilizado calcoflúor, cujo resultado foi positivo, pois puderam ser evidenciadas as

paredes celulares das estruturas embriogênicas, mostrando inclusive a formação de estruturas semelhantes a embriões, na epiderme.

Na tabela 16 é apresentada uma síntese das análises histológicas realizadas na espiga B069.

Tabela 16 - Síntese da análise histológica da cultivar BR-2, linhagem S₃B63, através do registro de presença (+) e ausência (-) para as categorias classificatórias de micrósporos e grãos de pólen. A cor verde representa a presença (+) da categoria no dia de observação e a amarela, presença de ELSs externas, com seus respectivos números de ocorrência

Linha-gem	Classificação		Dias													
			2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
S ₃ B63	Micrósporos		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1 ^a mitose		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Binucleado		-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bicelular		-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Trinucleado		-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Multinucleados		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Multinucleados/Multicelulares rompidos, material celular extravasado		-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Multicelulares		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
cv.	Estruturas Multicelulares		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BR-2	N° de ELSs (embrióides) externas	sem forma										4	1	5	30	24
		MAC														
		MAR														
		Bipolares														

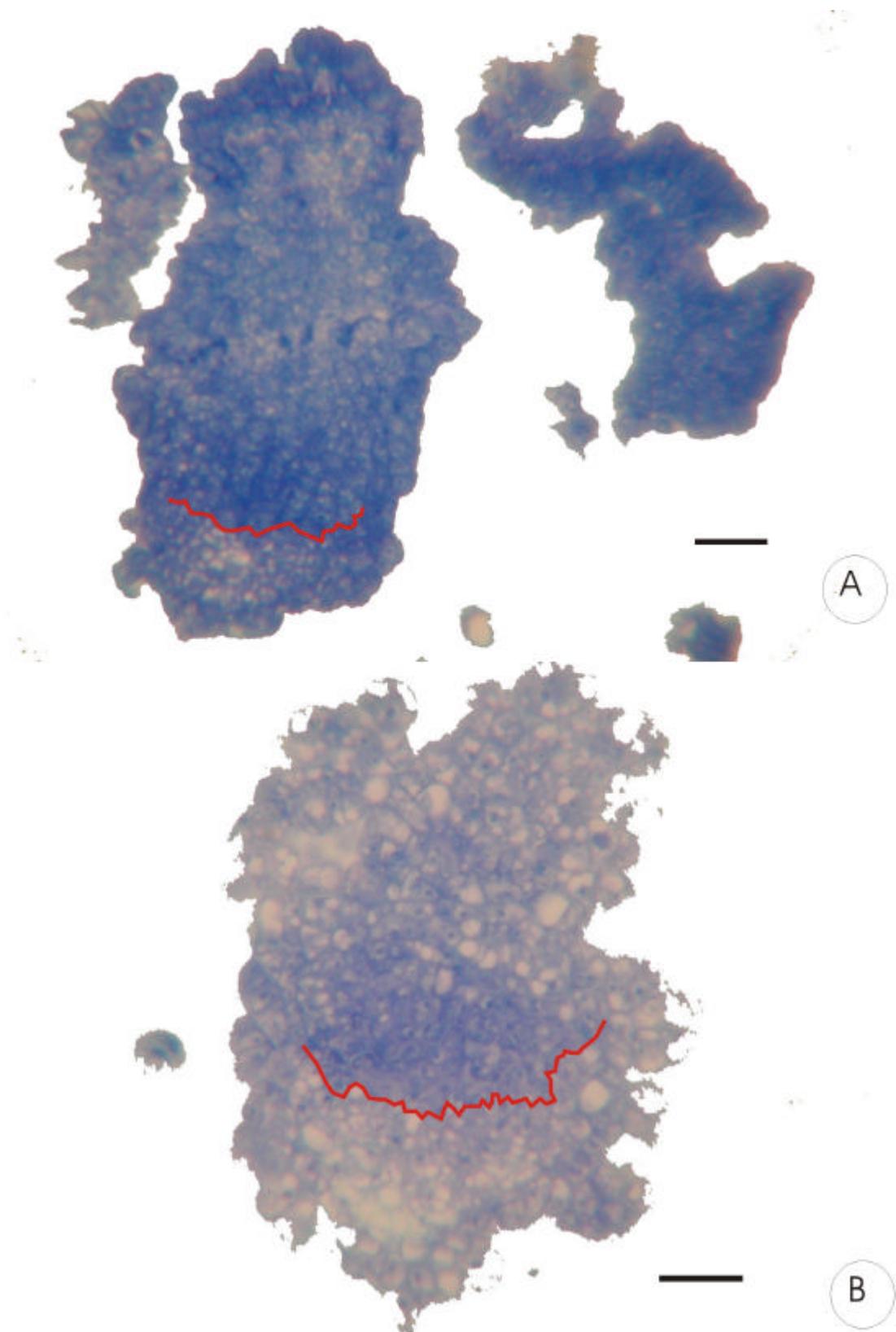


Figura 42 - Estruturas embriogênicas da espiga B069, linhagem S3B63 - 26 dias - antera 3cl2. A) Estrutura colapsada com raiz em diferenciação. B) Estrutura com raiz em diferenciação. Linhas vermelhas evidenciando as raízes. Escalas: 50 μ m.

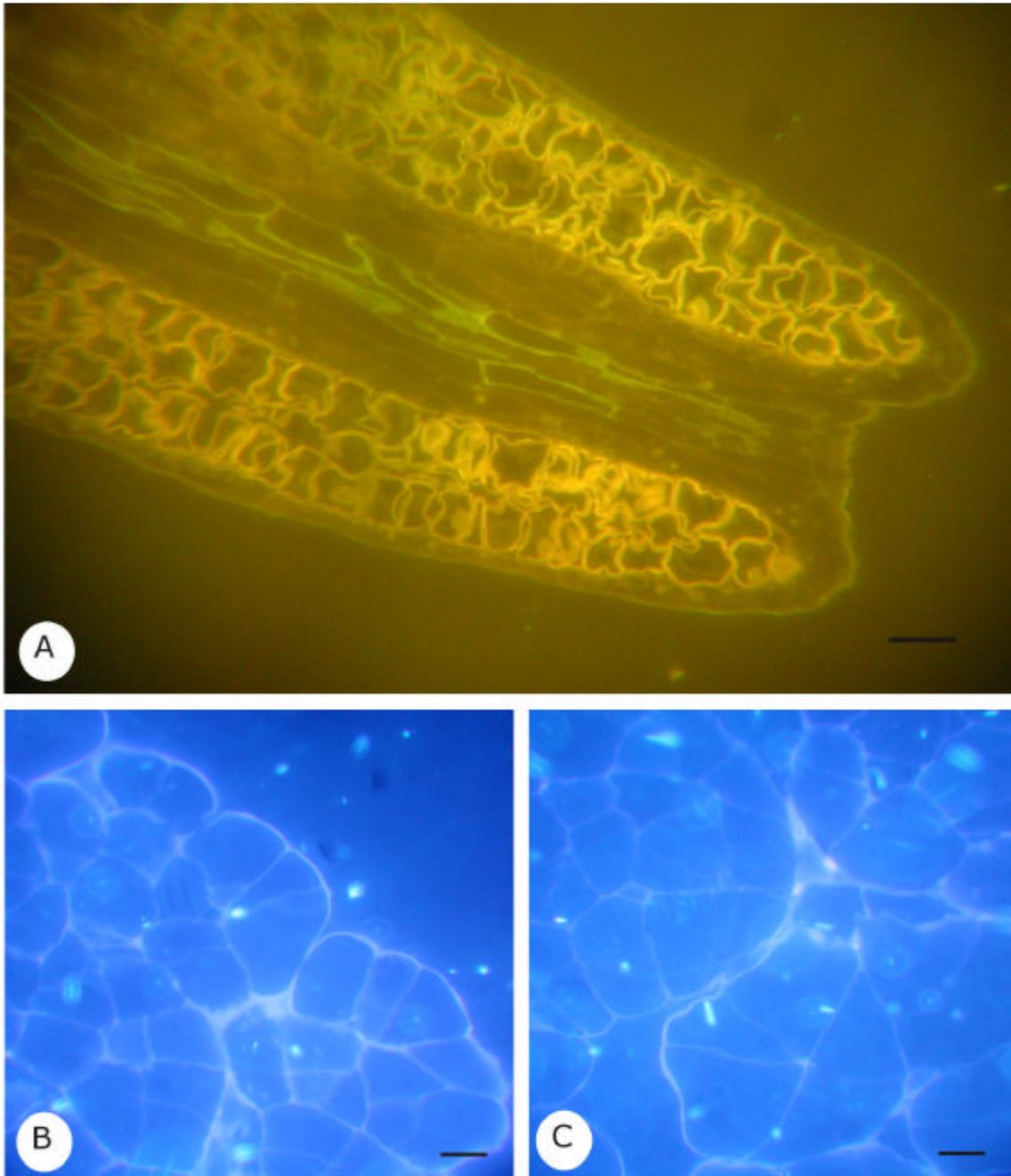


Figura 43 - Microscopia de Epifluorescência em estruturas embriogênicas e antera da linhagem S3B63. **A** - Antera cultivada *in vitro* aos 20 dias, demonstrando reação positiva à auramina, onde é evidenciada a esporopolenina da esporoderme dos micrósporos. Nota-se a extremidade distal da antera com micrósporos degenerados. **B** e **C** - Estruturas embriogênicas aos 28 dias de cultivo *in vitro* demonstrando reação positiva ao calcoflúor, onde são evidenciadas as paredes celulares. **Escalas: A** - 50 μm . **B** e **C** - 10 μm .

3.5 - ANÁLISE COMPARATIVA DAS LINHAGENS SELECIONADAS (CULTIVARES DE CEVADA A-05 E BR-2) E DA CULTIVAR MN-599

Nesse item foram realizadas as análises comparativas entre a cultivar MN-599 e as linhagens estudadas, a partir da análise histológica de cada uma delas. As análises referiram-se tanto às anteras, com seus respectivos micrósporos e grãos de pólen, quanto às estruturas multicelulares de cevada, obtidas *in vitro*.

A partir dos dados qualitativos obtidos, foram organizadas as tabelas de presença (+) e ausência (-) para cada tipo morfológico de grão de pólen/estrutura observado. Em todos os casos e em todas as amostras os micrósporos estiveram presentes.

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis mostrou que a única variável significativa foi “multinucleados/multicelulares rompidos”, sendo que a cultivar MN-599 apresentou maior proporção de presença (+) ao longo dos dias analisados (Tabela 17). Verificou-se também que a variável “binucleado” apresentou uma tendência à significância ($p = 0,072$), já que o nível de significância utilizado foi $p = 0,05$. Essa observação aponta novamente para um maior índice de presença (+) na cultivar MN-599.

O teste do χ^2 (qui-quadrado) [Tabela 18], aplicado para verificar a significância do número de estruturas embriogênicas (ELs) formadas externamente à antera, mostrou que a maior porcentagem foi de estruturas sem forma definida (média = 95,2%) para todas as linhagens e para a cultivar MN-599. No caso específico dessas estruturas sem forma, as porcentagens variaram de: S₃A22 = 98,5%, S₃B63 = 98,5%, MN-599 = 86,2% até S₃A23 = 33,3%. Deve ser ressaltado novamente (ver Material e Métodos para maiores detalhes) que a linhagem S₃A23 teve o n amostral pequeno.

Tabela 17 - Teste de Kruskal-Wallis para as categorias classificatórias da Morfologia dos grãos de pólen de cevada, obtidas das três linhagens selecionadas e uma cultivar, analisados histologicamente. Probabilidade (p)

Categorias Classificatórias da Morfologia dos Grãos de Pólen								
	1 ^a mitose	binucleado	bicelular	trinucleado	multinucleados	Multinucleados/Multicelulares rompidos, material celular extravasado	Multicelulares	Estruturas Embriogênicas Multicelulares
p	0,680	0,072	0,206	0,246	0,132	< 0,01	0,734	0,676

Tabela 18 - Teste do χ^2 (qui-quadrado) para as ELSs (“embryo like-structures”) analisadas nas linhagens e cultivar de cevada

ELSs das Linhagens e cv.								
			Linhagens e cv.				Total	
			S ₃ A22	S ₃ A23	S ₃ B63	MN-599		
N ^o ELSs	Sem forma	n	321	1	65	94	481	
		%	98,5%	33,3%	98,5%	86,2%	95,2%	
	MAC	n	1	1	1	5	8	
		%	0,3%	33,3%	1,5%	4,6%	1,6%	
	MAR	n	0	0	0	6	6	
		%	0,0%	0,0%	0,0%	5,5%	1,2%	
	BIPOLARES	n	4	1	0	5	10	
		%	1,2%	33,3%	0,0%	3,7%	2,0%	
	Total		n	326	3	66	110	505
			%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

p < 0,01

A única variável significativa com relação ao teste do χ^2 foi "multinucleados/multicelulares rompidos, material celular extravasado". Analisando-se os resultados para esta variável percebe-se que a cultivar MN-599 apresentou maior índice de presenças (+) ao longo dos dias analisados.

Estruturas apresentando somente meristema apical caulinar (MAC) tiveram valores de $S_3A22 = 0,3\%$, $S_3A23 = 33,3\%$, $S_3B63 = 1,5\%$ e MN-599 = 4,6%. O valor total foi de 1,6%.

Estruturas que apresentaram somente meristema apical radical embrionário adventício (MAR) foram observadas unicamente na cultivar MN-599 (5,5%), com um valor total de 1,2%. Os embriões, apresentando MAC e MAR na mesma estrutura, foram observados nas porcentagens de 1,2% em S_3A22 , 33,3% em S_3A23 , 1,5% em S_3B63 e 3,7% em MN-599.

Ainda que a maior porcentagem de MAC tenha sido observada na linhagem S_3A23 , quando comparada às outras linhagens e à cultivar MN-599, percebe-se que isso ocorreu devido à pequena amostragem daquela linhagem. Na cultivar MN-599 foi encontrado o maior n.

A linhagem S_3A23 produziu um único embrião, entre uma estrutura sem forma definida e uma estrutura com MAC, apresentando a porcentagem de 33,3%, sendo isso novamente devido ao fato da pequena amostra analisada. A linhagem S_3A22 e a cultivar MN-599 produziram o maior número de embriões, quatro e cinco, respectivamente.

Resumidamente, constatou-se que em relação ao número de ELSs (estruturas tipo-embrião):

- "Sem forma" foi predominante na cultivar S_3A22 ;
- "MAC" e "MAR" foram predominantes na cultivar MN-599.

Como a cultivar MN-599 não foi selecionada, e por esse motivo foi utilizada como controle, foi realizado um "padrão" dos tipos

morfológicos encontrados. Esse “padrão”, além de servir de base para estudos posteriores, pôde ser utilizado como comparativo para as linhagens selecionadas.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens, e também nas comparações das mesmas com a cultivar MN-599. Entretanto, foram observadas algumas diferenças no “timing” em função do tempo da formação dos diferentes tipos morfológicos, desde micrósporo até plântula.

Com relação às estruturas embriogênicas, a análise estatística também não apresentou diferenças entre os genótipos analisados, mesmo que visualmente tenha sido observada uma considerável diferença na produção das mesmas. A cultivar A-05, especialmente a linhagem S₃A22 produziu a maior quantidade de estruturas embriogênicas, quando comparada à cultivar BR-2, especialmente à linhagem S₃B63, que se mostrou intermediária. A cultivar não-selecionada, MN-599, produziu o menor número de estruturas. Na análise histológica houve variação na comparação desses resultados. Mesmo que um considerável número de embriões tenha sido observado na linhagem S₃A22, concordando com a análise estatística, na cultivar MN-599 foi observado um embrião a mais. Os resultados da análise histológica demonstraram que os embriões da linhagem S₃A23 não atingiram um grau de histodiferenciação tão elevado quanto aos embriões da cultivar não-selecionada MN-599. Isso pode ser explicado pela competência celular. Portanto, a cultivar não-selecionada, mesmo com um número menor de estruturas embriogênicas formadas, teve maior competência para formar embriões quando comparada com as outras duas linhagens analisadas.

Dependendo do período de tempo das anteras e estruturas mantidas em cultivo, só foram observadas estruturas SFD (sem forma definida). Alguns períodos foram característicos para a formação de estruturas, como 24 dias, período em que foram formadas estruturas

embriogênicas em todos os genótipos analisados. Com relação aos embriões, no mesmo período foram encontrados tanto para a cultivar MN-599, como para a linhagem S₃A22. A linhagem S₃A23 produziu embrião aos 18 dias. Isso significa que essa linhagem pode produzir embriões precocemente, mas no desenvolvimento da embriogênese *in vitro*, não possui capacidade de formar um maior número de embriões e, em diferentes períodos. Esse foi o caso da linhagem S₃A22, que produziu embriões em três diferentes períodos, e da cultivar MN-599, produzindo embriões em dois períodos diferentes. A linhagem S₃A22 foi selecionada para a maior produção de estruturas embriogênicas, e a S₃B63 para a menor produção. Esse comportamento foi observado na linhagem S₃B63, que não produziu embriões ao longo do período, apenas estruturas multicelulares SFD. A cultivar MN-599 como não foi selecionada, mostrou comportamento intermediário entre as linhagens de maior e menor produção.

Com o objetivo de se traçar uma comparação entre anteras *in vivo* e o material obtido *in vitro*, também foram realizadas seções em algumas anteras obtidas *in vivo* (ver item 6 – Trabalhos Futuros) – dados não mostrados. Como foi realizada uma análise pontual, não se obteve uma observação significativa para maiores comparações. Para tanto, seria necessário um acompanhamento detalhado da ontogenia das mesmas para ser traçada uma comparação real com o material obtido *in vitro*. Em algumas das anteras analisadas foi encontrado material semelhante ao obtido *in vitro*, com a presença de micrósporos e grãos de pólen nos lóculos das anteras. Da mesma forma, algumas anteras apresentaram somente micrósporos degenerados, com esporoderme evidenciada pelo corante Azul de toluidina, resultando numa coloração azul turquesa. Os grãos de pólen maduros, tricelulares, apresentaram uma quantidade considerável de amido.

4 - DISCUSSÃO



4.1 - CULTURA DE ANTERAS DE CEVADA

Como a cultura de anteras envolveu várias etapas, para uma melhor sistematização a discussão será abordada segundo os tópicos descritos nos resultados.

Etapa da coleta de espigas e Determinação do estágio de desenvolvimento dos micrósporos/grãos de pólen

O fato das aristas emergentes serem observadas somente nas cultivares BR-2 e MN-599 (mesmo que em pequena quantidade) pode ser explicado por uma mais rápida maturação das espigas dessas cultivares. Este aspecto mostra que cada cultivar possui um ritmo de crescimento específico em fases diferentes do ciclo vital. Como relatado por Revers (1993), as cultivares A-05 e BR-2 mostraram diferenças quando comparadas em diferentes fases do ciclo de vida, chamando a atenção para a velocidade mais lenta de germinação da BR-2, mesmo que tenha atingido antes o estágio ideal para a coleta das anteras quando comparada novamente à A-05.

Deve ser ressaltado que, de acordo com dados de Revers (1993), somente da cultivar BR-2 poderiam ser coletadas espigas com aristas emergentes (até $11,4 \pm 2,5$ mm), estando ainda as mesmas, no estágio adequado para o cultivo *in vitro* dos micrósporos e grãos de pólen.

Com relação aos outros marcadores morfológicos utilizados, foram realizadas correlações entre cada um deles (altura dos afilhos e distância interlígulas) com as cultivares, tendo sido obtidas correlações positivas (Assmann, 1996). A distância interlígulas foi o melhor marcador do estágio ideal de desenvolvimento dos micrósporos e grãos de pólen, com diferenças significativas entre a cultivar BR-2 e as demais cultivares analisadas (Revers, 1993). Segundo esse autor, a

altura dos afilhos não deve ser considerada um marcador do estágio de desenvolvimento, embora revele diferenças entre as cultivares.

Há evidências de que as condições fisiológicas das plantas doadoras das espigas para a cultura de anteras têm importância fundamental para a resposta *in vitro* na formação de estruturas embriogênicas, segundo Olsen (1987) e Szarejko & Kasha (1991).

Dessa forma, Revers (1993) constatou que a região de Porto Alegre - RS não se encontra entre as recomendadas para o plantio da cultura, sendo provável que as diferenças observadas no experimento com relação às regiões indicadas para a produção, possam ser atribuídas a fatores ambientais.

Ainda com relação ao comprimento das aristas, Assmann (1996) verificou a existência de correlação com o valor médio calculado para os estádios dos micrósporos e grãos de pólen da mesma espiga, nas cultivares A-05 e BR-2. Na cultivar MN-599 a correlação não foi testada devido ao número baixo de espigas, somente duas, que apresentaram aristas emergentes. Foi encontrada uma correlação positiva ($r = 0,378$) para a cv. BR-2 entre as duas variáveis ($r^2 = 14,3\%$). Na cultivar A-05 verificou-se correlação positiva significativa ($r = 0,743$), com $r^2 = 55,2\%$, embora a amostra tenha sido menor do que a da BR-2.

Com relação às outras variáveis analisadas, o mesmo autor referido anteriormente também encontrou correlação positiva entre cada uma delas (altura dos afilhos e distância interlígulas) com o estágio de desenvolvimento dos micrósporos e grãos de pólen.

Dessa forma, foi comprovada a necessidade da utilização dos marcadores morfológicos para uma coleta mais eficiente de espigas com micrósporos e grãos de pólen nos estádios adequados para a cultura *in vitro* de anteras de cevada, sendo que o efeito de cultivar foi observado para todos os marcadores (Assmann, 1996).

O estágio ideal dos micrósporos e grãos de pólen para a cultura *in vitro* de anteras de cevada, tem sido demonstrado por vários autores

como sendo entre o uninucleado inicial (UI) ou médio (UM) a final (UT) [Dale, 1975; Chen *et al.*, 1984; Assmann, 1996; Gilpin *et al.*, 1997]. Mas alguns autores também utilizaram anteras para a cultura *in vitro* com grãos de pólen entre o estágio unicelular final ao bicelular (Wilson *et al.*, 1978; Paire *et al.* 2003).

Como já relatado nos resultados, foram observadas aristas emergentes em algumas espigas, especialmente naquelas da cultivar BR-2. Resultado semelhante foi observado por Revers (1993), onde essa característica foi observada somente na referida cultivar, em cerca de 30% das espigas cujos grãos de pólen estavam no estágio adequado para o cultivo *in vitro*.

Assmann (1996) compara as três cultivares analisadas (as mesmas utilizadas no presente trabalho) com relação às aristas emergentes e o estágio do pólen. Verificou que na cultivar A-05 somente 2% das espigas correspondentes à subamostra UNI-1^a DIV (para maiores detalhes das classes, ver tabela 5) apresentaram aristas. O mesmo foi verificado para a cultivar MN-599, apresentando menos de 1% (somente uma espiga) das espigas na classe referida anteriormente. Portanto, conclui que para essas cultivares não se deve coletar espigas com aristas emergentes.

Por outro lado, na cultivar BR-2, o tamanho da arista aparece como um importante marcador morfológico para auxiliar na coleta das espigas com o estágio ideal dos micrósporos e grãos de pólen. A autora citada anteriormente verificou que 95% da amostra das espigas da subamostra UNI-1^a DIV e todas as espigas da amostra na classe BI-TRI apresentaram aristas emergentes.

Da mesma forma, no presente trabalho foram encontradas aristas emergentes na cultivar BR-2, com valores chegando até 1 e 1,5 cm, não significando que os micrósporos e grãos de pólen estivessem num estágio mais adiantado do desenvolvimento, mas sim, estavam no estágio ideal para o cultivo *in vitro*. Material mais adiantado no

desenvolvimento, com presença de aristas emergentes, somente foi observado nas outras duas cultivares, A-05 e MN-599, concordando com Assmann (1996) que no momento da coleta das espigas dessas duas cultivares não se deve coletá-las com aristas emergentes. Isso só pode ser realizado para a cultivar BR-2, que apresentou uma velocidade mais lenta no desenvolvimento das espigas, e conseqüentemente dos micrósporos e grãos de pólen.

Há relatos na literatura de que se pode utilizar a medida do tamanho da flor de cevada para obter alguma indicação da maturidade da antera, entretanto esse tamanho é afetado pela posição da flor na inflorescência, pelo genótipo e pela idade da planta (Atanassov *et al.*, 1995), o que também dificultaria a coleta de espigas apresentando o estágio ideal dos micrósporos e grãos de pólen para o cultivo *in vitro*. Uma solução poderia ser o aumento do número amostral das espigas, o que nem sempre é viável, mas ainda, pode-se utilizar o maior número possível de marcadores morfológicos para minimizar o erro de coleta de espigas com desenvolvimento tardio.

Etapa da Indução da Embriogênese

As diferenças observadas entre as linhagens e a cultivar não-selecionada, com relação à formação de estruturas embriogênicas, não foram comprovadas pela análise estatística, mas verifica-se que há uma tendência à significância (Tabela 6), devido à probabilidade ser próxima do nível de significância de 5%. Esse fato pode ser explicado também pelo tamanho da amostra, ou seja, se o número de espigas que permaneceram em cultivo *in vitro*, sem contaminação (53 espigas), fosse aumentado, poderia ser comprovada a significância através do teste estatístico, sendo assim, as linhagens e a cultivar seriam diferentes com relação à produção de estruturas embriogênicas *in vitro*.

Em trabalho anterior, realizado por Assmann (1996), foi

encontrada significância nos testes estatísticos para as mesmas variáveis, com as mesmas cultivares, mas com um número amostral de espigas maior.

O fato relatado anteriormente foi semelhante à produção de estruturas formadas/espiga, pois mesmo sendo encontrada uma aparente diferença na produção das mesmas entre os genótipos analisados, não houve diferença significativa, apenas uma tendência à significância (Tabela 6). O número de anteras responsivas formadas aos 21 dias de indução (formação inicial das estruturas embriogênicas) também não mostrou diferença significativa entre os genótipos analisados. Novamente, Assmann (1996) encontrou efeito do genótipo. Por outro lado, Revers (1993) em estudo preliminar de cultura de anteras das mesmas cultivares analisadas no presente estudo, verificou que as cultivares A-05 e MN-599 foram semelhantes entre si com relação às respostas das anteras *in vitro*, tanto aos sete, quanto aos 28 dias, onde a cultivar BR-2 diferiu das duas cultivares citadas anteriormente.

Assmann (1996) em sua discussão atribuiu a diferença de respostas encontradas em seu trabalho e no de Revers (1993), com as mesmas cultivares, à interação significativa observada entre os genótipos analisados e os pré-tratamentos testados e/ou meio de cultura que também diferiram, pois Revers (1993) utilizou somente um pré-tratamento, à temperatura constante durante 28 dias. No presente trabalho foi utilizado somente um período de pré-tratamento, 10 dias a 5 °C, o que pode explicar também a não significância entre os genótipos analisados.

Por outro lado, no presente trabalho foi encontrada diferença significativa entre os genótipos quanto à produção de estruturas embriogênicas aos 28 dias de cultivo *in vitro*, demonstrando a intensidade de produção rápida. Essa comparação não foi realizada pelos autores anteriormente citados.

Deve-se enfatizar que a análise estatística não foi realizada para todas as variáveis devido ao fato dessa etapa não ser o foco principal desse trabalho de doutorado.

A formação precoce das estruturas embriogênicas aos 28 dias, período da primeira transferência das mesmas para o meio de regeneração R-I, mostrou que a linhagem S₃A23 (da cv. A-05) obteve o maior número, e a cultivar MN-599 o menor. Assmann (1996) registrou que a cultivar A-05 produziu o maior número de estruturas embriogênicas na indução, aos 21 dias. Portanto, foram encontrados resultados semelhantes ao presente trabalho, mas no 21^o dia de cultivo.

Novamente, para a variável “n^o total de estruturas formadas”, a diferença na produção dessas estruturas entre as cultivares não foi significativa, mesmo que tenha sido observado um grande número delas na cultivar A-05, especialmente na linhagem selecionada S₃A22 (Tabela 6). Da mesma forma que Assmann (1996), pode-se inferir, no caso do presente estudo, que mesmo que a cultivar A-05 tenha apresentado visualmente um maior número de estruturas embriogênicas *in vitro*, ao final do período de indução a produção dessas estruturas não diferiu estatisticamente entre as cultivares A-05, BR-2 e MN-599. A autora anteriormente citada encontrou a cultivar MN-599 como a menos produtiva nas condições testadas. Essa observação pôde ser confirmada pela significância da probabilidade obtida.

Stival (1995) observou que um dos híbridos F₁ que obteve a maior produção de estruturas embriogênicas, no melhor meio testado, era oriundo de um cruzamento envolvendo a cultivar BR-2. Essa observação pode ser comparada com o presente trabalho, já que foi obtido um valor semelhante dessa cultivar com a que obteve a maior resposta, a cultivar A-05, linhagem S₃A22 (Tabela 6), não diferindo significativamente para a variável “n^o total de estruturas formadas”.

Com relação ao período de pré-tratamento à baixa temperatura, Assmann (1996) testou três diferentes períodos, 10, 20 e 30 dias,

verificando que o período que proporcionou maior produção de estruturas embriogênicas, de um modo geral para as três cultivares analisadas, foi o de 10 dias. A conclusão foi obtida a partir de observações em que o teste de significância mostrou equivalência nos três pré-tratamentos, para os três meios testados, nas cultivares A-05 e BR-2. Nesse mesmo período, e utilizando o meio de cultivo I-3, a cultivar MN-599 apresentou uma maior produção de estruturas embriogênicas, quando testados os outros dois meios e os outros dois períodos, sendo que em geral essa é a cultivar menos produtiva. Foi observado também que a cultivar BR-2 obteve a menor produção. Dessa forma, foi notado o efeito do pré-tratamento sobre as cultivares, com a cultivar MN-599 mostrando-se com a menor produção de estruturas embriogênicas quanto maior a exposição à baixa temperatura, ao contrário da cv. BR-2. A partir desse resultado, foi utilizado no presente trabalho o período de 10 dias no pré-tratamento, com temperatura de 5 °C.

Nesse sentido, Bhojwani & Razdan (1983) salientam que o tratamento à baixa temperatura aplicado ao botão floral, previamente ao estabelecimento *in vitro* das anteras, aumenta o número de micrósporos que desenvolvem embriões. Por outro lado, Szarejko & Kasha (1991) não encontraram benefícios, quando foi comparado o material cultivado *in vitro* diretamente (0 dias) com aquele pré-tratado. Entretanto, muitos autores utilizaram um período maior de pré-tratamento, 28 dias, para várias cultivares de cevada do hemisfério norte (Huang & Sunderland, 1982; Dunwell *et al.*, 1987; Olsen, 1987). Mesmo que esse tempo utilizado no pré-tratamento tenha sido considerado ideal para algumas cultivares de cevada do hemisfério norte, para as cultivares brasileiras parece não ser o mais recomendável (Assmann, 1996).

Segundo Jähne & Lörz (1995) a duração e a temperatura de pré-tratamento diferem em trabalhos de cultura de micrósporos de arroz,

demonstrando que as condições de pré-tratamento devem ser otimizadas para os diferentes genótipos, tendo sido esse fato também observado para as cultivares brasileiras de cevada, segundo Assmann (1996).

Da mesma forma que no presente trabalho pode ser inferida essa conclusão acerca da forte influência do genótipo na capacidade embriogênica das cultivares, na literatura também é encontrada essa afirmação para a cevada (Foroughi-Wehr *et al.*, 1982; Dunwell *et al.*, 1987; Szarejko & Kasha, 1991).

Foroughi-Wehr & Zeller (1990), Dunwell *et al.* (1987) e Larsen *et al.* (1991) relataram que não necessariamente a formação de um grande número de estruturas embriogênicas *in vitro* corresponde ao potencial de regeneração de plantas verdes. Isso pôde ser constatado na cultivar A-05, em que o maior número de estruturas embriogênicas não resultou na maior produção de plantas verdes, o que será discutido posteriormente.

Ainda com relação ao efeito do genótipo, Foroughi-Wehr & Zeller (1990) demonstraram diferentes resultados da embriogênese em 25 cultivares germânicas de trigo, observando desde uma baixa ou quase nenhuma produção, até alta frequência de regeneração de plantas a partir de estruturas embriogênicas derivadas do pólen. Grandó (1990) verificou em estudo de linhagens duplo-haplóides, para a mesma espécie citada anteriormente, diferenças que só puderam ser atribuídas ao efeito do genótipo.

Uma vez que o pré-tratamento é uma condição para ativar o estresse, responsável por ativar a rota gametofítica, anteras de cevada podem ser estabelecidas durante quatro dias em meio de cultura contendo 0,3 M de manitol (Jähne & Lörz, 1995). Foi observado por Roberts-Oehlschlager & Dunwell (1990) que essa resposta do pré-tratamento de manitol foi superior ao de baixa temperatura.

Li *et al.* (2001) utilizaram como pré-tratamento, drogas de

hipometilação do DNA (azacitidina e etionina), indicando que poderiam aumentar a frequência de calos e embriões. Os resultados sugeriram que esse tipo de pré-tratamento pode aumentar a frequência de desdiferenciação do micrósporo. A função das drogas de hipometilação do DNA parece ser a mesma dos pré-tratamentos à baixa temperatura e de manitol.

Wojnarowicz *et al.* (2004) comentam que entre os reguladores osmóticos utilizados no pré-tratamento, o manitol foi o mais eficiente. Sorbitol e sacarose, também utilizados no experimento, fizeram com que os plastídios se diferenciassem pouco, porém constataram um acúmulo de uma grande quantidade de amido. Os autores comentam que esse acúmulo de amido não está correlacionado com o albinismo.

No trabalho de Revers (1993) não foi observada a formação de estruturas embriogênicas, podendo esse fato ser explicado pela composição do meio de cultura utilizado pelo autor, seguindo protocolo de Olsen (1987) com modificações. Os reguladores de crescimento utilizados foram cinetina e 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), de acordo com Kao (1991), utilizados por esse autor para a indução de estruturas embriogênicas. Assmann (1996) testando três diferentes meios de cultura verificou que o meio de indução-1 (I-1), modificado de Olsen (1987), mas diferente daquele utilizado por Revers (1993), foi o que ofereceu as mais baixas condições de indução das anteras em cultura para a formação de estruturas embriogênicas.

No presente trabalho foi igualmente utilizada cinetina como citada anteriormente, mas ANA (ácido naftalenoacético) no lugar do 2,4-D, a partir da sugestão de Assmann (1996) que verificou ser essa combinação bastante benéfica para a indução da embriogênese a partir das anteras em cultura.

Num estudo comparando dois meios de cultura em 11 populações F_1 de cruzamentos intervarietais de cevada, Stival (1995) mostrou haver efeito significativo da interação entre os genótipos e o meio de

indução.

Segundo Cai *et al.* (1992) a composição dos fitorreguladores no meio de indução mostrou ter um efeito significativo na eficiência da cultura para os genótipos de cevada testados. São utilizadas várias combinações, pois segundo Clapham (1977), as anteras de cereais necessitam de auxinas e citocininas, tanto simultaneamente, quanto em seqüência. Dessa forma, as respostas do material em cultivo parecem depender dos níveis endógenos ótimos desses fitorreguladores.

Atualmente não se utilizam fitorreguladores, principalmente no cultivo de micrósporos e grãos de pólen isolados, como demonstrado por Fan *et al.* (1988) em *Brassica napus* L. e em *Zea mays* L. por Obert *et al.* (2000).

Etapa de Regeneração de Plântulas Verdes

Os resultados obtidos na etapa de regeneração referem-se à diferenciação das estruturas embriogênicas que foram transferidas para o meio de regeneração.

Foram encontrados cinco tipos de estruturas a partir desses resultados: estruturas indiferenciadas (amorfas), brotos albinos, brotos verdes, plântulas albinas e plântulas verdes. Para a análise no presente trabalho foram utilizados somente os dados das duas últimas citadas (Tabela 9). As plântulas verdes formadas foram cultivadas em meio de regeneração-II (R-II), adequado para o desenvolvimento das partes aérea e radical.

Assmann (1996) encontrou efeito do genótipo para a variável analisada "proporção de estruturas indiferenciadas", sendo também encontrado efeito do pré-tratamento à baixa temperatura, com um maior número de estruturas indiferenciadas aos 20 dias desse período.

A mesma autora verificou que a cultivar MN-599 diferiu das demais cultivares, com um maior número de plântulas albinas

regeneradas. Foi observado também, que quanto maior o tempo de pré-tratamento do material, maior foi a proporção de plântulas albinas, mostrando que o maior tempo a baixas temperaturas foi decisivo no aumento da regeneração dessas plântulas.

Szarejko & Kasha (1991) concluíram que a alta frequência de regenerantes albinos não foi alterada pela composição dos meios de cultura testados, mas sim pela forte influência do genótipo com relação a essa variável. Da mesma forma, Kao *et al.* (1991) verificaram efeito do genótipo sobre a frequência de plantas albinas regeneradas. Por outro lado, Assmann & Winge (1996) observaram que os diferentes meios de cultura testados tiveram influência na formação de plântulas albinas. Essas autoras verificaram interação dos fatores genótipo e meio de indução influenciando a produção de plântulas albinas, mais especificamente no meio I-1 a cultivar MN-599 diferiu das demais, que foram equivalentes entre si, tendo regenerado mais albinas.

Também em cevada, Olsen (1987) verificou que quando a maioria das estruturas formadas foi considerada do tipo calo, a produção inicial foi baixa e a maioria das plantas regeneradas era albina. Por outro lado, Hoekstra *et al.* (1992) relataram a formação de 0,4 plantas albinas por antera estabelecida *in vitro*. Cai *et al.* (1991) obtiveram a regeneração de 44,9 a 62,6 plantas albinas por 100 anteras estabelecidas, dependendo do genótipo.

A cultivar A-05 apresentou a linhagem S₃A23 com a maior proporção de plântulas albinas, o dobro do valor da linhagem S₃A22. Isso significa que essa cultivar produz grande quantidade de estruturas embriogênicas (Tabela 6), mas tem problemas na regeneração, tanto de plântulas verdes, quanto de plântulas albinas (Tabela 9). A diferença entre as cultivares na produção de plântulas albinas também foi constatada por Assmann (1996), em que a cultivar MN-599 diferiu significativamente das outras duas, A-05 e BR-2, apresentando o maior número de plântulas albinas.

O albinismo é um problema sério encontrado na cultura de anteras de gramíneas. Segundo Harada *et al.* (1991), vários fatores têm sido apontados como afetando o grau de albinismo durante a cultura: o genótipo e o estado fisiológico da planta doadora, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos e grãos de pólen, a temperatura de cultivo, o pré-tratamento a baixa temperatura e a concentração de açúcar em combinação com os fitorreguladores. Entretanto a causa primária ainda não é conhecida.

Além desses fatores, Cistué *et al.* (1995) observaram que a duração do cultivo está altamente correlacionada com a produção de uma alta proporção de regenerantes albinos. É possível que o período maior em cultura no escuro ou que mudanças no balanço de nutrientes, ao longo desse período de cultivo possam levar ao aumento de albinismo. Da mesma forma, Kühlmann & Foroughi-Wehr (1989) verificaram que as estruturas que se formavam nos primeiros 30 dias se desenvolviam em plantas, e as originadas posteriormente, em grande parte, mostraram proliferação de calos e uma menor regeneração de plantas. Kao *et al.* (1991) observaram que de 20 plantas obtidas de uma única antera, a maior parte das que foram regeneradas dentro de 70 dias, foi verde e a maioria das induzidas posteriormente foi albina.

Larsen *et al.* (1991) discutem que aparentemente todos os genes que controlam as porcentagens de plantas verdes em cultura de anteras, particularmente em cevada, são herdados cromossomicamente.

Caredda *et al.* (2004) sugeriram que o albinismo a partir de material obtido da embriogênese *in vitro* diferiu entre as cultivares de cevada analisadas. Na cultivar de inverno Igri, a alteração dos plastídeos ocorreu durante a etapa de regeneração, visto que nas linhagens de inverno eles foram afetados em embriões derivados de micrósporos, indicando que o albinismo não foi iniciado durante a regeneração, mas sim no início do processo de embriogênese.

Etapa de Regeneração de Plantas Adultas

O maior número de plantas verdes foi produzido pelas duas linhagens da cultivar BR-2. Observação semelhante foi relatada por Stival (1995), mostrando que a cultivar BR-2 é mais produtiva com relação à regeneração de plantas verdes, mesmo não produzindo grande quantidade de estruturas embriogênicas como a cv. A-05.

Assmann (1996) observou que a baixa proporção obtida de plantas verdes poderia ter sido devido à baixa capacidade genética de regeneração das cultivares testadas. Entretanto, como referido anteriormente, Stival (1995) observou resultados satisfatórios em cruzamentos que utilizaram a cultivar BR-2 como genitor.

Uma série de fatores tem sido apontada como responsável pela regeneração de uma maior proporção de plantas verdes. Entre esses fatores estão principalmente, o genótipo, o pré-tratamento e a composição dos meios de cultivo *in vitro*. Cai *et al.* (1992) cita ainda outros fatores como, estágio de desenvolvimento dos micrósporos, condições físicas durante o estabelecimento das anteras *in vitro* e condições de crescimento das plantas doadoras.

Segundo Guo & Pulli (2000), talvez a mais importante influência na cultura de micrósporos seja o genótipo das plantas doadoras, como no caso estudado em *Phleum pratense* L.

Quanto ao nível de ploidia das plantas regeneradas, foi observado um valor relativamente alto de plantas diplóides, sendo que para a cultivar BR-2 esse valor foi muito próximo nas duas linhagens, ultrapassando 50%. A cultivar MN-599 e uma das linhagens da cultivar A-05, a S₃A22, apresentaram valores semelhantes, com mais de 70% das plantas diplóides. O mesmo tipo de análise foi realizada por Assmann (1996), onde, mesmo numa amostra reduzida, verificou que cerca de 50% das plantas verdes regeneradas eram haplóides e o restante duplo-haplóides, supondo a ocorrência de duplicação

espontânea. A autora também não verificou a ocorrência de tetraplóides, como observado no presente trabalho.

A duplicação espontânea dos cromossomos tem sido documentada para a cultura de anteras de cevada em uma porcentagem de 50 a 80% dos regenerantes verdes derivados do micrósporo ou do pólen (Foroughi-Wehr *et al.*, 1982; Jähne & Lorz, 1995). Wilson (1977) relata uma alta porcentagem de micrósporos e pólen diplóides, indicando que a duplicação do número cromossômico ocorre subsequente à formação da célula haplóide, sendo resultado direto das condições de cultura. Interação significativa entre o nível de ploidia e o genótipo foi observada por Stival (1995), onde detectou diferenças entre o material de cruzamentos, testado quanto à frequência de plantas haplóides e diplóides, tendo os cruzamentos que envolveram a BR-2 apresentado baixa frequência de duplicações espontâneas, indicando controle genético dessa característica.

Em *Brassica napus* L. cv. Topas são relatados casos de duplicação espontânea com proporções de 30 a 40% de diplóides, sendo que XuHan *et al.* (1999) atribuiu essa duplicação à endomitose, e não à fusão nuclear, por não terem encontrado mitoses sem a formação de parede celular.

Segundo Clapham (1977), é desejável obter diplóides homozigotos a partir de haplóides, quando a duplicação não ocorre espontaneamente *in vitro*. Para isso, a colchicina é o anti-mitótico mais empregado para o restabelecimento da condição diplóide da planta, garantindo a fertilidade da mesma em detrimento do pareamento normal dos cromossomos. González-Melendi *et al.* (2005) utilizando microscopia confocal, eletrônica e óptica mostraram evidências de que a fusão nuclear é o principal mecanismo de diploidização, ocorrendo no 6^o dia de cultivo, como no presente trabalho.

A perda de plântulas verdes após a transferência para o meio RII até a transferência das mesmas para recipientes com substrato,

também pode ser explicada por problemas técnicos na manutenção da temperatura ideal da câmara de crescimento. Em alguns períodos, a temperatura foi superior a 25 °C, o que, para a cevada, é considerada uma temperatura alta. O mesmo fato foi registrado por Assmann (1996), que relatou que o baixo número de plântulas e plantas verdes obtidas foi influenciado pelo mau funcionamento do sistema de climatização.

4.2 - ANÁLISE CITOLÓGICA DA CULTIVAR MN-599 DE CEVADA

Para a análise citológica, de cada espiga coletada, foram utilizadas três espiguetas, com diferentes localizações na espiga, para verificar o estágio dos micrósporos/grãos de pólen da espiga, antes da cultura *in vitro* das anteras (ver Material e Métodos para maiores detalhes). A possibilidade de seleção prévia das espigas com anteras em estádios adequados para a cultura, permitiu economia de tempo, redução de gastos e aumento da eficiência na obtenção de respostas embriogênicas dos micrósporos/grãos de pólen.

Examinando a variação no grau de desenvolvimento do micrósporo e do pólen em diferentes anteras, ao longo das espigas de cevada, Assmann (1996) verificou que o uso de três espiguetas permitiu uma melhor caracterização de cada espiga quanto aos estádios de desenvolvimento dos micrósporos e grãos de pólen.

As análises citológicas realizadas por Ekberg & Eriksson (1965) nas cultivares suecas de cevada "Forma" e "Bonus", permitem supor que a análise realizada no presente trabalho, de três espiguetas, coletadas na base, meio e ápice (e utilizando a média das modas) deve representar razoavelmente bem o estágio geral de desenvolvimento dos grãos de pólen de cada espiga. Embora a distribuição ao longo da espiga, dos estádios de desenvolvimento das anteras das nossas cevadas seja diferente das suecas (Assmann, dados não-publicados), a utilização do mesmo método de coleta tem se mostrado adequado.

A variação, nos estádios de desenvolvimento dos micrósporos/grãos de pólen, entre anteras e espiguetas da mesma espiga, que já tinha sido constatada por Wilson (1977), e confirmada no presente trabalho, reduz a eficiência da resposta mesmo quando a maioria das anteras contém micrósporos/grãos de pólen no estágio uninucleado,

entre inicial e final - os mais adequados para a cultura *in vitro*.

Essa variação inicial explica a variação nas respostas obtidas entre as anteras da mesma espiga estabelecida em meio de cultura, bem como a variação entre micrósporos da mesma antera.

As análises, realizadas no presente estudo, foram realizadas por espiga e por antera. As anteras de cada espiga, estabelecidas em uma placa de petri e posteriormente fixadas para análise a cada três dias a partir do início da cultura, permitiu um exame das mudanças que ocorreram no desenvolvimento dos micrósporos/grãos de pólen.

Por essa razão, a partir da análise dos resultados obtidos, pode-se dizer que micrósporos continuaram presentes até os dezoito dias de cultivo *in vitro* das anteras, mostrando que nem todos continuam seu desenvolvimento. Foram também encontrados muitos micrósporos degenerados e colapsados ao longo da análise. Essa observação foi ampliada pela presença dos demais estádios iniciais do desenvolvimento normal dos grãos de pólen. Por outro lado, a análise permitiu avaliar em quantos dias de cultivo, foi detectada, pela primeira vez, um novo estágio de desenvolvimento *in vitro* dos micrósporos/grãos de pólen.

Binucleados assimétricos (não apresentados na tabela), em frequências dependentes da amostra, e simétricos, sempre raros, desde os controles e ao longo da cultura, puderam ser observados em todas as amostras. Entretanto, somente aos seis dias de cultivo, foram detectados os primeiros bicelulares simétricos, um sinal de possível ingresso na rota embriogênica.

Esses estádios puderam ser detectados pelo fato de a análise citológica permitir a observação tridimensional do grão de pólen evidenciando as duas células, generativa e vegetativa. Esse mesmo tipo de observação não pôde ser realizada, com a mesma facilidade, na análise histológica pelo fato da análise ser realizada em um só plano, através de seções histológicas de 3 μm (ver item 3.3).

A partir do 3^o dia de cultivo *in vitro* puderam ser detectados grãos

de pólen trinucleados simétricos, indicando uma possível entrada na rota da embriogênese do micrósporo e do pólen.

A observação dos bicelulares simétricos a partir do Exp6, indicou que os mesmos poderiam ser considerados também precursores do ingresso na rota do processo de embriogênese. Isso se deve ao fato de esse tipo celular não ser encontrado na rota normal do desenvolvimento do grão de pólen (rota gametofítica), pois os bicelulares são assimétricos.

Tricelulares simétricos, observados da Exp6 em diante, em baixas frequências, mostraram uma tendência da possível formação de estruturas embriogênicas. A formação de multinucleados (já observados a partir da Exp3) e de multicelulares, a partir da Exp6, confirmam essa tendência. Dessa forma, os trinucleados simétricos podem ser considerados um dos precursores da formação de estruturas embriogênicas.

As primeiras estruturas embriogênicas foram observadas com nove dias de cultura *in vitro* (Exp9). A partir dessa amostra, o número médio de estruturas por antera cresceu significativamente (aumentou mais de 50 vezes).

Fan *et al.* (1988) observaram que a primeira divisão produziu dois núcleos difusos corados, sendo que as divisões subseqüentes deram origem a grãos de pólen multinucleados. Esses autores observaram ainda que grãos de pólen binucleados produziram embriões através de divisões do núcleo vegetativo. O que foi observado pelos autores, em menor número, foi a produção de calos a partir de micrósporos, sendo que estes não continuam a dividir-se, resultando em calos degenerados.

Os resultados obtidos não apóiam a sugestão de alguns autores sobre a importância do "pólen-p" para a formação de estruturas embriogênicas e conseqüente obtenção de plantas haplóides e duplo-haplóides de cevada. Heberle-Bors (1982) concluiu que a ocorrência de "pólen-p" está integrada no desenvolvimento sexual das plantas, já que

condições alteram o balanço sexual em direção à feminilidade, resultando na produção de grãos de pólen estéreis, sendo indicados como competentes para a embriogênese *in vitro*. O mesmo autor encontrou "pólen-p" com núcleo tipo-vegetativo.

Como relatado anteriormente, há muitas hipóteses sobre a função e ocorrência dos grãos de "pólen-p", mas nada que seja esclarecedor. Alguns autores tentam explicar que esses pólenes não são imprescindíveis para a embriogênese, como por exemplo, Roberts-Oehlschlager & Dunwell (1991). Os autores relatam que esses grãos não seriam os únicos capazes de formar um embrião *in vitro*, pois observaram que a maioria dos grãos de pólen que estavam em contato com o tapete é que formaram estruturas multicelulares.

Binarova *et al.* (1997) estudando o tratamento de estresse em *Brassica napus* L., relataram que a síntese de DNA iniciou em ambas células, generativa e vegetativa, mas somente a vegetativa foi capaz de completar o ciclo celular e dividir posteriormente.

Andrófitos (grãos de pólen) com células extranumerárias foram observados, no presente trabalho, somente nas amostragens de material *in vitro* (a partir da Exp6), provavelmente devido à indução pelo pré-tratamento desencadeando divisão celular e possibilitando uma maior frequência dos tipos celulares com maior número de células. Assmann (1996) e Assmann & Winge (1996) analisaram o efeito da composição de diferentes meios de indução e de regeneração sobre as frequências da produção de estruturas embriogênicas e de embriões de cevada (cultivares brasileira); os melhores meios entre os testados, foi utilizado no presente trabalho.

A divisão celular simétrica também pode ser explicada da mesma forma, pois Wilson *et al.* (1978) verificaram que, após o pré-tratamento (2 dias) nas anteras responsivas, o número de grãos de pólen binucleados aumentou em aproximadamente 10 vezes, como resultado da divisão atípica (simétrica). Quando o período de pré-tratamento foi

prolongado além de dois dias, o desenvolvimento dos grãos de pólen chegou ao estágio trinucleado, mas não ocorreu deposição de amido. Após 10 a 14 dias, grãos de pólen multicelulares volumosos foram evidentes, aparentemente sem células derivadas da célula generativa. Cultivados por vários dias a mais, ocorreu a ruptura da exina e a liberação de uma estrutura embriogênica amorfa.

Kasha *et al.* (2001b) testando combinações de pré-tratamento, observaram que durante o período de quatro dias de pré-tratamento de 0,3 M de manitol, a maioria das primeiras divisões foi simétrica, tanto em 25 °C quanto em 4 °C. Por outro lado, durante 28 dias de pré-tratamento a 4 °C, 90% das divisões foram simétricas. Os autores ainda reforçam que essas duas rotas observadas em cevada são influenciadas pelos métodos de pré-tratamento. Entretanto, Assmann (1996) mostrou que pré-tratamento a 5 °C, por 30 dias, não regenerou plantas verdes em cultivares brasileiras de cevada, confirmando e ampliando resultados obtidos por Revers (1993), que utilizou 28 dias e mesma temperatura. Os melhores resultados, obtidos por Assmann, envolveram o meio I-3, após pré-tratamento de 10 dias à baixa temperatura.

Com pré-tratamento à baixa temperatura, Peng *et al.* (1997) encontraram, após 7 a 9 dias, primeira divisão mitótica simétrica, resultando na produção de dois núcleos idênticos em grãos de pólen de aspargo.

Deve ser ressaltado que a divisão simétrica não é um fenômeno exclusivo do cultivo *in vitro*, mas que também ocorre *in vivo*, registrado por Filho *et al.* (2003) em *Brachiaria decumbens*. Esse fato foi atribuído a uma mutação, provavelmente afetando a formação do microtúbulo no citoesqueleto.

Oliveira *et al.* (2001) também constataram, em andrófitos de *Anacardium occidentale* L. obtidos *in vivo*, que a partir da primeira mitose anômala foram produzidos grãos de pólen binucleados com

células idênticas, ou quase, demonstrando uma provável simetria.

Por outro lado, a formação de andrófitos multinucleados pode não ser uma resposta exclusiva ao cultivo. Rodrigues *et al.* (2005) registraram o aumento da proporção de andrófitos multinucleados de soja, tanto em botões florais mantidos em 4 °C no escuro quanto em anteras sob cultivo, sem diferença significativa. Apesar de eles terem alcançado a etapa de multinucleados, não houve celularização em ambos os tratamentos.

Em contrapartida, mas estudando cevada, Szarejko & Kasha (1991) não encontraram benefícios do pré-tratamento à baixa temperatura, quando foi comparado o material cultivado *in vitro* diretamente (0 dia) com aquele pré-tratado.

Foi observado que durante o período de pré-tratamento, as metáfases dos grãos de pólen foram quase todas haplóides, devido ao número de cromossomos observados na análise citológica (Wilson *et al.*, 1978).

A observação de uma maior concentração de grãos de pólen multinucleados e/ou multicelulares na região proximal da antera (em relação ao filete) pode ser explicada pelas reservas nutritivas existentes no lóculo, pelo transporte célula/célula do meio externo para o interior do esporângio ou pela manutenção da função translocadora dos elementos vasculares do filete. Esse fenômeno mereceria uma análise mais detalhada esclarecendo se essas hipóteses são ou não verdadeiras. Na região distal (em relação ao filete), foram encontrados somente alguns grãos de pólen multinucleados, da mesma forma que estruturas embriogênicas.

Demonstrando a importância do efeito posicional da antera, também em cevada, na cultivar Akka, Dale (1975) encontrou grãos de pólen dimórficos, verificando que os mesmos ocorriam predominantemente na porção basal da antera, ou seja, na região proximal. Porém, Oliveira *et al.* (2001) observaram, no clone CP76 de

A. occidentale L., que a distribuição dos grãos de pólen anômalos foi uniforme nos esporângios.

Deve ser ressaltado também que foram encontrados micrósporos vazios e “normais” em ambas regiões da antera, novamente demonstrando que o “timing” no desenvolvimento dos micrósporos e/ou grãos de pólen é diferente entre eles e também quando comparados com outras anteras, inclusive da mesma cultivar. Jähne & Lörz (1995) comentam a sincronia no desenvolvimento dos micrósporos e pólen de cevada. Essa sincronia não pode ser afirmada, porque cada micrósporo ou grão de pólen reage em períodos de tempo diferentes a certos estímulos, mesmo estando numa mesma antera. No presente trabalho foi constatada essa assincronia, pois numa mesma antera foram observados vários tipos celulares: micrósporos, grãos de pólen variando de binucleados a multicelulares, e até mesmo, estruturas embriogênicas. Em anteras de espigas recém-coletadas são normalmente encontrados micrósporos/grãos de pólen em diversos estádios próximos de desenvolvimento, mostrando a assincronia dos mesmos. Grãos de “pólen-p”, encontrados na parte central da antera, normalmente estão em estádios mais atrasados - provavelmente por gradiente nutricional (Roberts-Oehlschlager & Dunwell, 1991).

4.3 - ANÁLISE HISTOLÓGICA E COMPARAÇÕES PONTUAIS COM A ANÁLISE CITOLÓGICA DA CULTIVAR MN-599 DE CEVADA

O comportamento diferencial de cada antera com relação à formação de estruturas embriogênicas foi estudado em intervalos de tempo pré-estabelecidos, ou seja, de dois em dois dias na histologia e de três em três dias na citologia. Nesse estudo observou-se uma considerável variação no desenvolvimento dos micrósporos e dos grãos de pólen. Esse resultado pode ser explicado devido a posição da espiguetta na espiga, desenvolvimento diferencial de micrósporos e grãos de pólen, e genótipo.

No presente trabalho, ao mesmo tempo em que foram observados micrósporos, também foram observados grãos de pólen e, dependendo da data de análise do material, estruturas embriogênicas, presentes na mesma antera, demonstrando uma assincronia no desenvolvimento dos tipos celulares. Essa observação está de acordo com Pulido *et al.* (2005), onde foram realizadas análises a partir de material obtido da cultura de anteras e da cultura de micrósporos isolados. Ao contrário da observação realizada, Jähne & Lörz (1995) e Góralski *et al.* (1999), referem-se à sincronia de desenvolvimento.

Um outro aspecto observado a partir da análise citológica, diz respeito à análise de grãos de pólen binucleados simétricos e assimétricos, ao longo do período de desenvolvimento *in vitro*. Na análise histológica correspondente, essa descrição quanto à simetria não pôde ser constatada, devido ao fato de serem seções seriadas do material analisado. Uma análise precisa dependeria da observação de cada seção para cada tipo celular, o que ficaria inviável, devido à quantidade de material e lâminas a serem analisadas.

A questão da simetria nos grãos de pólen e a própria divisão simétrica, tem causado controvérsia, devido ao fato dos estudos não demonstrarem com clareza tanto a simetria das divisões, como os resultados.

Alguns autores referem-se a núcleos com divisão simétrica, como é o caso de Maraschin *et al.* (2005), mas o tamanho da célula é diferente, como demonstrado em grãos de pólen multinucleados analisados em microscopia de fluorescência.

Rihová & Tupý (1999) demonstraram que acima de 95% das divisões foram simétricas e produziram núcleos iguais. Alguns micrósporos que se dividiram simetricamente produziram, eventualmente, estruturas com 3 a 10 núcleos.

Portanto, com base no acima exposto, optou-se por não entrar no mérito da discussão da simetria, pelo menos na análise histológica. É necessário um estudo mais profundo e detalhado de simetria, para que de posse destes resultados, pudéssemos elucidar de forma mais precisa esta questão.

O fato de serem observados alguns grãos de pólen com um maior número de cromossomos quando comparado com um normal nos sugere uma hipótese sobre fusão nuclear, devido ao fato do material ser proveniente de cultivo *in vitro*. Segundo Kasha *et al.* (2001b), a fusão nuclear é considerada um fenômeno freqüente em plantas obtidas a partir da cultura *in vitro*. Os autores relataram que a alta freqüência de núcleos fusionados em cevada indica que a fusão nuclear ocorreu entre os núcleos simétricos e assimétricos. No entanto, Oliveira *et al.* (2001) observaram a ocorrência de fusão nuclear *in vivo* em *Anacardium occidentale* L., a partir de grãos de pólen onde a parede celular foi incompletamente formada na citocinese, ou até mesmo, sem a ocorrência da mesma. Dessa forma, o núcleo que iria compor a célula generativa migra em direção ao núcleo-irmão. A fusão ocorre após gradual difusão da cromatina e alteração da morfologia de ambos os

núcleos na região de contato. Posteriormente, ocorre a confluência da cariolinfa dos núcleos, originando um núcleo maior, posicionado na região central do grão de pólen.

A grande quantidade de amido encontrada tanto nos grãos de pólen jovens e multicelulares, quanto nas estruturas multicelulares pode ser explicado como uma fonte de energia acumulada para a divisão celular durante a primeira fase do crescimento, como demonstrado por Oka *et al.* (1995) em embriões de cevada, onde a reserva foi encontrada em células epidérmicas e subdérmicas da base foliar.

Da mesma forma que no presente trabalho, McCormick (1993) encontrou acúmulo de amido nos grãos de pólen, marcando o comprometimento para a rota de desenvolvimento do pólen.

Demonstrando a importância do amido, Ríhová & Tupý (1999) observaram que houve acúmulo no pólen de batata durante o desenvolvimento normal em anteras, sendo que o amido pode ser utilizado como um marcador para testar a expressão do "destino" celular gametofítico na dependência do modo de divisão do micrósporo.

A formação de estruturas semelhantes a embriões localizadas na epiderme de estruturas embriogênicas também foi registrada por Rodrigues *et al.* (2005) para a soja, onde também se referiu a embriões destacando-se da epiderme, mas a partir de anteras submetidas ao cultivo *in vitro*, e não diretamente da epiderme ou protoderme das estruturas multicelulares. De forma semelhante ao do presente trabalho, Ryschka *et al.* (1991) também encontraram estruturas na epiderme semelhantes a embriões, que foram denominadas de pró-embrióides, a partir do cultivo de embriões imaturos de cevada. No presente trabalho foram encontradas estruturas semelhantes a essas, dando-se preferência à adoção da descrição realizada por Cai *et al.* (1992), onde foi utilizado o termo "estruturas", devido ao fato da formação de embriões e de calos simultaneamente em uma mesma

antera.

A característica das células dessas estruturas globulares, apresentando tecido parenquimatoso, com as características típicas de uma célula parenquimatosa, destacando a presença de um vacuoma bem desenvolvido, também foi relatado por Haensch (2004) para *Pelargonium x hortorum* Bailey e Rodrigues *et al.* (2005) para a soja.

Segundo Hoekstra *et al.* (1992), micrósporos isolados de cevada podem desenvolver-se em estruturas tipo-embriões (ELSS) após 21 dias de cultura. Alguns autores consideram grãos de pólen multicelulares como estruturas embriogênicas e/ou embriões (Pulido *et al.*, 2001) e vice-versa (Moraes *et al.*, 2004), ou quando o pólen apresenta a esporoderme iniciando o rompimento (Hause & Hahn, 1998), como é o caso mostrado aos 10 dias de cultivo. Pulido *et al.* (2001), em cevada, classifica ainda os multicelulares em embriões homogêneos e heterogêneos, com relação ao tamanho das células. Moraes *et al.* (2004), em soja, destacam estruturas multicelulares como grãos de pólen multicelulares. Na literatura há muitas variações conceituais, afetando conseqüentemente a classificação dos tipos celulares. No presente trabalho foi considerada estrutura multicelular e/ou embriogênica, a etapa em que o pólen multicelular rompeu a esporoderme, ainda que parcialmente, apresentando algumas células para o desenvolvimento ontogenético posterior.

Hause & Hahn (1998) investigando a embriogênese de *Brassica napus* L. cultivar "Topas", três dias após a indução *in vitro*, puderam separar em seis grupos os tipos celulares observados, de micrósporos até estruturas multicelulares jovens (MCs). O agrupamento foi baseado em diferenças de tamanho, estrutura da parede, estrutura e distribuição de organelas e o grau de vacuolação. Somente um grupo multicelular representou o real pró-embrião, capaz de formar embriões e regenerar plântulas. Esse tipo multicelular apresentou características de células meristemáticas e embriogênicas, destacando as características de

parede celular fina, contendo plasmodesmos e vacúolos pequenos.

No presente trabalho foram encontradas estruturas multicelulares a partir dos 8 dias de cultivo *in vitro*, porém eram estruturas em fase inicial de diferenciação. Também foram constatadas estruturas jovens, multinucleados e multicelulares que não progrediram no desenvolvimento. De forma semelhante, Custers *et al.* (1994) verificaram que em *Brassica napus* L., mesmo após sucessivas induções de divisões embriogênicas, as estruturas multicelulares jovens (MCs) interromperam seu desenvolvimento e degeneraram.

Em concordância com o trabalho de Hause & Hahn (1998) tratando da embriogênese inicial de *Brassica napus* L., foi constatado que os grãos de pólen multicelulares e/ou estruturas multicelulares iniciais com a esporoderme parcialmente rompida, apresentaram maior diferenciação celular na região onde as células já estavam livres da esporoderme. Segundo esses autores, esse comportamento seria uma forma de degeneração, por apresentarem células com características diferentes daquelas observadas em células meristemáticas, como citado anteriormente. Dessa forma, a ruptura precoce da parede celular do grão de pólen *in vitro* ocasiona um elevado crescimento das células, vacuolação e posterior degeneração. Esse comportamento foi comumente encontrado no presente trabalho, desde as etapas iniciais do desenvolvimento, até a formação de estruturas embriogênicas.

Além do exposto anteriormente, o extravasamento de material celular de grãos de pólen multinucleados e multicelulares ainda pode ser explicado pelo processo de fixação do material. Nessa etapa a célula cessa sua atividade, e, dependendo do tipo de fixador, pode ter maior ou menor perda de material celular. Nesse caso específico do trabalho, para a análise histológica foi utilizado o fixador FAA 50% (Johansen, 1940) que provoca a coagulação dos componentes nucleares e dissolução da maior parte das organelas celulares, com manutenção

apenas dos plastídios. A parede celular se mantém com poucas alterações visíveis em microscopia de luz.

Os grãos de pólen multinucleados e multicelulares intensamente corados, mencionados nos resultados como “potencialmente embriogênicos”, foram observados através da análise de seções seriadas, podendo ser deduzido que esse tipo morfológico desencadeou a formação das estruturas embriogênicas. Mas a observação do material também permitiu constatar que grãos de pólen corados normalmente com azul de toluidina entraram na rota da embriogênese do micrósporo e do grão de pólen. Segundo Hause & Hahn (1998), esse tipo celular com citoplasma intensamente corado apresentou grandes amiloplastos. Os autores não verificaram o desenvolvimento posterior, pois não foi observada atividade mitótica no referido tipo celular, a partir do estudo das etapas iniciais da embriogênese de *Brassica napus* L.

As estruturas realmente embriogênicas, ou seja, aquelas onde houve a formação de um embrião, foram poucas, sendo observadas a partir dos 24 dias de cultura. Essa constatação só pôde ser realizada através da análise da histologia, com o apoio da morfologia interna das estruturas. Foi verificado que estruturas que possuíam a morfologia semelhante à ELSs, apresentando aparentemente alguns embriões, na verdade não puderam ser consideradas como tal, por demonstrarem, através da histologia, somente a formação de parênquima com tecido vascular, sem diferenciação em embrião. Outras estruturas embriogênicas apresentaram polaridade semelhante ao embrião zigótico, ou seja, mostrando bipolaridade. Em alguns casos foram observadas até plântulas em desenvolvimento. Haensch (2004), anteriormente citado, chama a atenção para a bipolaridade das estruturas embriogênicas, ressaltando novamente a importância da bipolaridade para a formação de um embrião semelhante ao zigótico.

Deve ser ressaltado que na literatura são escassos os trabalhos mostrando a ontogenia da embriogênese dos micrósporos e dos grãos

de pólen obtidos *in vitro*. Em geral, os autores se concentram no estudo das etapas iniciais do processo. Ainda, alguns autores se concentram no estudo das etapas iniciais do desenvolvimento *in vitro*, por se tratar da etapa da mudança de rota de desenvolvimento, como é o caso do estudo de Hause & Hahn (1998).

Foram encontradas estruturas embriogênicas com tecido vascular evidente, mostrando uma diferenciação das mesmas, em função da posição-dependência. Para essas estruturas se manterem no meio de cultura, sem degradação, elas precisam sofrer diferenciação celular, desenvolvendo tecido vascular para que haja transporte de solutos, retirados do meio, para toda a estrutura. Observação semelhante foi realizada em ELSs de soja por Rodrigues *et al.* (2005), que após 21 dias, células típicas do tecido pró-vascular diferenciaram na porção parenquimatosa dos calos oriundos do conectivo, dando origem a elementos traqueais.

As estruturas embriogênicas que não apresentaram meristema radical mostraram elementos vasculares com espessamentos helicoidais a espiralados, dependendo da seção analisada. Observação semelhante foi realizada por Haensch (2004) em ELSs somáticas de *Pelargonium x hortorum* Bailey, onde foram encontrados elementos do feixe xilemático com espessamento espiralado. Como as estruturas analisadas não apresentaram uma orientação para poderem ser emblocadas, em alguns casos pôde-se ter idéia do tipo de espessamento encontrado nas paredes dos elementos vasculares das mesmas.

Os cordões pró-vasculares encontrados em algumas estruturas embriogênicas, como células achatadas e dispostas concentricamente, também foram encontradas em outras plantas obtidas *in vitro*, como por exemplo em *Catsetum pileatum* Reichb. f. (Kraus, 1986) e em erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Cassol, 1997). Na literatura esses cordões pró-vasculares (ou meristemóides) são descritos como pequenos agregados de células em divisão, podendo tornar-se centros

de formação de ápices aéreos, primórdios radicais ou embriões incipientes (Doods, 1986). Por outro lado, Shanker & Mohan Ram (1990) definem os cordões pró-vasculares como sendo zonas discretas de xilema e floema separados por um meristem pró-vascular, enquanto os meristemóides são desprovidos de vascularização.

Em *Nicotiana* spp., Ronchi (1981) discute a função dos cordões vasculares em calos, sugerindo que uma vez diferenciadas as células de xilema e floema, essas providenciarão um caminho de condução que levaria ao desenvolvimento de estruturas organizadas. Outra função seria regular o gradiente de fitorreguladores sintetizados em regiões específicas do calo, sendo responsáveis pela diferenciação de diferentes tipos de estruturas organizadas, dependendo do balanço dos fitorreguladores. Deve ser ressaltado que o controle do processo morfogênico no tecido do calo pode ser diferente daquele da planta como um todo, pois a diferenciação do tecido vascular, que precede a morfogênese, ocorre na ausência de um meristema organizado.

Pérez-Francés *et al.* (1995) também relataram a presença de células nodulares em calos de *Erysimum scoparium*, onde foi verificada uma grande quantidade de amido. Os autores enfatizam ainda que, freqüentemente, muitas células localizadas no centro dos cordões pró-vasculares foram intensamente coradas em seções histológicas com toluidina, como encontrado no presente trabalho.

A transdiferenciação em elementos traqueais (TEs) *in vitro* é induzida pela combinação de auxina e citocinina e, em alguns casos, por ferimento. O processo de transdiferenciação pode ser dividido em várias etapas, sendo algumas semelhantes às observadas *in vivo* (Fukuda, 1997). Células isoladas do mesofilo de *Zinnia elegans* L. foram transdiferenciadas em TEs, células características que compõem os elementos xilemáticos na planta, caracterizadas pela formação de espessamentos secundários de parede celular e morte celular programada. Motose *et al.* (2004) observaram que a indução da

interação célula a célula foi mediada pela atuação de um fator secretor local, o xilogênio para atividade xilogênica, sendo essa atividade incluída nas frações das proteínas arabinogalactanos (AGPs), que são um grupo de proteoglicanos de plantas. Em *Asparagus officinalis* L. encontraram TEs aos 10 dias de cultura e em *Zinnia elegans* durante 96 h de cultura, sugerindo que o xilogênio não é espécie-específico, mas é comum em diversas angiospermas. A partir dos resultados, concluíram que o xilogênio é um AGP que é essencial para a diferenciação do TE. No presente trabalho foram observadas células de estruturas embriogênicas apresentando TE, variando a frequência e a diferenciação das mesmas com os dias de cultivo *in vitro*. Pode-se dizer que as estruturas possuem posição-dependência do meristema, por influência do meio de cultura. Não foi realizado um estudo aprofundado com relação a esse aspecto, por não ser o objetivo do trabalho, mas poderia ser estudada a ontogenia, concomitante com o uso dos AGPs para análise imunohistoquímica, no sentido de explicar como e quando é iniciada a diferenciação do tecido vascular *in vitro*.

Elementos traqueais também foram encontrados por Cassol (1997) em calos compactos e pulverulentos de erva-mate, apresentando espessamento helicoidal, como aqueles encontrados no presente trabalho. Os calos ou estruturas analisados também apresentaram espessamento aparentemente helicoidal, mas geralmente os calos ditos pulverulentos, mostraram ser uma massa celular amorfa.

Os tricomas, aparentemente da parte aérea, observados na epiderme de algumas ELSs também foram encontrados por Bandyopadhyay *et al.* (2004) em *Tectona grandis* L., a partir do cultivo de ápices aéreos. Sabe-se que os tricomas são apêndices epidérmicos possuindo várias formas, estrutura e função, sendo associados a um tricoblasto, comum em epidermes de raízes. No presente estudo, provavelmente estariam relacionados à nutrição, já que as estruturas, as ELSs, permaneceram em contato com o meio de cultura por um

longo período, até a coleta para a análise. Esses apêndices foram observados preferencialmente nas estruturas “mais velhas”, ou seja, as que permaneceram um período maior em contato com o meio.

Os ápices aéreos e radicais podem ter suas estruturas histológicas similares aos zigóticos, ou seja, constituídos de centro quiescente, protoderme, meristema pró-vascular e meristema fundamental.

Anatomicamente, as raízes das estruturas embriogênicas de cevada possuíam todos os sistemas histológicos de uma raiz primária, inclusive com a presença de um centro quiescente. Em erva-mate, Cassol (1997) também encontrou raízes neoformadas com as mesmas características. Da mesma forma em que foram observados sinais de degeneração das camadas de células marginais, nos dois trabalhos, indicando uma repetição *in vitro* da ontogenia da raiz, já que essa característica ocorreu mesmo quando o órgão não estava sofrendo algum tipo de resistência, havendo necessidade de proteção do ápice meristemático.

As estruturas embriogênicas apresentaram ápices aéreos em diferenciação, com a presença de vascularização, podendo ser evidenciados primórdios foliares e escutelo. Em alguns embriões foi detectada a presença de um possível epiblasto. Essa estrutura é característica de algumas Poaceae, especialmente da tribo Triticeae, como é o caso da cevada (Norstog, 1961) e trigo (Cocucci & Astegiano, 1978).

Em alguns embriões foram verificados meristema apical caulinar (MAC) organizados em três camadas. Derman (1947) estabelece o conceito de camadas histogênicas, apresentando um meristema composto de três camadas meristemáticas fundamentais: L1 ou C1 (dérmica) e L2 ou C2 (subdérmica), apresentando divisões anticlinais; L3 ou C3 (central), com divisões em diversos planos. Bowman & Eshed (2000) comentam que o MAC é inicialmente formado durante a

embriogênese, e as derivadas desse meristema formarão o parênquima fundamental da planta.

Plântula, segundo Font Quer (1993), refere-se ao embrião já desenvolvido, como consequência da germinação. No presente estudo, em algumas estruturas embriogênicas obtidas *in vitro* foi verificado, já pela análise morfológica, a presença tanto de uma parte aérea, com folha(s) verde(s) ou albina(s), como da parte radicular, ou de ambas. A análise histológica confirmou a morfológica, nos referidos casos, indicando tratar-se de uma plântula.

Lins (2005) estudando embrião zigótico de monocotiledônea, *Philodendron Schott* (Araceae), considerou plântula as fases de desenvolvimento compreendidas entre a emergência da radícula e da primeira raiz adventícia. Assim, foi possível o registro da emergência de todos os tipos de raízes desenvolvidas pelas espécies analisadas. A referida autora, na sua discussão em comparação com outros autores, considerou que a germinação se inicia com o rompimento da testa e tégmen e a emergência da radícula.

Em concordância com o presente trabalho, Stival (1995) comenta a dificuldade de se diferenciar claramente as estruturas de cevada obtidas *in vitro*, através do microscópio estereoscópico. Ainda, a autora ressalta que a diferenciação ocorreu tanto pela via embriogênica quanto pela organogênica. A partir da rota embriogênica foram obtidas plântulas com um considerável grau de desenvolvimento histológico. Por outro lado, as ELSs obtidas pela via organogênica apresentaram diferenciação em raiz e parte aérea, com a presença de tecido vascular. Essas observações foram semelhantes às encontradas no presente trabalho, ressaltando-se uma maior organização histológica das plântulas, bem como das ELSs, onde puderam ser visualizadas uma vascularização mais diferenciada. Como neste trabalho foram estudadas várias estruturas embriogênicas (ELSs) até a obtenção de plântulas, em

diferentes períodos de tempo, pôde-se obter um melhor acompanhamento e entendimento da diferenciação celular e histológica.

Ainda em cevada, Nonohay *et al.* (1999) estudaram calos embriogênicos obtidos a partir do cultivo *in vitro* de embriões imaturos oriundos do escutelo. Foram observados embriões somáticos mostrando os principais tecidos, com um elevado padrão de organização celular. No entanto, quando esses embriões foram comparados com o embrião zigótico, foram considerados atípicos. Em comparação com o presente trabalho, os embriões obtidos também se mostraram diferentes daqueles descritos pelos autores. Nesse caso, dependendo da cultivar ou linhagem analisada, foi encontrada uma maior diferenciação na parte aérea, como referido pelos autores, ou na parte radical, que foi o caso da cultivar não-selecionada MN-599.

Oka *et al.* (1995) comentam que o termo “embriogênico” não é bem definido devido aos poucos estudos anatômicos com relação ao desenvolvimento do embrião. Os autores mostram embriões somáticos de cevada com estruturas semelhantes ao embrião zigótico. Dessa forma, como relatado anteriormente, o termo estruturas “embriogênicas” (ELs) deveria ser utilizado somente quando se tivesse certeza que a estrutura estaria formando um embrião.

Estudando a embriogênese *in vitro* de soja, uma dicotiledônea, Rodrigues (2004) relatou a ocorrência de ELs incompletas, bem como de ELs com formação inicial do cotilédone e do ápice radicular. É comentada também a presença de tecido vascular, com destaque para os elementos traqueais, semelhantes aos encontrados no presente trabalho, mostrando um padrão de histodiferenciação.

Para a cultura *in vitro*, sabe-se que a rota embriogênica é imprescindível na formação de plântulas, sendo essencial para a alta frequência de regeneração. Cai *et al.* (1992) comentam essa importância para a cultura de anteras de cevada.

4.4 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS LINHAGENS SELECIONADAS (CULTIVARES DE CEVADA A-05 E BR-2)

Nesse item serão comentadas algumas variações encontradas nas linhagens analisadas, para posteriormente serem feitas as comparações com a cultivar não-selecionada MN-599.

Nas linhagens da cultivar A-05 (S₃A22 e S₃A23) foi encontrada uma alta frequência de estruturas embriogênicas, mesmo que estatisticamente não tenha sido encontrada diferença significativa, visualmente essa diferença foi percebida; bem como, um maior número de plântulas albinas.

Linhagem S₃A23

Na linhagem S₃A23 foi observado um grão de pólen multinucleado rompido e com material extravasado, aos 12 dias de cultivo *in vitro*. Há evidências de que a partir do material extravasado ocorra a formação de estruturas embriogênicas, como mostrado nas figuras do item 3.4. Um grão de pólen multicelular observado aos seis dias pode ser considerado como estrutura embriogênica por alguns autores (Pulido *et al.*, 2001). Por outro lado, no presente trabalho foi considerada estrutura embriogênica somente quando a esporoderme se rompe liberando um número significativo de células, sendo estas capazes de seguir o desenvolvimento. A esporoderme pode ainda estar parcialmente rompida, mas as células devem estar organizadas de tal forma que se possa fazer uma homologia com um pró-embrião zigótico. Esse caso foi observado aos 8 dias de cultivo *in vitro*. Aos 16 dias foi observado um embrião em desenvolvimento, semelhante ao pró-embrião zigótico (Goldberg, *et al.* 1994) inclusive com a presença de suspensor. Emons (1994) comenta que células semelhantes ao

suspensor, cuja estrutura é encontrada no embrião zigótico, geralmente não estão presentes nos embriões obtidos através da embriogênese somática. Entretanto, essa autora relatou a presença de estruturas semelhantes ao suspensor em *Picea mariana* e *P. glauca*, através da embriogênese somática.

Como foi já relatado para a cultivar MN-599, foi observada a divisão simétrica para a linhagem S₃A23. Ríhová & Tupý (1999), anteriormente citados, comentam que acima de 95% das divisões foram simétricas.

Aos 18 dias foram encontrados embriões em desenvolvimento. Devido a dificuldade de análise do material, não se pôde precisar o estágio de desenvolvimento, mas há indícios que poderiam ser embriões, com desenvolvimento de raiz, e com a parte aérea mais evidente. Pôde ser evidenciado um embrião, o qual possuía uma bipolaridade semelhante ao embrião zigótico, podendo inclusive ser destacada a presença de várias divisões mitóticas ocorrendo no meristema apical. Tal fato mostra a capacidade de diferenciação e alongamento celular da região. Esse embrião foi o único considerado como bipolar na linhagem S₃A23, segundo os dados que podem ser visualizados na tabela 14. Chasan & Walbot (1993) comentam que o desenvolvimento de embriões somáticos é similar ao do embrião zigótico, embora difiram na iniciação e nos eventos finais da embriogênese. Como a maioria dos trabalhos na literatura aborda a análise de embriões obtidos a partir da embriogênese somática, algumas comparações são realizadas no presente trabalho. Essa comparação é pertinente, pois nos dois sistemas abordados, os embriões são obtidos *in vitro*.

Os outros embriões foram considerados como possuindo apenas MAC (meristema apical caulinar), por estar bem evidenciado, e outro, como sem forma, pois a formação de raiz, além de inicial, não se tinha uma evidência mais concreta para poder ser feita uma afirmação.

Linhagem S₃A22

A celularização observada nos multinucleados foi um fator de grande importância com relação ao ingresso na rota da embriogênese do micrósporo e do pólen *in vitro*. Essa ocorrência celular foi observada a partir do 6^o dia, período em que pode ser marcado como início da embriogênese *in vitro*.

Novamente a divisão simétrica, ou uma aparente simetria, foi observada. Como explicado anteriormente, para se ter uma divisão simétrica é necessário que sejam evidenciados células e núcleos com o mesmo tamanho.

Os micrósporos e grãos de pólen testados quanto a presença de amido reagiram positivamente, mostrando uma elevada quantidade. Segundo Ríhová & Tupý (1999) o amido pode ser utilizado como um marcador do ingresso dos grãos de pólen na rota gametofítica.

Muitas constatações realizadas para a cultivar MN-599 se repetem para as linhagens analisadas, como é o caso de ruptura de multicelular com material extravasado, e fusão nuclear. Para não haver repetição de discussão de assuntos tratados anteriormente, nesse item serão abordados somente assuntos relevantes, sendo que posteriormente, no último item da discussão, a Análise comparativa, serão realizadas as devidas comparações.

Os multicelulares que apresentaram células com núcleos do tipo vegetativo ou generativo foram semelhantes aos analisados por Wilson *et al.* (1978). Os autores comentam que quando não ocorre a formação de parede celular, são produzidos grãos de pólen volumosos ("gigantes"). Nesse caso, com núcleos descendentes da célula generativa. Entretanto, é mais freqüente a ocorrência de descendentes de núcleos vegetativos nos grãos de pólen multicelulares, como constatado no presente trabalho e relatados por vários autores, inclusive os citados anteriormente (Wilson *et al.*, 1978).

Na rota III verifica-se que a célula generativa, do grão de pólen típico, é capaz de formar um embrião *in vitro*. Esse caso foi relatado em *Glycine max* (L.) Merrill por Kaltchuk-Santos *et al.* (1997), mas também, para a mesma espécie foi relatada a ocorrência das rotas I (Kaltchuk-Santos *et al.*, 1993) e IV (Kaltchuk-Santos *et al.*, 1997), mostrando que não somente o grão de pólen simétrico seja capaz de originar um embrião *in vitro*. Ainda que existam muitos trabalhos descrevendo esse aspecto e apoiando a simetria como um fator chave para que ocorra a embriogênese, como por exemplo os trabalhos de Fan *et al.* (1988) e Peng *et al.* (1997), os dados encontrados na literatura não são suficientemente detalhados para se ter uma idéia clara do que realmente ocorre no desenvolvimento do micrósporo e do grão de pólen.

Foi observada a presença de tricoma, como já discutido para a cultivar MN-599. Esse apêndice foi observado preferencialmente em estruturas apresentando vários feixes vasculares. Williams & Maheswaran (1986) relatam que estruturas tipo-tricomas ("hair-like structures") mostraram deposição de calose e cutinização da parede. Para os autores não ficou claro se essas características foram associadas com a embriogênese somática ou com a iniciação de tricomas, que poderiam ser iniciadas na embriogênese somática em estágio posterior.

Nas estruturas observadas aos 34 dias, produzidas a partir de uma das anteras analisadas, todas as estruturas foram classificadas como SFD mas com zonas de diferenciação, por apresentarem nódulos vasculares. Como referido anteriormente, esses nódulos vasculares são considerados como zonas discretas de xilema e floema (Shanker & Mohan Ram, 1990), ou centros de formação de ápices aéreos, primórdios radicais ou embriões incipientes (Doods, 1986). Essa explicação é pertinente, pois as estruturas pareciam estar se

diferenciando em primórdios caulinares e também, em tecidos vasculares.

Linhagem S₃B63

A presença de parede primária é necessária para a divisão e expansão celulares. A comprovação da parede celular nas estruturas multicelulares em desenvolvimento, através da reação com calcoflúor, mostrou uma organização das mesmas, onde foram evidenciados inclusive os espaços intercelulares. Segundo Kraus *et al.* (2003), a parede é formada nos primeiros estádios do desenvolvimento da célula.

4.5 - ANÁLISE COMPARATIVA DAS LINHAGENS SELECIONADAS (CULTIVARES DE CEVADA A-05 E BR-2) E DA CULTIVAR MN-599

Segundo Allard (1960), seleção, em genética, é a discriminação entre indivíduos quanto ao número de descendentes que contribuem para as gerações seguintes. Borém (1997) completa esse conceito comentando ainda que seleção é o favorecimento de determinados indivíduos em relação a outros.

A seleção realizada no presente trabalho é pioneira, no sentido da obtenção de melhores respostas *in vitro* das anteras a partir de linhagens selecionadas. Dessa forma, até o presente momento não foram encontrados trabalhos semelhantes na literatura que utilizaram a seleção no sentido genético, para a obtenção de plantas de cevada geneticamente melhoradas quanto à capacidade de melhor responder ao cultivo *in vitro* de suas anteras. Em trigo (*Triticum aestivum* L.), Mihály *et al.* (2002) utilizaram a técnica de cultura de anteras para a produção de linhagens resistentes a herbicidas, previamente selecionadas para a alta resposta na cultura de "tecidos somáticos". Os autores não informaram de que forma foi realizada essa seleção, ressaltando apenas que, das seis linhagens testadas, obtiveram quatro linhagens transgênicas com plantas T₂ (2^a geração de transformação genética) homogêneas resistentes a herbicidas.

São encontrados vários artigos na literatura abordando "seleção", porém utilizando essa palavra para referir-se à escolha do material obtido *in vitro*, como por exemplo em aveia (*Avena sativa* L.), onde foram selecionados calos embriogênicos para a transformação de genética de plantas (Cavichioli-Lamb *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2002). Segundo Bouharmont (1994), a regeneração de plantas a partir de células não-diferenciadas no cultivo *in vitro*, é freqüentemente uma fonte de variabilidade. Bouharmont & Dekeyser (1985) comentam que

uma alta frequência de modificações é induzida em cultivo *in vitro*, sendo que algumas delas são muito utilizadas. A partir da seleção *in vitro*, em nível celular, foram obtidas, por exemplo, plantas tolerantes à salinidade (Croughan *et al.*, 1981), ao alumínio (Swaminathan, 1982) e ao glifosato (Zambrano *et al.*, 2003).

Ainda, uma outra abordagem pode ser utilizada em seleção, onde algumas características agronomicamente importantes são selecionadas para o melhoramento das espécies. Essa é a abordagem mais comumente utilizada. Podem ser citados alguns trabalhos, como por exemplo o de Mazzocato *et al.* (2002), onde foram testados genótipos de milho em solução mínima para selecionar os tolerantes ao alumínio; e o de Rosal *et al.* (2000) com o objetivo de avaliar a eficiência da seleção precoce para o caráter produtividade de grãos na cultura do feijão.

Comparando-se os embriões das linhagens selecionadas e da cultivar, foram verificadas diferenças com relação à diferenciação dos mesmos. Para essas comparações, são necessárias, primeiramente, algumas comparações com embriões zigóticos:

Nas monocotiledôneas são encontradas grandes diferenças morfológicas e anatômicas, inclusive no embrião zigótico, como é o caso de Poaceae. Cocucci (2005) propõe um sistema de classificação de sementes com a sua respectiva fórmula. No caso das Poáceas, a fórmula da semente é 42: o embrião apresenta vários nós, tornando-se plantulóide do tipo multinodal. Os tecidos de reserva originam-se no endosperma (xenófita). Portanto, é um embrião multinodal do tipo endospérmico.

Esau (1974) chama a atenção para essa família Poaceae, comentando que o desenvolvimento e a estrutura do embrião são tão complexos que geram o maior número de problemas de interpretação morfológica do que qualquer outro embrião vegetal. Devido a essas características, Cocucci & Astegiano (1978) consideram o embrião das

Poáceas como altamente especializado, possuindo estruturas novas, sem haver homologia com outros embriões de Monocotiledôneas. As referidas estruturas são as seguintes: escutelo, coleóptilo, coleorriza e epiblasto. O escutelo é um órgão peltiforme que possui função haustorial, considerado como o cotilédone das monocotiledôneas. Segundo Guignard & Mestre (1971), durante a evolução a folha cotiledonar transformou-se em escutelo. O epiblasto é um apêndice não-vascularizado, contínuo com o escutelo e que, juntamente com parte desse último, circunda o coleóptilo, o qual contém o ápice caulinar (Cocucci & Astegiano, 1978). Alguns embriões apresentam epiblasto, como é o caso de *Triticum* sp. e *Avena* sp., analisados pelos referidos autores, pertencentes à tribo Triticeae, na qual encontra-se também a cevada. Natesh & Rau (1984) comentam sugestão de que o epiblasto denota um vestígio de um segundo cotilédone, em comparação com as dicotiledôneas. A coleorriza é uma massa quase cônica, não-vascularizada, cujo vértice se relaciona com o suspensor embrionário (Cocucci & Astegiano, 1978).

Ressaltando ainda as variações encontradas nos embriões de monocotiledôneas, Keating (2002) comenta que Araceae, entre a família das monocotiledôneas, é a que possui mais variações morfológicas relativas à expansão das estruturas embrionárias até plântulas, e que o estudo de germinação das sementes favorece o entendimento dessas variações.

Dessa forma, o estudo anatômico de plantas obtidas *in vitro* se mostra imprescindível na definição das estruturas encontradas em um embrião semelhante ao zigótico, no caso do presente trabalho, denominados como ELSs (estruturas tipo-embrião). Poucos foram os trabalhos encontrados na literatura descrevendo a embriogênese do micrósporo e do grão de pólen obtidos *in vitro*. De forma semelhante, há carência de trabalhos descrevendo tanto a morfologia quanto a anatomia das estruturas embriogênicas obtidas *in vitro*. Até o presente

momento, esse trabalho é também pioneiro no estudo detalhado da ontogenia da embriogênese, desde o micrósporo até plântula.

Johansen (1950), discutindo as teorias com relação ao crescimento e diferenciação dos embriões de plantas, postulou que os destinos das linhagens de células embriogênicas são determinados no período em que a polaridade é estabelecida no zigoto ou no pró-embrião. No desenvolvimento convencional, a disposição de células em relação aos tecidos e órgãos que eles formam podem ser extremamente ordenadas (teoria da disposição), sugerindo que o desvio do padrão normal de tal disposição pode ser desastroso para o embrião. A precisão geométrica cujas células embriogênicas devem dividir-se para a distribuição seqüencial e ordenada das células embriogênicas pode ser uma consequência do comportamento parcimônico (teoria da parcimônia: “o embrião produz somente as células absolutamente necessárias”).

Os embriões obtidos *in vitro*, mesmo quando semelhantes ao zigótico, apresentam grandes diferenças. Isso pôde ser observado nos embriões analisados, onde a bipolaridade não estava bem definida. Para conseguir a polaridade, uma célula deve ligar e integrar uma série de sinais extrínsecos e intrínsecos através de uma cascata de sinalização que leva à localização intracelular específica de complexos de macromoléculas ao longo do eixo (Quatrano & Shaw, 1997). Paquette & Benfey (2001) comentam que no estágio pró-embriogênico o crescimento da planta é altamente polarizado, com proliferações celulares ocorrendo quase que exclusivamente nas duas porções finais do eixo longitudinal: o ápice da raiz e o ápice caulinar. Fan *et al.* (1988) relatam que o desenvolvimento regular do embrião depende da produção de uma parede celular completa para separar as células-filhas. Em concordância com esses autores, Quatrano & Shaw (1997) relatam que a parede celular é necessária para a fixação de um eixo

polar no zigoto e para a determinação do destino celular em embriões com duas células.

Análises de genes necessários para a formação do eixo embrionário sugerem que a sinalização entre os domínios embriogênicos pode ser essencial para a formação da raiz (Harada, 1999). Como anteriormente citado, os ápices radicais embrionários adventícios, geralmente, também não apresentaram um elevado grau de diferenciação. Da mesma forma, os ápices caulinares, sendo observadas grandes massas celulares, simulando um escutelo. Alguns embriões (ELSs) apresentaram raízes aparentemente bem definidas, com tecidos em diferenciação. Nesses embriões foram observados a protoderme, o meristema fundamental e o pró-vascular. Em alguns casos, a protoderme já estava bem definida, diferenciando-se em epiderme.

Dentre as estruturas radicais, a coifa, pôde ser comparada ao embrião zigótico, por apresentar-se bem definida. Os primórdios radicais, provavelmente de origem do mesocótilo, conseqüentemente se desenvolveriam em raízes embrionárias adventícias. Segundo Font Quer (1993), nas plantas de muitas monocotiledôneas o mesocótilo se refere à porção caulinar situada entre o hipocótilo e o epicótilo. Esau (1982) considera o mesocótilo como a região entre o nó escutelar e o coleóptilo. Cocucci & Astegiano (1978) relatam que em *Triticum*, após a germinação do embrião, o desenvolvimento do mesocótilo foi praticamente nulo. A observação de raízes adventícias na região radicular das ELSs, foi semelhante ao encontrado em embriões zigóticos de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott por Lins & Oliveira (1994), demonstrando que, também nessa espécie, somente as raízes adventícias se desenvolveram, ressaltando novamente a complexidade de desenvolvimento dos embriões de monocotiledôneas.

Para uma melhor elucidação da análise histológica dos embriões (ELSs) obtidos *in vitro*, foram realizadas algumas seções de embriões

zigóticos maduros de cevada (dados não-mostrados). Os embriões encontrados foram semelhantes ao observado por Norstog (1961) aos 21 dias, apenas mais diferenciados. Nessas seções foram observadas cinco raízes, sendo que quatro apresentaram posição mais lateral, as embrionárias adventícias, de origem provável do mesocótilo. A outra raiz, observada no eixo embrionário, pode ser identificada como uma radícula. Norstog (1961) apresentou um esquema de uma seção de um embrião zigótico, e esquemas de seções de embriões obtidos *in vitro* a partir de embriões imaturos, aos 14, 21, 25 e 30 dias de cultivo. Fazendo-se uma comparação do embrião zigótico com aqueles observados *in vitro*, verificam-se algumas diferenças, principalmente referentes à diferenciação das células, ao período de tempo de desenvolvimento e à polaridade. No caso do ápice radical, como já relatado, a formação da coifa foi semelhante nas duas observações, no presente trabalho e no de Norstog (1961). De forma semelhante, Kraus (1986) também não constatou grandes diferenças nos ápices radiculares observados *in vitro* em plântulas de *Catsetum pileatum* obtidas a partir de explantes radiculares, quando comparadas com plântulas obtidas em casa de vegetação. Outro resultado observado pela referida autora, em concordância com o presente trabalho, foi a caracterização da coifa. Essa estrutura apresentou-se constituída por várias camadas de células na porção mais apical, mostrando as características celulares semelhantes ao embrião zigótico. Após a coifa, foi evidenciada a protoderme unisseriada, e internamente a ela, o meristema fundamental, formado por várias camadas celulares, aproximadamente isodiamétricas. O centro quiescente é responsável por toda a formação das células derivadas, que darão origem a protoderme, meristema fundamental e meristema pró-vascular.

Maraschin *et al.* (2003) comparando ELSs de cevada obtidas *in vitro* após 21 dias de indução com embriões zigóticos de 21 dias após a polinização, não encontraram diferenças nos padrões de expressão da

proteína 14-3-3. Essa proteína está presente na embriogênese, fazendo parte do processo de diferenciação celular. Os autores não fazem comparações dos tecidos embrionários observados nos embriões zigóticos e nos embriões obtidos *in vitro*. Porém, a partir das imagens podem ser realizadas algumas comparações com o presente trabalho: os embriões obtidos *in vitro* apresentaram diferenças, obviamente em uma menor organização celular, quando comparados aos zigóticos. Essa diferença na organização não se refletiu na formação dos tecidos e na organização final do embrião obtido *in vitro*, já que foram apontados os mesmos tecidos para os dois tipos analisados. Podem ser citados: escutelo, meristema apical caulinar, coleóptilo, primórdios foliares, mesocótilo, meristema apical radical e coifa. Essas mesmas estruturas foram observadas no presente trabalho. Os autores anteriormente citados não comentam sobre a característica adventícia embrionária dessas raízes (o meristema apical radical embrionário adventício).

Na comparação pontual do material obtido *in vitro* e *in vivo*, os grãos de pólen maduros com uma grande quantidade de amido marcam a rota de desenvolvimento da embriogênese do pólen, segundo McCormick (1993), armazenando a energia necessária para a maturação do pólen.

O desenvolvimento de toda a planta, a partir de uma única célula, como é o caso do presente estudo, em que foram utilizados micrósporos (mas também andrófitos imaturos) *in vitro*, requer tanto a determinação de muitos tipos celulares, como a organização dessas células em um padrão elaborado (Henry *et al.*, 1994). Esses autores ainda discutem que todos os genótipos possuem informações genéticas necessárias para a embriogênese zigótica. A variação encontrada nas diferentes respostas do material *in vitro* depende da regulação da informação genética, ou da capacidade das células vegetais entrarem em um novo programa, em diferentes etapas do desenvolvimento.

Comparando-se ainda o embrião zigótico e o embrião obtido *in vitro*, Norstog (1961) comenta que as células de pró-embriões cultivados *in vitro* retêm a capacidade para iniciar o desenvolvimento de primórdios radiculares e foliares, além da interrupção das relações ontogenéticas normais. O autor ainda discute que a simetria bilateral do embrião da cevada resulta do crescimento massivo, na porção mais superior e envolvente do escutelo. Com relação aos primórdios, o autor salienta que a diferenciação ocorreu após a produção de um número significativo de células. A partir desses comentários, pode-se inferir que no presente trabalho, como foram observados embriões com escutelo super desenvolvido, esse crescimento acentuado serviria para o armazenamento de energia para o desenvolvimento do embrião *in vitro* e conseqüente para a diferenciação dos tecidos.

Norstog (1961) relatou que o desenvolvimento de primórdios caulinares múltiplos em pró-embriões de cevada obtidos *in vitro*, pôde ser atribuído a um sistema relativamente imperfeito de gradientes estabelecidos nas culturas. Esses primórdios caulinares múltiplos também foram encontrados na análise de embriões somáticos de cevada por Nonohay *et al.* (1999). No presente trabalho não foram observados primórdios caulinares múltiplos, porém foram constatadas regiões do meristema caulinar onde houve uma grande proliferação celular. Portanto, pode-se dizer que a parte aérea foi superdesenvolvida no embrião *in vitro*, ressaltando uma diferença em comparação com o embrião zigótico.

A partir da discussão nesses subitens, serão traçadas algumas considerações pertinentes a esse assunto no item a seguir.

5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS



A partir dos resultados obtidos e da discussão antes realizada, podem ser traçadas as seguintes considerações:

Com relação aos períodos aparentemente descontínuos no desenvolvimento dos tipos celulares observados, foi verificado, em análises do conteúdo das anteras, que não há sincronia de estádios de desenvolvimento dos micrósporos/grãos de pólen dentro de cada espiga. De acordo com a posição da espiguetas ao longo de cada lado da espiga, as análises mostraram: a) alguma variação entre os estádios dos micrósporos/grãos de pólen de cada antera; b) entre espiguetas; c) variação mais acentuada entre espiguetas ao longo do mesmo lado da espiga, e d) alguma variação entre os dois lados da mesma espiga. Isso está em concordância com outros estudos anteriormente realizados (Ekberg & Eriksson, 1965, em cevadas suecas; Assmann dados não-publicados, em cevadas brasileiras).

Houve diferenças entre uma das linhagens selecionadas da cultivar A-05 em relação a cultivar MN-599, na produção inicial de estruturas embriogênicas, diferença que desapareceu quando avaliada a produção total. Entretanto, houve diferenças significativas entre as linhagens da cv. A-05 e as da BR-2 quanto à regeneração de plântulas verdes, maior na BR-2. Esses resultados indicam ter havido maior eficiência da seleção em relação à etapa da regeneração, do que na de indução. O ingresso na rota esporofítica e conseqüente formação de estruturas embriogênicas foi observado claramente a partir do 8^o dia de cultivo *in vitro*. Entretanto, já no 6^o dia de cultura, foram observados bicelulares simétricos – o que pode ser considerado um primeiro sinal de ingresso na rota esporofítica. Calos e estruturas embriogênicas liberadas dos lóculos das anteras, apresentaram embriões observados pela primeira vez aos 18 dias de cultivo *in vitro*.

Através dos resultados obtidos, pôde-se perceber que as linhagens da cultivar A-05 (linhagens S₃A22 e S₃A23) tiveram maior “competência” para formar estruturas multicelulares (ver Tabela 6

Análise Estatística). Por outro lado, a cultivar não-selecionada MN-599, pode ser considerada também competente, porém com uma menor produção de estruturas embriogênicas *in vitro*. Essa cultivar foi eficiente na diferenciação das mesmas para embriões, produzindo embriões histodiferenciados.

Portanto, a análise histológica comprovou os dados da produção da cultura de anteras, mostrando que a seleção foi eficiente, a partir do grande número de estruturas formadas nas linhagens da cultivar A-05. A cultivar MN-599 apresentou um considerável potencial para a formação de embriões. Como não foram observados embriões da linhagem S₃B63 na análise histológica, a hipótese é de que a formação aconteça com um maior tempo de cultivo *in vitro*. Essa linhagem foi analisada histologicamente até 28 dias, e como foi selecionada para uma alta regeneração de plântulas verdes, esses embriões foram formados posteriormente a esse período. Os dados da cultura de anteras revelaram que essa linhagem produziu um considerável número de plântulas.

A histologia mostrou-se de grande importância na identificação das estruturas realmente embriogênicas, ou seja, aquelas que formaram embriões. Através da morfologia, sem o emprego concomitante da histologia, podem ser formuladas hipóteses errôneas acerca da origem dos embriões obtidos *in vitro*.

Os padrões de histodiferenciação que foram observados no presente trabalho foram semelhantes ao de embriões somáticos observado por Emons (1994). Essa comparação pode ser feita ao embrião zigótico, uma vez que há algumas semelhanças. Deve ser ressaltado que os embriões obtidos *in vitro* apresentaram alterações no padrão de desenvolvimento de estruturas, como os ápices caulinares, destacando o escutelo como uma estrutura superdesenvolvida nos embriões obtidos *in vitro*. Esse comportamento pode ser devido à importância dessa estrutura para a reserva de nutrientes para a

plântula, e no caso da cultura *in vitro*, esses embriões dependem do desenvolvimento do escutelo para poderem se manter nesse ambiente artificial.

Houve variação no desenvolvimento dos meristemas das linhagens e da cultivar analisadas. Observou-se que nas duas linhagens da cultivar A-05 ocorreu menor diferenciação do meristema radical, quando comparadas à cultivar não-selecionada MN-599. Essa cultivar apresentou estruturas embriogênicas e embriões com meristema radical diferenciado, mostrando uma maior diferenciação nesse meristema quando comparado ao caulinar.

Diferenças entre as linhagens e a cultivar não-selecionada também foram observadas com relação ao tempo de formação dos tipos celulares e das estruturas embriogênicas e embriões. No caso das linhagens, a formação de estruturas embriogênicas semelhantes à pró-embriões foi verificada primeiramente aos 14 dias na linhagem S₃A22, enquanto que na linhagem S₃A23 somente foi constatada aos 16 dias de cultivo *in vitro*. Na linhagem S₃B63 não foi observada, dentro do período analisado, a formação de embriões.

A cultivar não-selecionada e as linhagens diferiram não só pelo tempo de formação dos embriões, mas pelo desenvolvimento dos embriões, mais diferenciados na cultivar não-selecionada MN-599, e observados antes nas duas linhagens da cultivar A-05: S₃A23 e S₃A22.

Por outro lado, a cultivar MN-599 teve comportamento semelhante à linhagem S₃A22 com relação à vascularização. Uma hipótese para essa constatação é de que os feixes vasculares foram encontrados somente na cultivar e nessa linhagem.

É pertinente ressaltar que este trabalho, por ser pioneiro no estudo detalhado da ontogenia da embriogênese, desde o micrósporo até plântula, permitiu, além de um melhor entendimento dos aspectos da embriogênese *in vitro*, mas também a consolidação de uma linha de pesquisa integrada entre Botânica e Genética.

Pela carência de artigos científicos publicados com relação a esse estudo, a divulgação dos resultados obtidos nesse trabalho trará uma contribuição significativa para outros grupos e Centros de Pesquisa. Dessa forma, poderão utilizá-lo como referência para apoio e comparações de novos estudos a serem realizados com cevadas de outras regiões.

6 - TRABALHOS FUTUROS



A partir de material já coletado poderão ser realizados trabalhos posteriores, nos seguintes aspectos:

6.1 - Análises citológicas de anteras cultivadas *in vitro*

O material já está coletado e fixado em FAA 50% (Johansen, 1940) e encontra-se armazenado em "eppendorfs" com etanol 70%. Essas anteras são as de BLOCOS, citadas anteriormente no Material e Métodos (Figura 6 e Tabela 2). Na Figura 6 pode-se observar o esquema de obtenção do material e na tabela 2, podem ser observadas a origem do material e a quantidade de material estocado.

Esse material, já obtido, poderá ser analisado para aumentar o tamanho amostral do presente trabalho, já que foi analisada somente uma espiga da cultivar MN-599 (espiga M088) e realizar a análise citológica das amostras das linhagens S₃A22 e S₃B63, para comparação com os resultados da análise histológica, e/ou futuramente, para servir de comparação com o material obtido *in vivo*.

6.2 – Análises cito-histológicas de espigas de cevada (cultivar MN-599) obtidas *in vivo*

Antes de iniciar a coleta das espigas de cevada, foram realizadas as seguintes medidas de cada planta (Figuras 44 B, C e D e Figuras 45 A, B e C):

- altura – altura da planta até a lígula da folha bandeira, em centímetros (cm);

- distância interlígulas – distância (cm) entre a lígula da folha bandeira e a da folha imediatamente abaixo no mesmo afilho (ver Figura 4 – Material e Métodos);
- tamanho da espiga – em centímetros

Foram coletadas, em diferentes momentos do seu desenvolvimento, as espigas, e conseqüentemente as espiguetas, de plantas de cevada cultivadas em casa de vegetação/telado, da cv. MN-599, tanto para a análise histológica quanto para a citológica. De cada amostra coletada, de um lado de cada espiga foram retiradas as espiguetas, em laboratório (Figuras 44 E e F e Figura 46 D), para a fixação em TRUMP (para a análise histológica), e do outro lado foram fixadas as espiguetas, todas juntas e ainda inseridas na espiga, em Farmer (para a análise citológica). O material obtido *in vivo* foi fixado da seguinte forma:

- Trump: Glutaraldeído 1% : formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M - pH 7,2 – Trump (McDowell, 1978) para as análises histológicas. O material (183 eppendorfs com 352 espiguetas) encontra-se estocado em geladeira;
- Farmer (3 : 1 – etanol absoluto : ácido acético glacial) e posteriormente (24 horas) transferido para etanol 70% para as análises citológicas. O material também encontra-se estocado em geladeira.
- Foram fixadas 29 espigas (na verdade, 29 meias-espigas, porque somente um lado da espiga foi fixado em Farmer, e a outra metade – cada espigueta, foi fixada em glutaraldeído : formaldeído).

O material obtido será utilizado, em trabalhos futuros, como testemunha para a comparação do processo *in vivo*, com as respostas do material, analisado no presente trabalho, obtido *in vitro*.

Nas Figuras 44-46 são apresentadas as etapas da coleta, bem como o material coletado.

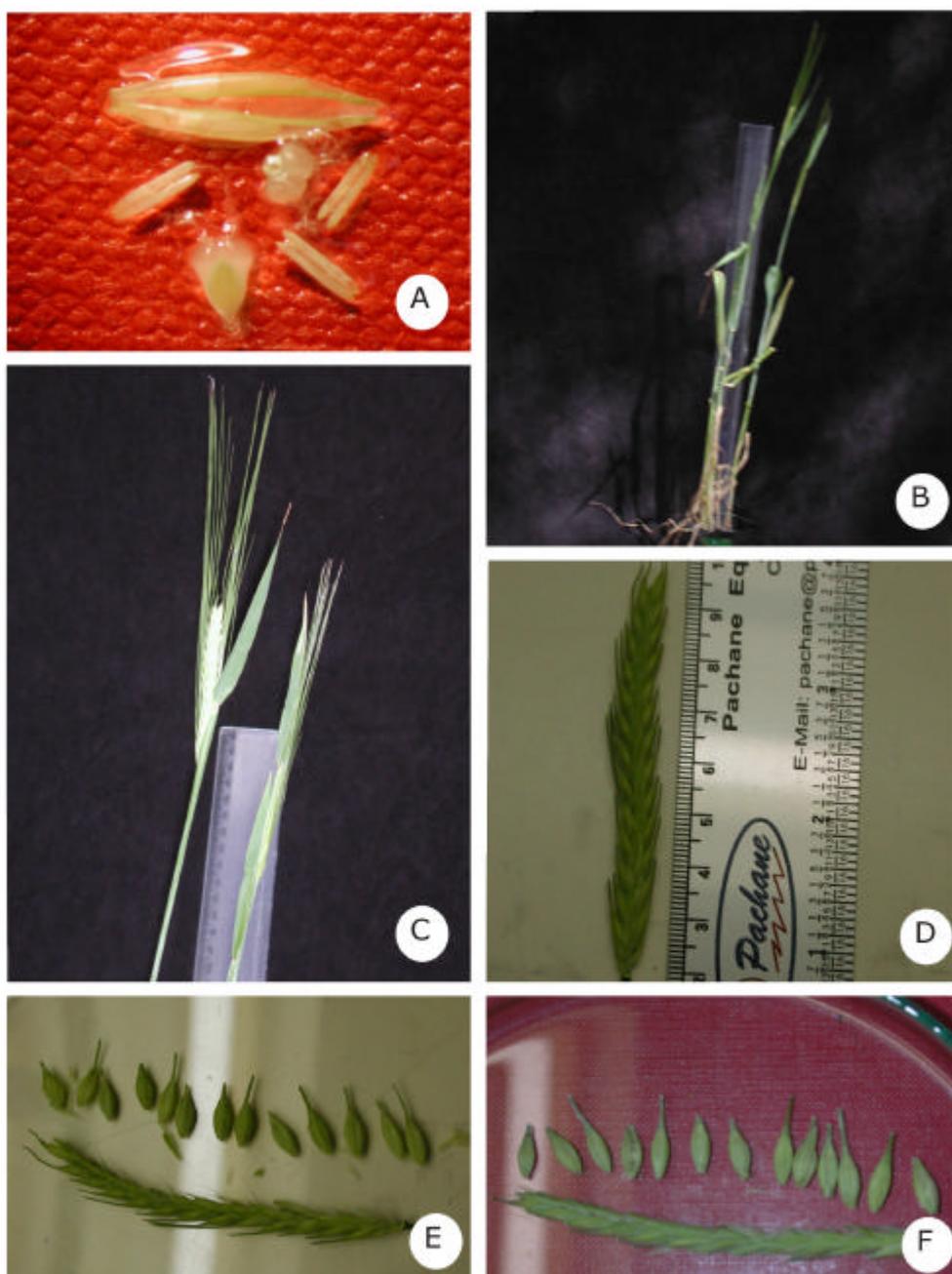


Figura 44 - Etapas realizadas durante a coleta do material para a realização de trabalhos futuros. Seqüência: B, C, D, E e F, e A. A - Anteras já isoladas e separadas do gineceu. **B** - Medida da altura da planta no momento da coleta das espigas. **C** - Medida da espiga. **D** - No laboratório, as aristas foram cortadas para a retirada das espiguetas de um dos lados da espiga para a análise histológica. **E e F** - Espiguetas isoladas prontas para serem fixadas em Trump. O outro lado da espiga foi fixado em Farmer para as análises citológicas.



Figura 45 - Espigas coletadas. A - Medida da espiga no momento da coleta da mesma. **B e C -** Espigas em laboratório, após terem sido retiradas as aristas. **D -** Detalhe de uma espiga, evidenciando as espiquetas. **Escala:** 1 cm.



Figura 46- Detalhes do material coletado. A - Frutos (cariopse) em formação. B - Androceu e gineceu de três flores de cevada. C - Detalhe de uma espiga evidenciando as espiguetas. D - Espiguetas isoladas. E - Frutos isolados para serem fixados. F - Detalhe de um fruto. Escalas: 1 cm.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. 3. ed. New York: John Wiley, 1960. 485 p.

ASSMANN, E.M. **Estudo da resposta androgenética na cultura de anteras *in vitro* de três cultivares brasileiras de cevada, *Hordeum vulgare vulgare*, Poaceae**. 1996. 128f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biociências, Curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

ASSMANN, E.M.; WINGE, H. Response to *in vitro* anther culture of three brazilian cultivars of barley, *Hordeum vulgare vulgare*. In: INTERNATIONAL OAT CONFERENCE, 5, 1996, Saskatoon. INTERNATIONAL BARLEY GENETICS SYMPOSIUM, 7, 1996, Saskatoon. **Proceedings...** Saskatoon: University Extension Press, University of Saskatchewan, 1996. v. 2, p. 455-457.

ATANASSOV, A. *et al.* In vitro production of haploid plants. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 11, p. 400-408, 1995.

BAJAJ, Y.P.S. *In vitro* production of haploids. In: SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V., YAMADA, Y. (Ed.) **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: MacMillan, 1983. p. 228-287.

BANDYOPADHYAY, T. *et al.* Trichomes: their diversity, distribution and density in acclimatization of teak (*Tectona grandis* L.) plants grown *in vitro*. **Plant cell, tissue and organ culture**, v.78, p. 113-121, 2004.

BHANDARI, N.N. The microsporangium. In: JOHRI (Ed.). **Embryology of Angiosperms**. Berlin: Springer, 1984. cap. 2, p. 53-121.

BHOJWANI, S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice** (Developments in crop science, 5). Amsterdam: Elsevier, 1983, cap. 7, p. 113-141.

BINAROVA, P. *et al.* A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. **Sexual plant reproduction**, v. 10, p. 200-208, 1997.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 1997. 547 p.

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: CAB International, 1991.

BOTHMER, R. von; JACOBSEN, N. Origin, taxonomy and related species. In: **Barley: Agronomy monograph**, Madison, v. 26, p. 19-56, 1985.

BOTHMER, R. von *et al.* **An ecogeographical study of the genus *Hordeum***: systematic and ecogeographic studies on crop genepools, 2.ed. Rome: IPGRI, 1995. 129 p.

BOUHARMONT, J. Application of somaclonal variation and *in vitro* selection to plant improvement. **Acta horticulturae**, v. 355, p. 213-218, 1994.

BOUHARMONT, J.; DEKEYSER, A. Plant regeneration from calli for *in vitro* selection in rice. In: OKA, H.I.; KHUSH, G.S. (Ed.). **Rice Genetics Newsletter**. Misima: Rice Genetics Cooperative, 1985. cap. 36, v. 2, p. 91.

BOWMAN, J.L.; ESHED, Y. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. **Trends in plant science**, v. 5, n. 3, p. 110-115, 2000.

BROWN, A.D.H. Barley. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J., (Ed.). **Isoenzymes in plant genetics and breeding**. Part. B. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.57-77.

CAI, Q. *et al.* The effect of sugars and growth regulators on embryoid formation and plant regeneration from barley anther culture. **Plant breeding**, v. 109, p. 218-226, 1992.

CAREDDA, S. *et al.* Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare*) cultivars. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 76, p. 35-43, 2004.

CASSOL, B. **Calogênese e morfogênese a partir de explantes embrionários de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae)**. 1997. 109 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

CASTRO, J.L.; CAMARGO, C.E.O.; FURLANI, P.R. Coleção IAC de cevada na Estação Experimental de Capão Bonito, SP. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS. 1995. Campinas. **Programa e Resumos...** Campinas: IAC, 1995. p.72.

CAVICHIOLO-LAMB, C.R. *et al.* Regeneração de plantas a partir de segmentos de base de folhas em aveia. **Ciência rural**, v. 31, n. 5, p. 751-755, 2001.

CHASAN, R.; WALBOT, V. Mechanisms of plant reproduction: questions and approaches. **The plant cell**, v. 5, p. 1139-1146, 1993.

CHEN, C.C.; KASHA, K.J.; MARSOLAIS, A. Segmentation patterns and mechanisms of genome multiplication in cultured microspores of barley. **Canadian journal of genetics and cytology**, v. 26, p. 475-483, 1984.

CISTUÉ, L. *et al.* Effects of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 42, p. 163-169, 1995.

CLAPHAM, D. *In vitro* development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. **Zeitschrift für pflanzenzüchtung**, v. 65, n. 4, p. 285-292, 1971.

CLAPHAM, D. Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro*. **Zeitschrift für pflanzenzüchtung**, v. 69, n. 2, p. 142-155, 1973.

CLAPHAM, D.H. Haploid inductions in cereals. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer, 1977. cap. 2, p. 279-298.

COCUCCI, A.E. Morphogenetic seed types of Spermatophyta. **Plant systematics and evolution**, v. 250, p. 1-6, 2005.

COCUCCI, A.E.; ASTEGIANO, M.E. Interpretacion del embrion de las Poaceas. **Kurtziana**, v. 11, p. 41-54, 1978.

CROUGHAN, T.P. Anther culture for doubled haploid production. In: GAMBORG, O.L.; PHILLIPS, G.C. (Ed.). **Plant cell, tissue and organ culture – Fundamental methods**. Berlin: Springer, 1995. p. 143-154.

CROUGHAN, T.P.; STAVAREK, S.J.; RAINS, D.W. *In vitro* development of salt resistant plants. **Environmental and experimental botany**, v. 21, p. 317-324, 1981.

DALE, P.J. Pollen dimorphism and anther culture in barley. **Planta**, Berlin, v. 127, p. 213-220, 1975.

DERMAN, H. Periclinal cytochimeras and histogenesis in cranberry. **American Journal of Botany**, 34: 32-43, 1947.

DOODS, J.H. **Experiments in plant tissue culture**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. 232p.

DUNWELL, J.M. Barley. In: ZAITLIN, M. *et al.* (Ed.). **Biotechnology in plant sciences**. New York: Academic Press, 1985. p. 49-76.

DUNWELL, J.M. Barley. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMilan. 1986. v. 4, p. 49-76.

DUNWELL, J.M.; FRANCIS, R.J.; POWELL, W. Anther culture of *Hordeum vulgare* L.: a genetic study of microspore callus production and differentiation. **Theoretical and applied genetics**, v. 74, p. 60-64, 1987.

ECHART, C.L. **Controle genético e mapeamento do gene de tolerância ao alumínio em cevada**. 2001. 100 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Programa de Pós-Graduação em

Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

EKBERG, I.; ERIKSSON, G. Demonstration of meiosis and pollen mitosis by photomicrographs and the distribution of meiotic stages in barley spikes. **Hereditas**, v. 53, p. 127-136, 1965.

EMONS, A.M.C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta botanica neerlandica**, v. 43, n. 1, p. 1-14, 1994.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blücher, 1974. 293 p.

ESAU, K. **Anatomia de las plantas con semilla**. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 1982. 512 p.

FAN, Z.; ARMSTRONG, K.C.; KELLER, W.A. Development of microspores *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* L. **Protoplasma**, v. 147, p. 191-199, 1988.

FAO. **Yearbook of production**. Rome: FAO, 1995.

FILHO, R.G.J. *et al.* Absence of microspore polarity, symmetric divisions and pollen cell fate in *Brachiaria decumbens* (Gramineae). **Genome**, v. 46, p. 83-88, 2003.

FONT QUER, P. **Diccionario de botánica**. Barcelona: Editorial Labor, 1993.

FOROUGHI-WEHR, B.; FRIEDT, W.; WENZEL, G. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. **Theoretical and applied genetics**, v. 62, p. 233-239, 1982.

FOROUGHI-WEHR, B. *et al.* Plant production from cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. **Zeitung für pflanzenzüchtung**, v. 77, p. 198-204, 1976.

FOROUGHI-WEHR, B.; ZELLER, F.J. In vitro microspore reaction of different German wheat cultivars. **Theoretical and applied genetics**, v. 79, n. 1, p. 77-81, 1990.

FUKUDA, H. Tracheary element differentiation. **The plant cell**, v. 9, p. 1147-1156, 1997.

GERRITS, P.O.; SMID, L. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of microscopy**, v. 132, p. 81-85, 1983.

GILPIN, M.J. *et al.* Morphological and molecular analysis of androgenic, selfed and backcrossed plants produced from a *Hordeum vulgare* X *H. bulbosum* hybrid. **Plant breeding**, v. 116, p. 505-510, 1997.

GOLDBERG, R.B.; PAIVA, G. de; YADEGARI, R. Plant embryogenesis: Zygote to seed. **Science**, v. 266, p. 605-614, 1994.

GONZÁLEZ-MELENDI, P. *et al.* Three dimensional confocal and electron microscopy imaging define the dynamics and mechanisms of diploidisation at early stages of barley microspore-derived embryogenesis. **Planta**, v. 222, p. 47-57, 2005.

GÓRALSKI, G. *et al.* Androgenic development: a fascinating embryo formation process. **Acta biologica cracoviensia**, v. 41, p. 51-65, 1999.

GRANDO, M.F. **Capacidade androgenética e sua relação com o dimorfismo do pólen em linhagens duplo-haplóides de trigo (*Triticum aestivum* L.) obtidas por cultura de anteras.** 1990. 186 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

GRANDO, M.F.; MORAES-FERNANDES, M.I. Two point 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.

GUHA, S.; MAHESHWARI, S.C. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. **Nature**, v. 212, n. 5057, p. 97-98, 1966.

GUIGNARD, J.-L.; MESTRE, J.-C. L'embryon des graminées. **Phytomorphology**, v. 20, n. 2, p. 190-197, 1971.

GUO, Y.-D.; PULLI, S. An efficient androgenic embryogenesis and plant regeneration method through isolated microspore culture in timothy (*Phleum pratense* L.). **Plant cell reports**, v. 19, p. 761-767, 2000.

HAENSCH, K.-T. Morpho-histological study of somatic embryo-like structures in hypocotyl cultures of *Pelargonium x hortorum* Bailey. **Plant cell reports**, v. 22, p. 376-381, 2004.

HANCOCK, J.F. **Plant evolution and the origin of crop species**. Englewood-Cliffs: Prentice Hall, 1992. 305 p.

HARADA, J.J. Signaling in plant embryogenesis. **Current opinion in plant biology**, v. 2, p. 23-27, 1999.

HARADA, T.; SATO, T.; ASAKA, D. *et al.* Large-scale deletions of rice plastid DNA in anther culture. **Theoretical and applied genetics**, v. 81, p. 157-161, 1991.

HARLAN, J.R. Barley. In: SIMMONDS, N.W. **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1976. p. 93-98.

HAUSE, G.; HAHN, H. Cytological characterization of multicellular structures in embryogenic microspore cultures of *Brassica napus* L. **Botanica acta**, v. 11, p. 204-211, 1998.

HEBERLE-BORS, E. *In vitro* pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. and its relation to pollen sterility, sex balance and floral induction of pollen donor plants. **Planta**, Heidelberg, v. 156, p. 396-401, 1982.

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

HORNER, M.; STREET, H.E. Pollen dimorphism - Origin and significance in pollen plant formation by anther culture. **Annals of botany**, v. 42, p. 763-771, 1978.

HOEKSTRA, S. *et al.* Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. **Plant science**, Ireland, v. 86, p. 89-96, 1992.

HUANG, B.; SUNDERLAND, N. Temperature-stress pretreatment in barley anther culture. **Annals of botany**, v. 49, p. 77-88, 1982.

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

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

JOHANSEN, D.A. **Plant embryology**. Waltham: Chronica Botanica, 1950.

JONES, T.J.; ROST, T.L. The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. **Botanical gazette**, v. 150, p. 41-49, 1989.

KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; MUNDSTOCK, E.C. Pollen dimorphism in soybean. **Protoplasma**, v. 174, p. 74-78, 1993.

KALTCHUK-SANTOS, E. *et al.* Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 49, p. 107-115, 1997.

KAO, K.N. *et al.* Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. **Plant cell reports**, v. 9, p. 595-601, 1991.

KASHA, K.J. *et al.* An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. **Euphytica**, v. 120, p. 379-385, 2001a.

KASHA, K.J. *et al.* 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, 2001b.

KEATING, R.C. Acoraceae and Araceae. In: GREGORY, M.; CUTLER, T.F. (Ed.). **Anatomy of the monocotyledons**. Oxford: Claredon Press. 2002. 322 p.

KLEINHOF, A. *et al.* A molecular, isozyme and morphological map of the barley genome. **Theoretical and applied genetics**, v. 86, p. 705-712, 1993.

KNOX, R.B. The pollen grain. In: JOHRI (Ed.). **Embryology of Angiosperms**. Berlin: Springer, 1984. cap. 5, p. 197-271.

KRAUS, J.E. **Formação e desenvolvimento *in vitro* de estruturas semelhantes a protocormos em ápices radiculares de *Catsetum pileatum* Reichb. f. (Orchidaceae): Aspectos fisiológicos, estruturais e histoquímicos**. 1986. 153 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.

KRAUS, J.E. *et al.* A célula vegetal. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.), **Anatomia Vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. cap. 2, p. 31-86.

KÜHLMANN, U.; FOROUGH-WEHR, B. Production of doubled haploid lines in frequencies sufficient for barley breeding programs. **Plant cell reports**, v. 8, n. 2, p. 78-81, 1989.

LAMB, C.R.C. *et al.* Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 37, n. 2, p. 123-130, 2002.

LARSEN, E.T.; TUVESON, I.K.D.; ANDERSEN, S.B. Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. **Theoretical and applied genetics**, v. 82, 417-420, 1991.

LI, H.; DEVAUX, P. Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. **Plant cell reports**, v. 20, p. 475-481, 2001.

LI, W.-Z. *et al.* The effects of DNA hypomethylating drugs on androgenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). **In vitro cell. dev. biology , plant**, v. 37, p. 606-608, 2001.

LINS, A.L.F.A. **Aspectos do desenvolvimento vegetativo de espécies de *Philodendron* Schott (Araceae), com ênfase na origem do sistema radical**. 2005. 159 f. Tese (Doutorado em Ciências – Botânica) - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

LINS, A.L.F.A.; OLIVEIRA, P.L. Origem, aspectos morfológico e anatômico das raízes embrionárias de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica**, v. 10, n. 2, p. 221-236, 1994.

LUIZZI, D.V.; CASTRO, A.J. **Variabilidad genetica, su aporte al desarrollo del cultivo de cebada en el Uruguay**. In: REUNIÓN NACIONAL DE INVESTIGADORES EN CEBADA CERVECERA, 2, 1991, Colonia. Anais... Colonia: 1991. n. 1, p. 1-13. (Publicação avulsa).

MARIATH, J.E.A.; SANTOS, R.P.; BITTENCOURT JR., N.S. Flor. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.), **Anatomia Vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. cap. 13, p. 329-373.

MARASCHIN, S. de F. *et al.* 14-3-3 isoforms and pattern formation during barley microspore embryogenesis. **Journal of experimental botany**, v. 54, n. 384, p. 1033-1043, 2003a.

MARASCHIN, S. de F.; LAMERS, G.E.M; WANG, M. Cell death and 14-3-3 proteins during the induction of barley microspore androgenesis. **Biologia**, v. 58, n. 1, p. 59-68, 2003b.

MARASCHIN, S. de F. *et al.* Time-lapse tracking of barley androgenesis reveals position-determined cell death within pro-embryos. **Planta**, v. 220, p. 531-540, 2005.

MARIS, A.F. **Caracterização isoenzimática de cultivares brasileiras de cevada (*Hordeum vulgare* L.)**. 1992. 107 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas – ênfase Genética). Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1992.

MAZZOCATO, A.C.; Estudos sobre o processo de androgênese em anteras de cevada, *Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*, cultivadas *in vitro*. **Relatório técnico**, Aperfeiçoamento/Pesquisa – APB. Processo: CNPq 522568/96-3, 1997. Porto Alegre: Departamento de Genética/UFRGS, 1997.

MAZZOCATO, A.C.; ASSMANN, E.M.; WINGE, H. Respostas androgenéticas divergentes em cultivares brasileiras de cevada por efeito de seleção. **Genetics and molecular biology**, v. 21, n. 3 supl., p. 221, 1998.

MAZZOCATO, A.C.; MARIATH, J.E.A.; WINGE, H. Análises citohistológicas do processo androgenético em linhagens selecionadas de cevada (*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*). In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA DE CEVADA, 23, 2003, Passo Fundo. **Anais e ata...** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2003. p. 83-91.

MAZZOCATO, A.C. *et al.* Tolerância ao alumínio em plântulas de milho. **Ciência rural**, v. 32, n.1, p. 19-24, 2002.

McCORMICK, S. Male gametophyte development. **Plant cell**, v. 5, p. 1265-1275, 1993.

McDOWELL, E.M. In: TRUMP, J. (Ed.). **Diagnostic electron microscopy**. New York: John Wiley, 1978. p. 113-139.

McKONE, M.J.; HALPERN, S.L. The evolution of androgenesis. **The american naturalist**, v. 161, n. 4, 2003.

MIHÁLY, R. *et al.* *In vitro* selection of transformed foreign gene (bar) in wheat anther culture. **Acta biologica szegediensis**, v. 46, n. 3-4, p. 9-10, 2002.

MINELLA, E. Melhoramento genético de cevada para tolerância à toxicidade de alumínio. In: Reunião de Pesquisa da Cevada, 16, 1996, Guarapuava – PR. **Relatório Técnico...** 1996.

MINELLA, E. Melhoramento da cevada. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 253-272.

MORAES, A.P. *et al.* Effect of temperature shock on soybean microspore embryogenesis. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 47, n. 4, p. 537-544, 2004.

MOTOSE, H.; SUGIYAMA, M.; FUKUDA, H. A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. **Nature**, v. 429, p. 873-878, 2004.

NATESH, S.; RAU, M.A. The embryo. In: JOHRI (Ed.). **Embryology of Angiosperms**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1984. cap. 8, p. 377-443.

NITSCH, J.P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, v. 163, p. 85-87, 3 jan. 1969.

NONOHAY, J.S.; MARIATH, J.E.A.; WINGE, H. Histological analysis of somatic embryogenesis in Brazilian cultivars of barley, *Hordeum vulgare vulgare*, Poaceae, **Plant cell reports**, v. 18, p. 929-934, 1999.

NORREEL, B. Étude cytologique de l'androgénèse expérimentale chez *Nicotiana tabacum* et *Datura innoxia*. **Bulletin de la société botanique de France**, p. 461-478, 1970.

NORSTOG, K. The growth and differentiation of cultured barley embryos. **American journal of botany**, v. 48, p. 876-884, 1961.

OBERT, B. *et al.* Effect of different saccharides on viability of isolated microspores and androgenic induction in *Zea mays*. **Biologia plantarum**, v. 43, n. 1, p. 125-128, 2000.

O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty, 1981. 345 p.

OKA, S.; SAITO, N.; KAWAGUCHI, H. Histological observations on initiation and morphogenesis in immature and mature embryo derived callus of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Annals of botany**, v. 76, p. 487-492, 1995.

OLIVEIRA, J.M.S.; MARIATH, J.E.A. Anther and pollen development in *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) clone CP76. **Phytomorphology**, v. 51, n. 1, p. 91-100, 2001.

OLIVEIRA, J.M.S.; MARIATH, J.E.A.; BUENO, D.M. Grãos de pólen anômalos no clone CP76 de *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae). **Revista brasileira de botânica**, v. 24, n. 4, p. 425-433, 2001.

OLMOS, I.L.J.; CAMARGO, M.N. Aluminum toxicity in brazilian soils: characterization and distribution. **Ciência e cultura**, v. 28, p. 171-180. 1976.

OLSEN, F.L. Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*: the effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. **Carlsberg research communications**, v. 52, p. 393-404, 1987.

PACINI, E.; FRANCHI, G.G.; RIPACCIOLI, M. Ripe pollen structure and histochemistry of some gymnosperms. **Plant systematics and evolution**, v. 217, p. 81-99, 1999.

PAIRE, A. *et al.* Proteins produced by barley microspores and their derived androgenic structures promote *in vitro* zygotic maize embryo formation. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 73, p. 167-176, 2003.

PAQUETTE, A.J.; BENFEY, P.N. Axis formation and polarity in plants. **Current opinion in genetics & development**, v. 11, p. 405-409, 2001.

PEETERS, J.P. The emergence of new centers of diversity: evidence from barley. **Theoretical and applied genetics**, v. 76, p. 327-378, 1988.

PENG, M.; ZIAUDDIN, A.; WOLYN, D.J. Development of asparagus microspores *in vivo* and *in vitro* is influenced by gametogenic stage and cold treatment. **In vitro cellular and development biology, plant**, v. 33, p. 263-268, 1997.

PÉREZ-FRANCÉS, J.P.; VALDÉS, F.; MARTÍN, R. Callus induction and culture from explants of *Erysimum scoparium* in a growth regulator-free medium. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 43, p. 223-228, 1995.

PETERS, J.A.; BOBROWSKI, V.L.; ROSINHA, G.M.S. Produção de haplóides e duplo-haplóides. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, 1999. v. 2, p. 569-611.

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.

PRETOVÁ, A. *et al.* Structural observations during androgenic microspore culture of the 4c1 genotype of *Zea mays* L. **Euphytica**, v. 65, p. 61-69, 1993.

PULIDO, A. *et al.* Early stages of pollen embryogenesis in barley anther cultures induced by pre-treatment with mannitol. **International journal of developmental biology**, v. 45, p. 55-56, 2001.

PULIDO, A. *et al.* Cytological and ultrastructural changes induced in anther and isolated-microspore cultures in barley: Fe deposits in isolated-microspore cultures. **Journal of structural biology**, v. 149, p. 170-181, 2005.

QUATRANO, R.S.; SHAW, S.L. Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos. **Trends in plant science**, v. 2, n. 1, p. 15-21, 1997.

RAGHAVAN, V. Developmental strategies of the angiosperm pollen: a biochemical perspective. **Cell differentiation**, v. 21, p. 213-226, 1987.

RAGHAVAN, V. Anther and pollen development in rice (*Oryza sativa*). **American journal of botany**, v. 75, n. 2, p. 183-196, 1988.

RAMOS, D.B. **Análise citológica da rota androgenética em cevada**. 2003. 24 f. Relatório (Estágio Curricular em Biotecnologia) – Curso Técnico em Biotecnologia, Escola Técnica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

REVERS, L.F. **Estudo comparativo da resposta à cultura de anteras in vitro, de cultivares brasileiras de cevada, *Hordeum vulgare* L. Poaceae**. 1993. 71 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas – ênfase Genética). Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

RÍHOVÁ, L.; TUPÝ, J. Manipulation of division symmetry and developmental fate in cultures of potato microspores. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 59, p. 135-145, 1999.

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

ROBERTS-OEHLSCHLAGER, S.L.; DUNWELL, J.M. Barley anther culture: Pretreatment on manitol stimulates production of microspore-derived embryos. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 20, p. 235-240, 1990.

ROBERTS-OEHLSCHLAGER, S.L.; DUNWELL, J.M. Barley anther culture: The effect of position on pollen development *in vivo* and *in vitro*. **Plant cell reports**, v. 9, p. 631-634. 1991.

RODRIGUES, L.R. **Eventos embriogênicos em tecidos estaminais de Glycine Max (L.) Merr.** 2004. 135 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, 2004.

RODRIGUES, L.R.; OLIVEIRA, J.M.S.; MARIATH, J.E.A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 2, n. 3, p. 143-150, 2004.

RODRIGUES, L.R. *et al.* Histology of embryogenic responses in soybean anther culture. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 80, p. 129-137, 2005.

RONCHI, V.N. Histological study of organogenesis in vitro from callus culture of two *Nicotiana* species. **Canadian journal of botany**, v. 59, n. 11, p. 1969-1977, 1981.

ROSAL, C.J.S. *et al.* Seleção precoce para a produtividade de grãos no feijoeiro. **Bragantia**, v. 59, n. 2, p. 189-195, 2000.

RYSCHKA, S.; RYSCHKA, U.; SCHULZE, J. Anatomical studies on the development of somatic embryoids in wheat and barley explants. **Biochem. physiol. pflanzen**, v. 187, p. 31-41, 1991.

SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. Ames: The Iowa state college, 1951. 391 p.

SCHMID, R. Filament histology and anther dehiscence. **Botanical journal of the linnean society**, v. 73, p. 303-315, 1976.

SHANKER, S.; MOHAN RAM, H.Y. Plantlet regeneration from tissue culture of *Sesbania grandiflora*. **Current science**, v. 59, n. 1, p. 39-43, 1990.

SILVA, A.L.S.da *et al.* Production of androgenetic barley doubled haploid lines. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1159-1166, 1997.

SILVA, A.L.S.da; MORAES-FERNANDES, M.I.; FERREIRA, A.G. Ontogenetic events in androgenesis of brazilian barley genotypes. **Revista brasileira de biologia**, v. 60, n. 2, p. 315-319, 2000.

SNAPE, J.W.; SIMPSON, E. The genetical expectations of doubled haploid lines derived from filial generations. **Theoretical and applied genetics**, v. 60, p. 123-128, 1981.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J.; JENKINS, J.B. **Principles of genetics**. New York: John Wiley, 1997. 829 p.

SOUTHWORTH, D. Cytochemical reactivity of pollen walls. **Journal of histochemistry and cytochemistry**, v. 21, p. 73-80, 1973.

STIVAL, A.L. **Aspectos fisiológicos, anatômicos e agronômicos da indução e regeneração de duplo-haplóides androgenéticos em genótipos brasileiros de cevada (*Hordeum vulgare* L.)**. 1995. 100 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

SUNDERLAND, N. Anther culture as a means of haploid induction. In: KASHA, K.J. (Ed.) **Haploids in higher plants** - advances and potential.

II – Methods of producing haploids. C – Culture methods. Guelph: University of Guelph, 1974. p. 91-122.

SUNDERLAND, N.; DUNWELL, J.M. Pathways in pollen embryogenesis. In: STREET, H.E. (Ed.) **Tissue culture and plant science**, London: Academic Press, p. 141-167, 1974.

SUNDERLAND, N. *et al.* Multicellular pollen formation in cultured barley anthers. **Journal of experimental botany**, v. 30, n. 119, p. 1133-1144, 1979.

SWAMINATHAN, M.S. Biotechnology research and third world agriculture. **Science**, v. 218, p. 967-974.

SZAREJKO, I.; KASHA, K.J. Induction of anther culture derived doubled haploids in barley. **Cereal research communications**, v. 19, n. 1/2, p. 219-236, 1991.

TAYLOR, M.G.; VASIL, I.K. The ultrastructure of somatic embryo development in pearl millet (*Pennisetum glaucum*; Poaceae). **American journal of botany**, v. 82, n. 2, p. 205-219, 1995.

VITHANAGE, H.I.V.M.; KNOX, R.B. Pollen development and quantitative cytochemistry of exine and intine enzymes in sunflower, *Helianthus annuus* L. **Annals of botany**, v. 44, p. 95-106, 1979.

WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of botany**, v. 57, n. 2, p. 443-462, 1986.

WILSON, C.L. The telome theory and the origin of the stamen. **American journal of botany**, v. 29, p. 759-764, 1942.

WILSON, H.M. Culture of whole barley spikes stimulates high frequencies of pollen calluses in individual anthers. **Plant science letters**, v. 9, n. 3, p. 233-238, 1977.

WILSON, H.M.; MIX, G.; FOROUGH-WEHR, B. Early microspore divisions and subsequent formation of microspore calluses at high frequency in anthers of *Hordeum vulgare* L. **Journal of experimental botany**, v. 29, n. 108, p. 227-238, 1978.

WOJNAROWIEZ, G. *et al.* Barley anther culture: assessment of carbohydrate effects on embryo yield, green plant production and differential plastid development in relation with albinism. **Journal of plant physiology**, v. 161, p. 747-755, 2004.

XUHAN, X. *et al.* Polyploidization in embryogenic microspore cultures of *Brassica napus* L. cv. Topas enables the generation of doubled haploid clones by somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 208, p. 240-247, 1999.

YEUNG, E.C. The use of histology in the study of plant tissue culture systems – Some practical comments. **In vitro cellular & developmental biology, plant**, v. 35, n. 2, p. 137-143, 1999.

ZAMBRANO, A.Y.; DEMEY, J.R.; GONZÁLEZ, V. *In vitro* selection of a glyphosate-tolerant sugarcane cellular line. **Plant molecular biology reporter**, v. 21, p. 365-373, 2003.