

TEMPERATURA E SEUS EFEITOS NA POLINIZAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE EMBRIÕES HAPLÓIDES DE TRIGO EM CRUZAMENTO INTERGENÉRICO

EFFECT OF POLLINATION TEMPERATURE TO OBTAIN HAPLOID WHEAT EMBRYOS IN INTERGENERIC CROSSES

SILVA, José A.G. da¹; CARVALHO, Fernando I. F. de²; SILVA, Simone A³; BARBIERI, Rosa L⁴; MARCHIORO, Volmir S.; LORENCETTI, Claudir¹; BENIN, Giovanni¹

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a influência da temperatura de polinização na obtenção de embriões haplóides em cruzamento intergenérico trigo x milho, foram testados quatro genótipos de trigo sob diferentes temperaturas, variando entre 14 a 34°C. Foram polinizadas 4489 flores, o que permitiu um resgate total de 110 embriões e levados ao meio de cultura. Através da análise de regressão foi possível caracterizar o número de embriões resgatados nas diferentes temperaturas de polinização e concluir que, de maneira geral, as temperaturas entre 20 a 30°C são as ideais para a obtenção de embriões haplóides.

Palavras chave: gimnogênese, regressão polinomial, milho e trigo.

INTRODUÇÃO

Entre os cereais de estação fria, o trigo (*Triticum aestivum* L.) é a cultura de maior importância econômica, sendo cultivado sob as mais variadas condições de ambiente, apresentando grande capacidade de produtividade de grãos, enorme potencial de qualidade nutricional e elevado grau de adaptabilidade, devido provavelmente, ao nível de ploidia.

No melhoramento de plantas autógamas, uma das grandes limitações é o tempo necessário para atingir a homozigose após a realização de cruzamentos artificiais, pois, do processo de criação até o lançamento de novas cultivares são necessárias de 7 a 9 gerações de avaliação e seleção das populações segregantes e mais 3 a 5 anos de experimentação.

O interesse na haploidia como uma ferramenta para o melhoramento genético de plantas tem aumentado durante os últimos anos com o desenvolvimento de métodos mais eficientes para a sua produção (SNAPE et al., 1986). Há previsão de que a haploidização transformará drasticamente a criação de linhagens puras de cereais, trazendo com isto substancial economia de tempo, podendo permitir alta variância genética entre linhas, melhor resposta à seleção devido a ausência do heterozigoto e grande valor como teste para identificar cruzamentos artificiais promissores. Num processo normal de autofecundação as espécies de flores perfeitas, onde os genitores diferem em apenas dois pares de locos independentes, o genótipo recessivo *aabb* tem a probabilidade de ser encontrado na proporção de 1/16 na população F₂. Entretanto, se for utilizada a haploidia o mesmo genótipo terá a probabilidade de ocorrência de ¼, isso devido a ausência dos heterozigotos, prevalecendo apenas quatro genótipos homozigotos. Com a obtenção de linhas homozigotas a variância aditiva é maximizada, os efeitos de dominância são neutralizados e as vantagens em caracteres quantitativos podem ser maiores, uma vez que a seleção é realizada somente com base na aditividade, não havendo interferência dos efeitos de dominância e epistasias.

Segundo MORAES-FERNANDES (1990), a duplicação do número cromossômico, pode ser espontânea ou induzida pela colchicina. Desta forma, a homozigose é obtida imediatamente, uma vez que cada cromossomo terá sua cópia exata, sendo também restaurada a fertilidade, devido a planta haplóide quase sempre ser estéril. Por outro lado, a produção de haplóides em trigo mediante cultura de anteras, utilizada

¹ Eng. Agr^o; Aluno de Mestrado em Agronomia, Depto. de Fitotecnia, FAEM/UFPel. Cx. Postal 354 CEP 96010-900 Pelotas - RS

² Eng. Agr^o; (Ph.D), Prof. do Depto de Fitotecnia, FAEM/UFPel. Cx. Postal 354 CEP 96010-900 Pelotas - RS.
E-mail: carvalho@ufpel.tche.br.

³ Eng. Agr^a; (Dr^a), Depto de Fitotecnia, FAEM/UFPel. Cx. Postal 354 CEP 96010-900 Pelotas - RS

⁴ Bióloga (Dr^a), Professora colaboradora Depto. de Fitotecnia, FAEM/UFPel. Cx. Postal 354 CEP 96010-900 Pelotas - RS

⁵ Eng. Agr^o Aluno de Doutorado em Agronomia, Depto. de Fitotecnia, FAEM/UFPel. Cx. Postal 354 CEP 96010-900 Pelotas - RS

(Recebido para publicação em 22/04/2002)

por mais de 20 anos, apresenta dificuldades e limitações para a obtenção de plântulas verdes, determinadas pela capacidade de regeneração dos genótipos (FADEL & WENZEL, 1990), pela interação do citoplasma do micrósporo ou de fatores maternos herdados, com genes nucleares que controlam a resposta dos genitores (HASAN & KONZAK, 1991) ou por falta de afinidade entre o genótipo com o meio de cultura (GHAEMI et al., 1993).

Os cruzamentos intergenéricos surgem como uma nova sistemática para superar as dificuldades apontadas. A da técnica desenvolvida por LAURIE & BENNETT (1987) no cruzamento trigo x milho que propiciou o entendimento da participação menos intensa do genótipo e maior eficiência na obtenção de haplóides (LAURIE & REYMONDIE, 1991). Além disso, mesmo com os avanços obtidos, a baixa frequência na recuperação de embriões haplóides ainda é um limitante do processo, sendo necessários estudos que permitam identificar os fatores que favoreçam em elevar o número de embriões haplóides resgatados.

Mediante o exposto, o objetivo deste trabalho foi o de verificar a influência da temperatura de polinização para a obtenção de embriões haplóides em cruzamento intergenérico trigo x milho em genótipos de trigo F₂ e também detectar as

temperaturas que favoreçam ou limitam a formação do embrião haplóide.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em telado, estufa e laboratório pertencente ao setor de Fitomelhoramento da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, localizado no município de Capão do Leão/RS no ano de 2001. O município está situado a 31° 52' 00" de latitude Sul e 52° 21' 24" de longitude e a uma altitude de 13,24 m. O clima segundo a classificação de Köepen é temperado, sendo 1280,2 mm a média anual de precipitação pluviométrica, com solo classificado em planossolo e tendo uma temperatura média anual de 17,9° C (SILVA, 1999).

Quatro genótipos de trigo F₂ proveniente da EMBRAPA Trigo de Passo Fundo, foram semeados sob condições de telado, utilizando populações de trigo contrastantes em relação aos caracteres tolerância ao alumínio (Al³⁺) e a estatura de planta (cm), como demonstra os dados incluídos na Tabela 1.

Tabela 1 - Populações de trigo F₂ utilizadas para o cruzamento intergenérico (trigo x milho) com seus respectivos cruzamentos de origem com presença ou ausência dos caracteres de importância agrônômica como tolerância ao Al³⁺ e estatura de planta (cm), FAEM, UFPel, 2001.

POPULAÇÃO	CRUZAMENTO	REAÇÃO AO Al ³⁺	ESTATURA
F ₂ P ₁	BR35 X CEP 24	T X T	I X A
F ₂ P ₄	CEP 24 X PF 87504	I X I	A X I
F ₂ P ₈	EMBRAPA 120 X EMBRAPA 49	T X T	I X A
F ₂ P ₉	PF 92231 X SONORA	T X S	A X B

Reação ao Al³⁺ : T (tolerante), I (intermediário) e S (susceptível)

Estatura : A (alta > 120 cm), B (baixa < 80 cm) e I (intermediário 80 – 120 cm)

As populações de trigo avaliadas foram semeadas em baldes, contendo solo adubado com macro e micronutrientes e com pH corrigido para 6,0; cada dois baldes foram colocadas sobre bandejas retangulares mantidas com água para manter o solo úmido. As populações foram semeadas em nove épocas distintas com intervalos de quinze a vinte dias para cada semeadura, onde cada genótipo ocupou dois baldes com quatro a cinco plantas cada.

A data de semeadura das diferentes épocas foram: época I (01/02/01), II (15/02/01), III (03/03/01), IV (18/03/01), V (02/04/01), VI (19/04/01), VII (03/05/01), VIII (23/05/01) e IX (11/06/01). Como fontes de pólen foram utilizados as cultivares de milho híbrido (AG 6018) e o (BR 400 – super doce) que eram semeados em intervalos de sete dias em condições de campo, em área preparada próximo ao telado. Com a queda de temperatura as plantas de milho com até 1m de estatura foram retiradas das condições de campo e transplantadas para dentro de uma estufa plástica para favorecer o florescimento. A partir daí, as novas épocas de milho para produção de pólen foram semeados em ambiente protegido. Lâmpadas fluorescentes de 100 W foram colocadas para aumentar a luminosidade no inverno devido à redução do fotoperíodo nesta época do ano e foi utilizada uma estufa elétrica para permitir o controle da temperatura e com isso a formação de pólen viável.

A emasculação do trigo foi realizada com a retirada das flores centrais, corte das glumas e a retirada das anteras e ensacadas em envelopes de papel vegetal. Posteriormente no 3º ou 4º dia após a emasculação era realizado a polinização

com pólen de milho recém coletado da planta doadora, mantendo sempre um horário de polinização que compreendia do meio dia até às 14 horas, sendo anotado a cada dia de polinização a temperatura em escala graus Celsius (C°) com o auxílio de um termômetro.

Foram utilizadas duas fontes de pólen, o mesmo número de espigas polinizadas com milho doce também era polinizado com milho híbrido. Após 24 e 48 horas da polinização era injetada no colmo uma solução de 2,4 D a 10%, permanecendo as espigas por 25 dias em casa de vegetação após a emasculação, iniciando logo após a coleta das espigas. O resgate dos embriões foi realizado no Laboratório de Di-haplóides e Hidroponia e em câmara de fluxo laminar, utilizando o microscópio estereoscópio.

Foi efetuada a polinização em 4489 flores em um total de 110 embriões resgatados e levados ao meio de cultura modificado "Batata-2" segundo CHUANG et al (1981). Os componentes do meio de cultura e suas quantidades para 1 litro foram: extrato de batata aquoso 5% (1/10 do volume total = 70 ml/l), Fe EDTA (10 ml/l), vitaminas (2 ml/l), AIA (1 ml/l), macro batata regeneração (100 ml/l), sacarose (30 g/l), agar (7 g/l) e pH corrigido para 5,9.

Antes do resgate dos embriões foi realizada a contagem do número de flores polinizadas, número de grãos cheios formados e número de embriões resgatados para cada genótipo analisado. Os embriões haplóides resgatados foram incubados em tubos de ensaio, permaneceram três dias no escuro e após transferidos para a luz, ficando na BOD por

mais 30 a 60 dias para o desenvolvimento da plântula haplóide e posterior tratamento com a colchicina.

Foi realizada a análise de variância para determinar se houve efeito da temperatura de polinização e dos genótipos de trigo estudados quanto a formação de embriões haplóides via gimnogeneese.

RESULTADO E DISCUSSÃO

As temperaturas ideais de polinização foram estimadas pela relação entre o número de embriões haplóides resgatados e as diferentes temperaturas analisadas, variando de 14 até 34°C e descrita conforme a equação de regressão polinomial de 2º Grau, $Y = a + bx + cx^2$, onde Y representa a média do número de embriões resgatados para cada genótipo; a, b, e c são os coeficientes de regressão e x a temperatura de polinização.

Os resultados do teste F para a variável número de embriões resgatados em relação as diferentes temperaturas para os genótipos analisados, estão inseridos na tabela 2.

Foram observadas diferenças significativas a 1 e 5% de probabilidade para as temperaturas analisadas nos genótipos

F₂P₉ e F₂P₈, respectivamente, não havendo influência significativa da temperatura para os genótipos F₂P₄ e F₂P₁.

Com relação ao número de flores polinizadas, os genótipos F₂P₉ e F₂P₈ foram os que revelaram o maior número de grãos cheios formados e permitiram o maior número de embriões resgatados, 38 para o genótipo F₂P₉ e 47 para o F₂P₈. Os genótipos F₂P₄ e F₂P₁ foram os que menos contribuíram para os parâmetros número de espigas polinizadas; número de grãos cheios formados e principalmente número de embriões resgatados, apresentando 15 e 10 embriões, respectivamente (Tabela 3), não ocorrendo diferenças significativas para as diferentes temperaturas de polinização analisadas para estes últimos dois genótipos.

As figuras da análise de regressão para os quatro genótipos avaliados evidenciam que o incremento da temperatura até 30º C permitiu o aumento do número de embriões resgatados, apresentando cada genótipo uma temperatura ideal de polinização que correspondeu a uma média entre 24 a 27°C; por outro lado, as polinizações realizadas nas temperaturas acima de 30°C comprometeram os trabalhos em cruzamento trigo x milho, reduzindo consideravelmente o número de embriões haplóides obtidos.

Tabela 2 - Resumo da análise de variação realizado nos genótipos de trigo F₂P₉, F₂P₈, F₂P₄ e F₂P₁ quanto ao número de embriões resgatados em sete diferentes temperaturas de polinização, FAEM, UFPel, 2001.

ANÁLISE DE VARIAÇÃO	GL	QM (Nº ER/TP)	GENÓTIPO
Tratamento	6	0,304**	F ₂ P ₉
Erro	70	0,095	
Total	76		
Tratamento	6	0,268*	F ₂ P ₈
Erro	72	0,115	
Total	78		
Tratamento	6	0,038 ns	F ₂ P ₄
Erro	46	0,061	
Total	52		
Tratamento	6	0,035 ns	F ₂ P ₁
Erro	36	0,066	
Total	42		

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Nº ER/TP – Número de embriões resgatados em diferentes temperaturas de polinização.

De modo geral, pode ser percebido pela análise de regressão que caracteriza o número de embriões resgatados para as diferentes temperaturas testadas na polinização (Figura 1 A, B, C, e D) que as temperaturas ideais variaram numa faixa de 20º a 30º C; porém, houve distinção para cada genótipo, correspondente as temperaturas que mais favorecem ou limitam a obtenção de embriões haplóides, evidenciando uma interação genótipo x temperatura para o caráter número de grãos cheios formados (NºGCF) nas populações avaliadas (Tabela 4).

Para os genótipos F₂P₉, F₂P₈, F₂P₄ e F₂P₁, a equação de regressão de 2º grau foi a que melhor ajustou as situações avaliadas, apresentando um coeficiente de determinação de 0,74; 0,91; 0,74 e 0,77 respectivamente. O emprego de diferentes temperaturas na polinização permitiu identificar os genitores mais ajustados quanto a formação de embriões haplóides em relação à tolerância e suscetibilidade as variações de temperatura, como expressa o genótipo F₂P₈, proveniente do cruzamento entre as cultivares EMBRAPA 120 e EMBRAPA 49, que evidencia uma maior tolerância as variações de temperatura.

Pode ser observado na figura B que a curva de regressão para o genótipo F₂P₉ indica que as temperaturas ideais na polinização ocorrem na faixa de 22 a 30°C, ou seja, um intervalo de 8°C, expressando uma média de 0,49 embrião resgatado por espiga. Na figura A para o genótipo F₂P₈ a curva obtida permite demonstrar que as temperaturas ideais estão na faixa de 20 a 30°C, ou seja, um intervalo de 10°C, possibilitando uma média de 0,59 embrião por espiga polinizada, apresentando tanto o genótipo F₂P₉ e F₂P₈ diferenças significativas quanto ao efeito da temperatura. Os genótipos F₂P₄ e F₂P₁ (Figura 1 C e D) embora a análise de variação não demonstrou diferença significativa quanto a temperatura de polinização, a análise de regressão indica que as temperaturas ideais ocorrem na faixa de 24 a 29°C e 22 a 28°C respectivamente, ou seja, um intervalo de 5º e uma média de 0,28 embrião resgatado por espiga para o F₂P₄ e intervalo de 6°C e média de 0,23 para o F₂P₁. Desta forma, para aumentar a probabilidade de obtenção de um número de combinações genéticas de importância agrônômica por meio da haploidização, é necessário o controle de temperatura e das constituições genéticas testadas, no sentido de incrementar o número de embriões haplóides resgatados.

Além disso, os cruzamentos intergenéricos poderiam ser efetuados em ambiente controlado sem a manipulação da temperatura, principalmente em telado, desde que as épocas permitam a coincidência entre o florescimento das populações de trigo com as temperaturas médias diárias estando na faixa de 20 a 30° C para a polinização, compreendendo o intervalo das temperaturas ideais para esses genótipos analisados.

Em relação às figuras analisadas podemos inferir que o genótipo F₂P₈ e F₂P₉ tem a característica de tolerar uma maior variação de temperatura na polinização, permitindo aumentar a possibilidade de obter embriões haplóides, o que é evidenciado por serem os genótipos mais promissores (Tabela 3). O genótipo F₂P₈ apresentou o maior número de embriões haplóides obtidos, além disso, tem como característica desenvolver um grande número de afilhos podendo contribuir em potencial para o melhorista, pois, possibilita elevar o número de espigas polinizadas e possivelmente aumentar o número de embriões haplóides resgatados.

Durante o início de florescimento das plantas, a polinização com pólen de milho foi realizada no terceiro ou

quarto dia após a emasculação das flores, porém, as espigas que não puderam ser emasculadas permaneceram nos baldes para que ocorresse a autofecundação natural das flores do trigo.

As espigas autofecundadas foram colhidas e analisadas no laboratório de di-haplóides onde foi verificado que ocorreu a formação do embrião 2n normal em todas as temperaturas de polinização trabalhadas, isso, nos leva a inferir que a temperatura de polinização esteja mais relacionada ao desenvolvimento do micrósporo na formação do tubo polínico por parte do grão de pólen, do que exclusivamente uma característica particular de cada genótipo de trigo doador do óvulo. Portanto, além das temperaturas ideais para a realização de cruzamento intergenérico trigo x milho, as populações de milho para a produção de pólen também devem ser desenvolvidas em condições adequadas de temperatura para permitir a obtenção de pólen viável no desenvolvimento do tubo polínico e de acordo com os dados obtidos, compreendendo as temperaturas na faixa de 20 a 30°C.

Tabela 3 - Temperatura de polinização, número de espigas polinizadas, número de flores polinizadas, número de grãos cheios formados e número de embriões haplóides de trigo resgatados para os genótipos F₂P₉, F₂P₈, F₂P₄ e F₂P₁, FAEM/UFPEL, 2001.

Pop.	T° P	N°EP	N°FP	N°GCF	N°ER	%NER	MN°ER
F ₂ P ₉	14 a 16	8	132	42	0	0	0
	17 a 19	8	101	48	1	0,99	0,12
	20 a 22	16	268	121	4	1,49	0,25
	23 a 25	17	316	150	15	4,75	0,88
	26 a 28	8	154	67	7	4,54	0,87
	29 a 31	12	244	119	9	3,69	0,75
	32 a 34	8	122	40	2	1,63	0,25
	-	-	-	-	-	-	-
	TOTAL	77	1337	587	38		
F ₂ P ₈	14 a 16	12	212	74	3	1,42	0,25
	17 a 19	9	120	44	4	3,33	0,44
	20 a 22	10	176	81	9	5,11	0,90
	23 a 25	13	262	132	11	4,2	0,85
	26 a 28	7	148	74	7	4,73	0,87
	29 a 31	18	354	201	10	2,82	0,56
	32 a 34	10	150	46	3	0,2	0,3
	-	-	-	-	-	-	-
	TOTAL	79	1422	652	47		
F ₂ P ₄	14 a 16	4	82	26	0	0	0
	17 a 19	4	74	20	0	0	0
	20 a 22	7	92	30	3	3,26	0,43
	23 a 25	14	240	74	5	2,08	0,36
	26 a 28	5	96	18	2	2,08	0,4
	29 a 31	15	284	124	4	1,41	0,27
	32 a 34	4	86	29	1	1,16	0,25
	-	-	-	-	-	-	-
	TOTAL	53	954	321	15		
F ₂ P ₁	14 a 16	3	66	0	0	0	0
	17 a 19	3	60	0	0	0	0
	20 a 22	5	68	23	1	1,47	0,20
	23 a 25	14	256	88	6	2,34	0,43
	26 a 28	6	112	32	1	0,89	0,33
	29 a 31	10	174	72	2	1,15	0,20
	32 a 34	2	40	0	0	0	0
	-	-	-	-	-	-	-
	TOTAL	43	776	215	10		

Pop (população) T° P (temperatura de polinização), N°EP (número de espigas polinizadas), N°FP (número de flores polinizadas), N°GCH (número de grãos cheios formados), N°ER (número de embriões haplóides resgatados), MN°ER (média do número de embriões haplóides resgatados por espiga)= N°ER/N°EP e %N°ER (percentagem do número de embriões haplóides formados a partir de flores polinizadas)= N°ER/N°FP.

Tabela 4 - Resumo da análise de variação no modelo fatorial envolvendo 4 genótipos e 7 temperaturas de polinização, FAEM, UFPel, 2001.

Fonte de Variação	GL	Q M (NºGCF)	QM (NºER)	Genótipos analisados
Genótipo	3	395,3786**	0,52189*	F ₂ P ₉ , F ₂ P ₈ , F ₂ P ₄ , F ₂ P ₁
Temperatura	6	222,9806**	0,28323*	
Genótipo x Temperatura	18	68,5277*	0,16906ns	
Erro	225			

* Significativo a nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

** Significativo a nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

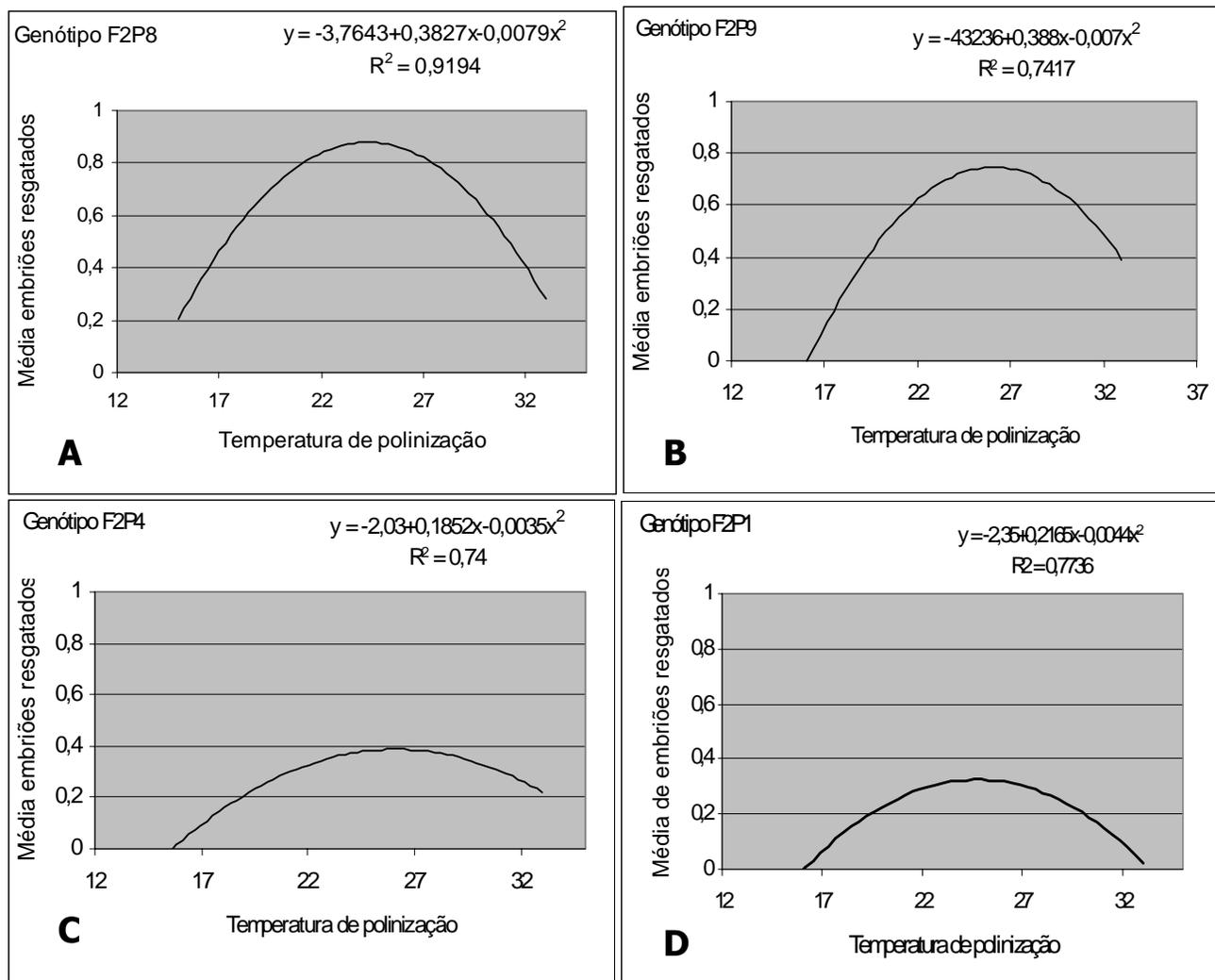


Figura 1 - Média do número de embriões haplóides de trigo resgatados e temperatura de polinização para os genótipos F₂P₈, F₂P₉, F₂P₄ e F₂P₁, FAEM/UFPel, 2001.

As populações de trigo por terem sido semeadas em épocas não adequadas para a semeadura como os meses de fevereiro e março, com as temperaturas médias diárias elevadas, apresentaram redução do tamanho da espiga e conseqüentemente do número de flores polinizadas. Apesar disso, as épocas não propícias para as populações de trigo são as mais indicadas no desenvolvimento das populações de milho para produção em quantidade e qualidade de pólen, por

necessitarem de maior fotoperíodo e temperaturas mais elevadas.

Como o trigo é o doador do embrião haplóide e necessita de espigas bem desenvolvidas, parece ser mais indicado a condução das populações de trigo durante a época adequada de desenvolvimento e as populações de milho para produção de pólen serem conduzidas em ambiente protegido com o controle adequado de temperatura.

CONCLUSÕES

Os genótipos F₂P₉ e F₂P₈ apresentam o maior número de embriões haplóides de trigo resgatados por espiga polinizada, evidenciando um comportamento diferenciado em relação aos genótipos estudados.

As temperaturas de 20 a 30°C são as ideais para a obtenção de embriões haplóides em cruzamento intergenérico trigo x milho.

ABSTRACT

Four wheat genotypes were evaluated under different temperatures of pollination, varying from 14 to 34°C to obtain haploid embryos from intergeneric crosses of wheat x corn. 4489 flowers were pollinated and 110 embryos were rescued and placed on the culture medium. The number of embryos rescued at different temperatures was characterized by regression analysis. Temperatures of 20 to 30°C are ideal to obtain haploid embryos.

Key words: Gymnogenesis, polinomy regression, maize and wheat.

REFERÊNCIAS

CHUANG, C.-C.; OU YANG, T.-W.; CHIA, H.; et al. A set of potato media for Wheat anther culture. In: **Symposium on plant tissue culture**, 1978, Peking. Plant tissue culture. Boston: Pitman, 1981. p. 51-56.

FADEL, F.; WENZEL, G. Medium-genotype-interaction on androgenetic haploid production in wheat. **Plant breeding**, Berlin, v. 105, n. 4, p. 278 - 282, 1990.

GHAEMI, M.; SARRAFI, A.; ALIBERT, G. Influence of genotype and culture conditions on the productions os embryos from anther of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). **Euphytica**, Wageningen, v. 65, n.2 p. 81 - 85, 1993.

HASAN, E.; KONZAC, C.F. Nuclear and cytoplasmatic control of anther culture response in wheat: III. Commum. Wheat Crosses. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 6, p. 1432 - 1436, 1991.

LAURIE, D.A.; BENNETT, M. D. Wheat x Maize hybridization and the production of haploid wheat plants. In: INTERNACIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 7., 1988, Cambridge, U.K. Proceedings. Cambridge, p. 349 - 354, 1987.

LAURIE, D. A; REYMONDIE, S. High frequencies of fertilization and haploid seedling production in crosses between commercial hexaploid wheat varieties and maize. **Plant Breeding**, Berlin, v. 106, n. 3, p. 182 - 189, 1991.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. Obtenção de plantas haplóides por meio da cultura de anteras. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; ed. Técnicas e aplicações da cultura de tecido de plantas. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1990. p. 311-332.

SILVA, S. A. **Estimativa da herança do caráter "stay-green" em genótipos de trigo hexaplóide**. Pelotas, 1999. 94 p. Dissertação, (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/Universidade Federal de Pelotas.

SNAPE, J.W.; E. SIMPSON, B.B.; PARKER, W. et al.. Criteria for selecting and using doubled haploid systems in cereal breeding programmes. In W. HORN et al (ed.) **Genetic manipulation in plant breeding**. Walter de Gruyter, Berlin, p. 217 - 229, 1986.