



MAXWEL VIEIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE INDUTORES NA OBTENÇÃO
DE DUPLO-HAPLOIDES EM GERMOPLASMA
TROPICAL DE MILHO**

LAVRAS – MG

2016

MAXWEL VIEIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE INDUTORES NA OBTENÇÃO DE DUPLO-
HAPLOIDES EM GERMOPLASMA TROPICAL DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. João Cândido de Souza

Orientador

Dr. Paulo Eduardo Rodrigues Prado

Coorientador

LAVRAS - MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Maxwell Vieira da.

Avaliação de indutores na obtenção de duplo-haploides em
germoplasma tropical de milho / Maxwell Vieira da Silva. – Lavras :
UFLA, 2016.

37 p. : il.

Dissertação(mestrado profissional)–Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador: João Cândido de Souza.

Bibliografia.

1. *Zea mays* L. 2. Melhoramento de milho. 3. Linhagem duplo-
haploides. 4. Indutor de haploidia. 5. Taxa de indução. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MAXWEL VIEIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE INDUTORES NA OBTENÇÃO DE DUPLO-
HAPLOIDES EM GERMOPLASMA TROPICAL DE MILHO**

***EVALUATION OF INDUCERS FOR OBTAINING DOUBLE-HAPLOIDS
IN TROPICAL CORN GERMPLASMA***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 14 de setembro de 2016.

Profª. Dra. Vânia Helena Techio

UFLA

Dr. Ramon Macedo Rangel

Syngenta

Prof. Dr. João Cândido de Souza
Orientador

LAVRAS - MG

2016

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, por me ter concedido o dom da vida, e saúde para enfrentar os obstáculos que nela encontramos.

Aos meus pais, Marcos Antônio Vieira e Francisca Maria da Silva, pelo apoio e força e dedicação para me ensinar a lutar, a tentar novamente, a superar e a surpreender.

Ao meu irmão Marcos Paulo Vieira da Silva pela ajuda, companheirismo, força e amizade em todos os momentos de minha vida.

A minha esposa, Jéssica Camila dos Santos Alves, pela compreensão, paciência e carinho nos momentos difíceis.

Em especial, ao professor Dr. João Cândido de Souza, pela orientação, dedicação e paciência durante a confecção do trabalho.

Aos colegas de mestrado, em especial: Astúrio, Rudnei, Diego, Keila e Itamara pelo convívio, amizade e companheirismo.

Ao meu grande amigo Wender Rezende, por sua dedicação, compreensão e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do programa de Pós-Graduação do departamento de Genética e Melhoramento, pela contribuição recebida.

À coorientação do amigo Paulo Eduardo Rodrigues Prado, pelo direcionamento, confiança e contribuição, pessoa fundamental para que eu concluísse mais esta etapa. Exemplo de gestor e ser humano a ser seguido.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas: César, João Bosco, José Airton e Magno Ramalho por serem mediadores do conhecimento durante esta jornada.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelo acolhimento e aprendizado.

À CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio concedido ao Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas.

Olhando para trás, reconheço e agradeço a todos que contribuíram para que hoje, eu pudesse chegar aonde cheguei.

Enfim esta vitória tem o sabor das dificuldades superadas, do dever cumprido, das sólidas amizades e dos momentos inesquecíveis compartilhados.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

A tecnologia de duplo-haploides é uma ferramenta importante para o melhoramento de milho, pois permite acelerar a obtenção de linhagens endogâmicas. Porém, a eficiência dos indutores de haploidia em regiões tropicais ainda é baixa. O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de indução de haploidia de três indutores em diferentes populações de milho provenientes da empresa Syngenta Brasil. Este trabalho foi realizado durante o ano de 2015 na Estação Experimental da Syngenta em Uberlândia – MG. Em março de 2015, foram semeados três indutores de haploidia (A, B e C) para serem utilizados como genitores masculinos, e seis populações (1, 2, 3, 4, 5 e 6) para serem utilizadas como genitores femininos. As sementes colhidas foram classificadas visualmente como haploides, utilizando-se o marcador morfológico R-Navajo. As plantas originadas pelas sementes consideradas haploides foram tratadas com colchicina para duplicação cromossômica. Posteriormente, foram transplantadas a campo, em outubro de 2015, e aquelas com reduzido vigor foram confirmadas como duplo-haploides. A partir do número de sementes obtidas em cada cruzamento e o número de plantas consideradas duplo-haploides no campo, calculou-se a taxa de obtenção de duplo-haploides (DH). Observaram-se taxas de obtenção de DH entre 0,18 e 5,6%. Verificou-se que tanto os indutores quanto as populações influenciaram a taxa de obtenção de DH. Além disso, esses fatores interagiram entre si. O Indutor C proporciona as maiores taxas de obtenção de DH para a maioria das populações avaliadas. De modo geral, as populações 2, 4 e 6 apresentam as maiores taxas de obtenção de DH.

Palavras-chave: *Zea mays* L. Melhoramento de milho. Linhagem duplo-haploides. Indutor de haploidia. Taxa de indução.

ABSTRACT

The technology of double-haploid is an important tool for corn breeding, allowing the swift achievement of inbred lines. However, the efficiency of the haploidy inducers in three tropical regions is still low. The objective of this work was to evaluate the haploidy induction rate of three inducers in different corn populations derived from the Syngenta Brasil company. This work was conducted during the year of 2015 at the Syngenta Experimental Station in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. In March of 2015, three haploidy inducers (A, B and C) were sown in order to be used as male genitors, and six populations (1, 2, 3, 4, 5 and 6), sown in order to be used as female genitors. The harvested seeds were visually classified as haploids using the R-Navajo morphological marker. The plants originated by the seeds considered haploid were treated with colchicines for chromosome duplication. Subsequently, the plants were transplanted to the field in October of 2015, and, those presenting reduced vigor were confirmed as double-haploid. With the number of seeds obtained in each cross, and the number of plants considered double-haploid in the field, we calculated the double-haploid (DH) occurrence rates, verifying rates between 0.18 and 5.6%. We observed that both inducers and populations influenced the DH occurrence rate. In addition, these factors interact between each other. Inducer C provided the highest DH occurrence rate for most of the evaluated populations. In general, populations 2, 4 and 6 presented the highest DH occurrence rates.

Keywords: *Zea mays*. Corn breeding. Double-haploid lines. Haploidy inducer. Inducing rate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Temperaturas registradas entre a semeadura (06/03/2015) e a colheita (21/07/2015) pela Estação Climatológica da Estação Experimental da Syngenta, em Uberlândia – MG.....24
- Figura 2 - Seleção de plantas em bandeja após germinação de sementes haploides.....26
- Figura 3 - Desdobramento da taxa de obtenção de duplo-haploides em função dos indutores de haploidia, fixando-se populações.31
- Figura 4 - Desdobramento da taxa de obtenção de duplo-haploides em função das populações, fixando-se indutores de haploidia.....32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo da análise de <i>deviance</i> para os efeitos Indutor e População e para a interação dos mesmos sobre a taxa de obtenção de duplo-haploides.	29
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Obtenção de duplo-haploides	13
2.1.1	Indutores de haploidia e taxa de indução em haploidia de milho	15
2.1.2	Identificação de haploides	17
2.1.3	Duplicação cromossômica de haploides	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Obtenção dos haploides	23
3.2	Identificação dos haploides	25
3.3	Duplicação cromossômica	26
3.4	Confirmação dos duplo-haploides	27
3.5	Análises estatísticas	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5	CONCLUSÕES	33
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Os híbridos são as cultivares predominantes na cultura do milho no Brasil, pois apresentam alto desempenho agrônômico, uma vez que aproveitam a heterose (vigor híbrido). Para obtenção de híbridos de milho, é necessário o cruzamento entre indivíduos contrastantes, normalmente duas linhagens elites (BORÉM; MIRANDA, 2013). Para tanto, a primeira etapa desse processo é a obtenção de linhagens endogâmicas, seguida pelo teste de capacidade de combinação das mesmas, identificando as melhores combinações e, posteriormente, a produção e comercialização das cultivares híbridas (PIERRE et al., 2011).

Tradicionalmente as linhagens endogâmicas são obtidas por sucessivas autofecundações de diversas plantas da população – geralmente seis a sete gerações de autofecundação (BATTISTELLI, 2012). Esse processo gasta, normalmente, entre três e quatro anos, ou seja, é um processo que demanda muito tempo. No entanto, na cultura do milho, o uso da tecnologia de duplo-haploide (DH) permite acelerar a obtenção de linhagens endogâmicas (PIERRE et al., 2011). Com isso, o período pode ser reduzido para aproximadamente 18 meses (BATTISTELLI et al., 2013).

Essa tecnologia consiste em cruzar um genótipo, a partir do qual se deseja obter uma linhagem, com um indutor de haploidia, obtendo assim indivíduos haploides. Posteriormente, é realizada a duplicação cromossômica desses indivíduos, utilizando-se geralmente a colchicina. Desse modo, obtém-se um indivíduo diploide com todos os locos em homozigose (KEBEDE et al., 2011). Essa é outra vantagem do uso de DH, pois utilizando autofecundação, mesmo após seis a oito gerações não se obtém 100% de homozigose (PIERRE et al., 2011).

Conforme relatado, o uso de DH depende de um indutor de haploidia, que normalmente é também uma linhagem endogâmica. A maioria desses

indutores foi desenvolvida para regiões de clima temperado. Há falta de informação sobre a capacidade de indução de haploidia e o desempenho agrônômico desses indutores em condições tropicais. Por isso, o desenvolvimento de linhagens de milho com a tecnologia de DH tem sido limitado em regiões tropicais (PRIGGE et al., 2011).

A avaliação da capacidade de indução dos indutores em condições tropicais e sobre germoplasma tropical pode contribuir para o uso mais eficiente da tecnologia de DH. Visto isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de obtenção de duplo-haploides de três indutores em diferentes híbridos de milho provenientes da empresa Syngenta Brasil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Obtenção de duplo-haploides

A obtenção de linhagens duplo-haploides envolve quatro etapas fundamentais. A primeira etapa consiste na indução de haploidia através da polinização com pólen do indutor de haploidia; a segunda etapa corresponde à identificação de sementes com embrião haploide utilizando marcador adequado; a terceira etapa consiste na duplicação cromossômica do suposto haploide com inibidor mitótico e a quarta etapa na autofecundação das plantas duplo-haploides para aumentar a quantidade de sementes das linhagens recém-geradas (PRIGGE et al., 2011).

A utilização de DH apresenta como principais vantagens: a máxima variação genética entre as linhagens *per se* e desempenho de *test cross* da primeira geração, a redução no tempo de obtenção de linhagens, o cumprimento dos critérios de proteção de cultivares, o menor custo na produção de linhagem, a obtenção de linhagens com 100% de homozigose e o aumento da eficiência na seleção assistida por marcadores moleculares (GEIGER; GORDILLO, 2009; PIERRE et al., 2011). No entanto, existem algumas limitações nesse método devido à baixa taxa de indução de haploides através de linhagens indutoras e aos sistemas de marcador morfológico, que nem sempre são precisos e eficazes na identificação de sementes haploides (COUTO, 2013).

No processo comum de autofecundação em espécies diploides, considerando apenas dois pares de locos independentes segregando entre genitores (AAbb) e (aaBB), o genótipo recessivo tem a probabilidade de ser encontrado na proporção de 1/16 na população F₂. Porém, na indução de haploidia, o mesmo genótipo terá probabilidade de ocorrência de 1/4 na população. Isso ocorre devido à ausência dos heterozigotos, prevalecendo

apenas quatro genótipos homozigotos (AABB, AAbb, aaBB e aabb) (SILVA et al., 2009).

Em linhagens haploides, a variância aditiva é maximizada, e as vantagens na seleção de características quantitativas podem ser maiores, não ocorrendo interferência do efeito de dominância (SILVA et al., 2009).

Existem duas formas principais de gerar haploides, uma se baseia na indução genética (*in vivo*) e os outros por meio de técnicas de cultura de tecidos (*in vitro*), uma vez que a indução de haploides de ocorrência natural apresenta uma taxa extremamente baixa (BELICUAS et al., 2007). Para fins de produção em larga escala, é preciso fazer uso de linhagens indutoras de haploidia, sendo o método de indução genética *in vivo* o preferido pelas empresas de melhoramento genético de milho (BATTISTELLI, 2012; PIERRE et al., 2011).

O mecanismo de indução de haploidia pode apresentar origem paterna ou materna (PIERRE et al., 2011). De acordo com os autores, quando o crescimento esporofítico ocorre a partir da célula gamética masculina (micrósporo) acontece a androgênese e o haploide produzido é considerado androgenético. Na origem materna, há o desenvolvimento esporofítico induzido na célula-ovo não fertilizada (gameta feminino), ocorre a gimnogênese, gerando um haploide gimnogenético. Porém, o mecanismo de capacidade de indução de haploide em milho não é bem compreendido até o momento (EDER; CHALYK, 2002).

As duas linhagens indutoras de haploidia que se destacaram inicialmente foram a Stock6 e a Wisconsin 23, sendo que a primeira induz à produção de haploide gimnogenético e a segunda à produção de haploide androgenético (COUTO, 2013). O autor comenta ainda que quando a linhagem Stock6 é autofecundada produz uma frequência de haploides em torno de 3,2%.

A partir destas linhagens foram produzidas várias outras linhagens indutoras com maiores taxas de indução de haploidia, em condições de clima

temperado (COUTO, 2013). Com a utilização de linhagens indutoras de haploidia é possível produzir linhagens haploides, entretanto, é necessário produzir mais indutores e conhecer as características agronômicas dos mesmos.

2.1.1 Indutores de haploidia e taxa de indução em haploidia de milho

A produção confiável de haploides é um dos principais elementos para o sucesso na implementação da tecnologia de duplo-haploides em programas de melhoramento de milho (PRIGGE et al., 2012a). A ausência de indutores de haploidia adaptados impede atualmente a adoção desta tecnologia em ambiente tropical (PRIGGE et al., 2011).

Os indutores de clima temperado, quando submetidos às condições tropicais, podem apresentar sintomas de má adaptação, como falta de sincronia entre a antese dos indutores e espigamento da fonte de germoplasma tropical, e a suscetibilidade da folha a doenças tropicais, particularmente à mancha de turcicum (*Exserohilum turcicum*) (PRIGGE et al., 2012a).

Com o intuito de avaliar a aplicabilidade de indutores de haploidia de clima temperado em programas de desenvolvimento de linhagens duplo-haploides tropicais, Prigge et al. (2011) avaliaram três indutores (RWS, UH400 e o híbrido RWS x UH400), adaptados às condições climáticas da Europa Central, em região tropical, e observaram que os indutores RWS e UH400 foram capazes de apresentar alta taxa de indução de haploides mesmo em condições não temperadas.

O elemento chave para o sucesso da aplicação da indução de haploides *in vivo* na cultura do milho é a produção de sementes haploides a partir da fonte de germoplasma tropical, e para isso é crucial que a taxa de indução de haploides do genótipo indutor seja elevada (PRIGGE et al., 2011). A utilidade da técnica de duplo-haploides pode ser maior aumentando-se a taxa de indução de haploidia dos indutores (KEBEDE et al., 2011).

A indução de haploides maternal depende principalmente do indutor utilizado como polinizador, no entanto, a fonte de germoplasma usada como pais maternos e as condições ambientais da indução também podem interferir na indução do haploide, e tais aspectos não foram analisados ainda em milho tropical (KEBEDE et al., 2011). A fonte de germoplasma e ambiente são aspectos que devem receber atenção na indução de haploidia (EDER; CHALYK, 2002).

Kebede et al. (2011) verificaram maior taxa de indução de haploidia e menor taxa de erro de classificação quando a polinização foi realizada durante o inverno, quando comparada à polinização realizada no verão. Esses autores explicam que a principal diferença entre as duas estações foi a temperatura, mas outros fatores, como precipitação e umidade relativa não podem ser descartadas. Ou seja, isso demonstra que é importante conhecer as condições ambientais ideais para a indução de haploides.

Desde a descoberta do primeiro indutor Stock6, tem sido relatada a importância de se aumentar a taxa de indução de haploides, e para proporcionar tal aumento é preciso melhorar as linhagens indutoras (EDER; CHALYK, 2002; RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

A partir disso, diversas linhagens indutoras de haploidia foram geradas. Wu et al. (2014) descrevem que atualmente as taxas de indução de haploides dos indutores utilizados é superior a 5% e, em alguns casos, há indutores com taxa de indução de 10%, oriundos da seleção contínua de indutores, como WS14, ZMS, MHI, RWS e UH400.

Um dos indutores de haploidia que tem sido mais eficiente é a linhagem RWS, desenvolvida pela Universidade de Hohenheim. Esse indutor é derivado do cruzamento entre o indutor KEMS e o indutor WS14, que são adaptados às condições de clima temperado. O indutor RWS também é eficiente em condições tropicais (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

A média de uma ampla gama de doadores e ambientes apresenta uma taxa de indução de haploide de cerca de 8%, sendo que uma linhagem irmã de RWS e RWK-76, desenvolvida a partir do cruzamento recíproco (WS14 x KEMS) forneceu uma taxa de indução média de 9 a 10% (GEIGER; GORDILLO, 2009). Esses autores comentam que para evitar uma superestimação da taxa de indução é importante usar um genótipo doador materno que seja homozigoto recessivo.

Assim, o conhecimento sobre a diversidade genética das linhagens e das populações é importante para o desenvolvimento de novos híbridos. Esse conhecimento é necessário na identificação de linhagens para cruzamentos que resultem em ótimos níveis de heterose, sem precisar realizar todos os cruzamentos possíveis entre os pais potenciais (MAKUMBI et al., 2011).

Prigge et al. (2012b) verificaram que a herdabilidade da taxa de indução de haploidia de indivíduos entre famílias é menor do que a herdabilidade de indivíduos da mesma família. De acordo com esses autores, isso ocorre devido à seleção natural, que pode desfavorecer a indução de haploidia dos gametas durante a autofecundação, uma vez que observaram distorção de segregação.

2.1.2 Identificação de haploides

A identificação de ambientes e épocas de semeadura favoráveis ao desenvolvimento de linhagens de indução de haploides é essencial para um programa de melhoramento genético de milho visando à produção de híbridos a partir destas linhagens. Além disso, é importante também a identificação rápida e barata de supostos haploides e o desenvolvimento de métodos precisos para a duplicação cromossômica, para a produção de linhagens de duplo-haploides na sequência (BATTISTELLI et al., 2013).

Com o intuito de identificar as sementes haploides oriundas da utilização de linhagens indutoras, Chase e Nanda (1965) relataram um sistema de marcador

fenotípico baseado na pigmentação por antocianina, determinado pelo gene R-navajo (R1-nj). Esse gene controla a pigmentação do endosperma e do embrião, como um marcador dominante derivado da fonte indutora. Como o endosperma é triploide, o marcador irá se expressar em qualquer tipo de cruzamento. Porém, devido ao embrião ser haploide, este não possui a contribuição do genoma da linhagem indutora, que possui o alelo R-navajo, logo o marcador não irá se expressar (SILVA et al., 2009). Assim, as sementes com a pigmentação púrpura do endosperma e a não pigmentação do embrião podem ser selecionadas como possíveis haploides (EDER; CHALYK, 2002).

Entretanto, a expressão desse gene é normalmente influenciada pelo *background* genético e pelo processo de maturação da semente, além da existência de genes dominantes que inibem a síntese de antocianina (EDER; CHALYK, 2002). Esses fatores dificultam a identificação precoce de genótipos haploides, limitando a ampla aplicação dessa metodologia em programas de melhoramento (BELICUAS et al., 2007).

Prigge et al. (2011) descreveram dois tipos de decisões incorretas que podem acontecer na identificação de haploides. O primeiro tipo ocorre quando a semente ou planta haploide é descartada erroneamente, e o segundo tipo de erro acontece quando a semente ou planta F₁ normal é classificada erroneamente como um haploide.

O primeiro tipo de erro descrito anteriormente pode ocorrer devido à eficiência limitada do marcador R1-nj, ou então devido à equipe técnica estar insuficientemente treinada. A seleção das sementes haploides quando realizada na época da colheita ou imediatamente após (antes da secagem) contribui para reduzir este tipo de erro, pois a coloração do embrião codificado com o marcador R1-nj é geralmente mais visível nessa fase. Em contrapartida, se a semente for selecionada após a secagem, o haploide verdadeiro pode ser descartado erroneamente (PRIGGE et al., 2011).

Durante o processo de secagem de sementes, pode haver a formação de bolsas de ar na região do pericarpo, as quais podem cobrir o embrião provocando o aparecimento de tons mais escuros, que podem ser percebidos de maneira errônea como pigmentação do embrião (PRIGGE et al., 2011).

Eder e Chalyk (2002) relataram que a dificuldade de identificar haploides de genótipos de milho está relacionada à existência de alelos dominantes de genes como C1-I, C2-Idf e In1-D, pois estes genes inibem a síntese de antocianina do marcador para seleção de haploides. Quando pelo menos um desses genes está sendo expresso no genótipo materno, a identificação de haploide é dificultada devido à falta de pigmentação do endosperma e do embrião. A presença de genes que inibem a síntese de antocianina é rara em milho dentado.

Além do gene R1-nj, existem outros genes de cores adicionais (B1, PL1), que condicionam a pigmentação do coleóptilo e da raiz das plântulas, facilitando a separação de indivíduos haploides de diploides (COUTO, 2013). Esse autor descreve também que marcadores morfológicos como a coloração do colmo adicionado ao marcador no embrião torna possível a remoção de plantas F₁ da fração dos possíveis haploides em estádios iniciais em casa de vegetação e no campo. Esse método pode ser utilizado após o procedimento de duplicação cromossômica artificial para a seleção de plantas haploides.

Portanto, na identificação de haploides, é mais fácil utilizar o marcador morfológico R1-nj em híbridos de milho do que o uso de populações segregantes quando comparados (EDER; CHALYK, 2002; PRIGGE et al., 2011; RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005). Entretanto, esses autores recomendam que outros métodos para a identificação de haploides, tais como vigor de plântula, coloração do coleóptilo, quantidade de óleo no embrião e características fenotípicas das plantas durante o seu desenvolvimento devem ser utilizados para eliminar as amostras falso-haploides classificados pelo marcador R1-nj.

2.1.3 Duplicação cromossômica de haploides

A duplicação cromossômica era considerada uma restrição na produção de linhagens duplo-haploides em escala comercial (COUTO, 2013). Isso se devia ao fato da duplicação espontânea ocorrer em baixa frequência. Contudo, atualmente é comum o uso de protocolos de indução de duplicação utilizando agentes antimitóticos, como colchicina e os herbicidas amiprofosfo-metil, orizalina e trifluralina (PIERRE et al., 2011).

Esses compostos inibem a formação do fuso mitótico por se ligarem à tubulina, o que resulta na não segregação das cromátides irmãs e, conseqüentemente, na duplicação cromossômica (CASTILLO et al., 2009). A indução da duplicação pode ser realizada *in vitro*, com os agentes antimitóticos sendo adicionados ao meio nutritivo, ou *in vivo*, aplicando os agentes diretamente nas plântulas ou por imersão das mesmas em soluções antimitóticas (PIERRE et al., 2011).

A duplicação cromossômica em haploides na cultura do milho é feita principalmente por meio do tratamento com colchicina, sendo esta a etapa mais difícil para a produção de duplo-haploides, pois ocorre alta taxa de mortalidade e baixa taxa de duplicação (DANG et al., 2012). Esses autores explicam que embora a colchicina seja um produto químico tóxico para os organismos, a sua aplicação na produção de duplo-haploides continua crescendo, pois não existe outro produto químico que possa competir com ele em termos de eficiência na duplicação cromossômica.

Há diversos protocolos para a realização da duplicação artificial utilizando bloqueadores mitóticos. Um desses protocolos, utilizado por Dang et al. (2012) e descrito por Deimling, Röber e Geiger (1997), consiste em imergir o coleótilo das plântulas, quatro a cinco dias após a germinação, em solução de colchicina a 0,06% e DMSO (dimetil-sulfóxido) a 0,05%, num período de 12 horas. Em seguida, os coleótilos devem ser lavados em água corrente por 20

minutos, e as plântulas então cultivadas em casa de vegetação. Passado duas a três semanas do tratamento, as amostras das folhas mais jovens devem ser coletadas para verificar o nível de ploidia das plantas tratadas.

Após a duplicação cromossômica da planta haploide, é necessário verificar o nível de ploidia, dessa maneira, a identificação do duplo-haploide gerado pode ser feita pelo uso da citometria de fluxo ou de marcadores microssatélites (COUTO, 2013). A técnica de citometria de fluxo consiste na análise de propriedades óticas, como dispersão da luz e fluorescência de partículas que fluem na suspensão líquida. A partir disso, é possível mensurar o conteúdo de DNA de núcleos, permitindo avaliar o nível de ploidia, o teor de DNA de cada cromossomo complemento de uma espécie, entre outras características (BATTISTELLI, 2012). O autor explica ainda que essa técnica quantifica o nível de ploidia por meio da análise da intensidade de fluorescência emitida pelos núcleos corados com fluorocromos específicos para DNA. Esta tecnologia é uma boa alternativa na contagem cromossômica devido à facilidade de preparo da amostra; por ser rápida, podendo ser realizada inúmeras amostras por dia e ser um método não destrutivo.

Dang et al. (2012) realizaram o controle do nível de ploidia utilizando a citometria de fluxo. Nesse trabalho, observaram que, embora a taxa de sobrevivência das plântulas tenha sido alta em todos os híbridos analisados, variando entre 47,2 e 80%, as plântulas se recuperaram lentamente e exibiram fenótipos incomuns, como a ocorrência de folhas retorcidas, plantas anãs e crescimento lento nos primeiros estádios de desenvolvimento. A taxa de duplicação cromossômica observada foi de 30% em média.

Conforme citado acima, os marcadores moleculares microssatélites SSR (Simple Sequence Repeats) também podem ser utilizados na análise do nível de ploidia de uma espécie. Os microssatélites são regiões de DNA compostas de

unidades que se repetem em *tandem*, e tem sido preferido a outros tipos de marcadores, por causa da agilidade da técnica de PCR (COUTO, 2013).

Os marcadores SSR apresentam a característica de codominância que propicia a distinção entre o homocigoto e o heterocigoto. Ou seja, mesmo em genótipos de base genética estreita como o milho híbrido, esses marcadores podem detectar alto número de alelos por loco, sendo também uma alternativa na diferenciação de indivíduos haploides dos F₁ heterocigotos, quando utilizadas linhagens indutoras de haploidia para produzir linhagens duplo-haploides (BATTISTELLI, 2012).

Belicuas et al. (2007) utilizaram marcadores SSR na identificação de haploides em milho com posterior confirmação destes por meio de outras técnicas, como a contagem cromossômica e a citometria de fluxo. Esses autores salientaram a necessidade de tornar essa estratégia facilmente utilizável em programas de melhoramento de milho tropical.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado durante o ano de 2015 na área experimental da empresa Syngenta Seeds (18°55'42"S, 48°10'24"W e 945 m de altitude), localizada no município de Uberlândia – MG.

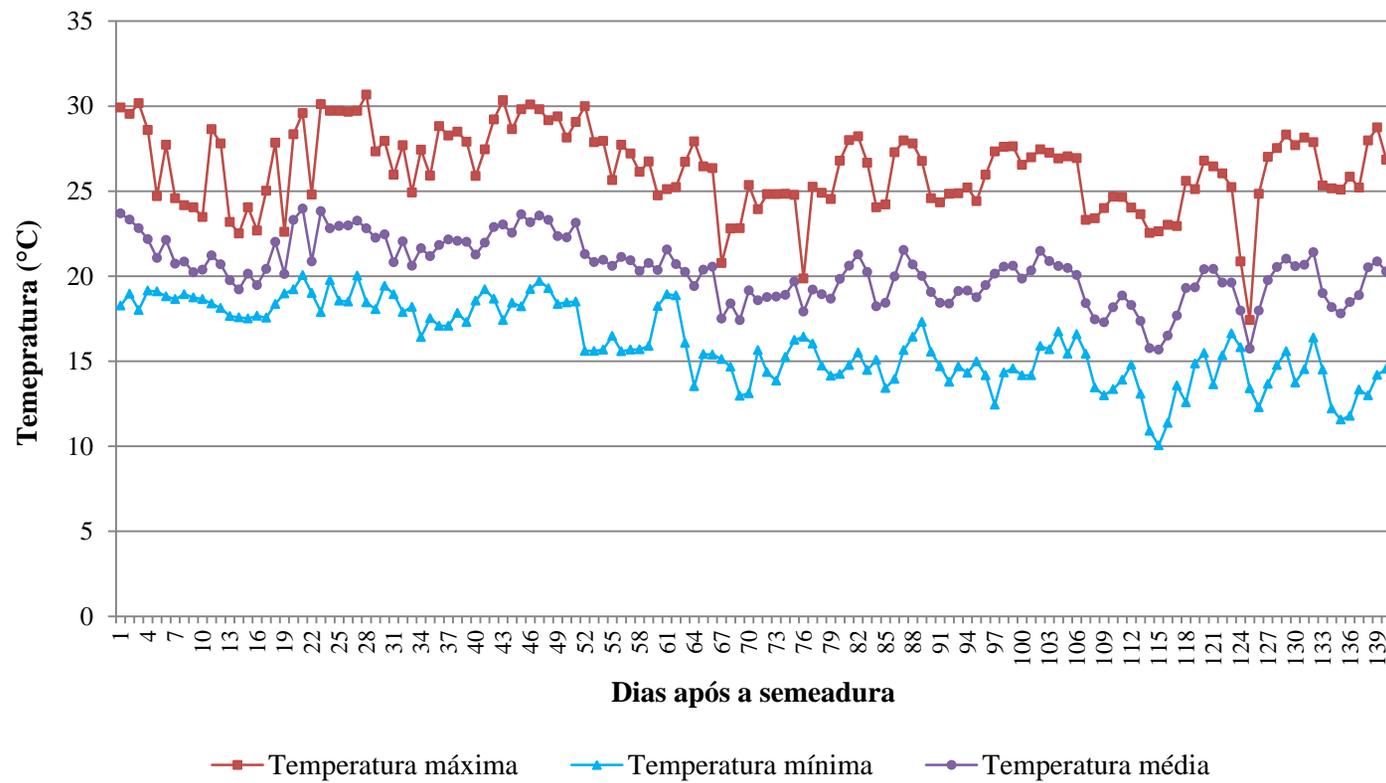
3.1 Obtenção dos haploides

Foram utilizadas seis populações de milho (geração F₁) obtidas a partir do cruzamento de linhagens endogâmicas de um mesmo grupo heterótico. Essas populações foram denominadas Pop. 1, Pop. 2, Pop. 3, Pop. 4, Pop. 5 e Pop. 6.

Cada uma das populações foi cruzada manualmente com três indutores de haploidia, denominados Indutor A, Indutor B e Indutor C. Esses indutores são originários de regiões temperadas, porém foram melhorados no Brasil. Por isso, são considerados “tropicalizados”.

Para obtenção de sincronia entre os genitores masculinos (indutores) e femininos (populações) durante o florescimento, cada indutor foi semeado em três épocas, posteriormente à semeadura das populações, pois os indutores utilizados apresentam maior precocidade. Assim, a semeadura das populações ocorreu em 06 de março de 2015 e dos indutores nas datas 13, 18 e 24 de março de 2015. As temperaturas registradas durante o ciclo da cultura estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1 - Temperaturas registradas entre a semeadura (06/03/2015) e a colheita (21/07/2015) pela Estação Climatológica da Estação Experimental da Syngenta, em Uberlândia – MG.



Dessa forma, o experimento foi constituído por um fatorial 6 x 3 (seis populações e três indutores). Cada população foi semeada em uma linha de 90 m, com cinco plantas por metro e espaçamento de 0,6 m das linhas adjacentes. A linha de 90 m de cada população foi subdivida em três partes de 30 m. Essas partes foram utilizadas para receber pólen de cada um dos três indutores. Cada indutor foi semeado em duas linhas de 90 m externamente às seis linhas com populações.

Em sementeira, utilizou-se o fertilizante formulado 08-20-20 na dose de 500 kg ha⁻¹. A adubação de cobertura foi realizada em duas épocas, nos estádios V₄ e V₈, aplicando-se, respectivamente, 250 e 350 kg ha⁻¹ do fertilizante formulado 20-00-20. Os demais tratamentos culturais foram realizados de forma a suprir todas as exigências da cultura. Quando necessário, utilizou-se irrigação por aspersão em autopropelido.

Na época do florescimento, antes da emissão dos estilo-estigmas, as espigas das populações foram cobertas com sacos plásticos a fim de se evitar contaminação com pólen indesejado. Após a emissão dos estilo-estigmas das populações, os pendões dos indutores foram cobertos com saco de papel kraft. No dia seguinte, esses sacos de papel, contendo pólen do indutor, foram levados até as espigas das populações para polinização de acordo com os cruzamentos preestabelecidos. As espigas polinizadas permaneceram protegidas pelos sacos de papel até o momento da colheita, que foi realizada em 21 de julho de 2015.

3.2 Identificação dos haploides

As sementes resultantes dos cruzamentos foram colhidas com 18% de umidade e secas em secador até atingir a umidade de 13%. Para a identificação das sementes haploides, utilizou-se o método visual levando em consideração a pigmentação roxa do endosperma, conferida pelo marcador morfológico R-narvajo, e a não pigmentação do embrião (CHASE; NANDA, 1965). As

sementes selecionadas foram semeadas, em 07 de setembro de 2015, em bandejas de células individuais, com argila expandida, e conduzidas em casa de vegetação. Após quinze dias de germinação, as plantas consideradas de baixo vigor foram consideradas haploides (Figura 2).

Figura 2 - Seleção de plantas em bandeja após germinação de sementes haploides.



3.3 Duplicação cromossômica

As plantas consideradas haploides foram submetidas ao tratamento para duplicação cromossômica com solução de colchicina (0,06%) e dimetil sulfóxido (0,05%). Para tanto, as raízes das plantas ficaram em contato com a solução por aproximadamente 5 horas.

Posteriormente, as plantas foram lavadas em água corrente por cerca de 10 minutos e replantadas em bandeja de células individuais com substrato vegetal adequado. As plantas foram submetidas à aclimação em casa de vegetação e posteriormente em telado, com o objetivo de adaptação às condições de campo. Nesta etapa foram realizadas duas adubações foliares com o produto Energig (0,5% de boro e 0,7% de cobalto).

3.4 Confirmação dos duplo-haploides

Após 15 dias de aclimação e adaptação, as plantas foram identificadas com etiquetas e transplantadas para o campo. O transplante ocorreu em 05 de outubro de 2015. O espaçamento utilizado foi de 0,6 m entre linhas e 0,2 m entre plantas.

A adubação de base utilizada foi de 550 kg ha⁻¹ do fertilizante formulado 08-28-16. A adubação de cobertura foi realizada nos estádios V₄ e V₈ com 300 kg ha⁻¹ do fertilizante formulado 20-00-20 em cada uma dessas épocas. Os demais tratamentos culturais foram realizados de forma a suprir todas as exigências da cultura. Quando necessário, utilizou-se irrigação por aspersão em autopropelido.

A confirmação de plantas duplo-haploides foi realizada visualmente no campo após as plantas adaptarem-se e desenvolverem-se a ponto de surgir algumas com desempenho e vigor superiores às demais. Essas plantas mais vigorosas foram consideradas como não haploides ou falso-positivo e, então, foram eliminadas do experimento. Este procedimento foi repetido por diversas vezes (semanalmente), a fim de se obter o máximo de eficiência na eliminação das plantas não haploides.

A taxa de obtenção de duplo-haploides (DH) foi calculada a partir da relação de plantas realmente haploides (baixo vigor no campo) e o número de sementes obtido do cruzamento entre híbrido (F1) e indutor.

3.5 Análises estatísticas

As proporções observadas foram avaliadas usando-se a abordagem de modelos lineares generalizados mistos (MLGM), de forma análoga ao proposto por Nunes, Morais e Bueno Filho (2004), uma vez que foi detectada superdispersão. Neste caso, foi empregado o MLGM binomial com a função de ligação logit.

A significância dos modelos foi verificada por análise de *deviance*, com aplicação de teste Qui-Quadrado a 5% de probabilidade. Posteriormente, calculou-se o intervalo de confiança de 95% para as médias. Para tanto, foi utilizada a função GLM do pacote Stats do programa R (R CORE TEAM, 2016).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de *deviance*, o modelo que melhor explicou os resultados foi o que compreendeu a interação entre as populações e as linhagens indutoras de haploidia (TABELA 1). Portanto, a influência de cada um desses fatores na taxa de obtenção de DH dependeu do outro fator.

Tabela 1 - Resumo da análise de *deviance* para os efeitos Indutor e População e para a interação dos mesmos sobre a taxa de obtenção de duplo-haploides.

FV	Graus de liberdade	Deviance	Pr(>Chi)
Indutor (I)	2	128,7	0,00 **
População (P)	5	1127,1	0,00 **
I x P	10	63,9	0,00 **

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste Qui-Quadrado.

Todos os indutores foram capazes de induzir a haploidia nas populações avaliadas (Figura 3). As taxas de obtenção de DH variaram de 0,18 a 5,6%. Os resultados apresentados na literatura científica normalmente são maiores. Por exemplo, Bastistelli (2012) obteve taxas de indução entre 3,7 e 11,6% utilizando o indutor KEMS. Couto et al. (2015) verificaram taxas de indução entre 3,8 e 15,4% utilizando o mesmo indutor. Porém, no presente trabalho a taxa avaliada foi a de obtenção de DH, diferentemente dos demais trabalhos, que avaliaram a taxa de indução a partir da proporção de sementes consideradas haploides. Parte dessas sementes não originam plantas duplo-haploides, devido à presença de falso-positivos ou à mortalidade de plantas após o tratamento com colchicina ou no campo. Logo, a taxa de obtenção de DH normalmente é menor que a taxa de indução. Por isso, as taxas obtidas neste trabalho podem ser consideradas satisfatórias.

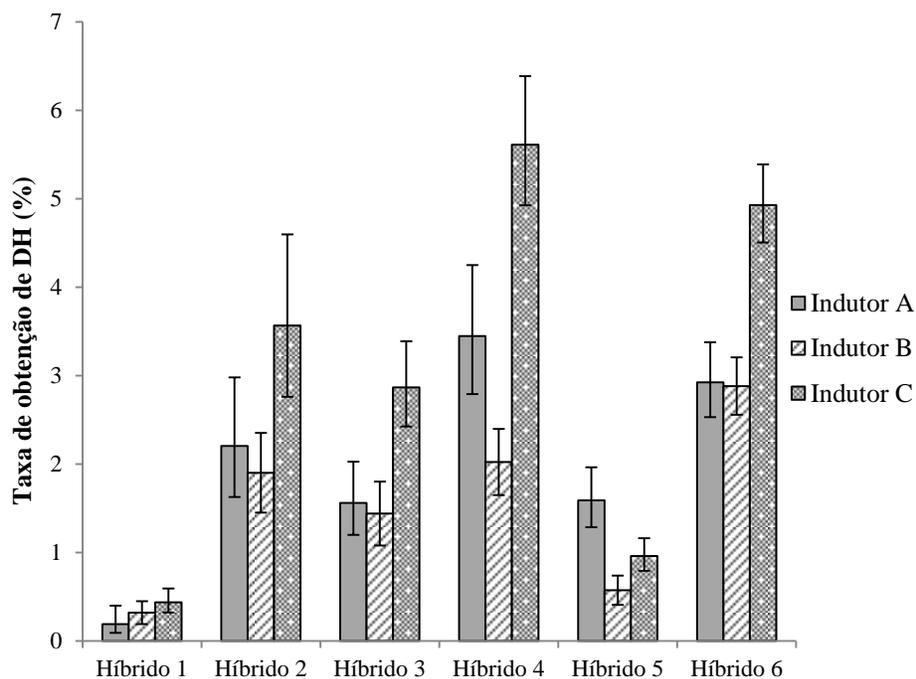
Ainda assim, as taxas de obtenção de DH foram menores que as esperadas. Possivelmente, esses resultados são decorrentes das condições adversas durante a condução do experimento. Estresses bióticos e abióticos têm sido relatados como responsáveis por reduções na taxa de indução de haploidia em milho (KEBEDE et al., 2011). Neste mesmo trabalho, realizado no México, os autores observaram maior taxa de indução no inverno, comparada ao verão. A menor taxa de indução no verão foi atribuída às altas temperaturas.

No presente trabalho, foram verificadas baixas temperaturas durante a época de polinização (aproximadamente entre 55 e 65 dias após a semeadura) (Figura 1). Diferentemente do que foi observado por Kebede et al. (2011), a condução do presente trabalho em época com menores temperaturas pode ter prejudicado a polinização e, conseqüentemente, prejudicado a taxa de obtenção de DH.

Houve sobreposição dos intervalos de confiança dos três indutores na Pop. 1, ou seja, para essa população a taxa de obtenção de DH foi semelhante ao se utilizar qualquer um dos três indutores. Contudo, a taxa de obtenção de DH nessa população foi muito pequena. Logo, possivelmente essa população não é propícia à obtenção de duplo-haploides e, por isso, a diferenciação entre os indutores tornou-se difícil.

Quando a indução foi realizada na Pop. 5, a maior taxa de obtenção de DH foi verificada no cruzamento com o Indutor A. Nas demais populações, as maiores taxas de obtenção de DH foram proporcionadas pelo Indutor C. O Indutor B, em geral, apresentou as menores taxas de obtenção de DH quando comparado aos indutores A e C.

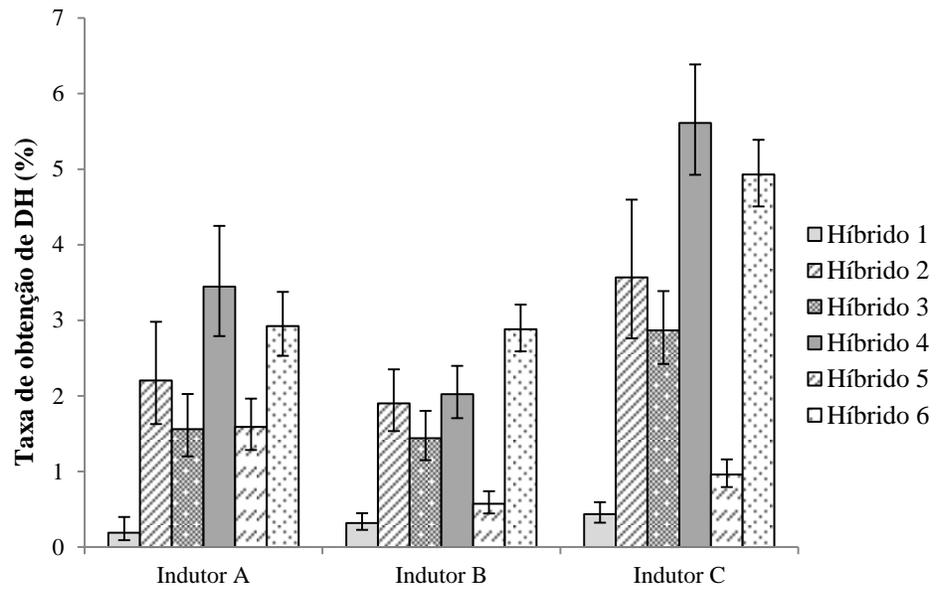
Figura 3 - Desdobramento da taxa de obtenção de duplo-haploides em função dos indutores de haploidia, fixando-se populações.



* Intervalo de confiança de 95%.

Para os indutores A e C foram utilizados, as populações que apresentaram maior taxa de obtenção de DH foram 2, 4 e 6 (Figura 4). Quando foi utilizado o Indutor B, a maior taxa de obtenção de DH foi verificada na Pop. 6. As populações, utilizadas como genitores femininos, apresentam grande influência na taxa de indução (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005). Battistelli et al. (2013), utilizando o indutor KEMS, verificaram diferença significativa na taxa de indução a partir de diferentes híbridos. Por exemplo, verificaram taxa de indução de 4,5% com os híbridos 30F53 e DKB240 e de 11,6% com o híbrido GNZ 2004.

Figura 4 - Desdobramento da taxa de obtenção de duplo-haploides em função das populações, fixando-se indutores de haploidia.



* Intervalo de confiança de 95%.

5 CONCLUSÕES

Os indutores de haploidia e as populações influenciam a taxa de obtenção de duplo-haploides. Além disso, esses fatores interagem entre si.

O Indutor C proporciona as maiores taxas de obtenção de duplo-haploides para a maioria das populações avaliadas. De modo geral, as populações 2, 4 e 6 apresentam as maiores taxas de obtenção de duplo-haploides.

REFERÊNCIAS

BATTISTELLI, G. M. **Estratégias para obtenção e identificação de duplo-haploides em milho tropical**. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

BATTISTELLI, G. M. et al. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, Lavras, v. 12, n. 4, p. 4230-4242, 2013.

BELICUAS, P. R. et al. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 156, n. 1, p. 95-102, 2007.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013. 523 p.

CASTILLO, A. M. et al. Chromosome doubling in monocots. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, 2009. chap. 27, p. 329-338.

CHASE, S. S.; NANDA, D. K. Comparison of variability in inbred lines and monopleid-derived lines of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 5, p. 275-276, 1965.

COUTO, E. G. O. **Indução de haploides e duplicação cromossômica em milho**. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

COUTO, E. G. O. et al. *In vivo* haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 39, n. 5, p. 435-442, set./out. 2015.

DANG, N. C. et al. Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 183, n. 1, p. 145-160, 2012.

DEIMLING, S.; RÖBER, F.; GEIGER, H. H. Methodik und Genetik der in vivo-Haploideninduktion bei Mais. **Vorträge Pflanzenzüchtung**, Quedlinburg, v. 38, n. 1, p. 203-224, 1997.

EDER, J.; CHALYK, S. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 1, p. 703-708, 2002.

GEIGER, H. H.; GORDILLO, G. A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. **Maydica**, Ames, v. 54, n. 1, p. 485-499, 2009.

KEBEDE, A. Z. et al. Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 180, n. 1, p. 219-226, 2011.

MAKUMBI, D. et al. Combining ability, heterosis and genetic diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) under stress and non-stress conditions. **Euphytica**, Wageningen, v. 180, n. 1, p. 143-162, 2011.

NUNES, J. A. R.; MORAIS, A. R.; BUENO FILHO, J. S. S. Modelagem da superdispersão em dados binomiais por um modelo linear generalizado misto. **Revista de Matemática e Estatística**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 55-70, 2004.

PIERRE, P. M. O. et al. Duplo-haploides: estratégias para obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2011.

PRIGGE, V. et al. Development of in vivo haploid inducers for tropical maize breeding programs. **Euphytica**, Wageningen, v. 185, n. 1, p. 481-490, 2012a.

PRIGGE, V. et al. Doubled haploids in tropical maize: I., effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 1, p. 1498-1506, 2011.

PRIGGE, V. et al. New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. **Genetics**, Bethesda, v. 190, n. 2, p. 781-793, 2012b.

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

RÖBER, F. K.; GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. In vivo haploid induction in maize: performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica**, Ames, v. 50, n. 1, p. 275-283, 2005.

SILVA, G. J. et al. **Produção de haploides androgenéticos em milho**. Sete Lagoas: CNPMS-EMBRAPA, 2009. 15 p. (Documentos, 81).

WU, P. et al. Mapping of maternal QTLs for in vivo haploid induction rate in maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 196, n. 1, p. 413-421, 2014.