



PAULA KLOTZ BRANDÃO RODRIGUES

**IDENTIFICAÇÃO DE PROGÊNIES INDUTORAS
DE HAPLOIDIA EM MILHO USANDO
DIFERENTES ESTRATÉGIAS**

**LAVRAS-MG
2019**

PAULA KLOTZ BRANDÃO RODRIGUES

**IDENTIFICAÇÃO DE PROGÊNIES INDUTORAS
DE HAPLOIDIA EM MILHO USANDO
DIFERENTES ESTRATÉGIAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de mestre.

Orientador

Dr. João Cândido de Souza

**LAVRAS-MG
2019**

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

Rodrigues, Paula Klotz Brandão.

Identificação de progênies indutoras de haploidia em milho
usando diferentes estratégias / Paula Klotz Brandão Rodrigues. -
2019.

42 p. : il.

Orientador(a): João Cândido de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. citometria de fluxo. 3. marcador molecular. I.
Souza, João Cândido de. II. Título.

PAULA KLOTZ BRANDÃO RODRIGUES

**IDENTIFICAÇÃO DE PROGÊNIES INDUTORAS DE
HAPLOIDIA EM MILHO USANDO DIFERENTES
ESTRATÉGIAS**

**IDENTIFICATION OF INDUCTION PROGENIES OF HAPLOIDY
IN MAIZE USING DIFFERENTIAL STRATEGIES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2019.
Dr. Welison Andrade Pereira - UFLA
Dra. Marcela Pedroso Rezende - UFG

Orientador

Dr. João Cândido de Souza

**LAVRAS-MG
2019**

*Aos meus avós Renato, Vera e Rosa por serem meus exemplos de
bondade, honestidade e amor ao próximo.
Com muito carinho e saudades, dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre iluminou meus caminhos, guiou minhas escolhas e me abençoou com pessoas muito especiais no meu convívio.

Ao meu pai que sempre me incentivou e me apoiou durante esses anos de estudo. E a toda minha família, por tanto carinho, amor e apoio. Ao meu namorado Guilherme, agradeço pelo amor, paciência, respeito e apoio.

A universidade Federal de Lavras e ao departamento de Biologia pelos anos de aprendizado, oportunidades e crescimento profissional e pessoal. Ao professor João Candido de Souza, minha gratidão pelos ensinamentos, orientação, paciência e dedicação. Aos professores do programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Aos técnicos Lamartine e Felipe por toda ajuda, boa convivência e amizade.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora.

Aos amigos Alice, Brena, Maria Beatriz, Talieiesse, Paula, Rafael, Murilo, Élcio, pela preciosa ajuda e companheirismo. E a todos os meus amigos que me apoiaram e torceram pelo meu sucesso.

MUITO OBRIGADA!

“Não existe um caminho para a felicidade, a felicidade é o caminho.”

(Mahatma Ghandi).

RESUMO

Na cultura do milho, o sucesso de um programa de melhoramento depende do desenvolvimento de linhagens elites para a produção dos híbridos. Uma alternativa para melhorar a eficiência dos programas de melhoramento, de forma a reduzir custos e tempo na produção de linhagens, é a utilização da tecnologia duplo haploide. O sucesso da produção de linhagens duplo haploide, depende de elevadas taxas de indução e da identificação eficiente dos reais haploides. O sistema in vivo de indução de haploidia, se tornou a maior ferramenta na produção de haploides na cultura. O objetivo deste estudo foi recombinar as progênes indutoras de haploidia do programa de genética e melhoramento de plantas da UFLA, selecionar as progênes com maiores porcentagens de indução, identificar haploides pelo marcador morfológico R-navajo e por citometria de fluxo, e também verificar se é possível identificar indivíduos indutores de haploidia utilizando marcadores moleculares. Os experimentos foram realizados em Lavras-MG. Na safra 2017/18 foram recombinadas e autofecundadas progênes S2:5. Os indutores foram cruzados com os híbridos simples P30F90, MG580, 2B810, 30A37, 2B640, 2A620, 2A401. As sementes obtidas foram avaliadas em relação ao marcador morfológico, 196 sementes com endosperma roxo e embrião branco foram selecionadas como possíveis haploides. As sementes selecionadas como possíveis haploides foram germinadas em casa de vegetação e submetidas à citometria de fluxo visando a confirmação da ploidia. O cálculo das taxas de indução foi feito considerando os haploides confirmados pela citometria de fluxo. O DNA de 48 progênes foi extraído, submetido a PCR e observado em gel de agarose a 1%. Nenhum fragmento foi amplificado pelo primer. Observou-se que a manifestação fenotípica do marcador morfológico R1-navajo não é precisa. Portanto, são necessários estudos e aprimoramento das metodologias utilizadas na identificação dos indivíduos haploides de forma a garantir resultados mais precisos sobre as taxas de indução.

Palavras-chave: *Zea mays*, citometria de fluxo, marcador molecular

ABSTRACT

In maize, the success of a breeding program depends on the development of elite lines for the production of hybrids. An alternative to improving the efficiency of improvement programs, in order to reduce costs and time in the production of lines, is the use of double haploid technology. The success of double haploid lines production, depends on high induction rates and efficient identification of the true haploids. The *in vivo* haploid induction system, has become the major tool in haploid production in the crop. The objective of this study was to recombine the haploid inducers progenies of UFLA's plant breeding and genetics program, to select the progenies with the highest percentages of induction, to identify haploids by the R-Navajo morphological marker and by flow cytometry, and also to verify if it is possible to identify individuals inducers haploid using molecular markers. The experiments were carried out in Lavras-MG. In the 2017/18 crop, S2: 5 progenies were recombined and self-fertilized. Inducers were crossed with the single hybrids P30F90, MG580, 2B810, 30A37, 2B640, 2A620, 2A401. The seeds obtained were assessed in relation to the morphological marker, 196 seeds with purple endosperm and white embryo were selected as possible haploids. The seeds selected as possible haploids were germinated in a greenhouse and submitted to flow cytometry to confirm ploidy. The calculation of induction rates was done considering haploids confirmed by flow cytometry. DNA from 48 progenies was extracted, submitted to PCR and observed on 1% agarose gel. No fragment was amplified by primer. It was observed that the phenotypic manifestation of the R1-Navajo morphological marker is not precise. Therefore, it is necessary to study and improve the methodologies used to identify haploid individuals in order to ensure more accurate results on induction rates.

Keywords: *Zea mays*, flow cytometry, molecular marker

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
1.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1.	Duplo-haploides no melhoramento de milho.....	13
2.2.	Indução de haploidia.....	15
2.3.	Métodos para certificação da haploidia	17
2.3.1.	Marcador R-1 navajo.....	17
2.3.2.	Citometria de fluxo.....	19
2.4.	Marcadores moleculares para selecionar indutores	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1.	Área Experimental.....	22
3.2.	Material genético utilizado e obtenção dos haploides	23
3.3.	Identificação de haploides	24
3.3.1.	Marcador Morfológico R-navajo.....	24
3.3.2.	Citometria de fluxo.....	24
3.3.3.	Análises dos dados.....	26
3.4.	Extração e amplificação do DNA genômico.....	26
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1.	Marcador morfológico R-1 navajo	28
4.2.	Citometria de fluxo	30
4.3.	Taxa de indução de haploidia	32
4.4.	Seleção dos indutores por meio de marcador molecular	34

5. CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor, e segundo maior exportador mundial, de milho, cereal de maior produção no mundo (CONAB, 2018). Devido ao aumento na demanda por alimentos e pressão sob as áreas cultiváveis, ganho em produtividade é o principal objetivo de programas de melhoramento. Na cultura do milho o aumento do rendimento de grãos por área se deve entre outros fatores, ao desenvolvimento de híbridos com genética superior.

No processo de obtenção do milho híbrido, estão envolvidas as etapas: obtenção das linhagens endogâmicas, teste de capacidade de combinação e a produção das sementes. A obtenção das linhagens é a etapa mais demorada e de custo elevado, pois são necessárias 6 a 8 gerações de autofecundações até que se atinja quase completa homozigose dos locos (PATERNIANI E CAMPOS 1999).

Uma alternativa para a obtenção de linhagens endogâmicas em menor espaço de tempo é a utilização da tecnologia duplo haploide (DH), reconhecida mundialmente como um meio importante para melhorar a eficiência dos programas de melhoramento genético de milho, visto que acelera significativamente o processo de produção de linhagens completamente homozigotas.

O processo de obtenção de linhagens DH envolve a seleção da linhagem indutora de haploidia, cruzamento da linhagem indutora com um doador desejado para a obtenção dos possíveis haploides, identificação dos possíveis haploides, duplicação cromossômica das

sementes selecionadas e multiplicação e seleção das linhagens DH. Apesar das vantagens do método, o uso de DH é limitado principalmente pela dificuldade de geração de linhagens a partir dos haploides devido à baixa eficiência das metodologias de duplicação cromossômica.

O sucesso da obtenção de linhagens DH depende inicialmente de um indutor de haploidia. O sistema *in vivo* de indução de haploidia baseado na descoberta da linhagem indutora stock 6 (COE 1959) e as demais linhagens indutoras melhoradas se tornaram a principal ferramenta na produção de haploides no milho. A taxa de indução de haploides tem sido o principal foco em programas de melhoramento.

As linhagens indutoras que se destacaram inicialmente foram a Wisconsin 23 e Stock 6. A partir dessas linhagens surgiram outras com taxas de indução variáveis. O método progrediu em relação as taxas de indução que eram de 2,3% no início dos anos 60 (COE 1959) e atualmente existem taxas mais elevadas como as dos indutores do CYMMIT, TAIL 8 e TAIL 9 que apresentam taxas de indução entre 8 e 12% (CHAIKAM et al, 2016).

Para a obtenção da taxa de indução é necessária a confirmação dos indivíduos haploides. A fim de evitar desperdícios de recursos e tempo, é necessária precisão na confirmação dos reais haploides obtidos nos cruzamentos. Existem diversas técnicas utilizadas para identificação de indivíduos haploides, como marcadores morfológicos, marcadores de DNA, citometria de fluxo, contagem cromossômica e vigor de plântulas. O marcador visual R1-navajo vem sendo amplamente utilizado, mas nem sempre é uma ferramenta confiável, visto que pode ser influenciado pelo ambiente, e por outros fatores que podem inibir a identificação do

haploide pelo R1-navajo. Portanto, é importante associá-lo a outras metodologias que garantam a seleção de reais haploides. A citometria de fluxo, apesar da necessidade de amostras de planta de alta qualidade e do citômetro de fluxo, aparelho de elevado custo, destaca-se como alternativa na determinação do nível de ploidia quando comparada aos métodos clássicos, por ser uma técnica precisa e por permitir várias amostras por dia.

Estudos recentes indicam que um QTL chamado qhir 1 é essencial na indução de haploides em milho. Kelliher et al. (2017) relataram através de mapeamentos que esta região contém sete genes. Estudos de sequenciamentos indicam uma mutação de inserção de 4pb no alelo do gene MATRILINEAL (MTL) na linhagem indutoras de haploidia Stock 6 e sua derivada RWK. O alelo mutante foi chamado matrilineal (mtl) e os dados sugerem que a mutação seja responsável pela indução devido à perda de função do alelo. A partir das informações obtidas nesse trabalho, uma maneira de identificar os indutores seria por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélite.

No programa de Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Lavras encontram-se progênies indutoras de haploidia em milho apresentando taxas de 1,93% de indução de haploides.

Diante do exposto, é importante fazer o estudo das melhores progênies indutoras de haploidia da Universidade Federal de Lavras. Objetivou-se neste trabalho recombinar as progênies indutoras de haploidia existentes no Programa de Genética e Melhoramento de Plantas da UFLA, selecionar as que apresentaram as maiores taxas de indução, e

verificar se é possível selecionar indivíduos indutores por meio do uso de marcadores moleculares.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Duplo-haploides no melhoramento de milho

O atual desafio dos melhoristas é obter genótipos superiores com boa capacidade de combinação e caracteres agronômicos favoráveis. Na cultura do milho, destaca-se o híbrido devido à sua padronização de produção que facilita o manejo da cultura e a expressão de alto vigor e produtividade (CONAB 2018).

A obtenção de híbridos com alto desempenho é proveniente do cruzamento entre linhagens elites (PATERNIANI e CAMPOS, 1999). O processo tradicional para obtê-las envolve a seleção de indivíduos com médias elevadas para os caracteres desejados, ou seja, alta frequência de alelos favoráveis, seguida de autofecundação. Os descendentes de cada indivíduo S1 são semeados em linha e submetidos à avaliação de acordo com os caracteres de interesse. As plantas selecionadas são autofecundadas a fim de aumentar a taxa de homozigose. Esse procedimento de avaliação e autofecundação é repetido por seis a oito ciclos (PATERNIANI e CAMPOS, 1999) até que se obtenha uma linhagem com cerca de 99% de homozigose (PATERNIANI e CAMPOS, 1999; FORSTER e THOMAS, 2005; GEIGER e GORDILLO, 2009; CHANG e COE, 2009; PRASANNA et al, 2012).

Uma alternativa disponível na cultura do milho para acelerar o processo de obtenção de linhagens é o emprego da tecnologia duplo haploide, que consiste na produção de linhagens homozigotas instantâneas pelo uso de haploides duplicados (CHASE, 1952).

A aplicação da tecnologia duplo haploide reduz o tempo de desenvolvimento das linhagens em mais da metade quando comparado com o método tradicional e fornece vantagens genéticas, operacionais, logísticas e econômicas (NEI 1963; SCHMIDT 2003; MELCHINGER et al. 2005; SEITZ 2005; SMITH et al. 2008; CHANG e COE 2009; GEIGER 2009).

Segundo Geiger e Gordillo (2009), a tecnologia do DH simplifica a logística, pois exige menos tempo, trabalho e recursos financeiros no desenvolvimento de novas linhagens; tais recursos podem ser direcionados para a liberação acelerada de cultivares elite.

Uma vantagem do DH relacionada ao melhoramento é a maior exploração da variância aditiva. Considerando um processo normal de autofecundação, dois locos independentes segregando entre os genitores com genótipo AAbb e aaBB, em uma população F₂ o genótipo recessivo aabb ocorre na frequência de 1/16. Entretanto, quando ocorre a indução da haploidia e posterior duplicação cromossômica, o mesmo genótipo ocorrerá na frequência de 1/4 na população devido à ausência dos genótipos heterozigotos, prevalecendo apenas os genótipos AABB, AAbb, aaBB e aabb (PRIGGE et al., 2011). Dessa maneira, a variância aditiva é maximizada e a seleção de características quantitativas pode ser facilitada (BORDES et al., 2006). Permite maior eficiência e precisão da seleção para alguns caracteres agronômicos (ROBER et al., 2005;

GEIGER e GORDILLO, 2009), especialmente quando combinada com o uso de marcadores moleculares (PRASANNA et al. 2012). Segundo Prasanna et al. (2012), pode-se também acelerar o desenvolvimento de híbridos superiores pela rápida piramidação de alelos favoráveis para caracteres poligênicos como a produtividade e a resistência a estresses ambientais.

2.2. Indução de haploidia

Os indivíduos haploides, de modo geral, apresentam plantas de baixo vigor quando comparadas com diploides, e são mais sensíveis às variações ambientais e ao ataque de doenças e pragas. Portanto, não apresentam aplicação direta na agricultura, como cultivares. No melhoramento são utilizados no desenvolvimento de cultivares dando origem aos duplo- haploides (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2012).

Um duplo haploide é um genótipo formado quando células haploides conseguem realizar a duplicação cromossômica, espontaneamente ou induzidas artificialmente (PRASANNA et al., 2012). A planta haploide é de fundamental importância para a obtenção de linhagens duplo-haploides, uma vez que, a partir da duplicação das células do meristema das sementes haploides serão originadas inflorescências férteis. Se essas células que dão origem às inflorescências tornarem-se diploides, então a fertilidade é restaurada, e obtém-se o indivíduo duplo-haploide (MELCHINGER et al., 2015).

Segundo Chase (1963), a ocorrência de haploides naturais em milho é de uma em cada mil, ou seja, insuficiente para ser utilizada em

programas de melhoramento de milho. Para aumentar a frequência de duplo-haploides (DH), podem ser utilizados diferentes métodos, tais como: *in vivo*, cultura de anteras e micrósporos e cruzamentos interespecíficos (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO e BORÉM, 2012). A indução *in vivo* tem sido preferida em virtude de sua maior eficiência e baseia-se na utilização de linhagens indutoras de haploides (Geiger e Gordillo, 2009). Pode-se definir como linhagem indutora qualquer planta capaz de impedir a formação do embrião diploide, fazendo com que o material genético do embrião permaneça haploide (DANG et al., 2011).

Inicialmente, duas linhagens indutoras de haploidia se destacaram. A primeira delas foi desenvolvida a partir de uma linhagem denominada Stock 6 (COE, 1959). A porcentagem de indução observada na Stock 6 foi de 3,23% (SARKAR e COE JUNIOR, 1966). A linhagem indutora Stock6 gera haploides de origem materna ou gimnogenéticos. O mecanismo de indução de haploidia dessa linhagem não é bem conhecido (ROTARENCO et al., 2009). No caso dos indutores gimnogenéticos, o genitor masculino é a linhagem indutora doadora de pólen, e o parental feminino tem o genótipo desejado. Portanto o haploide resultante tem genótipo materno. Quando se utiliza um indutor gimnogenético, o manejo no campo é mais fácil, uma vez que vários genótipos podem ser induzidos simultaneamente (FRITSCHÉ- NETO; GARBUGLIO; BOREM, 2012). A outra linhagem, conhecida como Wisconsin 23 (W23), gera haploides androgenéticos. A taxa de indução é relativamente menor, variando de 1 a 3% (KERMICLE, 1969, 1973). No caso dos indutores androgenéticos, a planta utilizada como genitor feminino é a linhagem indutora que recebe o pólen do parental masculino do qual se deseja extrair as linhagens.

Dessa forma, o embrião será formado a partir do núcleo reprodutivo do grão de pólen (FRITSCHÉ- NETO; GARBUGLIO; BOREM, 2012).

Baixas taxas de indução dos indutores limitavam a utilização de haploides em programas de melhoramento genético. Buscando por melhorias das taxas de indução de haploides das linhagens Stock 6 e W23 foram geradas inúmeras outras. A maioria das linhagens indutoras existentes está relacionada com a Stock6 (RÖBER et al., 2005). Pelo cruzamento entre Stock 6 e W23, Lashermes e Beckert (1988) obtiveram a linhagem WS14 com taxa de indução de 3 a 5%. Do cruzamento da linhagem Stock 6 com a WS14 foram obtidas as linhagens ZMS e KMS, e o cruzamento da ZMS com KMS deu origem a linhagem MHI com taxa de indução de em média 6,5% de haploides. (EDER, CHALYK, 2002). Do cruzamento entre a linhagem WS14 e KEMS foi obtida a linhagem indutora RWS, com 8 a 10% de haploides gminogenéticos (RÖBER et al., 2005). Atualmente existem taxas mais elevadas como as dos indutores do CIMMYT, TAIL 8 e TAIL 9 que apresentam taxas de indução entre 8 e 12% CHAIKAM et al. (2016). Diante disso, pode-se observar o progresso da capacidade de indução haploide que aumentou de menos de 2% para 6-12% em indutores modernos.

2.3. Métodos para certificação da haploidia

2.3.1. Marcador R-1 navajo

Um sistema de genes marcadores antocianina dominante, *R-navajo* (R1-*nj*) é amplamente utilizado (NANDA e CHASE, 1966; GREENBLATT e BOCK, 1967; CHASE, 1969; EDER e CHALYK, 2002) para a identificação precoce das sementes haploides geradas a partir das linhagens indutoras. Este alelo dominante, quando expresso, promove a pigmentação com antocianina no endosperma e no embrião das sementes diploides, sendo que as sementes haploides apresentam pigmentação somente no endosperma e o embrião sem pigmentação (CHASE e NANDA, 1965).

O endosperma é formado por um tecido triploide, sendo um conjunto haploide proveniente do parental masculino e dois do parental feminino. O embrião é formado por um tecido diploide. Como o marcador morfológico *R-navajo* é dominante, esse será expresso no endosperma e não será expresso em um embrião haploide, pois o embrião não contém o genoma da linhagem indutora que carrega o alelo marcador. O alelo marcador R1-*nj* tem penetrância incompleta e expressividade variável, não fornecendo uma indicação precisa das sementes haploides (RABEL, 2008).

A expressão da antocianina é controlada por um grande número de genes e isso dificulta o seu uso em análises de pureza genética, pois durante o processo de melhoramento pode ocorrer segregação ou variabilidade de expressão (SINGH & SARKAR, 1982). Além disso, a presença de alelos inibidores de coloração (CHAIKAM et al., 2014; CHAIKAM et al., 2016), elementos transponíveis (ERHARD JR et al., 2013) ou a ação de fatores ambientais (CHASE, 1969) pode influenciar ou inibir a identificação do haploide pelo R1-*navajo*.

2.3.2. Citometria de fluxo

No melhoramento de plantas, a citometria de fluxo é uma metodologia utilizada para identificação de indivíduos haploides, que quando comparada a outros métodos, é considerada atual, rápida e confiável. Seu emprego para a determinação do nível de ploidia tem sido bem sucedido em muitas espécies cultivadas. Esta técnica é uma das mais empregadas em estudos envolvendo DH em milho (BELICUAS et al. 2004; DANG et al., 2011; RABEL, 2008). Sua principal característica é a análise de parâmetros ópticos de partículas coradas em suspensão. Os sinais gerados pelas partículas são convertidos em valores digitais, armazenados e exibidos na forma de histogramas (DOLEZEL, 1997). Essa técnica possui dentre as principais vantagens facilidade na preparação e rapidez da amostra, permitindo várias análises das amostras em um único dia; não necessita de células em divisão; é um método não destrutivo, uma vez que uma amostra pode ser preparada a partir de 50mg de tecido foliar; e é capaz de detectar mixoploidias (LOUREIRO & SANTOS, 2004).

Esta técnica permite mensurar o conteúdo de DNA dos núcleos, fazer comparações intra e interespecíficas do tamanho nuclear, avaliar o teor de DNA de cada cromossomo do complemento de uma dada espécie, realizar estudos do ciclo celular, entre outros e o nível de ploidia é

avaliado a partir desses dados. (HESLOP HARRISON; SCHWARZACHER, 2001).

Os histogramas são obtidos no citômetro de fluxo a partir de um pico referente às fases G1 e G2 do ciclo celular. Nos eucariontes, o crescimento e a divisão celular são processos cíclicos. Basicamente, a intérfase corresponde ao tempo entre cada mitose e encontra-se dividida em três fases: G1, S e G2. Durante a fase G1, período de crescimento celular, uma célula diploide apresenta um conteúdo 2C apresentando assim duas cópias de cada cromossomo. Durante a fase S ocorre a duplicação do DNA, e, portanto na fase seguinte, denominada de G2, em que ocorre o segundo período de crescimento celular, o conteúdo de DNA é 4C. Em seguida, ocorre a mitose, denominada fase M, em que a célula se divide formando duas células filhas, cada uma com um conteúdo 2C de DNA (RAMALHO et al., 2012). Quando uma planta está em desenvolvimento, com as células em divisão, o número de núcleos na fase G1 é maior do que o número de núcleos na fase G2. Assim, quando os citômetros realizam suas leituras, os histogramas são obtidos de maneira que se observa um pico de maior intensidade devido à fase G1 do ciclo celular, enquanto que normalmente, a fase G2 apresenta um pico de menor intensidade. A estimativa do nível de ploidia é realizada comparando-se os picos G1 do histograma de uma amostra, com o pico de uma amostra de planta padrão com o nível de ploidia conhecido (DOLEZEL, 1997).

2.4. Marcadores moleculares para selecionar indutores

Marcadores genéticos ou moleculares são fenótipos moleculares originários de um gene ou de um segmento de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Belicuas et al. (2007), Herpich (2012), Rabel (2008) e Couto et al. (2013), realizaram a identificação de haploides em milho com o uso desses marcadores. Battistelli (2012), Couto et al. (2013) e Herpich (2012) a utilizaram para confirmação da obtenção de linhagens duplo-haploides.

A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) destaca-se pela facilidade de uso, rapidez, versatilidade e sensibilidade. A técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença de enzima e posterior visualização em gel de agarose ou poliacrilamida sob eletroforese (BUENO et al, 2001).

Segundo Nair et al. (2017), estudos genéticos recentes identificaram um QTL chamado qhir 1 atuando na indução *in vivo* de haploides. Mapeamentos desse QTL indicam uma região de 0,57Mb que contém sete genes (KELLIHER et al. 2017). Foram feitos estudos de sequenciamentos dos sete genes das linhagens indutoras Stock 6 e sua derivada RWK e do não indutor RWK-NIL e foi descoberta uma mutação de inserção de 4pb no alelo do gene MATRILINEAL (MTL) nos indutores Stock 6 e RWK, os dados sugerem que a mutação causa a perda de função do alelo devido ao aparecimento prematuro de um códon de parada, sendo então responsável pela indução de haploides (KELLIHER et al. 2017). Acredita-se que a partir do uso de marcadores moleculares,

como o *primer* desenhado para o alelo *mtl*, poderá ser feita a confirmação de indutores em milho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área Experimental

A primeira safra foi semeada em novembro de 2017, no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Agropecuária – UFLA, localizada no município de Lavras, MG.

As atividades para estudos moleculares para a seleção dos indutores foram realizadas no laboratório de Genética Molecular, localizado no Departamento de Biologia da UFLA.

As sementes haploides identificadas pelo marcador R-navajo foram germinadas em bandeja em casa de vegetação, localizada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

A técnica de citometria de fluxo para a confirmação dos possíveis haploides, selecionados pelo marcador R-navajo foi realizada no laboratório de Cultura de Tecidos, localizado no Departamento de Agricultura da UFLA.

3.2. Material genético utilizado e obtenção dos haploides

Ribeiro (2016) selecionou 14 plantas de uma população S0 indutora, oriunda do cruzamento da linhagem KEMS (SHATSKAYA et al., 1994) com outras linhagens de origens diversas. Tal população foi submetida à seleção recorrente.

No presente trabalho, na safra 2017/2018, 300 sementes S_{2:5} provenientes de 6 progênies S_{2:4} com maiores porcentagens de indução de haploides foram semeadas. Os indivíduos das progênies S_{2:5} que germinaram, foram autofecundados, para avançar a geração de endogamia e manter o genótipo, e simultaneamente foram cruzados com genótipos testadores. Nesses cruzamentos, esses indivíduos S_{2:5} foram utilizados como parental masculino, uma vez que seus genitores apresentam o sistema gimnogênico de indução de haploidia e os híbridos simples P30F90, MG580, 2B810, 30A37, 2B640, CD3612, 2A620, 2A401 foram utilizados como genótipos testadores.

De forma a garantir a não contaminação dos cruzamentos, as primeiras espigas de todos os indivíduos indutores e híbridos foram cobertas com saco plástico antes da emissão estilo-estigma para que este não fosse exposto a pólen indesejado antes do cruzamento que foi feito manualmente. No momento do florescimento, o pendão do indutor foi coberto com saco de papel e o pólen coletado. Esse pólen após ser coletado foi utilizado para polinização dos híbridos e para a autofecundação do indutor. A polinização foi feita sobre o estigma receptivo da primeira espiga. Após a polinização, as espigas foram

cobertas novamente com sacos de papel identificados e ficaram protegidas até a colheita.

No momento da colheita, foram colhidas manualmente as espigas das plantas indutoras e também das plantas do híbrido simples cruzadas com o indutor. Logo após a colheita, as espigas foram debulhadas manualmente. As sementes provenientes da autofecundação foram guardadas em câmara fria para manutenção dos genótipos. As sementes provenientes dos cruzamentos dos indutores com os híbridos testadores foram avaliadas quanto à indução de haploidia de acordo com o marcador morfológico R-navajo e posteriormente de acordo com a citometria de fluxo.

3.3. Identificação de haploides

3.3.1. Marcador Morfológico R-navajo

As sementes colhidas dos cruzamentos realizados foram separadas visualmente de acordo com a metodologia descrita por Chase e Nanda (1966). Sementes com embrião e pericarpo roxo foram consideradas diploides, enquanto sementes com endosperma roxo e embrião branco, foram consideradas haploides.

3.3.2. Citometria de fluxo

As sementes identificadas como prováveis haploides pelo marcador R-navajo foram germinadas em casa de vegetação no departamento de Biologia.

As plantas que foram selecionadas como prováveis haploides foram submetidas à citometria de fluxo 7 dias após a germinação visando à confirmação da ploidia e exclusão dos diploides selecionados erroneamente. As análises foram realizadas no laboratório de Cultura de Tecidos.

Para a realização da técnica de citometria de fluxo foi utilizada a metodologia estabelecida por Galbraith (1983), na qual o tecido de, aproximadamente, 50mg de folhas jovens foi macerado com lâminas de bisturi em uma placa de Petri contendo 1mL do tampão de extração LB01 (DOLEŽEL, 1997) modificado, para a obtenção da suspensão nuclear. Após o isolamento dos núcleos, esses foram filtrados por uma rede de nylon com cerca de 50 μ m, de forma a eliminar a maior parte dos resíduos obtidos. Em seguida, os núcleos de cada suspensão foram corados com 25 μ L de iodeto de propídio (1mg mL⁻¹) e analisados no citômetro de fluxo. Os histogramas foram obtidos no citômetro de fluxo *FacsCalibur* (Becton Dickinson) com o programa *Cell Quest* (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA).

Os histogramas obtidos foram analisados pelo software WinMDI 2.8 (2009) para avaliação dos picos de DNA. A estimativa da ploidia de cada amostra foi realizada de acordo com a posição do pico G1, quando comparado à posição apresentada normalmente para a cultura do milho, logo após a marca de intensidade relativa de fluorescência de 10². Nos

casos em que o pico G1 se encontra deslocado para a esquerda dessa marca, a amostra foi considerada como haploide.

3.3.3. Análises dos dados

3.3.3.1. Taxa de indução

O cálculo da taxa de indução de haploidia foi calculado da seguinte maneira: Indução de haploidia = (número de haploides/número total de sementes) x 100

Em que: Número de haploides = sementes confirmadas como haploides pela citometria de fluxo. Número total de sementes = número total de sementes de cada cruzamento

3.4. Extração e amplificação do DNA genômico

O DNA dos indutores foi extraído segundo Doyle e Doyle (1987) no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Após a extração, os DNAs foram quantificados em espectrofotômetro GE Nanovue e diluídos para a concentração de 50ng/μL. Os *primers* foram diluídos para a concentração de 10μM/μL.

Para a amplificação do fragmento correspondente ao alelo do gene foi utilizado *primer* específico (tabela 1) obtido a partir de informações do trabalho realizado por Kelliher et al. (2017).

Para as reações de amplificação por PCR foram utilizados 2 μ L de DNA (100 ng), 1,25 μ L de cada *primer* (10 mM) componente de um par, 1 μ L de dNTP (10 mM), 1,5 μ L de MgCl (50 mM), 1,25 μ L da enzima Taq polimerase (5u/ μ L), 5 μ L de tampão de reação (5 X), 11,75 μ L de água ultrapura, com a exceção do controle negativo, no qual não foi adicionado o DNA e a quantidade de água adicionada será de 13,75 μ L, ambos totalizando o volume de 25 μ L. As reações foram conduzidas em termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems), programado com uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida por 25 ciclos de 95°C por 23 segundos, 66°C por 45 segundos, e 72°C por 2 minutos. Uma etapa final a 72°C por 10 minutos, seguida pela manutenção das amostras em baixa temperatura (4°C). Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1 % por eletroforese a 110V por 70 minutos.

Tabela 1. Sequências do *primer* utilizado para amplificar o alelo mutante *mtl*

<i>Primer</i>	Forward	Reverse
GRMZM2G471240_R WK.	TACGCCGTGCGCTAA CATA	GTACCTCGCTCCCTGT CTCC

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 300 sementes $S_{2:5}$ plantadas, apenas 206 germinaram. Dentre as 206 plantas indutoras, apenas 108 foram utilizadas nos cruzamentos com os híbridos testadores, devido à falta de pólen viável nas demais. Apenas 49 foram autofecundadas devido a não sincronia do florescimento masculino e feminino.

4.1. Marcador morfológico R-1 navajo

De todos os cruzamentos entre progênies indutoras e híbridos testadores, 8 apresentaram sementes com a coloração roxa no endosperma. Do total de sementes desses 8 cruzamentos, 196 foram selecionadas como possíveis haploides. As quantidades de sementes obtidas dos cruzamentos entre os indutores e os híbridos simples, que expressaram a coloração do marcador morfológico R-1 navajo, são apresentadas na tabela 2. As taxas de indução de acordo com os possíveis haploides selecionados pelo marcador R-navajo variaram de 0,67% a 22,38%, em média 5,86%.

Tabela 2. Indutores, híbridos, quantidade total de sementes de cada cruzamento, possíveis haploides selecionados pelo marcador R-navajo e porcentagem de indução

Indutores	Híbridos	Total sementes	Possíveis haploides	% indução
16	2410	232	6	2,59

34	P30F53	352	21	5,97
38	2B640	480	12	2,5
42	CD3612	436	18	4,13
44	CD3612	514	36	7,00
45	CD3612	420	94	22,38
51	MG580	445	3	0,67
96	MG580	360	6	1,67

Observou-se que houve variação na expressão da antocianina entre as sementes. A pigmentação das sementes selecionadas como possíveis haploides variou na forma e no tamanho. Em algumas sementes, o marcador foi facilmente identificado, enquanto que em outras havia um sinal pouco nítido, dificultando a seleção visual.

Segundo Ribeiro (2016), a expressão diferenciada do marcador R1-navajo tem sido observada em diversos estudos e é atribuída as condições ambientais e ao background genético do genótipo doador. De acordo com CHAIKAN et al. (2016), isso se deve principalmente ao fato de que alguns germoplasmas possuem a expressão da antocianina natural no tecido do pericarpo.

Segundo Coe (1994), a expressão do marcador R1-navajo é fortemente influenciada pela presença de alguns genes dominantes que inibem a síntese de antocianina, presentes na planta a ser induzida. Esses genes estão presentes principalmente em genótipos de grãos duros. Resultados semelhantes foram encontrados por Eder e Chalyk (2002). Os autores observaram que, quando se trata de indutores gimnogenéticos, a indução de haploides é muito influenciada pelo tipo de germoplasma

utilizado como parental feminino em relação ao tipo de grãos. A expressão do marcador R1-navajo foi melhor em genótipos dentados e dentados x duros, quando comparada a genótipos com grãos duros. Röber, Gordillo e Geiger (2005) encontraram erros na classificação dos possíveis haploides de 52% para os genótipos doadores com grãos do tipo duro.

Provavelmente os valores de porcentagem de indução encontrados nesse trabalho se devem ao fato de terem sido utilizados diferentes genótipos maternos e seus grãos de textura do tipo semidura. É possível que o gene R1-navajo tenha apresentado expressividade variável e penetrância incompleta.

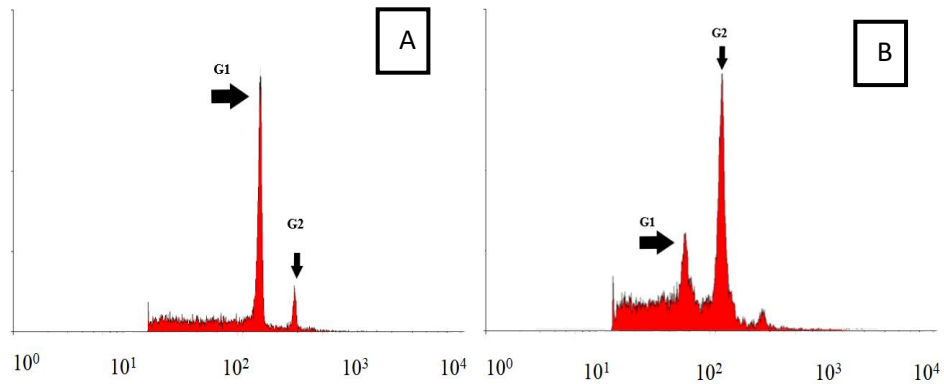
4.2. Citometria de fluxo

Das 196 sementes selecionadas como possíveis haploides, 127 germinaram. Foi realizada a citometria de fluxo nas 127 sementes possíveis haploides de forma a distinguir indivíduos diploides e haploides por meio dos histogramas obtidos pelo método.

A citometria de fluxo, confirmou 5 haploides da progênie indutora 38 e 5 haploides da progênie indutora 45, ou seja, 10 dos 127 avaliados da safra 2017/2018 (figura 1). Os diploides de milho possuem o pico G1 logo após a marca de 10^2 (figura 1A). Nos haploides, o pico G1 se encontra a esquerda da marca de 10^2 (figura 1B).

Figura 1 - Histogramas das ploidias obtido por meio da técnica de citometria de fluxo em plantas de milho. Planta diploide proveniente do indutor 44 (A). Planta haploide proveniente do indutor 38 (B). Eixo

vertical = número de núcleos lidos. Eixo horizontal = intensidade relativa de fluorescência. As setas evidenciam os picos G1 e G2.



Geralmente faz-se a comparação do histograma obtido com o histograma de uma planta padrão, por exemplo, *Vicia faba*, de forma que os dados do histograma da planta padrão possibilitem calcular a quantidade de DNA nuclear contida nas amostras. A quantidade de DNA de indivíduos haploides é a metade da de indivíduos diploides, sendo, portanto possível fazer inferências a respeito do nível de ploidia por meio da quantidade de DNA das amostras. A ploidia dos indivíduos também pode ser determinada por meio da posição do pico G1 da amostra no eixo da intensidade relativa de fluorescência.

Como no presente trabalho não havia interesse na quantidade de DNA das amostras, somente a determinação da ploidia, e visto que para a cultura do milho o ponto de intensidade relativa de fluorescência de cada ploidia já é bem conhecido, não foi utilizado padrão de referencia.

4.3. Taxa de indução de haploidia

O número total de sementes de cada cruzamento, entre híbridos testadores e progênes indutoras, o número de haploides confirmados pela citometria de fluxo, e a taxa de indução dos indutores estão dispostos na tabela 3. A taxa de indução foi calculada utilizando-se os dados de haploides confirmados em relação ao número total de sementes de cada cruzamento.

Tabela 3. Progênes indutoras, total de sementes, haploides confirmados pela citometria de fluxo e % de indução

Progênes indutoras	Total de sementes	Haploides confirmados	% de Indução
16	232	0	*
34	352	-	-
38	480	5	1,04
42	436	0	*
44	514	0	*
45	420	5	1,19
51	445	-	-
96	360	-	-

*todos os possíveis haploides foram identificados como diploides

- todas as sementes não germinaram

Conforme exposto na tabela 3, o indutor 45 apresentou a maior taxa de indução, 1,1905%.

Couto (2013) ao utilizar a linhagem temperada KEMS observou uma média de 9,16% de indução de haploides de acordo com os possíveis haploides selecionados pelo marcador morfológico R1-navajo. Após a citometria de fluxo, tal taxa caiu para 2,85%.

Belicuas et al. (2007) e Rabel (2008) encontraram elevadas porcentagens de indução ao utilizar a linhagem indutora W23 baseados na expressão do marcador R1-navajo. Entretanto, quando utilizaram outros métodos na confirmação da ploidia, observaram alta frequência de falsos haploides. Belicuas et al. (2007) ressaltam que o gene R-navajo apresenta expressividade variável e penetrância incompleta.

Ribeiro (2016) em sua pesquisa observou que a expressão da coloração foi diferente entre as duas safras, e que na primeira safra do total de 5279 sementes selecionadas pelo R-navajo, apenas 552 foram confirmadas pela citometria de fluxo. Na segunda safra de 389, apenas 260 foram confirmadas. Esses dados mostram que o marcador não fornece uma indicação precisa dos haploides. Fazendo com que falsos haploides sejam selecionados, bem como, haploides verdadeiros não sejam selecionados. Ribeiro (2016), Couto et al. (2013), Belicuas et al. (2007) observaram uma eficiência de 1,41%, 1% e 0,86% respectivamente na utilização da coloração do endosperma.

Diante do exposto, é possível concluir que o marcador morfológico R-1 navajo não fornece precisão na seleção dos haploides. Assim, algumas sementes haploides podem não ter sido selecionadas por causa da ausência do marcador morfológico no endosperma afetando a taxa de indução. Portanto a baixa taxa de indução pode ser explicada pela penetrância incompleta do gene R1-navajo.

4.4 Seleção dos indutores por meio de marcador molecular

O *primer* GRMZM2G471240_RWK não amplificou nenhum fragmento e, portanto não foi eficiente neste trabalho.

Tal resultado pode ser explicado pelo fato que no trabalho de Kelliher et al., (2017) o material utilizado foi de origem temperada, enquanto que o material utilizado no presente trabalho foi tropical. A população utilizada também pode ter interferido na amplificação do *primer*. Além disso, outros genes, que não estão ligados a esse marcador, podem estar envolvidos na indução.

É possível que os resultados sejam diferentes se utilizadas outras populações e outros germoplasmas. Portanto, devem ser feitas novas tentativas de selecionar indutores utilizando o *primer* GRMZM2G471240.

5. CONCLUSÕES

A manifestação fenotípica do marcador morfológico R1-navajo não é precisa e, portanto devem ser utilizadas outras metodologias associadas ao marcador para a identificação de haploides.

São necessários estudos e aprimoramento das metodologias utilizadas na identificação dos indivíduos haploides de forma a garantir resultados mais precisos sobre as taxas de indução.

Neste trabalho, não foi possível selecionar os indutores utilizando o *primer* GRMZM2G471240_RWK como marcador molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATTISTELLI, G.M. (2012). **Estratégias para obtenção e identificação de duplo-haploides em milho tropical**. 61p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

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

BORDES, J.; CHARMET, G.; DUMAS DE VAULX, R.; POLLACSEK, M.; BECKERT, M.; GALLAIS, A. Doubled haploid versus family recurrent selection for testcross performance in a maize population, **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 1063-1072, 2006.

BUENO, L.C.S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. **Melhoramento genético de plantas**. Lavras: UFLA, 2001.262p.

CHAIKAM, V. et al. Analysis of effectiveness of R1-nj antochyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. **Theor. Appl. Genet.** V.128, n.1., p.159-171, 2014.

CHAIKAM, V. et al. Development and validation of red root marker-based haploid inducers that effectively complement R1-nj (Navajo) marker-based in vivo haploid identification in maize. **Crop Sci.** v.56, 2016.

CHANG, M.T.; COE, E.H. Doubled haploids. In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry. V.63. Molecular Genetic Approaches to maize improvement**. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, p.127-142, 2009.

CHASE, S. S. Androgenesis, its use for transfer of maize cytoplasm. **Heredity**, Edinburgh, v. 54, p. 152- 158, 1963.

CHASE, S.S. Monoploids and monoploid - derivatives in maize (*Zea mays* L.) **The Botanical Reviews**, v.35, p117-167, 1969.

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

COE, E. H. A line of maize with high haploid frequency. *American Naturalist*, Chicago, v. 93, p. 381-382, 1959.

COE, E. H. Anthocyanin genetics. In: Freeling M., Walbolt, V., eds. **The Maize Handbook**. New York: Springer Verlag, p.279–281, 1994.

COUTO, E. G. O. et al. Identification of haploid maize by flow cytometry, morphological and molecular markers. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 37, n. 1, p. 25-31, jan./fev., 2013.

DANG, N-C. et al. Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality subtropical maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, Zurich, v.183, n.3, Apr., p.153-160, 2011.

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plants genomes. *Journal of Applied Genetics*, Olomouc, v. 38, n. 3, p. 285-302, June 1997.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v.19, p.11-15, 1987.

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

ERHARD JR, K. F. et al. Maize RNA polymerase IV defines *trans*-generational epigenetic variation. **Plant Cell Reports**, v.25, no.3, p.808-819, 2013.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução al uso de marcadores moleculares en el analisis genético**. Brasília, DF: MA/Embrapa/Cenargen. 1998.220p.

FORSTER, B.P.; THOMAS, W.T.B. Doubled haploids in genetics and plant breeding. **Plant Breed Rev.**, v.25, p.57-88, 2005.

FRITSCHÉ-NETO, R.; GARBUGLIO, D. D.; BORÉM, A. In: BORÉM, A. e FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotecnologia aplicado ao melhoramento de plantas**. 1 edição. 335 p.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid Flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, New York, v.220. n. 4201, p. 1049-1051, June, 1983.

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

GEIGER, H. H., 2009 Doubled haploids, pp. 641–657 in *Maize Handbook*, Vol. 2, edited by J. L. Bennetzen, and S. Hake. Springer, New York.

GREENBLATT, I. M.; BOCK, M.. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. **Journal of Heredity**. Washington. v.58. p.9-13, 1967.

HERPICH, M.T. (2012). **Obtenção de linhagens duplo-haploides de milho**. 45p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZER, T. Flow cytometry and chromosome sorting. **Methods in Cell Science**, Norwell, v.23, p.115-124, 2001.

KELLIHER, T., et al. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. **Nature**, v.542, p.105-109, 2017.

KERMICLE, J. L. Androgenesis and the indeterminate gametophyte (ig) mutation: influence of pollen parent on androgenesis frequency. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.47, p.207-208, 1973.

KERMICLE, J. L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science**, New York, v.166, p.1422-1424, 1969.

LASHERMES, P.; BECKERT, M. A genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines, **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 76, p. 405-410, 1988.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. **Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal**. Boletim de Biotecnologia, São Paulo, v. 77, p. 18-29, Abr. 2004.

MELCHINGER, A. E., et al. Colchicine alternatives for chromosome doubling maize haploids for doubles haploid production. **Crop Science**, 2015. doi:10.2135/cropsci2015.06.0383

MELCHINGER, A. E., C. F. H. Longin, H. F. Utz, and J. C. Reif, 2005 Hybrid maize breeding with doubled haploid lines: quantitative genetic and selection theory for optimum allocation of resources. Proceedings of the 41st Annual Illinois Corn Breeders' School 2005, Univ. of Illinois, Urbana-Champaign, IL, March 7-8, 2005, pp. 8-21.

NAIR, S.K. et al. Dissection of a major QTL qhir1 conferring maternal haploid induction ability in maize. **Theor Appl.Genet**, v.130, p.1113-1122, 2017.

NANDA, D. K.; CHASE, S. S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, v.6, p.213-215, 1966.

NEI, M., 1963 The efficiency of haploid methods of plant breeding. *Heredity* 18: 95-100.

PATERNIANI, E; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, p. 429-486, 1999.

PRASANNA, B.M.et al. Doubled haploid (DH) technology in maize breeding: an overview. In: *Doubled Haploid Technology in Maize Breeding Theory and Practice*. Mexico, D.D.: CIMMYT. (eds), 2012.

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, p. 1498-1506, 2011.

RABEL, M. **Haploides androgenéticos em milho tropical**. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RAMALHO, M.A.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.B. **Genética na agropecuária**. Lavras: FAEPE, 1990. 359p.

RIBEIRO, C. B. **Estratégias para obtenção de duplo-haploides e progênies indutoras de haploidia em milho**. 2016, 104 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 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*, Bergamo, v. 50, n. 3/4, p. 275-283, Feb. 2005.

ROTARENCO, V. A.; ADICU, G.; SARMANIUC, M. Induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.83. 2009.

SARKAR, K. R.; COE, E. H. Jr. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. **Genetics**, v. 54, p. 453-464, 1966.

SEITZ, G., 2005 The use of doubled haploids in corn breeding. Proceedings of the 41st Annual Illinois Corn Breeders' School 2005, Univ. of Illinois, Urbana-Champaign, IL, March 7-8, 2005, pp. 1-7.

SHATSKAYA, O, A. et al. Mass induction of maternal haploids in corn. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.68, p., 1994.

SCHMIDT, W., 2003 Hybrid maize breeding at KWS SAAT AG. Proceedings of the Annual Meeting of the Austrian Seed Association, Gumpenstein, Austria, November 25-27, 2003, pp. 1-6 (in German).

SINGH, N.N.; SARKAR, K.R. Anthocyanin pigmentation in various parts of maize plant in relation to line development and seed certification. **Seed Science Research**, v.10, n.1, p.18-26, 1982.

SMITH, J. S. C., T. Hussain, E. S. Jones, G. Graham, D. Podlich et al., 2008 Use of doubled haploids in maize breeding: implications for intellectual property protection and genetic diversity in hybrid crops. *Mol. Breed.* 22: 51–59.