



GUILHERME MENDES BATTISTELLI

**ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO DE DUPLO-HAPLOIDES EM
MILHO TROPICAL**

LAVRAS - MG

2012

GUILHERME MENDES BATTISTELLI

**ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE DUPLO-
HAPLOIDES EM MILHO TROPICAL**

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. Renzo Garcia Von Pinho

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Battistelli, Guilherme Mendes.

Estratégias para obtenção e identificação de duplo-haploides em milho tropical / Guilherme Mendes Battistelli. – Lavras : UFLA, 2012.

61 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Renzo Garcia Von Pinho.

Bibliografia.

1. Milho híbrido. 2. Duplicação cromossômica. 3. Indutores de haploidia. 4. Citometria de fluxo. 5. Linhagens. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

GUILHERME MENDES BATTISTELLI

**ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE DUPLO-
HAPLOIDES EM MILHO TROPICAL**

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 29 de fevereiro de 2012.

Dr. Adriano Teodoro Bruzi UFLA

Dra. Lisete Chamma Davide UFLA

Dr. Renzo Garcia Von Pinho
Orientador

LAVRAS - MG

2012

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por me abençoar em todos os momentos da minha vida.

A minha mãe, Denise; aos meus avós, Odilon e Aparecida; a minha irmã, Bianca; ao meu cunhado, Bruno; a minha madrinha, Ana e a todos meus familiares pelo amor, apoio, incentivo e compreensão em toda a minha vida.

A minha esposa e companheira Ariana Justus, pelo amor e carinho em todo esse tempo que estamos juntos.

À família da minha esposa, pelo apoio.

Aos meus amigos e mentores, Marcos V. Faria e José Wilacildo de Matos, pelo incentivo para a realização deste mestrado.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de plantas e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade e a estrutura concedida para o desenvolvimento deste trabalho e a obtenção do título de mestre.

À Empresa Geneze Sementes S.A., pela concessão da bolsa de estudos, e pelo apoio financeiro e na realização do projeto.

Ao professor Renzo Garcia Von Pinho, pela orientação, oportunidade, conhecimento e apoio.

Ao Heberte Silva e Livia Maria Chamma Davide, pela coorientação, apoio na elaboração e execução do trabalho e pelas valiosas sugestões que enriqueceram o projeto.

Aos membros da banca, Lisete Chamma Davide e Adriano Teodoro Bruzi, pela atenção, sugestões e correções na redação da dissertação.

Aos professores José Airton e Júlio, pela grande contribuição e ajuda nas análises estatísticas.

Aos demais professores do Departamento de Biologia da UFLA, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos professores Lisete Chamma Davide, João Bosco dos Santos, Édila Vilela de Resende Von Pinho e Moacir Pasqual, por disponibilizarem os laboratórios para a realização deste projeto, a aos laboratoristas, pelo auxílio na execução das análises.

Ao pessoal da Hortiagro, por disponibilizar a área de condução dos experimentos.

À equipe de trabalho, Tallyta, Evellyn, Adriano, Ludmila, Leandro, Álvaro e os demais colegas do grupo do milho, pela contribuição na execução dos experimentos e análises laboratoriais.

Aos colegas e amigos Breno, Edivaldo e Matheus, pela amizade, disposição em ajudar, ensinar, aprender junto e por estarem presentes nos momentos de alegrias e dificuldades.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Muito Obrigado!

RESUMO

A obtenção de linhagens duplo-haploides (DH) de milho é uma técnica utilizada pelas empresas privadas, entretanto, pouco difundida nas instituições públicas do país. Pesquisas sobre essa técnica são essenciais para desenvolver e aperfeiçoar a obtenção de linhagens DH em condições tropicais de cultivo. Dessa forma, este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a capacidade de dois indutores com sistemas diferentes de indução de haploidia (androgenético e gimnogenético) em ambientes tropicais, testar a eficiência do marcador morfológico R-navajo e vigor de plântulas na seleção dos haploides, verificar se há interferência da geração dos híbridos doadores na indução de haploides, aferir a capacidade das técnicas de citometria de fluxo e marcadores moleculares SSR na confirmação de duplo-haploides e obter linhagens DH. Sementes dos indutores W23 e KEMS foram semeadas em Ponta Grossa, PR e Cravinhos, SP e as plantas cruzadas com seis híbridos e suas gerações F₂. As sementes obtidas foram separadas conforme o marcador morfológico indicador de haploidia R-navajo (endosperma roxo e embrião branco) e germinadas em ambiente controlado, para uma segunda seleção de haploides baseada no vigor das plântulas. Nas plântulas selecionadas como haploides putativos, foi realizada a duplicação cromossômica, com posterior confirmação da ploidia e sucesso de duplicação pelo uso das técnicas de citometria de fluxo e marcadores moleculares SSR. Pode-se concluir que a produção de linhagens DH utilizando a linhagem indutora W23 (sistema androgenético) é inviabilizada pela baixa porcentagem de indução e produção de sementes. Porém, é possível obter linhagens DH a partir dos híbridos cruzados com o indutor KEMS. A geração de endogamia dos híbridos não interferiu na taxa de indução e na duplicação cromossômica de haploides. O uso da citometria de fluxo e marcadores moleculares SSR é eficiente na comprovação da duplicação cromossômica dos haploides. A utilização do marcador morfológico R-navajo e vigor das plântulas auxilia na identificação dos haploides.

Palavras-chave: Indutores de haploidia. Duplicação cromossômica. Citometria de fluxo. Linhagens duplo-haploides. Milho híbrido.

ABSTRACT

The obtainment of double-haploid lines (DH) of maize is a technique used by private companies, however it is not so widely used by public institutions in Brazil. Researches on this technique are essential in order to develop and improve the obtainment of DH lines under tropical conditions of growth. Thus, this study aimed to evaluate the capacity of two inductors with different systems for induction of haploidy (androgenetic and gynogenetic) in tropical environments; to test the efficiency of the morphological marker R-Navajo and vigor of seedling in haploid selection; to verify the presence of interference by generation of hybrid donors on haploid induction and to measure the ability of flow cytometry techniques and SSR molecular markers on confirming double haploid strains and obtaining DH. Seeds of the inductors W23 and KEMS were sown in Ponta Grossa-PR and Cravinhos-SP and plants were crossed with six hybrids and their F2 generations. The seeds obtained were separated according to the morphological marker that indicates R-Navajo haploidy (purple endosperm and white embryo) and germinated in a controlled environment in order to obtain a second selection of haploids based on the seedling vigor. In seedlings selected as putative haploids, we performed chromosome duplication with subsequent confirmation of ploidy and success of duplication through the use of flow cytometry techniques and SSR markers. We conclude that the generation DH lines using W23 as inductor (androgenetic system) becomes not viable because of the low percentage of induction and seed production, however it is possible to obtain DH lines through hybrids crossed with the inductor KEMS. The generation of inbreeding on hybrids did not affect the rate of induction and chromosome duplication of haploids. The use of flow cytometry and SSR markers is efficient on proving the chromosome duplication of haploids. The use of morphological marker R-Navajo and seedling vigor assist in the identification of haploids.

Keywords: Haploidy Inductors. Chromosome duplication. Flow cytometry. SSR. Double haploid lines. Hybrid maize.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Obtenção de linhagens	11
2.2	Indutores de haploidia	13
2.3	Identificação dos haploides	16
2.4	Comparação entre linhagens duplo-haploides e convencionais	18
2.5	Duplicação cromossômica artificial	19
2.6	Citometria de fluxo para análise de ploidia	21
2.7	Marcadores moleculares SSR na identificação de haploides	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Área experimental	25
3.2	Genótipos avaliados	25
3.3	Obtenção e identificação de haploides	26
3.4	Duplicação cromossômica	27
3.5	Avaliação da duplicação cromossômica por citometria de fluxo	28
3.6	Avaliação da duplicação cromossômica pela fertilidade do pendão	29
3.7	Avaliação da duplicação cromossômica por marcadores microssatélites	30
3.8	Análises estatísticas	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Obtenção de haploides identificados pelo marcador morfológico R-navajo	35
4.2	Seleção de haploides pelo vigor das plântulas	40
4.3	Porcentagem de duplo-haploides identificados pela citometria de fluxo	42
4.4	Porcentagens de plantas que produziram pólen	49
4.5	Confirmação de duplo-haploides utilizando marcadores moleculares SSR	52
5	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior país produtor de milho do mundo, com produção de, aproximadamente, 58 milhões de toneladas de grãos, no ano agrícola 2010/2011 (COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011). A área cultivada com milho nesta safra foi de 13,84 milhões de hectares. Desse total, acima de 90% das sementes utilizadas para plantio são de milho híbrido.

O mercado de sementes híbridas de milho é dominado por empresas multinacionais, que possuem acesso às recentes inovações tecnológicas, como os transgênicos e métodos para a obtenção de linhagens duplo-haploides (DH). Dessa forma, as informações sobre o desenvolvimento de linhagens DH no país são restritas a empresas privadas, dificultando o acesso de outras instituições públicas nacionais.

O uso da técnica de produção de linhagens DH por meio de indutores de haploidia possibilita a produção de novos híbridos num menor tempo e com menor custo, em comparação aos métodos tradicionais. O método tradicional utilizado para a obtenção de linhagens necessita de, pelo menos, seis gerações de autofecundações, até alcançar a homozigose. Utilizando-se a tecnologia de DH, esse tempo pode ser abreviado em dezoito meses, o que aumenta consideravelmente a competitividade e a dinâmica do programa de melhoramento. Essa técnica também permite ao melhorista realizar o *test-cross* com linhagens em vez de progênies endogâmicas.

Na implementação desse método é necessária a utilização de linhagens indutoras que podem gerar haploides paternos ou maternos, dependendo da linhagem empregada. Em geral, essas linhagens indutoras têm origem temperada, dificultando o manejo e o desenvolvimento destas em condições tropicais.

Normalmente, os genótipos que se encontram na geração F_1 são cruzados com as linhagens indutoras para a obtenção de haploides, tornando o processo mais rápido para a obtenção das linhagens. Porém, Bernardo (2009) sugere a obtenção de linhagens duplo-haploides a partir da geração F_2 , para que ocorra uma geração a mais de recombinação.

Para um programa de melhoramento de milho que visa à produção de híbridos a partir de linhagens indutoras de haploidia é essencial identificar ambientes e épocas de semeadura, os quais propiciam um melhor desenvolvimento dessas linhagens. Também é importante identificar os possíveis haploides de maneira rápida e com baixo custo, além de estabelecer, de forma precisa, métodos de duplicação cromossômica e de obtenção das linhagens depois de realizada a duplicação.

A técnica da citometria de fluxo está sendo amplamente utilizada, devido à facilidade e à rapidez na preparação das amostras e na obtenção dos resultados (LOUREIRO; SANTOS, 2004). Pelo fato de avaliar o conteúdo de DNA, essa técnica vem se mostrando uma ótima ferramenta para auxiliar na determinação da eficiência do método de indução de haploidia e o sucesso de duplicação cromossômica. Outra ferramenta utilizada na identificação de haploides são os marcadores moleculares microssatélites (SSR), por serem estáveis e codominantes, possibilitando a separação dos homocigotos dos heterocigotos (F_{1s}) (BELICUAS et al., 2007).

Dessa maneira, este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a capacidade de dois indutores com sistemas diferentes de indução de haploidia (androgenético e gimnogenético) em ambientes tropicais, testar a eficiência do marcador morfológico R-navajo e o vigor de plântulas na seleção dos haploides, verificar se há interferência da geração dos híbridos doadores na indução de haploides, aferir a capacidade das técnicas de citometria de fluxo e marcadores moleculares SSR na confirmação de duplo-haploides e obter linhagens DH.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Obtenção de linhagens

O melhorista de milho tem como um de seus principais objetivos o aumento da produtividade de grãos. E nessa busca por híbridos de alta produtividade, uma das metodologias mais empregadas é o aproveitamento da heterose. A heterose, ou vigor híbrido, é oriunda do cruzamento entre duas ou mais linhagens homocigotas, preferencialmente contrastantes que, quando cruzadas, expressam o máximo vigor híbrido (PATERNIANI; CAMPOS, 1999).

De acordo com Paterniani e Campos (1999), a produção de híbridos com alto desempenho necessita do cruzamento entre linhagens elites. O desenvolvimento dessas linhagens envolve a obtenção de linhagens e o cruzamento posterior com um testador, para identificar as que possuem maior capacidade de combinação. O processo tradicional utilizado para obter linhagens elites implica na autofecundação de várias plantas da população. Os descendentes S_1 são semeados em linha e os melhores são selecionados e novamente autofecundados. O procedimento é repetido até que a maioria dos locos esteja em homocigose. Em geral, após seis a sete autofecundações, obtém-se uma nova linhagem.

Uma alternativa disponível na cultura do milho para acelerar a obtenção de linhagens consiste na produção de linhagens homocigotas instantâneas pelo uso de haploides duplicados, também conhecidos como duplo-haploides ou di-haploides (CHASE, 1952). Essa tecnologia tem se mostrado bastante vantajosa.

Por exemplo, em um processo normal de autofecundação em espécies diploides, considerando apenas dois pares de locos independentes segregando entre os genitores (AA bb) e (aaBB), o genótipo recessivo aabb tem a probabilidade de ser encontrado na proporção de 1/16 em uma população F_2 .

Entretanto, na indução de haploidia, o mesmo genótipo terá a 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) (PIERRE et al., 2011). Com a obtenção de linhas homozigotas, a variância aditiva é maximizada, os efeitos de dominância são neutralizados e as vantagens na seleção de características quantitativas podem ser superiores, uma vez que é realizada somente com base na aditividade, não havendo interferência dos efeitos de dominância e epistasia (BORDES et al., 2006).

Outras vantagens no uso desta tecnologia são a garantia na qualidade das avaliações iniciais dos híbridos, uma vez que todas as plantas geradas de uma única semente haploide serão idênticas geneticamente (MILACH, 2007) e a possibilidade de que sejam herdados blocos gênicos inteiros, sem que tenha ocorrido recombinação (BERNARDO, 2009). No entanto, a maior vantagem desse processo está na redução significativa do tempo para a obtenção de linhagens. De acordo com a empresa Pioneer Sementes (2010), esse processo permite reduzir em, ao menos 18 meses, o tempo necessário para a obtenção de novas linhagens.

A ocorrência de haploides naturais em milho já foi verificada, porém, em uma taxa extremamente baixa. Segundo Chase (1963), esta taxa é de uma em cada mil, ou seja, não suficiente para ser utilizada em programas de melhoramento de milho. Entretanto, têm sido utilizados dois processos para aumentar a frequência de produção de haploides. Um deles é realizado por meio da indução genética (*in vivo*) e o outro, por técnicas de cultura de tecido (*in vitro*). A indução *in vivo* tem sido preferida e baseia-se na utilização de linhagens indutoras de haploides, seguida por duplicação cromossômica (GEIGER; GORDILLO, 2009).

2.2 Indutores de haploidia

Inicialmente, duas linhagens indutoras de haploidia se destacaram: Stock6 e W23. A primeira delas foi desenvolvida a partir de uma variedade denominada Stock6 (COE, 1959) que, quando autofecundada, produziu uma frequência de haploides em torno de 3,2%. A linhagem indutora Stock6 gera haploides de origem materna ou gimnogenéticos. Várias iniciativas foram realizadas no intuito de aumentar as frequências de indução de haploides com indutores melhorados. Em condições temperadas, a partir das linhagens Stock6 e W23, foram geradas inúmeras outras linhagens indutoras com maiores taxas de indução de haploidia.

Lashermes e Beckert (1988) cruzaram a linhagem W23 com a linhagem Stock6 e obtiveram a linhagem indutora WS14, com taxa de indução de 3% a 5%. Sarkar et al. (1994) conseguiram uma taxa de indução de 6% nos cruzamentos realizados. As linhagens indutoras ZMS e KMS também foram derivadas da Stock6 e o cruzamento delas deu origem à linhagem MHI que induz, em média, 6,5% de haploides (CHALYK, 1999). A linhagem indutora RWS foi recentemente desenvolvida e caracterizada por Röber, Gordillo e Geiger (2005). Esta surgiu a partir do cruzamento entre as linhagens indutoras WS14 (LASHERMES; BECKERT, 1988) e KEMS (SHATSKAYA et al., 1994). Com a sua utilização, de 8% a 10% dos descendentes são haploides derivados da planta mãe.

De acordo com Geiger e Gordillo (2009), existem duas hipóteses dos mecanismos concebíveis que podem explicar a ocorrência de haploides de origem maternal. A primeira hipótese propõe que um dos dois núcleos reprodutivos do grão de pólen do indutor tenha uma alteração, mas ainda seja capaz de se fundir com a oosfera e, durante as divisões celulares subsequentes, os cromossomos do indutor se degeneram e são gradualmente eliminados das

células primordiais. O outro núcleo reprodutivo se funde com os núcleos polares, formando o endosperma triploide. A segunda hipótese sugere que um dos núcleos reprodutivos do grão de pólen não é capaz de se fundir com a oosfera, mas pode provocar a embriogênese haploide, e o segundo núcleo reprodutivo se une com os núcleos polares, formando o endosperma, como na primeira hipótese.

Os estudos de Wedzony, Röber e Geiger (2002) evidenciaram, experimentalmente, a primeira hipótese. Os autores fixaram os ovários de plantas autofecundadas do indutor RWS em intervalos regulares, durante os primeiros 20 dias após a polinização. De acordo com a taxa de indução do RWS, 18 dos 203 embriões continham os micronúcleos em todos os primórdios das células. Os micronúcleos variaram em número e diâmetro, exibindo características típicas de cromatinas metabolicamente inativas. Em algumas placas equatoriais, fragmentos de cromossomos também foram observados. A eliminação dos micronúcleos se inicia durante o estado globular da embriogênese. Essas observações são indiretamente encontradas nos resultados de Fischer (2004) e Li et al. (2009).

Em todos os estudos, pequenas frações do genoma indutor foram detectadas nos indivíduos haploides por meio de técnicas de marcadores moleculares. No experimento de Fisher (2004), usando indutor RWS, foi detectado, em 1,4% dos haploides, o DNA paterno. Li et al. (2009), utilizando a linha indutora chinesa CAUHOI, identificou que, em média, 1,8% do genoma indutor foi transmitido. Geralmente, os segmentos transmitidos têm substituído os segmentos homólogos maternos. CAUHOI é um genótipo com alto teor de óleo. Dessa forma, a transmissão paterna também pode ser confirmada por um aumento da concentração de óleo em alguns haploides carregando segmentos cromossômicos do indutor.

Rotarenco, Adicu e Sarmaniuc (2009) polinizaram duas linhas puras doadoras com duas linhas de indutores e seus F₁. Amostras representativas do campo cultivado com progênies haploides revelou diferenças significativas entre os indutores para altura de planta, comprimento da folha, largura da folha, comprimento da espiga e número de sementes, em 9 de 25 casos. Isso indica, novamente, a possibilidade de transmissão paterna e parece que é um fenômeno comum de alguns indutores.

Até agora, nenhuma evidência experimental tem sido relatada em apoio à segunda hipótese. No entanto, é concebível que os indutores com anomalias reprodutivas, como microsporocitos aneuploides (CHALYK et al., 2003) ou aumento na taxa de heterofertilização (ROTARENCO; EDER, 2003), podem ser capazes de induzir a embriogênese haploide, devido a não penetração de um dos núcleos reprodutivos na oosfera.

A outra linhagem, conhecida como Wisconsin 23 (W23), gera haploides androgenéticos a uma taxa que varia de 1% a 3% (KERMICLE, 1969, 1973). Segundo Kermicle (1973), os haploides são gerados por influência de uma mutação espontânea, devido ao alelo recessivo denominado gametófito indeterminado (*ig*), sendo de origem paterna, ou seja, androgenéticos. Este gene está localizado no braço longo do cromossomo 3 a 90 cM do loco *lg*², o mais distal do braço curto (LASHERMES; BECKERT, 1988) e causa algumas alterações no desenvolvimento do saco embrionário. Assim, em uma megasporogênese normal, ocorrem três mitoses sucessivas, resultando em um saco embrionário com oito núcleos. Sob a ação do gene *ig*, algumas megasporogêneses sofrem quatro ou mais mitoses, resultando em um saco embrionário com 16 núcleos ou mais, em vez de oito núcleos normalmente observados (LIN, 1981). Como resultado dessas divisões mitóticas adicionais, o indivíduo mutante que apresenta o alelo *ig1* exibe heterofertilização, poliembrião e variação no nível de ploidia do endosperma depois da

fertilização. Segundo Lin (1981), provavelmente, os sacos embrionários com oosfera degenerada favorecem o desenvolvimento de um núcleo reprodutivo de grão de pólen, sem a ocorrência de fertilização, dando origem a um embrião haploide.

Kermicle (1969) observou que metade das sementes de uma espiga provenientes de plantas que contêm o alelo *ig* em homozigose recessiva é defeituosa e um quarto das sementes provenientes de plantas que contêm o alelo *ig* em heterozigose também são defeituosas.

A linhagem W23 tem sido utilizada em pesquisas no Brasil (BELICUAS et al., 2007; RABEL, 2008). Segundo Belicuas et al. (2007), em condições tropicais de cultivo, a W23 é capaz de produzir haploides androgenéticos, mas é suscetível ao ataque de doenças e sensível ao calor e ao fotoperíodo.

2.3 Identificação dos haploides

O uso de haploides *in vivo*, em escala comercial, é possível devido a uma marcação morfológica nas sementes de milho, permitindo ao melhorista separar as sementes haploides e diploides obtidas do cruzamento do doador com o indutor. Chase e Nanda (1965) descreveram o sistema de marcador fenotípico baseado na pigmentação por antocianina determinado pelo gene R-navajo (*RI-nj*). Este alelo promove a pigmentação com antocianina no endosperma e no embrião das sementes diploides, e as sementes haploides apresentam pigmentação somente no endosperma, ficando com o embrião branco. Como se sabe, o endosperma é formado por um tecido triploide, sendo um conjunto haploide do parental masculino e dois do parental feminino. Já o embrião é formado por um tecido diploide. Como o marcador morfológico R-navajo é dominante em um cruzamento, esse será expresso no endosperma. No caso de um embrião haploide, o marcador não será expresso, pois o embrião não contém

o genoma da linhagem indutora que carrega o alelo marcador. A pigmentação pode variar em extensão e intensidade, dependendo do *background* genético do doador, em particular e do indutor (GEIGER; GORDILLO, 2009).

De acordo com Rotareno et al. (2009), existem, em conjunto com o gene *RI-nj*, os genes de cores adicionais (*BI*, *PLI*), que também condicionam a pigmentação do coleóptilo e da raiz das plântulas, favorecendo a separação de haploides e diploides. Após a germinação das sementes, as plântulas que apresentarem pigmentação no coleóptilo ou nas radículas são identificadas como diploides.

Segundo Rabel (2008), o gene marcador *RI-nj* não se expressa em todos os genótipos, indicando que sua expressão é influenciada pelo *background* genético do parental masculino. O mesmo autor constatou que os marcadores morfológicos R-navajo e a coloração verde do coleóptilo não foram eficientes na identificação de indivíduos haploides. No trabalho de Rotareno et al. (2009), algumas sementes também não expressaram a coloração arroxeadada no endosperma, possivelmente devido ao fato de o indutor não ser homozigoto *RI* ou o doador ser homozigoto *CI-1* do alelo dominante que inibe a expressão da antocianina no endosperma. Este gene ocorre frequentemente em materiais *flint* europeus ou tropicais (BELICUAS et al., 2007). Em alguns casos, quando o gene *RI-nj* é pouco expressado, a validação dos haploides putativos é possível precocemente nos estágios de plântula, havendo a ausência da coloração no coleóptilo e radículas que são expressos pelo gene *PII* presente nos indutores.

Lashermes e Beckert (1988) utilizaram outros marcadores fenotípicos para identificar haploides. Os autores utilizaram os genes da ausência de lígula e glossy (*lg1*, *lg2* e *gl1*) e verificaram que a frequência de indução variava de 0,4% a 2,4%.

2.4 Comparação entre linhagens duplo-haploides e convencionais

Apesar das vantagens do novo método de obtenção de linhagens de milho, o uso de DH continuou restrito pela dificuldade de geração de linhagens a partir destes haploides. Resultados promissores utilizando linhagens indutoras foram obtidos somente após a década de 1980 (CHALYK, 1999; SARKAR et al., 1994; SHATSKAYA et al., 1994). O desenvolvimento da técnica de indução de gimnogenese *in situ* facilitou a produção em escala de indivíduos DH.

Linhagens duplo-haploides obtidas por meio de culturas de anteras e linhagens convencionais obtidas de descendente de semente única (SSD) foram comparadas por Murigneux, Baud e Beckert (1993). Os autores observaram que a altura de espigas é maior em DHs.

Chalyk (1994) avaliou plantas haploides obtidas por cruzamento com o indutor ZMK e verificou taxas de diploidização espontânea entre 3,3% e 3,6%. Na comparação com linhagens convencionais, observou-se que plantas duplo-haploides são inferiores em algumas características, quando comparadas às linhagens convencionais, uma vez que não sofreram seleção natural e visual para a sua obtenção. Dentre as características para as quais os DH se mostram inferiores estão inserção de espiga, largura de folhas, número de nós, tamanho de pendão, diâmetro e número de espigas. Porém, estas apresentaram boa capacidade de combinação, sendo duas superiores às convencionais, seis com desempenho similar e duas com desempenho inferior.

Bordes et al. (2006) avaliaram e compararam linhagens DH com progênies S_1 e consideraram que, em teoria, num programa de seleção recorrente, o uso de DHs pode aumentar o ganho genético por unidade de tempo, devido ao aumento da variância genética entre unidades testadas que lidera o aumento da herdabilidade. Também observaram que a vantagem das DHs é a possibilidade de realizar o *test-cross* com linhagens terminadas e totalmente

homozigotas. Login et al. (2007) compararam diferentes esquemas de melhoramento utilizando linhagens DH obtidas de plantas F_1 ou F_2 e levaram em consideração o número ótimo de famílias, o ganho de seleção, os componentes de variância, o orçamento e o tempo de produção. Concluíram que o melhor esquema está em realizar um *test-cross* com plantas F_2 cruzadas com um testador e, simultaneamente, com as sementes remanescentes, cruzar com o indutor. As famílias selecionadas são duplicadas e as linhagens obtidas são novamente cruzadas com um testador.

Barbosa (2009), comparando o desequilíbrio de ligação entre linhagens duplo-haploides e linhagens convencionais, observou que, em linhagens duplo-haploides, o desequilíbrio de ligação foi maior que nas linhagens convencionais para uma mesma distância em todos os marcadores. Sugere, dessa forma, que, com a duplicação de indivíduos haploides, a segregação ocorre em blocos maiores, resultando em um maior número de genes. Assim, Bernardo (2009) sugere utilizar plantas F_2 para a geração de linhagens DH, visto que a taxa de recombinação nessa geração é maior que em plantas F_1 . Este mesmo autor, objetivando identificar a influência da origem genética das populações na taxa de indução de haploides, constatou que, realmente, a origem genética das populações influencia a taxa de indução de haploides e também a sobrevivência em casa de vegetação, após o tratamento com colchicina.

2.5 Duplicação cromossômica artificial

A duplicação cromossômica costumava ser uma restrição na produção de linhagens DH em escala comercial, inicialmente devido ao fato de a duplicação espontânea ocorrer em baixa frequência e somente em poucos germoplasmas e, posteriormente, em função de os protocolos de duplicação artificial serem pouco eficientes. A duplicação cromossômica artificial em milho

utiliza bloqueadores mitóticos, sendo a colchicina bastante empregada pelos pesquisadores, em concentrações que variam de 0,02% a 0,125%. A colchicina se liga à tubulina e inibe a polimerização dos microtubulos que compõem as fibras dos fusos, não havendo, assim, a migração dos cromossomos para os polos das células. Dessa forma, as células que anteriormente eram n (haploides) passam a ser $2n$ (BELICUAS et al., 2007).

Gayen et al. (1994) inovaram a duplicação artificial em milho, cortando a ponta do coleóptilo das plântulas haploides (com 3-4 dias de germinação) e colocando-as imersas em uma solução de colchicina mais dimetil sulfóxido (DSMO), por 12 horas, a 18 °C. Anos mais tarde, Deimling, Röber e Geiger (1997) aumentaram ainda mais a eficácia do método, reduzindo as raízes de 20-30 mm e colocando as plântulas imersas no escuro. Outro método utilizado para a duplicação foi desenvolvido por Zabirowa et al. (1996), em que, no estádio de 3-4 folhas, a solução de colchicina é injetada cerca de 3-5 mm acima do ápice. Após a injeção, as plântulas são mantidas no escuro, por dois dias, a 18 °C e, em seguida, plantadas em campo. Chalyk (2000), utilizando haploides maternos, comparou a eficiência dos métodos citados, avaliando a porcentagem de linhagens DH com pendão fértil. Além dos métodos conhecidos, os pesquisadores fizeram outros dois tratamentos com variações de temperatura e concentração de colchicina no método proposto por Deimling, Röber e Geiger (1997), para verificar se havia diferenças nos resultados. Os resultados demonstraram que os métodos desenvolvidos foram bastante eficientes, nas condições em que o trabalho foi realizado. O método de Deimling, Röber e Geiger (1997) permitiu a obtenção de 28,8% e 31,8% de haploides com pólen fértil, nas temperaturas de 18 °C e 26 °C, após o tratamento.

O uso de injeção de colchicina, de acordo com o método de Zabirowa et al. (1996), resultou em 27,5% de plantas haploides com pólen fértil. Essa porcentagem foi semelhante à obtida com o método usado por Deimling, Röber

e Geiger (1997), e ao que foi relatado por Eder e Chalyk (2002). A tentativa de reduzir a concentração de colchicina não teve resultados positivos e nenhuma planta apresentou pólen fértil.

2.6 Citometria de fluxo para análise de ploidia

A técnica de citometria de fluxo foi desenvolvida, para a contagem e a análise de células sanguíneas, por volta da década de 1940 (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007). As duas áreas que impulsionaram o seu desenvolvimento foram a hematologia e a imunologia (CÔRTE-REAL et al., 2002). No entanto, com o avanço da técnica e o uso de novos marcadores fluorescentes, essa técnica generalizou-se para outras áreas, como a citogenética vegetal e microbiana (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007).

A técnica de citometria de fluxo é baseada na análise de propriedades óticas, como dispersão da luz e fluorescência de partículas (núcleos, organelas, células e cromossomos) que fluem em uma suspensão líquida. As partículas em suspensão movem-se emergidas num fluido (tampão de extração) no interior de um capilar, dentro de um aparelho denominado citômetro de fluxo. Essas partículas intersectam uma a uma um feixe de laser, ocorrendo um processo de dispersão da luz e ou emissão de fluorescência. Dessa forma, podem-se verificar, simultaneamente, as distribuições dos valores da frequência e/ou densidade de cada parâmetro. Os sinais gerados pelas partículas são convertidos em valores digitais, armazenados e exibidos na forma de histogramas (DOLEZEL, 1997).

Por meio de citometria de fluxo é possível mensurar o conteúdo de DNA de núcleos, permitindo avaliar o nível de ploidia, fazer comparações intra e interespecíficas do tamanho nuclear, avaliar o teor de DNA de cada cromossomo do complemento de uma espécie, realizar estudos do ciclo celular, análises de

citogenotoxicidade e determinação do sexo (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2001).

Nos eucariontes, o crescimento e a divisão celular são processos cíclicos. O tempo entre cada mitose encontra-se dividido em três fases: G1, S e G2. Durante a fase G1, período de crescimento celular, uma célula diploide apresenta um conteúdo 2C, possuindo, assim, duas cópias de cada cromossomo. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear e, na fase seguinte (fase G2), ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo de DNA nuclear é mantido no nível 4C. Em seguida, ocorre a mitose (fase M), durante a qual a célula se divide, formando-se duas células filhas, cada uma com um conteúdo 2C de DNA. Numa população de células em crescimento, o número de núcleos na fase G1 é maior do que na fase G2. Dessa forma, nos histogramas obtidos pelos citômetros de fluxo em uma análise de ploidia observa-se o pico de maior intensidade referente à fase G1 do ciclo celular e a fase G2 apresenta um pico menor.

A quantificação do nível de ploidia por citometria de fluxo é realizada pela análise da intensidade de fluorescência emitida pelos núcleos corados com fluorocromos específicos para DNA. A estimativa do nível de ploidia é feita comparando-se os picos G₁ do histograma de uma amostra com o pico de uma planta padrão com ploidia conhecida (DOLEZEL, 1997). Portanto, a quantificação de DNA por citometria de fluxo é uma excelente alternativa, quando comparada aos métodos clássicos de contagem cromossômica. Apresenta como vantagens: fácil preparação da amostra; é mais rápida, podendo ser processadas várias amostras em um dia; não necessita de células em divisão; é um método não destrutivo e é capaz de detectar mixoploidia (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

O emprego da citometria de fluxo para a determinação do nível de ploidia em muitos acessos de espécies cultivadas foi bem sucedido. Por meio

dessa técnica foi feita a caracterização do nível de ploidia de vários acessos do germoplasma de diversas espécies, como, por exemplo, *Medicago sativa* (BRUMMER; CAZCARRO; LUTH, 1999), *Bromus ssp.* (TUNA et al., 2001) e *Dioscorea alata* (EGESI, 2002). Em milho, a técnica de citometria de fluxo foi utilizada na identificação de haploides (BELICUAS, 2004; DANG et al., 2012; GEIGER; SCHÖNLEBEN, 2011; RABEL, 2008).

2.7 Marcadores moleculares SSR na identificação de haploides

Atualmente, os marcadores moleculares são considerados uma importante ferramenta para o melhoramento vegetal, fornecendo grande quantidade de polimorfismo não afetada pelos efeitos ambientais e estágios de desenvolvimento da planta. Seu emprego vem sendo realizado com diversas finalidades, tais como avaliação da diversidade genética, proteção de cultivares, pureza genética, seleção de genótipos em programas de melhoramento, construção de mapas genéticos e identificação de haploides (BELICUAS, 2004; LANZA; GUIMARÃES; SCHUSTER, 2000).

Vários são os tipos de marcadores moleculares e, segundo Milach (1998), eles podem ser divididos em dois grupos, os de hibridação e os de amplificação. Os microssatélites, ou *Simple Sequence Repeats* (SSR), são do grupo de amplificação e utiliza a técnica denominada de *polymerase chain reaction* (PCR). Essa técnica envolve a síntese *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Esta enzima inicia a síntese de DNA a partir de um pequeno segmento chamado de *primer*. Os *primers* são pequenas moléculas de DNA de fita simples sintetizadas artificialmente, com sequências de nucleotídeos complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo (BORÉM; CAIXETA, 2006).

A preferência pelos marcadores SSR deve-se à agilidade da PCR. Além disso, são codominantes e estão espalhados ao acaso no genoma, com uma frequência relativamente alta (AKKAYA; BHAGWAT; CREGAN, 1992). Os SSR possuem de 1 a 6 nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes em *tandem*, ao longo da molécula de DNA, amplamente distribuídas nos genomas eucariotos, que são flanqueadas por regiões conservadas entre indivíduos da mesma espécie (CAIXETA et al., 2006).

A característica de codominância dos SSR possibilita a distinção entre o homocigoto e heterocigoto. Mesmo em genótipos de milho simples, detentores de base genética estreita, eles podem detectar alto número de alelos por loco. Devido a isso e à estabilidade da herança mendeliana dos locos SSR, permite que este seja uma alternativa interessante na diferenciação de indivíduos haploides dos F₁ heterocigotos, quando utilizadas linhagens indutoras de haploidia para a obtenção de linhagens DH. Belicuas et al. (2007), utilizando marcadores SSR, fizeram a identificação de haploides em milho, com posterior confirmação destes por meio de outras técnicas, como contagem cromossômica e citometria de fluxo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área experimental

Os campos de cruzamentos foram conduzidos nos municípios de Cravinhos (situado a 650 m de altitude, nas coordenadas 21° 20' 25" de latitude Sul e a 47° 43' 46" de longitude Oeste, no estado de São Paulo) e Ponta Grossa (situado a 975 m de altitude, nas coordenadas 25° 5' 42" de latitude Sul e 50° 9' 43" de longitude Oeste, no estado do Paraná). As atividades laboratoriais e a aclimação das plântulas foram realizadas no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, situado a 918 m de altitude, nas coordenadas 21°14'30" de latitude Sul e a 45°00'10" de longitude Oeste, no estado de Minas Gerais. Posteriormente, as plantas duplicadas foram conduzidas em Ijaci, MG (a 830m de altitude, nas coordenadas 21° 9' 24" Sul, 44° 55' 34" Oeste).

3.2 Genótipos avaliados

Foram utilizados seis híbridos F_1 e suas gerações F_2 , de diferentes origens, os quais foram cruzados com dois indutores de haploidia (Tabela 1). A linhagem indutora de haploidia Wisconsin-23 (KERMICLE, 1969) (sistema androgenético), que carrega o alelo mutante *ig* e também alelos do sistema R-navajo (*R1-nj*), foi utilizada como parental feminino e o outro indutor, KEMS (SHATSKAYA et al., 1994), que também carrega o alelo dominante *R1-nj* (sistema gimnogenético), como parental masculino. Em cada local, para favorecer a sincronia de florescimento, as sementes dos híbridos foram semeadas dez e quatorze dias antes da semeadura das linhagens indutoras, devido ao fato de estas possuírem origem temperada e serem mais precoces.

Tabela 1 Identificação dos híbridos cruzados com os indutores para a obtenção de haploides

Híbridos	Textura de grão	Ciclo	Origem
P30F53	Semiduro	Precoce	Pionner
DKB240	Dentado	Superprecoce	Monsanto
L3/DENT	Dentado	Precoce	UFLA
30/31	Duro	Precoce	Geneseeds
43/48	Dentado	Precoce	Geneseeds
GNZ 2004	Dentado	Precoce	Geneze Sementes

O campo de cruzamento em Ponta Grossa, PR, foi conduzido na safra 2010/11 e, em Cravinhos, SP, na safrinha 2011. Para cada local, os indutores foram semeados em 20 linhas de 5 m, a fim de garantir a quantidade mínima de plantas para a realização dos cruzamentos. As sementes dos híbridos (F_1) e suas gerações F_2 foram semeadas em duas linhas de 5 m. Duas sementes por cova foram distribuídas em linhas espaçadas de 80 cm, com 20 cm entre plantas. Aproximadamente 15 dias após a emergência das plantas, foi realizado o desbaste, deixando-se cinco plantas por metro linear. A adubação de semeadura foi de 500 Kg.ha⁻¹ do formulado 10-30-10 e, em cobertura, foram aplicados 500 Kg.ha⁻¹ de 20-0-20, após o desbaste. Os demais tratos culturais foram realizados conforme recomendação para a cultura do milho.

3.3 Obtenção e identificação de haploides

As sementes obtidas entre os cruzamentos citados anteriormente foram secas a 13% de umidade e separadas visualmente pela coloração do endosperma e embrião. Grãos com endosperma roxo e embrião branco foram considerados haploides e selecionados conforme descrito por Chase e Nanda (1965).

As sementes selecionadas de acordo com o marcador morfológico R-navajo foram colocadas para germinar, por 72 horas, em papel de germinação

umedecido, no germinador de marca Mangelsdors, com temperatura controlada de 23 °C. Com a finalidade de eliminar os falsos haploides, antes da realização da duplicação cromossômica, depois de germinadas, as plântulas com baixo vigor apresentando radículas e coleóptilo menores foram selecionadas como haploides (Figura 1).



Figura 1 Classificação das plântulas pelo vigor, após a germinação das sementes identificadas como haploides, pelo marcador R-navajo

3.4 Duplicação cromossômica

No Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da UFLA, as plântulas de menor vigor identificadas como possíveis haploides foram submetidas ao tratamento de duplicação cromossômica com solução de 0,06% de colchicina e 0,5% de dimetil sulfoxido, por 12 horas, de acordo com o protocolo proposto por Deimling, Röber e Geiger (1997). A única adaptação do protocolo foi de não cortar as pontas dos coleótilos.

Após o tratamento com colchicina, as plântulas foram lavadas, por 20 minutos, em água corrente e transferidas para bandejas de isopor com células de 1 cm³ em substrato vegetal. As plântulas foram aclimatadas na casa de vegetação do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, e

permaneceram em ambiente controlado por 20 dias. Nesse período, foi realizada a adubação foliar com monoamônio fosfato-MAP purificado, a 5% de concentração.

3.5 Avaliação da duplicação cromossômica por citometria de fluxo

No Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, foi feita a confirmação da duplicação dos cromossomos das plântulas haploides por meio da técnica de citometria de fluxo (GALBRAITH et al., 1983), realizada entre 15 e 20 dias após o tratamento com colchicina.

Para a análise do conteúdo de DNA pela técnica de citometria de fluxo, foram utilizadas folhas jovens com 20-30 mg dos genitores (os seis híbridos e os dois indutores) e dos 918 descendentes obtidos desses cruzamentos, que sobreviveram à duplicação cromossômica. Juntamente com cada amostra, utilizaram-se, como padrão interno de referência, 20-30 mg de folhas jovens de *Vicia faba* (26,9 pg/2C). As amostras de cada plântula de milho e de *Vicia faba* foram coletadas e fragmentadas com bisturi em uma placa de Petri contendo 1 mL de tampão de extração LB01 gelado, para a obtenção da suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997). A suspensão foi aspirada com pipeta plástica e gaze para evitar a passagem de fragmentos maiores dos tecidos vegetais e, posteriormente, filtrada em uma malha de náilon (50 μm), durante a transferência para um tubo de polietileno. Utilizaram-se 25 μL do tampão de extração contendo 1 mg/mL de iodeto de propídeo e 2,5 μL de RNase, os quais foram adicionados à suspensão em temperatura ambiente.

Cada suspensão foi analisada no citômetro de fluxo (FacsCalibur-Becton Dickinson). Os histogramas obtidos foram analisados pelos softwares Cell Quest e WinMDI 2.8 (2009). A estimativa do conteúdo de DNA nuclear

(pg) de cada amostra foi realizada por meio da comparação da posição do seu pico G1 com o pico G1 do padrão interno de referência, com conteúdo de DNA conhecido.

Para essa comparação, foi utilizada a seguinte expressão:

$$Q = (E/S) \times R \quad (1)$$

em que

Q é a quantidade de DNA da amostra (pg/2C);

E é a posição do pico G1 da amostra;

S é a posição do pico G1 do padrão de referência;

R o conteúdo de DNA do padrão (26,9 pg/2C).

As médias das quantidades de DNA foram calculadas para análise dos resultados. Assim, por meio da quantidade de DNA, foi possível fazer inferências a respeito do nível de ploidia do material avaliado.

3.6 Avaliação da duplicação cromossômica pela fertilidade do pendão

Após 20 dias da aplicação do protocolo para duplicação cromossômica, as plantas foram transplantadas para ambiente protegido com cobertura de lona plástica transparente nas dependências da empresa HortiAgro, localizada no município de Ijaci, MG. Todas as plantas foram identificadas para que houvesse o rastreamento e a possibilidade de confrontar os resultados de citometria com os dados de fertilidade do pendão. A adubação de semeadura foi de 450 kg do formulado 8-28-16, com espaçamento de 0,6 m entre linhas e 0,3 m entre plantas. A adubação de cobertura e os tratos culturais foram realizados conforme o recomendado para a cultura na região.

As espigas foram protegidas com sacos plásticos antes da emissão do estilo estigma das plantas, para que a autofecundação pudesse ser realizada posteriormente. As informações sobre a fertilidade do pendão foram coletadas de cada planta, após a emissão dos mesmos, sendo classificados em pendão fértil e estéril (Figura 2).



Figura 2 Plantas com diferentes fertilidades de pendões. (A) Pendão fértil e (B) pendão estéril

As plantas que produziram pólen foram autofecundadas para a manutenção e a multiplicação de sementes.

3.7 Avaliação da duplicação cromossômica por marcadores microssatélites

No Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia extraiu-se o DNA do indutor KEMS dos 6 híbridos e de 65 plantas provenientes do cruzamento entre o indutor KEMS e os híbridos. A amostragem foi realizada procurando-se coletar DNA de plantas classificadas como haplóides, haploides/diploides, diploides e diploides/tetraploides pela citometria de fluxo, que produziram pólen e possuíam folhas verdes. O procedimento de extração foi realizado conforme Pereira et al. (2007). Foram coletadas 3 g de folhas de cada planta. Em seguida, foram trituradas com 10 ml de tampão de extração e 20 μ l

de β -mercaptoetanol, em um almofariz com nitrogênio líquido. O tampão de extração foi constituído por 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH 8,0), 1,4 M de NaCl e 1% de polivinilpirrolidona (PVP). O material triturado foi colocado em tubos de centrífuga e incubado, em banho-maria, a 65 °C, por 30 minutos. Durante a incubação em banho-maria, os tubos foram agitados levemente e, depois de centrifugados, o sobrenadante contendo os ácidos nucleicos foi coletado. Em seguida, os ácidos nucleicos foram extraídos com 10 ml da mistura clorofórmio:álcool isoamil (24:1). Estes foram precipitados pela adição de 30 ml da mistura de etanol 95% e acetato de amônio 7,5M (6:1), os quais foram mantidos em freezer, a -20 °C, por, aproximadamente, 12 horas. Após a precipitação, os ácidos nucleicos foram transferidos para microtubos centrifugados e secos. Posteriormente, foram reidratados em tampão TE (1 mM de TRIS e 0,1 mM de EDTA). Logo após a segunda extração com clorofórmio:álcool isoamil (24:1), o sobrenadante foi precipitado pela adição de, pelo menos, três volumes de uma mistura de acetato de sódio 3M:etanol 95% (1:20). Os ácidos nucleicos precipitados foram reidratados em tampão TE. Uma terceira extração foi realizada com clorofórmio-álcool-isoamil, com igual volume de TE. Coletou-se o sobrenadante e o DNA foi precipitado (durante, aproximadamente, 12 horas, no freezer) com álcool acetato de sódio, até completar o tubo (1,5 μ l). Centrifugou-se por 10 minutos, a 10.000 rpm e os ácidos nucleicos foram reidratados com tampão de TE. Aliquotas de DNA obtidas de cada indivíduo foram quantificadas em gel de agarose 1%, ao lado de um padrão de concentração de DNA, construído a partir de DNA de fago λ , nas concentrações de 100, 200 e 300 ng/ μ l. Mediante comparação visual da intensidade das bandas do DNA das amostras e dos padrões, a concentração de cada amostra foi estimada e, posteriormente, diluída para a concentração de 10 ng/ μ l, utilizada nas reações.

Cada reação continha volume total de 11,06 μL . Esta foi preparada pela mistura dos seguintes reagentes com as respectivas concentrações (PEREIRA et al., 2007): 2,25 μL de DNA genômico, 1 μL de uma solução contendo os ácidos desoxirribonucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 0,6 μL da enzima Taq DNA polimerase, 0,8 μL do par de *primer*, 1,00 μL de tampão de reação (50 mM tris pH 8,3; 2,0 mM MgCl_2 ; 20 mM de KCl; 10 μg de BSA; 0,25% de ficol 400; 10 mM de tartrazina) e 4,45 μL água bidestilada até totalizar o volume final. As amplificações foram realizadas em tubos de 0,2 ml, em termociclador modelo Mastercycler Eppendorf. A programação do equipamento foi de cinco minutos, a 95 °C, para desnaturação do DNA, oito ciclos, em que foram usados 20 segundos, à temperatura de 94 °C para desnaturação, 20 segundos para anelamento do *primer*, cuja temperatura foi de 55 °C e 60 °C, dependendo do *primer* testado, 1 minuto a 72 °C, para extensão de DNA, 24 ciclos que diferiram dos primeiros apenas na temperatura de anelamento de 52 °C a 65 °C e uma extensão final, por quatro minutos, a 72 °C.

As reações amplificadas foram submetidas à eletroforese vertical por uma hora e quarenta minutos, a 130 V, em gel de poliacrilamida 6%. Logo depois, corou-se o gel em solução de nitrato de prata, durante 10 minutos, seguido de enxague em água corrente e, então, foi imerso em solução reveladora, até o aparecimento das bandas. O gel foi avaliado em luz fluorescente e fotografado com câmera digital.

Utilizaram-se 25 *primers* indicados para a cultura do milho, de acordo com Veiga (2011), em estudo de QTLs associados à resistência à cercosporiose e produção de grãos de milho. Dentre os 25 *primers* utilizados, cinco deles (BNLG1175, BMC 1714, BNLG 1520, BNLG 1233 e BNLG 1258) foram considerados polimórficos entre os genitores, cujas bandas apresentaram, boa definição no gel. Estes foram usados nas progênies para analisar e comprovar a paternidade dos haploides.

3.8 Análises estatísticas

As análises foram realizadas utilizando-se locais como repetições e as proporções observadas foram avaliadas usando-se a abordagem de modelos lineares generalizados mistos (MLGM), de forma análoga ao proposto por Nunes, Moraes e Bueno Filho (2004), uma vez que foi detectada superdispersão. Neste caso, foi empregado o MLGM binomial com a função de ligação *logit*, conforme descrito a seguir:

$$R_{ijk}/m_{ijk} \sim \frac{\text{Binomial}(m_{ijk}, \pi_{ijk})}{m_{ijk}} \quad (2)$$

$$\log\left(\frac{\pi_{ijk}}{1 - \pi_{ijk}}\right) = \mu + l_i + h_j + g_k + hg_{jk} + P_{ijk} \quad (3)$$

em que

R_{ijk}/p_{ijk} : proporção observada na parcela que recebeu o híbrido j na geração k e no local i , admitida condicionalmente, independente ao efeito aleatório de parcela;

μ : intercepto;

l_i : efeito fixo do local i ;

h_j : efeito fixo do híbrido j ;

g_k : efeito fixo da geração k ;

hg_{jk} : efeito fixo da interação do híbrido j com a geração k ;

P_{ijk} : efeito aleatório da parcela ijk , sendo $p_{ijk} \sim N(0, \sigma_p^2)$.

Os MLGMs foram ajustados com estimação dos efeitos fixos e aleatórios, bem como dos componentes de variância, via maximização da função de verossimilhança restrita (REML). Para isso, utilizou-se o pacote lme4 do programa R (versão 2.14) (BATES; MAECHLER; BOLKER, 2011).

A significância dos efeitos do modelo foi verificada via análise de “deviance”, com aplicação do teste estatístico de χ^2 (qui-quadrado), a 5% de probabilidade (CORDEIRO; DEMÉTRIO, 2007). Evidenciada a significância, especialmente para híbridos e interação híbridos x gerações, procedeu-se ao agrupamento, com base na distância de Mahalanobis, pelo método do vizinho mais próximo e estabelecido o ponto de corte usando o método de reamostragem bootstrap (MOURÃO JÚNIOR, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção de haploides identificados pelo marcador morfológico R-navajo

Em ambos os locais, as linhagens indutoras foram muito precoces e ocorreu maior coincidência no florescimento com os genótipos doadores, quando estes foram semeados 14 dias antes das linhagens indutoras. Rabel (2008) observou resultado similar quando conduziu cruzamentos com a linhagem indutora W23, no Brasil. Este autor encontrou maior coincidência de florescimento com os genótipos doadores de pólen quando estes foram semeados 16 dias antes da linhagem indutora. A precocidade é justificada pelo fato de linhagens indutoras de haploidia possuírem origem temperada.

Belicuas (2004) e Rabel (2008) descreveram a suscetibilidade da linhagem W23 a doenças de final de ciclo e baixa adaptação às condições tropicais de cultivo. Neste trabalho, esses fatores foram bastante evidentes, de modo que, com a mesma quantidade de plantas e com os mesmos cruzamentos realizados entre os dois indutores com os genótipos doadores, a linhagem W23 apresentou um número menor de sementes de possíveis haploides, quando comparada com o indutor KEMS (Tabela 2).

A maior quantidade de sementes obtidas pelos cruzamentos realizados com o indutor KEMS já era esperada, uma vez que este é utilizado como parental masculino, sendo que as sementes colhidas dos genótipos doadores vieram a partir de plantas adaptadas às condições tropicais de cultivo, além de este indutor possuir maior taxa de indução (SHATSKAYA et al., 1994).

Tabela 2 Número de sementes totais e classificadas como haploides, identificadas pelo marcador morfológico R-navajo, obtidas dos cruzamentos com os indutores KEMS e W23 em Ponta Grossa, PR (safra 2010/11) e Cravinhos, SP (safra 2011)

Indutor	Híbrido	Gerações	Ponta Grossa-PR			Cravinhos-SP		
			Total Haplóides	Indução de haplóides (%)		Total Haplóides	Indução de haplóides (%)	
KEMS	30F53	F1	1781	118	6,6	1389	113	8,1
KEMS	30F53	F2	974	72	7,4	662	26	3,9
KEMS	DKB240	F1	330	106	32,1	3745	106	2,8
KEMS	DKB240	F2	1792	73	4,1	569	19	3,3
KEMS	L3/DENT	F1	1207	152	12,6	1100	107	9,7
KEMS	L3/DENT	F2	403	58	14,4	548	72	13,1
KEMS	30/31	F1	1574	207	13,2	1831	228	12,5
KEMS	30/31	F2	537	76	14,2	135	13	9,6
KEMS	43/48	F1	1668	113	6,8	2855	176	6,2
KEMS	43/48	F2	1306	110	8,4	1192	23	1,9
KEMS	GNZ 2004	F1	2067	383	18,5	2090	193	9,2
KEMS	GNZ 2004	F2	1191	378	31,7	2452	241	9,8
W23	30F53	F1	532	23	4,3	1440	63	4,4
W23	30F53	F2	404	11	2,7	821	7	0,9
W23	DKB240	F1	751	39	5,2	713	13	1,8
W23	DKB240	F2	409	36	8,8	587	2	0,3
W23	L3/DENT	F1	438	44	10,0	407	3	0,7
W23	L3/DENT	F2	139	13	9,4	255	0	0,0

Mesmo sendo suscetível às doenças e pouco adaptado, este indutor apresentou quantidade satisfatória de pólen, favorecendo a produção de sementes. Entretanto, Prigge et al. (2011), utilizando indutores derivados do indutor KEMS em condições tropicais de cultivo, observaram que, além de apresentarem baixa performance para as características agronômicas, a quantidade produzida de pólen sob condições de altas temperaturas dificultou a produção de sementes dos cruzamentos com algumas fontes de germoplasma, como também ocorreram dificuldades na produção de sementes do indutor. Estes autores salientam a necessidade de desenvolvimento de indutores tropicalizados.

Para alguns cruzamentos com a linhagem indutora W23 não foi possível obter sementes devido a fatores ambientais e à falta de coincidência de florescimento. Dessa forma, foram utilizados os dados dos cruzamentos balanceados, ou seja, quando se obtiveram sementes dos híbridos com as duas gerações e nos dois locais (Tabela 2). Portanto, o número de híbridos avaliados com o indutor KEMS foi maior do que os obtidos pelo cruzamento com a linhagem indutora W23.

Pelo teste da razão de verossimilhança, com probabilidade de 5%, houve diferença significativa entre os indutores na taxa de indução de haploides. O indutor de haploides maternos KEMS teve uma porcentagem média de indução de 7,1% (Tabela 2). Este valor é semelhante ao encontrado por Shatskaya et al. (1994), que obtiveram porcentagem de indução variando de 6,3% a 8%.

A taxa de indução de haploides da linhagem W23 caracterizados pelo R-navajo variou de 0 a 10% (Tabela 2). Kermicle (1969) relatou que a porcentagem de indução de haploides com esse indutor varia de 1% a 3%. Belicuas (2004) e Rabel (2008) também encontraram porcentagens de indução elevadas, com base na observação da expressão do marcador morfológico R-navajo. No entanto, quando utilizaram métodos mais precisos para a confirmação da haploidia, constataram a alta frequência de falsos haploides. Belicuas (2004) utilizou 425 sementes identificadas como haploides pelo marcador R-navajo e obteve, a partir destas, somente quatro plantas haploides induzidas pela W23. Ciente deste fato, e como as quantidades das sementes de possíveis haploides por genótipos obtidas nesta pesquisa foram pequenas, o restante das análises para identificar efeitos de híbridos, gerações e locais foi realizado considerando apenas os dados dos híbridos cruzados com o indutor KEMS que produziu sementes.

Na Tabela 3 apresenta-se o resumo da análise de “deviance” da proporção de haploides (identificados por meio do marcador R-navajo) pelo total

de sementes obtidas do cruzamento de seis híbridos e suas gerações F₂ com o indutor KEMS. Diferenças significativas foram observadas para os efeitos de locais e híbridos.

Tabela 3 Resumo da análise de “deviance” para taxa de indução de haploides identificados pelo marcador R-navajo dos seis híbridos cruzados com o indutor KEMS

FV	GL	DEVIANCE
Locais	1	12,58*
Híbridos	5	15,56*
Gerações	1	1,29
Híb x Ger	5	7,42

* Diferenças significativas, pelo teste χ^2 , com probabilidade de 0,05

O efeito não significativo para gerações demonstra que, mesmo com uma geração de endogamia, esta não interfere na taxa de indução de haploides dos híbridos, não havendo diferença significativa na taxa de indução de haploides entre uma geração e outra.

As médias ajustadas obtidas pela análise de “deviance” da taxa de indução em Ponta Grossa foram de 16,9% e, em Cravinhos, de 9,2%. As porcentagens médias de indução dos locais ficaram acima do normalmente relatado nos cruzamentos com esse indutor (SHATSKAYA et al., 1994).

Röber, Gordillo e Geiger (2005) utilizaram vários indutores, entre eles o indutor KEMS, e encontraram diferenças significativas entre os ambientes. Esses autores enfatizaram que o ambiente pode influenciar, de várias formas, a taxa de indução. Entretanto, Eder e Chalyk (2002), quando utilizaram o indutor MHI para a indução de haploides em ambiente controlado e em campo, não encontraram diferença significativa na taxa de indução entre os ambientes.

De acordo com Rotarencu, Kirtoca e Jacota (2007), um fator que pode influenciar a taxa de indução de haploides é a época da polinização. Segundo o autor, a melhor fase para a polinização visando uma maior indução de haploidia

é no terceiro dia após o aparecimento do estilo estigma. A partir disso há um decréscimo na indução de haploides.

A porcentagem de indução avaliada pelo marcador R-navajo variou significativamente entre os híbridos. Os híbridos GNZ 2004, L3/DENT e 30/31 foram os que apresentaram as maiores taxas de indução de haploides (Tabela 4).

Tabela 4 Médias ajustadas das taxas de indução de haploides identificados pelo marcador morfológico R-navajo, oriundos dos cruzamentos dos seis híbridos com o indutor KEMS

Híbridos	Taxa de indução (%)
30F53	4,5 b
DKB240	4,5 b
L3/DENT	9,0 a
30/31	8,9 a
43/48	3,7 b
GNZ 2004	11,6 a

*Porcentagens médias seguidas da mesma letra pertencem ao mesmo agrupamento, com base na distância de Mahalanobis, com ponto de corte a 5% de probabilidade.

Ao avaliar diversos germoplasmas aliados a diferentes texturas de grãos, Barbosa (2009), Eder e Chalyk (2002) e Röber, Gordillo e Geiger (2005) encontraram diferenças entre genótipos na taxa de indução de haploides. Prigge et al. (2011) também relataram diferenças significativas entre diferentes germoplasmas. Segundo os autores, há maior facilidade em identificar haploides pelo marcador morfológico R-navajo em híbridos, comparado à utilização de populações segregantes.

Dessa forma, outros métodos (vigor das plântulas, coloração do coleóptilo, quantidade de óleo no embrião e características fenotípicas das plantas durante seu desenvolvimento) para a identificação de haploides devem ser utilizados para eliminar os indivíduos falsos haploides, classificados pelo marcador R-navajo.

4.2 Seleção de haploides pelo vigor das plântulas

A seleção de haploides pelo vigor das plântulas precedeu a duplicação cromossômica, a fim de identificar possíveis falsos haploides selecionados pelo marcador morfológico R-navajo. Dessa forma, daquelas sementes classificadas pelo marcador morfológico como haploides, selecionaram-se as plântulas com menor vigor, sendo estas consideradas como haploides. Rotarencu, Adicu e Sarmaniu (2009), trabalhando com indutores de haploides maternos, verificaram que, mesmo na presença do gene inibidor de antocianina *Cl-1*, é possível selecionar os haploides pelo baixo vigor e/ou coloração púrpura das radículas. Os mesmos autores salientam que é possível identificar haploides nas sementes pelo marcador R-navajo, pelo vigor de plântulas e em plantas adultas.

Durante a avaliação de plântulas, foi identificada alta taxa de falsos haploides que anteriormente foram selecionados com relação ao marcador morfológico R-navajo. Isso permitiu a redução significativa da quantidade de plântulas que foram tratadas com colchicina.

Na Tabela 5 apresenta-se o resumo da análise de “deviance” da proporção de haploides identificados pelo vigor em relação aos identificados pelo marcador R-navajo. Os resultados demonstram que houve diferença significativa entre híbridos e na interação híbridos x gerações.

Tabela 5 Resumo da análise de “deviance” da proporção de haploides classificados pelo vigor, em relação aos identificados pelo marcador R-navajo

FV	GL	DEVIANCE
Locais	1	4,47
Híbridos	5	17,52*
Gerações	1	0,4
Híb x Ger	5	17,24*

* Diferenças significativas, pelo teste χ^2 , com probabilidade de 0,05

O híbrido L3/DENT, em sua geração F₁, apresentou a menor porcentagem de haploides identificados pelo vigor, diferindo estatisticamente da sua geração F₂ (Tabela 6). O contrário ocorreu para o híbrido GNZ 2004, em que a geração F₂ apresentou menor porcentagem de haploides que na geração F₁. Neste caso, há concordância com os resultados encontrados por Prigge et al. (2011) que encontraram maior dificuldade para identificar os haploides em populações segregantes, quando comparados com híbridos simples.

Tabela 6 Porcentagens médias ajustadas de plântulas haploides selecionadas pelo vigor em relação aos selecionados pelo marcador morfológico R-navajo

Híbridos	F ₁	F ₂	Média
30F53	63,4 a	53,8 a	59,8 A
DKB240	43,0 a	34,9 a	39,3 B
L3/DENT	27,4 b	42,9 a	33,7 B
30/31	34,8 a	39,0 a	35,6 B
43/48	44,5 a	52,0 a	47,5 B
GNZ 2004	53,3 a	35,5 b	44,3 B

*Porcentagens médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, pertencem ao mesmo agrupamento, com base na distância de Mahalanobis, com ponto de corte a 5% de probabilidade

Diferenças significativas também foram observadas entre as médias dos híbridos (Tabela 6). O híbrido 30F53 apresentou a maior média na porcentagem de haploides classificados pelo vigor das plântulas. A maior porcentagem de falsos haploides foi observada para o híbrido L3/DENT, tendo, aproximadamente, 66,3% sido identificados pelo vigor como falsos haploides.

Röber, Gordillo e Geiger (2005), utilizando o indutor de haploides RWS, encontraram erro, na classificação de haploides putativos, de 52% para os doadores com textura de grãos tipo duro. Segundo os autores, os genótipos com textura de grão duro exibiam uma expressão do marcador igualmente forte como

o grupo dentado. Outro método rápido e barato para identificar haploides é por meio da quantidade de óleo no embrião (ROTARENCO; KIRTOCA; JACOTA, 2007). Segundo os autores, devido ao tamanho reduzido, os embriões haploides possuem quantidades inferiores e significativas de óleo, quando comparados com embriões diploides.

Além da conhecida ocorrência de falsos positivos (BELICUAS, 2004; RABEL, 2008; RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005), outro fator que pode ter favorecido a elevada taxa de falsos haploides foi a pouca experiência dos avaliadores para identificar haploides pelo marcador morfológico R-navajo, principalmente nos casos em que a expressão do marcador não foi nítida. Prigge et al. (2011) relataram esse acontecimento para alguns de seus genótipos, nos quais a ocorrência de falsos haploides também foi elevada e identificada posteriormente pelo vigor e fenótipo das plantas. Para não haver necessidade de aguardar o crescimento das plantas para a identificação dos haploides, outros métodos de identificação, como, por exemplo, o uso de marcadores moleculares e a citometria de fluxo, são muito eficientes e têm sido utilizados em outros trabalhos (BELICUAS, 2004; DANG et al., 2012; GEIGER; SCHÖNLEBEN, 2011; RABEL, 2008).

4.3 Porcentagem de duplo-haploides identificados pela citometria de fluxo

Após a duplicação cromossômica, diversas plântulas não sobreviveram até o período das coletas das amostras, provavelmente devido ao efeito tóxico da colchicina. Dessa forma, as análises de citometria foram realizadas com todas as plantas que sobreviveram ao tratamento com colchicina e permaneceram vivas até a coleta das amostras, totalizando 918 plantas, o que representa aproximadamente 62% do total de plantas tratadas com colchicina. Dang et al. (2012) alcançaram resultados similares de sobrevivência das plântulas (65,7%)

no tratamento com colchicina de haploides obtidos de milho ceroso e opaco. Os autores ressaltam que as plantas sobreviventes apresentaram folhas torcidas com crescimento retardado no primeiro estágio de desenvolvimento. Também foram encontradas plantas anãs entre as sobreviventes.

Por meio das análises de citometria foram identificadas plantas com vários níveis de ploidia, como haploides, haploides/diploides, diploides e diploides/tetraploides. No Gráfico 1(A) é apresentado o histograma do parental doador GNZ 2004, identificado como diploide, com a quantidade de DNA de 6,6 pg/2C.

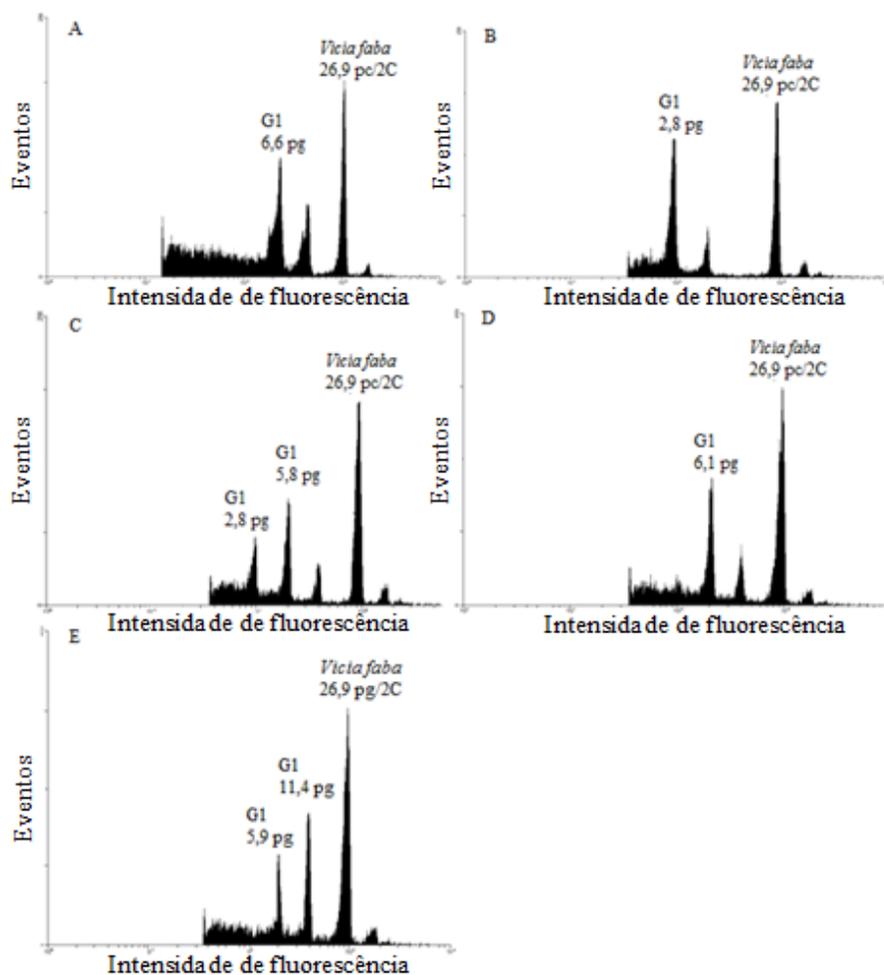


Gráfico 1 Histogramas de citometria de fluxo para quantificação do conteúdo de DNA de amostras de folhas de plantas de milho. (A) Parental GNZ 2004 (planta diploide) e *Vicia faba* (amostra padrão) com quantidade de DNA de 26,9 pg/2C. (B) Planta haploide. (C) Planta haploide/diploide. (D) Planta diploide. (E) Planta diploide/ tetraploide

Os Gráficos 1 (B e C) são exemplos de histogramas oriundos de plantas haploides e haploides/diploides. No Gráfico 1 (B) é apresentado o pico G1 das células haploides da amostra, com a quantidade de DNA de 2,8 pg/2C, estimada pela comparação da quantidade de DNA usando o feijão (*Vicia faba*) como

padrão, com a quantidade de DNA conhecida de 26,9 pg/2C, fornecida por Dolezel (1997). Por meio da estimativa da quantidade de DNA da amostra, fica evidente que esta apresentou aproximadamente a metade da quantidade do DNA do híbrido doador. Neste exemplo, foi considerado que a duplicação cromossômica não foi eficaz devido à observação do pico da fase G1 apenas de células haploides. O pico menor próximo ao pico G1 da amostra é considerado como o pico G2 das células haploides.

No histograma do Gráfico 1(C) é possível observar que há dois picos altos considerados picos G1 de células haploides e diploides, respectivamente. Neste caso, a planta apresenta variação no número cromossômico em um mesmo tecido. Ao lado do pico G1 das células classificadas como diploides pela quantidade de DNA, é possível perceber um pequeno pico G2 destas mesmas células. Assim, infere-se que houve sucesso na duplicação de parte das células dessa planta. Outros tipos de histogramas encontrados apresentaram pico G1 com quantidade de DNA similar à dos híbridos doadores (Gráfico 1D), sendo as plantas consideradas diploides, ou dois picos G1, cujas plantas foram consideradas diploides/tetraploides (Gráfico 1E). Estas plantas não foram consideradas como plantas DH, por acreditar que dificilmente se obtém uma planta completamente diploide após a indução de duplicação cromossômica (comunicação pessoal com pesquisador). Assim, essas plantas foram consideradas como falsos haploides.

No campo, por meio da avaliação do fenótipo das plantas, foi possível distinguir as plantas haploides e haploides/diploides anteriormente avaliadas pela citometria de fluxo, das plantas heterozigotas (F_1 s). As plantas haploides e haploides/diploides apresentaram menor vigor e ausência de pigmentação de antocianina, como mostrado na Figura 3 (A e B). Essa diferença no vigor das plantas também foi relatada por Rotarencu (2000), que constatou que plantas haploides têm menor vigor, quando comparadas com plantas diploides.

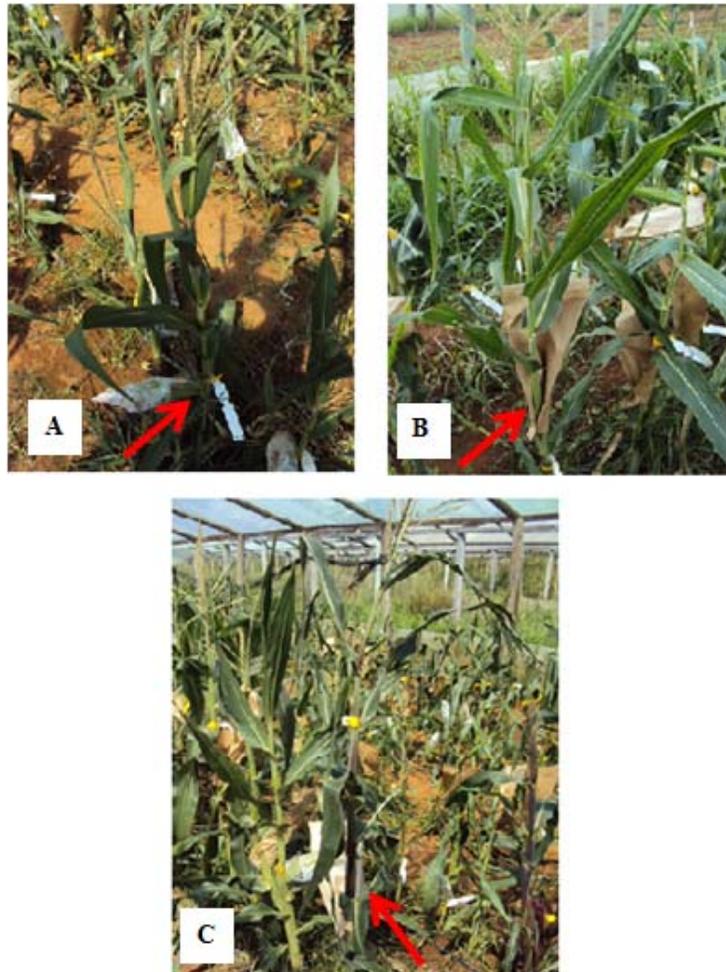


Figura 3 Exemplos de plantas identificadas no campo experimental. (A) Planta identificada como haploide pela citometria de fluxo. (B) Planta identificada como haploide/diploide pela citometria de fluxo. (C) Planta diploide (falso haploide) identificada pelo fenótipo. Note a diferença de vigor e ausência da pigmentação púrpura de antocianina das plantas A e B, comparadas com a planta C (setas).

Para algumas plantas oriundas do cruzamento do indutor com o híbrido foi relativamente fácil identificar que estas foram originadas da fusão de gametas de ambos (Figura 3C). Além do maior vigor, quando comparada com as

plantas sabidamente oriundas de sementes haploides, estas plantas apresentaram coloração arroxeadada intensa e pendão característico, semelhantes aos da linhagem indutora. No entanto, é preciso ressaltar que algumas plantas classificadas como diploides ou diploides/tetraploides (Gráficos 1 C e D) pela citometria de fluxo apresentaram características fenotípicas semelhantes às das plantas duplicadas originadas de sementes haploides (Figura 4). Como essas plantas não haviam sido contabilizadas como sucesso na duplicação cromossômica, esse fato pode ter gerado uma subestimativa na obtenção dos duplo-haploides pela citometria de fluxo. Porém, uma alternativa para identificar se essas plantas eram realmente DH ou resultantes de cruzamento seria a utilização de marcadores moleculares ou, então, a semeadura das sementes obtidas pela autofecundação com a posterior observação da ocorrência ou não de segregação entre as plantas. Caso haja segregação para características da planta seria constatado que não se tratava de linhagens homozigotas DH.



Figura 4 Plantas identificadas como diploides pela citometria de fluxo, com características fenotípicas de haploides

As plantas consideradas como duplo-haploides foram aquelas que apresentaram histogramas com pico G1 de células haploides/diploides. Dessa forma, foi estimada a proporção de plantas duplo-haploides dentro daquelas confirmadas como haploides.

Dos parâmetros avaliados, houve significância apenas para a interação híbrido x gerações. Para os demais, não houve diferença significativa (Tabela 9).

Tabela 9 Resumo da análise de “deviance” da taxa de duplo-haploides pelo total de haploides, identificados pela citometria de fluxo

FV	GL	DEVIANCE
Locais	1	0,99
Híbridos	5	4,92
Gerações	1	0,61
Híb X Ger	5	13,64*

* Diferenças significativas, pelo teste χ^2 , com probabilidade de 0,05

Os híbridos 30F53, L3/DENT e GNZ 2004 apresentaram comportamentos diferentes entre as gerações (Tabela 10). A taxa de duplicação dos híbridos 30F53 e GNZ 2004 foi maior na geração F1, quando comparada com a geração F2. Situação adversa foi evidenciada para o híbrido L3/DENT, mostrando que essa situação varia entre os genótipos.

Não houve diferenças significativas entre os híbridos, porém, pelas médias, é possível observar que a taxa de duplicação variou de 59,1% a 80% (Tabela 10). Essas porcentagens foram maiores que as alcançadas por Dang et al. (2012), que encontraram porcentagens de 28% a 54%. Estes autores consideram a fase de duplicação a mais difícil na obtenção de linhagens DH, devido à alta mortalidade e à baixa taxa de duplicação. Segundo eles, embora a colchicina seja um produto químico tóxico para os organismos vivos, a sua aplicação na produção de DH continua crescendo, devido à sua eficiência na duplicação de cromossomos, não havendo nenhum outro produto químico que apresente competitividade com tal finalidade.

Tabela 10 Porcentagens médias ajustadas de haploides com células duplicadas, analisados na citometria de fluxo dos híbridos nas duas gerações e sua média geral.

Híbridos	F ₁	F ₂	Média
30F53	88,9 a	58,1 b	73,5A
DKB240	67,5 a	65,9 a	66,7A
L3/DENT	51,7 b	87,4 a	69,5A
30/31	74,8 a	85,2 a	80,0A
43/48	62,4 a	55,7 a	59,1A
GNZ 2004	85,7 a	70,1 b	77,9A

*Porcentagens médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas pertencem ao mesmo agrupamento, com base na distância de Mahalanobis, com ponto de corte a 5% de probabilidade

É importante enfatizar que os resultados de citometria constataram o sucesso da duplicação cromossômica nas células somáticas da planta (folha), o que não garante que a mesma seja fértil e produza sementes. Uma maneira de aferir a fertilidade do pendão é estimar a porcentagem de plantas que produziram pólen.

4.4 Porcentagens de plantas que produziram pólen

Uma forma prática de se avaliar o sucesso da duplicação das plantas haploides é por meio da produção de pólen para a autofecundação e a produção de sementes. Neste trabalho, considerou-se o sucesso real da duplicação por meio da constatação da produção de pólen. No entanto, algumas plantas produziram pólen, porém, não havia estilo estigma para a fecundação. Esse fato foi relatado também por Dang et al. (2012), entretanto, os autores destacam que o milho tropical é muito sensível à temperatura e ao fotoperíodo nos primeiros estágios vegetativos. Dessa forma, mudando-se as condições iniciais de crescimento para um dia curto com temperatura mais elevada, há possibilidade de sincronizar os florescimentos masculino e feminino das plantas DH.

Por meio da análise “deviance” (Tabela 11) é possível constatar que não houve diferença significativa para nenhum dos efeitos avaliados.

Tabela 11 Resumo da análise de “deviance” das proporções de duplo-haploides com pendões férteis pelo total de haploides identificados pela citometria de fluxo

FV	GL	DEVIANCE
Locais	1	0,19
Híbridos	5	5,83
Gerações	1	0,88
Híbrido X Geração	5	10,69

* Diferenças significativas, pelo teste χ^2 , com probabilidade de 0,05

As porcentagens médias ajustadas de plantas haploides duplicadas que produziram pólen são apresentadas na Tabela 12. Mesmo não sendo encontradas diferenças significativas entre os híbridos, as porcentagens médias de obtenção de plantas com pólen variaram de 18,3% e 32,1%.

Tabela 12 Porcentagens médias ajustadas de haploides com pendões férteis analisados na citometria de fluxo

Genótipos	Porcentagem
30F53	32,1 a
DKB240	26,8 a
L3/DENT	18,3 a
30/31	24,3 a
43/48	19,6 a
GNZ 2004	30,8 a

*Porcentagens médias seguidas da mesma letra pertencem ao mesmo agrupamento, com base na distância de Mahalanobis, com ponto de corte a 5% de probabilidade

Chalyk (2000) utilizou haploides maternos e comparou a eficiência de vários métodos de duplicação, buscando encontrar o de maior eficiência na porcentagem de linhagens DH com pendão fértil após a duplicação. Dentre os

métodos estudados pelo autor, um foi proposto por Zabirowa et al. (1996) e outro por Deimling, Röber e Geiger (1997). As porcentagens encontradas pelo autor foram de 27,5% e 31,8%, respectivamente. Eder e Chalyk (2002), comparando métodos de duplicação em genótipos distintos, alcançaram porcentagem média de 27,3%, empregando o método proposto por Deimling, Röber e Geiger (1997). Embora as porcentagens de obtenção de plantas com pendões férteis estejam dentro do relatado pelos diversos autores, sua eficiência pode ser melhorada, aperfeiçoando algumas etapas do processo.

Foi observado que 10% das plantas haploides que produziram pólen apresentaram apenas um pico de células haploides nos histogramas avaliados, não sendo encontrado sucesso na duplicação pela citometria de fluxo. Algumas possibilidades podem explicar esse fato, como o tecido da planta do qual foi retirada a amostra para a realização da análise de citometria de fluxo apresentava apenas células haploides, porém, as células precursoras dos gametas foram duplicadas ou, então, são plantas haploides macho-férteis (CHASE, 1974; GEIGER; SCHÖNLEBEN, 2011). Geiger e Schönleben (2011), avaliando plantas haploides de diferentes fontes de germoplasma elite dentado, constataram a ocorrência de várias plantas produzindo pólen viável. Para comprovar, os autores fizeram a análise de citometria de fluxo de todas as plantas analisadas e verificaram que algumas plantas produziram pólen. Dessa forma, concluíram que, em longo prazo, os melhoristas poderão aperfeiçoar a capacidade de plantas haploides de produzirem pendões férteis, permitindo eliminar o processo de duplicação artificial de cromossomos utilizando colchicina.

4.5 Confirmação de duplo-haploides utilizando marcadores moleculares SSR

Os marcadores moleculares SSR foram utilizados com o objetivo de confirmar se as plantas que apresentaram picos de células haploides nos histogramas gerados pela citometria de fluxo eram realmente haploides. Os indivíduos que apresentaram apenas bandas do híbrido doador foram considerados duplo-haploides oriundos destas sementes haploides e aquelas plantas que apresentaram bandas do indutor e do respectivo híbrido são diploides resultantes de cruzamento.

Das 65 plantas das quais foram extraídos DNA para confirmação da ploidia por citometria de fluxo, 26 apresentaram histogramas com pico de células haploides. Todas as 26 plantas apresentaram bandas apenas dos híbridos doadores, confirmando que, definidas como haploides pela citometria de fluxo, eram realmente haploides antes da duplicação cromossômica.

Exemplos de padrão de bandas de haploides duplicados oriundos dos híbridos 30/31 e 43/48 confirmados pelos marcadores estão identificados nas Figuras 5 e 6.

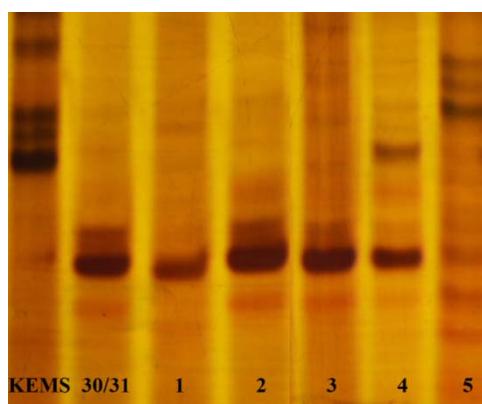


Figura 5 Padrão de amplificação com o marcador SSR bnlg 1233 em gel de poliacrilamida 6%. KEMS: indutor de haploidia; híbrido: 30/31; plantas 1, 2 e 3: duplo-haploides; plantas 4 e 5: F1/heterozigotos

As plantas DH 1, 2 e 3 (Figura 5) também produziram pendões férteis. As plantas 4 e 5 são heterozigotas, por apresentarem bandas do híbrido doador e do indutor de haploidia. Neste caso, foi possível identificar os heterozigotos, porém, em outros, não foi possível identificar com os *primers* utilizados. Dessa forma, o indicado é utilizar outros *primers* com maior polimorfismo ou, então, observar, nas sementes das plantas colhidas, se há expressão do marcador morfológico R-navajo.

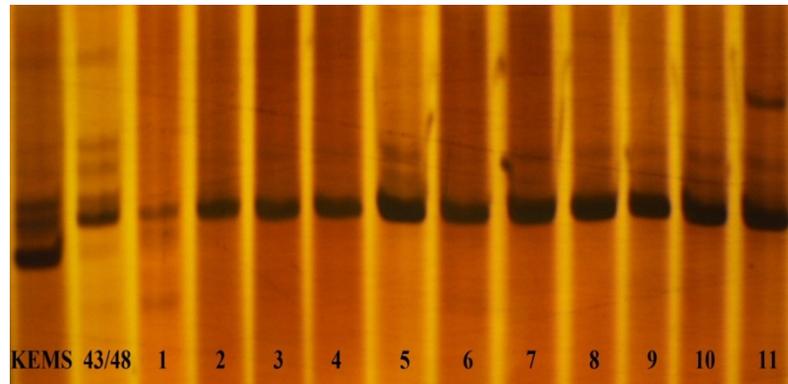


Figura 6 Padrão de amplificação com o marcador SSR bnlg 1175 em gel de poliacrilamida 6%. KEMS: indutor de haploidia; híbrido: 43/48; plantas 1 a 11: duplo-haploides

Na Figura 6, todas as plantas amostradas para a confirmação utilizando marcadores moleculares SSR foram identificadas como DH pela citometria de fluxo. Isto foi confirmado pelo padrão das bandas no gel, no qual todas as plantas (1 a 11) apresentaram apenas as bandas do híbrido doador 43/48.

5 CONCLUSÕES

A produção de linhagens DH utilizando a linhagem indutora W23 (sistema androgenético) é inviabilizada pela baixa porcentagem de indução e produção de sementes.

É possível obter linhagens DH a partir dos híbridos cruzados com o indutor KEMS, porém, o manejo pré e pós-duplicação deve ser melhorado, buscando aumentar a eficiência na produção de linhagens DH.

A produção de linhagens DH utilizando o indutor KEMS (sistema gimnogenético) é favorecida em condições tropicais de cultivo.

A utilização do marcador morfológico R-navajo e o vigor das plântulas auxiliam na identificação dos haploides.

A geração de endogamia dos híbridos não interferiu na taxa de indução e duplicação cromossômica de haploides.

O uso da citometria de fluxo e marcadores moleculares SSR é eficiente na identificação dos duplo-haploides.

REFERÊNCIAS

AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, Austin, v. 132, n. 4, p. 1131-1139, Dec. 1992.

BARBOSA, M. P. M. **Avaliação do desequilíbrio de ligação e da origem genética em duplo-haplóides de milho**. 2009. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

BATES, D.; MAECHLER, M.; BOLKER, B. **Lme4**: linear mixed-effects models using S4 classes. Version 0.999375-42. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=lme4>>. Acesso em: 10 out. 2011.

BELICUAS, P. R. **Obtenção, identificação e caracterização de haplóides androgênicos em milho**. 2004. 52 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica/Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

BELICUAS, P. R. et al. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 165, n. 1, p. 95-102, Jan. 2007.

BERNARDO, R. Should maize doubled haploides be induced among F1 or F2 plants? **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 119, n. 2, p. 255-262, Apr. 2009.

BORDES, J. et al. Doubled haploid versus family recurrent selection for testcross performance in a maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 6, p. 1063-1072, Apr. 2006.

BORÉM, A.; CAIXETA, T. E. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 374 p.

BRUMMER, E. C.; CAZCARRO, P. M.; LUTH, D. Ploidy determination of alfalfa germplasm accessions using flow cytometry. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 4, p. 1202-1207, Aug. 1999.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 9-78.

CHALYK, S. T. Creating new haploid-inducing lines of maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 73, n. 1, p. 53-54, Apr. 1999.

_____. Obtaining fertile pollen in maize maternal haploids. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 74, n. 1, p. 17-18, Mar. 2000.

_____. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 79, n. 1, p. 13-18, Jan. 1994.

CHALYK, S. T. et al. Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 77, n. 1, p. 29-30, Mar. 2003.

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

_____. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, p. 263-267, 1952.

_____. Utilization of haploids in plant breeding: breeding diploid species. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HAPLOIDS IN HIGHER PLANTS, 1., 1974, Ontario. **Proceedings...** Ontario: University of Guelph, 1974. p. 211-230.

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. **America Naturalist**, Chicago, v. 93, p. 381-382, 1959.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Projeção safra brasileira 2010/2011**. Disponível em:
<<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/RS11prevprodutiv.pdf>>.
Acesso em: 29 maio 2011.

CORDEIRO, G. M.; DEMÉTRIO, C. G. B. **Modelos lineares generalizados**. Santa Maria: UFSM, 2007. v. 1, 165 p.

CÔRTE-REAL, M. et al. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 19-33, 2002.

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. 153-160, Jan. 2012.

DEIMLING, S.; RÖBER, F.; GEIGER, H. H. Methodik und Genetik der in-vivohaploideninduktion bei Mais. **Vortr Pflanzenzüchtung**, Hamburg, v. 38, p. 203-204, 1997.

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.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. In: _____. **Flow cytometry with plant cells**. Weinheim: Wiley-Verlag, 2007. p. 41-65.

EDER, J.; CHALYK, S. T. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 4, p. 703-708, Mar. 2002.

EGESI, C. N. Ploidy analysis in water yam, *Dioscorea alata* L. germplasm.

Euphytica, Wageningen, v. 128, n. 2, p. 225-230, Apr. 2002.

FISCHER, E. **Molekulargenetische untersuchungen zum vorkommen paternaler DNA-Übertragung bei der in-vivo Haploideninduktion bei Mais (*Zea mays* L.)**. 2004. 86 p. Thesis (Ph.D. in Plant Breeding) - University of Hohenheim, Stuttgart, 2004.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, New York, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.

GAYEN, P. et al. Chromosome doubling in haploids through colchicine. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 68, 1994. Disponível em:

<<http://www.agron.missouri.edu/mnl/68/101gayen.html>>. Acesso em: 18 out. 2011.

GEIGER, H. H.; GORDILLO, G. A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. **Maydica**, Bergamo, v. 54, n. 4, p. 485-499, Aug. 2009.

GEIGER, H. H.; SCHÖNLEBEN, M. Incidence of male fertility in haploid elite dent maize germplasm. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 85, n. 22, p. 1-10, Feb. 2011.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZER, T. Flow cytometry and chromosome sorting. **Methods in Cell Science**, Norwell, v. 23, n. 1/3, p. 115-124, Mar. 2001.

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

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

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 97-108, Mai/Jun. 2000.

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, n. 3, p. 405-410, Sept. 1988.

LI, L. et al. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in a haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. **Planta**, Berlin, v. 230, n. 2, p. 367-376, July 2009.

LIN, B. Megagametogenetic alterations associated with the indeterminate gametophyte (*ig*) mutation in maize. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 557-563, 1981.

LONGIN, C. F. H. et al. Hybrid maize breeding with doubled haploids: III., efficiency of early testing prior to doubled haploid production in two-stage selection for testcross performance. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 115, n. 4, p. 519-527, Jun. 2007.

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.

MILACH, S. C. K. O melhoramento de milho. **Informativo Pioneer**, Santa Cruz do Sul, n. 25, p. 16-17, 2007.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MOURÃO JUNIOR, M. **Avaliação de um critério probabilístico em análise multivariada de agrupamento (Cluster analysis), por meio de simulação Monte Carlo**. 2001. 78 p. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agropecuária) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

MURIGNEUX, A.; BAUD, S.; BECKERT, M. Molecular and morphological evaluation of doubled-haploid lines in maize: 2., comparison with single-seed-descent lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 87, n. 1/2, p. 278-287, Oct. 1993.

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.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 429-485.

PEREIRA, H. S. et al. Informações fenotípicas e marcadores microssatélites de QTL na escolha de populações segregantes de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 5, p. 707-713, Maio 2007.

PIERRE, P. M. O. et al. Duplo-haplóides: 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.

PIONEER SEMENTES. **Double haploids**. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/ArtigosDetalhe.aspx?Id=90>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

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, July/Aug. 2011.

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

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. The comparative characteristic of the correlation between the traits of maize diploids and haploids. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 74, n. 1, p. 14-15, 2000. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/74/47rotarenco.html>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

ROTARENCO, V. A.; ADICU, G.; SARMANIUC, M. Induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 83, 2009. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/83/46rotarenco.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

ROTARENCO, V. A.; EDER, J. Possible effects of heterofertilization on the induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 77, 2003. Disponível em: <<http://www.maizegdb.org/cgi-bin/displayrefrecord.cgi?id=891724>>. Acesso em: 20 nov. 2011.

ROTARENCO, V. A.; KIRTOCA, I. H.; JACOTA, A. G. Possibility to identify kernels with haploid embryo by oil content. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 81, 2007. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/81/mnl81.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

SARKAR, K. R. et al. Stabilisation of high haploid inducer lines. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 68, n. 1, p. 64-65, 1994. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/68/100sarkar.html>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

SHATSKAYA, O. A. et al. Mass induction of maternal haploids in corn. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 68, n. 1, p. 51-52, 1994. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/68/76shatskaya.html>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

TUNA, M. et al. DNA content and ploidy determination of bromegrass germoplasm accessions by flow cytometry. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 5, p. 1629-1634, May. 2001.

VEIGA, A. D. **Identificação de QTLs associados à resistência a cercosporiose e produção de grãos de milho**. 2011. 90 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

WEDZONY, M.; RÖBER, F.; GEIGER, H. H. Chromosome elimination observed in selfed progenies of maize inducer line RWS. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON SEXUAL PLANT REPRODUCTION, 7., 2002, Lublin. **Abstracts...** Lublin: Maria Curie-Sklodowska University, 2002. p. 173.

ZABIROVA, E. R. et al. Technology of the mass accelerated production of homozygous lines: in Russian. **Kukuruza i Sorgo**, Moskva, v. 4, n. 1, p. 17-19, 1996.