



**MARCELA REZENDE DE CARVALHO**

**SELEÇÃO DE PROGÊNIES VISANDO À OBTENÇÃO DE  
INDUTORES DE HAPLOIDES EM MILHO**

**LAVRAS-MG  
2017**

**MARCELA REZENDE DE CARVALHO**

**SELEÇÃO DE PROGÊNIES VISANDO À OBTENÇÃO DE INDUTORES DE  
HAPLOIDES EM MILHO**

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 Melhoramento Genético de Plantas de Importância Econômica para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. João Cândido de Souza  
Orientador

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2017**

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

Carvalho, Marcela Rezende de.

Seleção de progênies visando à obtenção de indutores de  
haploides em milho / Marcela Rezende de Carvalho. - 2017.

61 p. : il.

Orientador(a): João Cândido de Souza.

Coorientador(a): Welison Andrade Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Indutor de haploidia. 3. Elemento transponível.  
I. Souza, João Cândido de. II. Pereira, Welison Andrade. III. Título.

**MARCELA REZENDE DE CARVALHO**

**SELEÇÃO DE PROGÊNIES VISANDO À OBTENÇÃO DE INDUTORES DE  
HAPLOIDES EM MILHO**

**SELECTION OF PROGENIES FOR THE OBTAINMENT OF HAPLOID  
INDUCTORS IN MAIZE**

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 Melhoramento Genético de Plantas de Importância Econômica para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 12 de setembro de 2017.  
Dr. Adriano Delly Veiga – EMBRAPA  
Dr. Magno Antônio Patto Ramalho – UFLA

Prof. Dr. João Cândido de Souza  
Orientador

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2017**

*Aos meus pais, Haroldo e Marluce, ao meu irmão Henrique, ao meu namorado Levy e aos meus avós, Murilo e Márcia, por serem meu exemplo de vida, humildade e caráter e por todo apoio e incentivo que me deram nesta etapa tão importante da minha vida.*

*Com muito amor,*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar e me guiar sempre pelos melhores caminhos, além de me dar forças para superar e obter sucesso nos obstáculos da vida.

À minha mãe, Marluce, ao meu pai, Haroldo, e ao meu irmão, Henrique, por todo apoio, amor e força, essenciais na minha caminhada. Ao meu namorado, Levy, por sempre me incentivar na busca pela minha realização profissional, e, principalmente, por todo amor e carinho. Aos meus avós, Márcia e Murilo, pelo exemplo de vida e simplicidade e a toda minha família pelo carinho e união. Sem vocês eu nada seria, vocês são o motivo e o incentivo de todas as minhas lutas.

À Universidade Federal de Lavras, pelos sete ótimos anos, nos quais pude usufruir de sua excelência, obtendo muito crescimento profissional e, principalmente, pessoal. Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, especialmente ao Prof. João Cândido pela orientação, por sempre me incentivar a buscar alternativas para solucionar os problemas e a ser persistente. Ao Prof. Magno pelas dicas de ouro e por sempre questionar de forma construtiva, instigando a busca incessante de conhecimento. Ao Prof. Welison por dispor grande parte do seu tempo para me ajudar, sempre com muita boa vontade e paciência, auxiliando de forma essencial para a conclusão deste trabalho.

Aos demais professores do programa, pelos ensinamentos e experiências transmitidos. Aos funcionários do departamento, em especial, Zélia, Rafaela, Lílian, Ironдина e Patrícia, pelo ótimo convívio e ajuda constante.

Aos técnicos Lamartine, Miler, Felipe e Ramon por sempre estarem dispostos a auxiliar da melhor maneira possível, e, principalmente, à Gisele pelas palavras de conforto, pela dedicação e pela imensurável ajuda que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Melhoramento Genético de Milho, Gen e do G-Milho, pelo companheirismo, por toda ajuda e por dividirem comigo importantes etapas de crescimento profissional e pessoal. Aos funcionários da fazenda Muquém, Léo, Lindolfo e Zé Carlinhos, por todo suporte prestado na condução dos experimentos.

Ao Indalécio, por todo auxílio nas análises estatísticas e pela imensa paciência e disposição em ajudar. Ao Prof. Daniel, pela disponibilidade e auxílio na estatística para definição das estratégias de trabalho. Ao Prof. Pascoal, Profa. Leila, Filipe e Adalvan pela

disposição e amparo na Citometria. Ao Prof. João Almir, Prof. Renato, Dalva, Jacqueline e Geraldo pela imensurável boa vontade e pela disponibilidade ao emprestar os equipamentos solicitados.

À Profa. Vânia, Profa. Larissa, Profa. Giovana, Profa. Flávia, Evellyn Couto, Camila Bastos, Adriano Delly e Roberto Trindade por todas as ideias e ajudas fornecidas, sempre com muita disposição.

Às amigas, Paula Vieira, Heloisa, Paula Furtado, Dyanna por toda ajuda nas disciplinas e por dividirem comigo ótimos momentos de descontração. À grande amiga Magda pelo apoio e pelas palavras sábias e de muita importância na minha vida. A todos os meus amigos por sempre torcerem pelo meu crescimento e sucesso.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente auxiliaram de alguma forma e torceram pela finalização e sucesso deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

Submeter progênies indutoras de haploidia a ciclos de seleção possibilita ganhos quanto à taxa de indução de haploides e auxilia na identificação e seleção daquelas que apresentem maior desempenho. Para estimar as taxas de indução, são utilizados métodos para identificação dos haploides. O marcador morfológico R-navajo é o mais utilizado, mas pode ser inibido devido à expressividade variável e penetrância incompleta, à presença de alelos inibidores dos genes reguladores de antocianina, a elementos transponíveis, a fatores ambientais ou do genótipo utilizado como doador de genoma para o haploide. Objetivou-se neste trabalho recombinar as progênies indutoras de haploidia existentes no Programa de Genética e Melhoramento de Plantas da UFLA e selecionar as mais adaptadas às condições tropicais e com maiores porcentagens de indução. Os experimentos foram realizados em Lavras-MG. Na safra 2015/2016, foi realizada a recombinação de sementes S<sub>2:4</sub>. Os indivíduos obtidos foram autofecundados e avaliados quanto à indução de haploidia pelo do cruzamento com o híbrido 30A37PW. As sementes provenientes dos cruzamentos dos indutores com o doador foram avaliadas quanto à indução de haploidia. No entanto, houve a completa inibição do R1-navajo, tornando necessária a busca por outros métodos de identificação e para a explicação dessa inibição. O método que obteve resultados foi a semeadura de 200 sementes por tratamento em casa de vegetação e a seleção dos possíveis haploides pelo tamanho de plântula aos 50 dias. Aquelas que apresentavam tamanho menor que a metade da média dos demais indivíduos do tratamento foram selecionadas como possíveis haploides e submetidas à confirmação por citometria de fluxo. Foi realizado o cálculo da taxa de indução, considerando os haploides confirmados pela citometria de fluxo. As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se modelos lineares generalizados mistos (MLGM). Para maior conhecimento da inibição do R1-navajo, foram realizadas análises moleculares com marcadores específicos desenhados para o gene C1 e para o alelo C1-I inibidor. O DNA dos híbridos 30A37PW e DKB390, utilizados como controle, foram extraídos, submetidos à PCR e observados em gel de agarose 1%. Duas bandas expressivas não esperadas foram identificadas, extraídas e submetidas ao sequenciamento de DNA para melhor conhecimento. A estratégia de seleção de haploides pelo tamanho não permitiu a avaliação precisa da taxa de indução, porém consistiu no método mais adequado diante das circunstâncias. Houve incremento na taxa de indução das progênies anteriores para as do presente ciclo. Observou-se que não é possível, de forma viável e prática, distinguir os indivíduos haploides nos casos de inibição total do R1-navajo. Quando se deseja utilizar o R1-navajo, é indicado realizar testes para garantir que o genótipo doador não possui inibidores de coloração. São necessários estudos e técnicas alternativas ao R1-navajo para a identificação de possíveis haploides e cálculo das taxas de indução. Constatou-se ainda, que o alelo inibidor C1-I não está presente no híbrido 30A37PW e não causou a inibição do R1-navajo. Porém, o sequenciamento de uma das bandas obteve alinhamento de 99% com um elemento transponível de repetição invertida em miniatura da família *Heartbreaker* que, provavelmente, causou o silenciamento do gene C1 e a inibição da coloração conferida pelo R1-navajo.

**Palavras-chave:** *Zea Mays*. Indutor de haploidia. Elemento transponível.



## ABSTRACT

Submitting haploid inducing progenies to selection cycles allows gains in haploid induction rate and aids in the identification and selection of those that present better performance. Haploid identification methods are used to estimate induction rates. The R-navajo morphological marker is the most used but can be inhibited to the presence of inhibiting alleles of the anthocyanin regulating genes, transposable elements, environmental factors, or genotype used as genome donor for the haploid, due to variable expressiveness and incomplete penetrance. With this work, the objective was to recombine haploid-inducing progenies, existing in the Plant Genetics and Breeding Program of UFLA, and select the most adapted to tropical conditions and with the highest percentages of induction. The experiments were conducted at Lavras, MG, Brazil.  $S_{2:4}$  seeds of the 2015/2016 harvest were recombined. The obtained individuals were self-fertilized, and evaluated regarding haploid-induction by crossing with hybrid 30A37PW. Induction was verified for the seeds derived from the cross between the inducers and the donors. There was complete inhibition of R1-navajo, demanding the search for other identification methods and explanation for this inhibition. The method that obtained results was the sowing of 200 seeds per treatment in greenhouse, and the selection of possible haploids by the size of the seedling at 50 days of age. Those presenting size inferior to half the average of the remaining individual of the treatment were selected as possible haploids and submitted to confirmation by flow cytometry. The calculation of the induction rate was done considering the haploids confirmed by flow cytometry. The statistical analyses were done using mixed generalized linear models (MGLM). For better understanding the inhibition of the R1-navajo, molecular analysis with specific markers designed for gene C1 and allele C1-I inhibitor were performed. The DNA of hybrids 30A37PW and DKB390, used as control, were extracted, submitted to PCR, and observed in 1% agarose gel. Two non-expected expressive bands were identified, extracted, and submitted to DNA sequencing for better understanding. The haploid selection strategy by size did not allow a precise assessment of the induction rate, however, it was the most adequate method given the circumstances. There was increase in the induction rate of the previous progenies when compared to the present cycle. It was impossible to, feasibly and practically, distinguish haploid individuals in the cases of total inhibition of R1-navajo. When desiring to use the R1-navajo, it is indicated that tests be conducted to guarantee that the donor genotype does not present coloration inhibitors. Alternate studies and techniques are necessary to identify possible haploids and to calculate induction rates. It was verified that the C1-I inhibiting allele is not present in the 30A37PW hybrid and it has not caused the inhibition of the R1-navajo. However, the sequencing of one of the bands obtained 99% of alignment with a miniature inverted replicate transposable element of the *Heartbreaker* family, which probably caused the silencing of the CA gene and the coloration inhibition conferred by the R1-navajo.

**Keywords:** *Zea Mays*. Haploid inductor. Transposable element.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Importância das linhagens duplo-haploides na cultura do milho .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Obtenção de haploides pelo método <i>in vivo</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Indutores de haploidia .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Determinação da plodia .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Marcador morfológico R1-navajo .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Vigor dos haploides .....</b>	<b>25</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Citometria de fluxo .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Área Experimental .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Material genético utilizado e obtenção de haploides .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>Identificação de haploides .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Marcador morfológico <i>R1-navajo</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Vigor das plântulas .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Citometria de fluxo .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Análises dos dados .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.4.1</b>	<b>Taxa de indução .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.4.2</b>	<b>Análises estatísticas .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.5</b>	<b>Identificação do gene C1 e do alelo inibidor C1-I .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.6</b>	<b>Sequenciamento de DNA .....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Marcador morfológico R1-navajo .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Vigor de plântulas .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Citometria de fluxo .....</b>	<b>41</b>
<b>4.4</b>	<b>Taxa de indução de haploidia e análises estatísticas .....</b>	<b>43</b>
<b>4.5</b>	<b>Identificação do gene C1 e do alelo inibidor C1-I .....</b>	<b>48</b>
<b>4.6</b>	<b>Sequenciamento de DNA .....</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Na produção convencional de linhagens, é preciso realizar de seis a oito autofecundações para atingir homozigose de até 99% (GEIGER; GORDILLO, 2009; CHANG; COE, 2009). Além de demandar muito tempo, esse procedimento não permite a completa homozigose das linhagens, o que impede um ganho genético maior na produção de híbridos. Devido a isso, visando a otimizar tempo e a reduzir custos, os melhoristas têm buscado outros métodos de obtenção de linhagens ou de seleção, e implementado técnicas tais como obtenção de linhagens duplo-haploides, seleção genômica e fenotipagem em larga escala.

O método de obtenção de duplo-haploides (DH) tem sido largamente utilizado pelas empresas privadas e públicas. Por meio dessa tecnologia, é possível reduzir para duas ou três as etapas utilizadas na obtenção de linhagens (PRASANNA; CHAIKAM; MAHUKU, 2012), uma vez que no primeiro ano, ocorre a indução de haploides e a duplicação cromossômica para a formação das linhagens DH.

O processo de desenvolvimento de linhagens DH pode ter variações na forma de obtenção do indivíduo haploide. Esse indivíduo pode ser obtido pelo uso de gene indutor da haploidia ou cruzamentos interespecíficos (método *in vivo*) ou cultura de anteras e micrósporos (método *in vitro*) (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012). Em milho, a primeira alternativa é mais bem sucedida, e a mais adotada.

Dentre as etapas envolvidas na cultura do milho, estão: seleção da linhagem indutora de haploidia, cruzamento da linhagem indutora de haploidia com um genótipo doador do genoma desejado para a obtenção dos possíveis haploides, identificação dos possíveis haploides, duplicação cromossômica das sementes selecionadas e multiplicação e seleção das linhagens DH.

O sucesso da obtenção de linhagens DH em milho depende, inicialmente, de um indutor de haploidia. As linhagens indutoras, inicialmente descobertas, tais como W23, que apresenta entre 1 e 3% de taxa de indução, e Stock 6, com cerca de 3,23% (KERMICLE, 1969, 1973), possuem origem temperada e não se desenvolvem bem em clima tropical. A partir dessas duas linhagens surgiram outras com taxas de indução variáveis (CHALYK, 1999; ROTARENCO et al., 2010; PRASANNA; CHAIKAM; MAHUKU, 2012), foram obtidos no CIMMYT os indutores de origem tropical conhecidos hoje, uma vez que as

empresas privadas não divulgam seus resultados. Os indutores do CIMMYT, TAIL 8 e TAIL 9, apresentam taxas entre 8 e 12% (CHAIKAM et al., 2016).

A tropicalização do indutor é importante, principalmente, na coincidência do florescimento e na resistência a doenças. Para que essa tropicalização ocorra, é importante a realização do cruzamento do indutor temperado portador dos genes de haploidia com um genótipo de milho tropical vigoroso.

No programa de Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Lavras, encontram-se progênies indutoras de haploidia em milho apresentando taxas, em média, de 1,67% de indução de haploides (RIBEIRO, 2016). A continuidade do programa de melhoramento dessas progênies é de fundamental importância, e deve objetivar o incremento na taxa de indução, bem como a tropicalização das progênies.

É possível empregar diversos métodos para identificar progênies indutoras de haploidia superiores e realizar a predição dos ganhos obtidos na taxa de indução. A utilização de ciclos de seleção possibilita ganhos quanto à taxa de indução das progênies, além de auxiliar na identificação e seleção daquelas que apresentem maior desempenho para que sejam utilizadas no próximo ciclo. É importante ressaltar que a avaliação por meio de métodos confiáveis e eficazes dessa taxa de indução é de fundamental importância para a seleção das progênies indutoras de haploides em milho.

A verificação da taxa de indução se dá pela identificação do número de indivíduos haploides obtidos. A determinação do nível de ploidia pode ser realizada diretamente, por meio da contagem cromossômica ou através da citometria de fluxo. Métodos indiretos, que podem envolver caracterização citoanatômica e morfológica, também são utilizados.

Na metodologia de duplos-haploides, é comum a utilização do gene marcador R1-navajo na identificação das sementes haploides (CHASE; NANDA, 1965; NANDA; CHASE, 1966). O alelo dominante R1-nj, do gene regulador de antocianina na semente R1, possibilita que as sementes sejam selecionadas visualmente. Porém essa seleção nem sempre é confiável uma vez que o marcador pode apresentar penetrância incompleta e expressividade variável (BELICUAS et al., 2007). Além disso, a presença de alelos inibidores de coloração (CHAIKAM et al., 2014; CHAIKAM et al., 2016), elementos transponíveis (ERHARD JR et al., 2013) ou a ação de fatores ambientais (CHASE, 1969) pode influenciar ou inibir a identificação do haploide pelo R1-navajo. Devido a esse fato, é importante associá-lo a outras metodologias que permitam a seleção de reais haploides para se investigar a taxa de indução.

Empresas privadas de produção de sementes híbridas de milho detêm metodologias bem estabelecidas para a obtenção de linhagens duplo-haploides, e possuem inclusive, linhagens indutoras tropicalizadas com alta indução de haploides e, ainda, híbridos lançados no mercado nos quais uma ou mais linhagens envolvidas são provenientes do método de DH. A DuPont Pioneer alega que, apenas em 2011, mais linhagens de milho foram geradas usando tecnologia DH do que o número total de linhas consanguíneas de milho geradas nos primeiros 80 anos de seu programa de criação (DWIVEDI et al., 2015).

No setor público, o uso da tecnologia de duplo-haploides é mais recente, necessitando de aperfeiçoamentos e divulgações de trabalhos a fim de que o domínio da metodologia seja maior. No Brasil, há universidades promovendo estudos em relação à obtenção de linhagens DH em diferentes espécies e por meio de diferentes métodos. No entanto, as que dependem de indutores de haploidia são incipientes, uma vez que a obtenção de um bom indutor com alta taxa de indução é difícil em diferentes espécies.

Diante do exposto, é importante dar continuidade à recombinação e à seleção das melhores progênes indutoras da UFLA, a fim de divulgar os resultados à comunidade científica e iniciar um programa de melhoramento para obtenção de linhagens DH. Objetivou-se neste trabalho recombinar as progênes indutoras de haploidia existentes no Programa de Genética e Melhoramento de Plantas da UFLA e selecionar as mais adaptadas às condições tropicais e com maiores porcentagens de indução.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Importância das linhagens duplo-haploides na cultura do milho**

A obtenção de híbridos com alto desempenho é proveniente do cruzamento entre linhagens elites (PATERNIANI; CAMPOS, 1999). Tradicionalmente, o processo para obtê-las implica na seleção de indivíduos com médias elevadas para os caracteres desejados, ou seja, alta frequência de alelos favoráveis, seguida de autofecundação. Os descendentes de cada indivíduo são semeados em linha e submetidos à avaliação de acordo com os caracteres de interesse. As plantas selecionadas são autofecundadas a fim de aumentar a taxa de homozigose. Esse procedimento de avaliação e autofecundação é repetido por seis a oito etapas de campo (PATERNIANI; CAMPOS, 1999) até que se obtenha uma linhagem com cerca de 99% de homozigose (PATERNIANI; CAMPOS, 1999; FORSTER; THOMAS,

2005; GEIGER; GORDILLO, 2009; CHANG; COE, 2009; PRASANNA; CHAIKAM; MAHUKU, 2012).

A técnica de haploides duplicados ou duplo-haploides (DH) é uma alternativa para acelerar a obtenção de linhagens de milho (CHASE, 1952). A metodologia mais utilizada na cultura do milho para a obtenção de haploides é uma metodologia *in vivo*, consiste no cruzamento do genótipo do qual se deseja extrair os haploides com plantas contendo o gene indutor de haploidia, denominadas indutores. Outros métodos como cruzamentos interespecíficos (método *in vivo*), cultura de anteras e micrósporos (método *in vitro*) também podem ser utilizados (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012). Como já citado, a utilização de indutores possui maior adoção na cultura do milho e envolve a seleção da linhagem indutora de haploidia, o cruzamento da linhagem indutora com o genótipo desejado para a obtenção dos possíveis haploides, a identificação dos possíveis haploides, a duplicação cromossômica desses indivíduos e a multiplicação das linhagens identificadas como DH.

A tecnologia DH foi, efetivamente, implantada por programas de melhoramento comercial em larga escala na Europa (SCHMIDT, 2004), América do Norte (SEITZ, 2005) e China (CHEN; LI, 2009). Várias publicações destacam as vantagens de usar a tecnologia DH em programas de melhoramento de milho, incluindo logística simplificada, tempo reduzido para gerar linhagens e híbridos comerciais, demanda de menor área experimental nos campos de melhoramento, resultando em economia de recursos (MILACH, 2007). Strahwald e Geiger (1988) afirmam que é possível aumentar, em até três vezes, a velocidade de obtenção de linhagens por meio do método de duplo-haploides em relação aos métodos tradicionais.

Pode-se citar, ainda, aumento da variabilidade genética e da eficiência de seleção (RÖBER et al., 2005; GEIGER; GORDILLO, 2009; PRASANNA; CHAIKAM; MAHUKU, 2012; BATTISTELLI et al., 2013), pois com plantas homozigotas, a variância aditiva será máxima e os efeitos de dominância e epistasia serão neutralizados, o método também aumenta a discrepância genética entre famílias e diminui a discrepância residual (BORDES et al., 2007).

A obtenção da completa homozigose e a possibilidade da realização de pré-cruzamentos da linhagem homozigota com o testador devem ser ressaltados, no método convencional os testes são realizados com material ainda em segregação. Dessa maneira, é permitido ao melhorista selecionar as melhores linhagens duplo-haploides, ainda, no ciclo D1, logo após a duplicação, acelerando o processo de obtenção de híbridos, o que não acontece com uma linhagem convencional.

Uma vantagem, ainda pouco explorada, é que, no método tradicional por meio de autofecundações sucessivas, há um aumento da ocorrência de recombinações entre os genes ligados. Dessa forma, a possibilidade de manter combinações favoráveis existentes nas linhagens genitoras é pequena, ou seja, na geração  $F_{\infty}$ , todas as linhagens resultantes serão virtualmente recombinantes, inclusive nos genes ligados. A recombinação de genes ligados ocorre somente em uma meiose nos DH, ou seja, naquela que originou o gameta responsável pela formação da planta. Isso garante que grande parte dos locos ligados não será recombinada e a chance de manter combinações existentes em linhagens parentais aumenta (PIERRE et al., 2011). Chase & Nanda (1965) afirmam, ainda, que linhagens DH tendem a ter menor recombinação causada por mutações, quando comparadas às linhagens desenvolvidas por métodos convencionais.

Apesar das notáveis vantagens expostas anteriormente, alguns autores relatam que com a duplicação dos cromossomos do indivíduo F1 haploide, pode-se obter genótipos homocigotos para alelos recessivos na proporção de  $(1/2)^n$ , em que n é o número de genes. Considerando-se uma geração F2, no método convencional, essa probabilidade seria, consideravelmente, menor,  $(1/4)^n$ . O método de produção de DH, ainda, pode ser considerado limitado, devido à baixa taxa de indução de haploides por meio da linhagem indutora, à falta de indutores tropicalizados em empresas públicas no Brasil, aos sistemas de marcador morfológico não serem sempre precisos e eficientes na detecção das sementes haploides e, ainda, devido à necessidade de um protocolo de duplicação eficiente e que permita repetibilidade de resultados e obtenção de um número razoável de DH.

Durante a duplicação dos haploides, é necessária a utilização de um agente antimitótico, o agente mais utilizado é a colchicina. Um "haploide duplicado" é um genótipo formado quando células haploides (n) sofrem com êxito tanto a duplicação de cromossomos espontânea quanto a induzida artificialmente (PRASANNA; CHAIKAM; MAHUKU, 2012). Devido à elevada toxicidade dos agentes antimitóticos e do enorme estresse causado nas plântulas, há grandes índices de mortalidade e alta produção de plantas mixoploides (RÖBER et al., 2005), bem como pouca produção de pólen, o que propicia baixa eficiência na autofecundação das linhagens DH. Tal produção pode ser aumentada, realizando o cruzamento de uma geração mais avançada e, conseqüentemente, menos frágil, da linhagem duplo-haploide ou com a utilização de um antimitótico com menor efeito tóxico. Tratamentos químicos alternativos ou abordagens como trifluralina, amiprofos-metilo e gás óxido nitroso têm sido sugeridos para melhorar as taxas de duplicação (KITAMURA et al., 2009), mas não

são tão eficazes como a colchicina. Portanto, duplicação do genoma continua a ser um gargalo fundamental para melhorar a eficiência da tecnologia DH.

Os haploides podem tornar-se férteis sem tratamento particular, isto é, pela duplicação espontânea do genoma haploide. A duplicação espontânea do genoma é um método alternativo à duplicação artificial do genoma (GEIGER; SCHÖNLEBEN, 2011; KLEIBER et al., 2012; WU et al., 2017). Barnabás et al. (1999) relataram que as taxas de duplicação espontânea do genoma haploide variaram de 0 a 21,4% entre o germoplasma de milho.

Após a indução de haploides *in vivo* e seu plantio no campo, os haploides de milho apresentam um alto grau de fertilidade feminina, já a fertilidade masculina é altamente reduzida (CHALYK, 1994; GEIGER e SCHÖNLEBEN, 2011; KLEIBER et al., 2012; WU et al., 2017), o que limita o número de linhagens DH produzidas em uma população sem tratamento com colchicina. Estudos devem ser realizados para a obtenção de métodos que aumentem a taxa de fertilidade masculina dos haploides. Kleiber et al. (2012) concluíram que a escolha de um ambiente apropriado é uma opção para evitar taxas ainda menores de fertilidade masculina em haploides, os autores observaram que essa taxa é, significativamente, menor em cultivos em casa de vegetação, quando comparado com o campo (Kleiber et al., 2012). No entanto, o uso de casas de vegetação limita o número de linhagens DH que podem ser produzidas (Kleiber et al., 2012).

No setor público, o uso da tecnologia de duplo-haploides é mais recente e pode ser considerada incipiente, necessitando de aperfeiçoamentos e domínio de uma metodologia que permita repetibilidade de resultados, e para isso, estudos e publicações são necessárias. Segundo Prasanna, Chaikam e Mahuku (2012) isso pode ser devido a vários fatores, incluindo pouco conhecimento sobre a tecnologia DH, a falta de acesso aos indutores haplóides tropicalizadas, ou a falta de relevante conhecimento prático para integrar, efetivamente, DH em programas de melhoramento.

No geral, ainda existem desafios no uso da tecnologia DH que devem ser abordados. Estes incluem uma melhor compreensão dos processos moleculares e celulares envolvidos na formação de plantas haploides, bem como a duplicação do genoma e suas consequências, a necessidade de estabelecer a tecnologia DH, maior aperfeiçoamento na formação DH mais eficaz (incluindo procedimentos automatizados) e desenvolvimento de novas estratégias baseadas em haploides ou DHs, aumento de germoplasma, manejo de recursos genéticos e desenvolvimento de novos tipos de populações experimentais (LUBBERSTEDT et al., 2015 citado por DIWIVEDI et al., 2015).



## 2.2 Obtenção de haploides pelo método *in vivo*

A haploidia ocorre naturalmente em, aproximadamente, 100 espécies de angiospermas, no entanto é considerada rara. O primeiro relato de plantas haploides foi descrito em *Datura stramonium*, por Blakeslee et al. (1922). A primeira planta haploide de milho foi descrita por Stadler e Randolph, em 1929 (dados não publicados citados em RÖBER et al., 2005), e Chase (1952) foi o pioneiro a propor o emprego de haploides de milho com o intuito de acelerar a obtenção de linhagens.

Um em cada mil indivíduos de milho podem ser haploides naturais, quantidade não suficiente para ser utilizada em programas de melhoramento de milho (CHASE, 1963; RÖBER et al., 2005). Frequências maiores podem ser obtidas pelo uso de gene indutor da haploidia ou cruzamentos interespecíficos (método *in vivo*), cultura de anteras e micrósporos (método *in vitro*) (ZHANG et al., 2008; FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012). Em milho, os métodos *in vitro* possuem um sucesso muito limitado devido à falta de capacidade de resposta dos vários genótipos de milho, além da necessidade de se ter um bom laboratório e pessoal qualificado (PRASANNA; CHAIKAM; MAHUKU, 2012).

A metodologia *in vivo* é mais bem sucedida graças à descoberta de linhagens indutoras de haploidia, que possuem, ainda, a incorporação de um gene marcador morfológico de antocianina R1-navajo para facilitar a identificação de haploides nos estágios de sementes e mudas (NANDA; CHASE, 1966; GREENBLATT; BOCK, 1967; CHASE, 1969). A obtenção de haploides por esse método é de baixo custo e não depende do uso de reagentes ou equipamentos caros (BELICUAS et al., 2007).

Empresas de melhoramento detêm preferência pelas linhagens indutoras gimnogenéticas, nas quais o embrião é proveniente da diferenciação da oosfera. A preferência pela utilização de indutores gimnogenéticos pelas empresas está relacionada não só às maiores taxas de indução dos indutores modernos, mas também à praticidade. Quando se utiliza um indutor gimnogenético, o manejo no campo é mais fácil, uma vez que vários genótipos podem ser induzidos simultaneamente (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BOREM, 2012). Nesse caso, a linhagem indutora é utilizada como doadora de pólen.

Entretanto, no caso dos indutores androgenéticos, a planta de que se deseja extrair as linhagens é utilizada como parental masculino e a linhagem indutora como feminino. Dessa forma, o embrião será formado a partir do núcleo reprodutivo do grão de pólen (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BOREM, 2012).

Inúmeras hipóteses são lançadas a fim de se explicar a formação do embrião haploide. Para tanto, é necessário o conhecimento da fertilização normal de um óvulo, na qual há a formação do embrião diploide. O grão de pólen proveniente do parental masculino é formado por dois núcleos espermáticos e um núcleo vegetativo. O núcleo vegetativo é utilizado na formação do tubo polínico que conduz os núcleos espermáticos até o óvulo. Um dos núcleos espermáticos fertiliza a oosfera, dando origem ao embrião diploide. O outro será conduzido até os núcleos polares do óvulo, onde ocorrerá a fertilização e formação do endosperma triploide. Dessa forma, pode-se definir como linhagem indutora qualquer planta capaz de impedir a formação do embrião diploide, fazendo com que o material genético do embrião permaneça haploide (DANG et al., 2010).

Geiger e Gordillo (2009) citam duas hipóteses 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, 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. Zhang et al. (2008) também relataram essa hipótese em seus estudos. 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. Chalyk et al. (2003) e Sarkar e Coe (1966) também relataram essa última hipótese.

A planta haploide é de fundamental importância para a obtenção de linhagens duplo-haploides, uma vez que, a partir da duplicação das células do meristema das sementes haploides, serão originadas inflorescências férteis. Se essas células que dão origem às inflorescências tornarem-se diploides, então a fertilidade é restaurada, e obtém-se o indivíduo duplo-haploide por meio de autofecundação (MELCHINGER et al., 2015).

### **2.3 Indutores de haploidia**

A indução de haploides *in vivo* por meio de cruzamentos com genótipos intraespecíficos especiais, denominados indutores, é exclusiva da cultura do milho (HU et al., 2016). Os mecanismos moleculares que envolvem os indutores de haploides maternos em milho ainda não estão claramente elucidados (NAIR et al., 2017). Para explicar a indução de haploidia por meio dos indutores, dois loci de traços quantitativos (QTL), *qhir1* e *qhir8*, com

grandes efeitos na taxa de indução de haploides, foram mapeados com precisão no cromossomo um (PRIGGE et al., 2012, DONG et al., 2013) e no cromossomo nove (LIU et al., 2015), respectivamente. Dois QTL, *qmh1* e *qmh2*, que influenciam o efeito materno sobre as taxas de indução, foram detectados nos cromossomos um e três, respectivamente (WU et al., 2014).

Hu et al. (2016), utilizaram GWAS para identificar as regiões genômicas necessárias para a característica de indução de haploides. Dissecaram o intervalo de suporte combinado do QTL *qhir1*, detectados em estudos anteriores, em dois segmentos genômicos, intimamente, relacionados à expressão de indução. O primeiro segmento, chamado *qhir11*, compreende uma região já bem mapeada, mas não foi o diagnóstico para diferenciar indutores e não indutores. O segundo segmento, denominado *qhir12*, apresentou um alelo haplótipo comum a 53 linhagens indutoras avaliadas, e não foi encontrado em nenhum dos 1.482 não indutores. Ao comparar os dados de um indutor com 14 não indutores, os autores detectaram na região *qhir12* três genes candidatos envolvidos em ligação de DNA ou aminoácidos, no entanto, nenhum para *qhir11*. Os genes GRMZM2G137502 e GRMZM2G135834, cada um codificando uma proteína de ligação a DNA, e GRMZM2G096682, que codificam uma proteína de ligação a aminoácido, constituem candidatos intuitivos para desencadear a indução de haploides em milho.

Em contraste com a hipótese apresentada por Hu et al. (2016), um segmento da sub-região de *qhir11* foi evidenciado nos estudos de Nair et al. (2017) como a única sub-região com forte efeito para a habilidade de indução de haploides, enquanto *qhir12* teve um efeito insignificante. Os autores evidenciaram ainda, que *qhir11* está mais fortemente associado que *qhir12* com a distorção de segregação e o aborto de grãos, dois traços associados à indução de haploides materna. Dessa maneira, Nair et al. (2017) sugerem que marcadores moleculares que delimitem *qhir11* podem ser utilizados para o desenvolvimento mais eficiente de novos indutores adaptados a diferentes zonas agroclimáticas usando seleção assistida por marcador.

Vale ressaltar que os indutores devem ser, constantemente, monitorados quanto às suas respectivas taxas de indução a fim de evitar que essa característica se deteriore devido aos genes causadores de distorção de segregação (XU et al., 2013; MELCHINGER et al., 2016). Observa-se, ainda, que os grãos de pólen viáveis dos indutores têm menor capacidade competitiva perante grãos de pólen de genótipos normais (XU et al., 2013).

As primeiras linhagens indutoras identificadas são de origem temperada, Stock 6 (gminogenética) ou W23 (androgenética), fator que dificulta o manejo e desenvolvimento

destas em condições tropicais. A porcentagem de indução observada na Stock 6 foi de 3,23% (SARKAR; COE, 1966) e, na W23, variou entre 1 e 3% (KERMICLE, 1969). Em condições temperadas, cruzamentos entre essas linhagens foram realizados a fim de aumentar a taxa de indução. Lashermes e Beckert (1988) promoveram o cruzamento entre essas duas linhagens e obtiveram a linhagem WS14, com taxa de indução variando entre 3 e 5%.

As linhagens ZMS e KMS foram obtidas através do cruzamento da Stock 6 com a WS14 e o cruzamento da ZMS com KMS deu origem à linhagem MHI, com 6,5% de porcentagem média de indução (EDER; CHALIK, 2002). O cruzamento da linhagem WS14 com a KMS deu origem à linhagem RWS com indução gminogenética de haploides variando entre 8 e 10% (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

O indutor RWK-76 foi relatado por Geiger e Gordillo, (2009) com porcentagem de indução de 9%. Esse indutor foi cruzado com a linhagem indutora RWS e apresentou entre 9 e 10% de indução. Outro cruzamento realizado foi da linhagem RWK-76 com a RWS, apresentando 9 a 10% de indução (ROTARENCO et al., 2010), além de melhores desempenhos agronômicos (TSENG, 2012). Desse cruzamento, foram selecionadas nove linhagens indutoras com taxas entre 10,7 e 16,8%, enquanto a Stock 6 obteve indução variando entre 0,7% a 2,1% e a MHI de 5,5% a 16,8% (ROTARENCO et al., 2010).

A maioria das linhagens indutoras existentes está relacionada com a Stock6 (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005). A capacidade de indução haploide aumentou de menos de 2% para 6-10% em indutores modernos (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005). Taxas mais elevadas, acima de 10%, foram obtidas por Sarkar et al. (1994), e Shatskaya et al. (1994) em progênies de cruzamentos entre Stock6 e germoplasma indiano e russo. Resultados semelhantes foram obtidos por Chalyk (1999) com um indutor proveniente do cruzamento de Stock6 com germoplasma da Moldávia (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

Kelliher et al. (2016) obtiveram taxas de indução de 3,6% através do uso de transgenes CENH3-tailswap, o que faz essa técnica promissora para a modificação e criação de linhagens indutoras. Os autores argumentaram que centrômeros construídos com proteínas CENH3 alteradas funcionam normalmente até que são forçados a competir com centrômeros do tipo selvagem para o carregamento centrômero com componentes do cinetócoro no zigoto híbrido e embrião. Isso faz com que a fixação do fuso seja reduzida no genoma do indutor, que conduz à eliminação dos cromossomos pela fragmentação, e a formação de micronúcleos durante a mitose. Dessa forma, haploides foram obtidos com mais frequência, quando a CENH3 alterada estava do lado feminino no retrocruzamento (~ 30%) do que o quando

utilizado como parental masculino (4%), mas penetrância incompleta é uma característica comum de eliminação genoma em outros sistemas de indução (ZHAO et al., 2013).

No CIMMYT, foram desenvolvidas indutores híbridos tropicalizados denominados TAIL 8 e TAIL 9, com induções variando de 8 a 12%. Além disso, desenvolveram uma linhagem indutora tropical de raiz vermelha que possibilita que plântulas haploides sejam selecionadas com maior precisão, antes da duplicação, devido à ausência da coloração vermelha (CHAIKAM et al., 2016). O valor para a aquisição do indutor do CIMMYT juntamente a um dos genitores é em torno de U\$25.000 (PRASANNA et al., 2012), o que torna, ainda, mais importante o desenvolvimento de indutores pelas universidades.

A maioria das linhagens indutoras disponíveis, hoje, é de origem temperada, desenvolvidas, em sua maioria, na Europa. No entanto, os indutores temperados não estão adaptados para o crescimento em condições tropicais, o que representa uma restrição séria ao seu uso em um programa de melhoramento em grande escala (BELICUAS et al., 2007). Ribeiro (2016) salienta que é possível obter e explorar a variabilidade genética para o caráter indução de haploidia em programas de melhoramento de milho, com o principal objetivo de aumentar a indução e ao mesmo tempo selecionar outros caracteres agrônômicos desejáveis, que facilitem a utilização dessas plantas em condições tropicais.

Diante do exposto, e em vista da importância da metodologia DH, é fundamental que o Brasil desenvolva indutores de haploidia tropicais nas instituições públicas a fim de tornar a técnica de duplo-haploides cada vez mais acessível e eficaz, garantindo materiais genéticos de milho cada vez melhores e maior acessibilidade ao conhecimento científico para a população.

## **2.4 Determinação da ploidia**

A precisão e agilidade na identificação de haploides obtidos pelo cruzamento do indutor de haploidia com o germoplasma de interesse é fundamental para o sucesso do aperfeiçoamento dos indutores e da aplicação da técnica de duplo-haploides. O reconhecimento do número correto de haploides gerados por um indutor é fundamental para o cálculo das taxas de indução e seleção dos melhores indutores. Tal reconhecimento, também, permite que sejam submetidos à duplicação cromossômica apenas os reais haploides, evitando a utilização de recursos de forma desnecessária e otimizando tempo.

São encontrados na literatura diversos métodos para a identificação de haploides utilizados na cultura do milho. A determinação do nível de ploidia pode ser realizada

diretamente, por meio da contagem cromossômica (RIBEIRO, 2016) ou através da citometria de fluxo (DOLEZEL, 1997; BARRET; BRINKAMANN; BECKERT, 2008; DANG et al., 2012; CHOE et al., 2012). Métodos indiretos, que podem envolver caracterização citoanatômica e morfológica, também são utilizados, como por exemplo, marcador morfológico R1-navajo (Chase e Nanda, 1965), demais genes de coloração como B1 e PL1 (ROTARENCO; DICU; SARMANIUC, 2009), vigor de planta (BATTISTELLI et al., 2013; RIBEIRO, 2016), pesagem (SMELSER et al., 2015), teor de óleo (MELCHINGER et al., 2013), resistência à herbicidas (TSENG, 2012), triagem baseada em infravermelho próximo reflectância espectroscopia – NIRS (TSENG, 2012; JONES et al., 2012), marcador *glossy 1* (BORDES et al., 1997), marcador vermelho de raiz (CHAIKAM et al., 2016), análise anatômica de estômatos (CHOE et al., 2012), e, ainda, número de cloroplastos nas células-guarda (HO et al., 1990) consistem em alguns deles.

Muitos desses métodos são utilizados de forma associada por não serem totalmente eficientes e induzirem seleção de falsos haploides ou por serem trabalhosos e dificilmente aplicáveis em grande escala. Tseng (2012) ressalta que há grande demanda de procedimentos simples e eficazes para a identificação de haploides. A autora define, ainda, que um processo ideal de identificação deve ser: (i) viável, de preferência durante a fase de sementes ou mudas; (ii) aplicável para todas as origens genéticas e todos os germoplasmas; (iii) deve ser rápido e de baixos custos; (iv) deve ter a possibilidade de êxito com a automação.

#### **2.4.1 Marcador morfológico R1-navajo**

O sistema de marcador morfológico de antocianina, R1-navajo, descrito por Chase e Nanda (1965), é uma alternativa amplamente utilizada (NANDA; CHASE, 1966; GREENBLATT; BOCK, 1967; CHASE, 1969; EDER; CHALYK, 2002) a fim de distinguir as sementes haploides das diploides. O método possui limitações, mas garante a redução no número de indivíduos diploides, os quais não são interessantes para a técnica de duplo-haploides ou para a identificação de taxas de indução de haploidia. Alguns autores consideram que a utilização de linhagens DH em escala comercial só é possível devido a essa marcação morfológica nas sementes de milho (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO e BORÉM, 2012).

A maior parte dos indutores de haploidia descritos na literatura possui o sistema *R1-navajo*. Nesse sistema, o alelo dominante R1-nj, do gene regulador de antocianina R1, confere

pigmentação arroxeadada ao endosperma e ao embrião de sementes provenientes do cruzamento do indutor com o genótipo a ser induzido, permitindo a identificação de haploides (CHASE; NANDA, 1965). Como o alelo pigmentante está presente no indutor, toda parte da semente que portar o genoma do indutor, potencialmente expressará o pigmento. O embrião haploide não apresenta o genoma do indutor, permanecendo branco enquanto o endosperma triploide apresenta coloração.

As sementes obtidas desse cruzamento podem ser classificadas com maior elucidação conforme os critérios propostos por Vanous (2011): (i) Híbridos - O gene R1-nj faz com que a camada de aleurona do endosperma e o escutelo do embrião expressem uma pigmentação roxa. Nesse caso, o endosperma é triploide normal e um embrião normal diploide está presente. (ii) Haploides - A pigmentação é expressa na camada de aleurona, mas está ausente a partir do escutelo. Essas sementes contêm endosperma triploide normal e um embrião haploide. (iii) Abortados - Sementes que expressam pigmentação no escutelo do embrião e o endosperma não é pigmentado. Isso ocorre, quando a célula do ovo é fertilizada, mas não a célula central, resultando em um embrião diploide normal e em um endosperma diploide não normal. O aborto ocorre no início do desenvolvimento da semente. (iv) Contaminação/Inibição - Sementes sem pigmentação na camada de aleurona e no escutelo, mas com desenvolvimento, normalmente. Esse tipo é facilmente identificado e pode ser descartado, já que a seleção não é possível devido a genes inibidores da expressão da antocianina (COE JUNIOR, 1994), ou, ainda, devido à existência de contaminação por pólen não proveniente do indutor no momento do cruzamento manual.

Chaikam et al. (2014) ressaltam que a coloração roxa do marcador fenotípico pode ser totalmente suprimida ou fracamente expressa em alguns germoplasmas, tornando a identificação de haploides pelo método R1-nj impossível. O marcador pode ser expresso em uma taxa muito baixa no embrião, que visualmente passa a impressão de não estar sendo expresso. Nessa situação, o melhorista acaba por selecioná-lo como um falso-positivo para haploidia, e é descartado, por exemplo, na fase do plantio em campo, em que as plantas serão mais vigorosas e muito contrastantes em relação às demais (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012).

A não expressão ou expressão fracamente expressa do R1-navajo podem ser explicadas pelo fato do alelo marcador R1-nj ter penetrância incompleta e expressividade variável, não fornecendo uma indicação precisa das sementes haploides (BELICUAS et al., 2007). A expressão do alelo R1-nj pode ser inibida por fatores ambientais, sutileza do

fenótipo mutante ou pela ação de genes presentes em germoplasma tropical (CHASE, 1969, CHAIKAM et al., 2014; CHAIKAM et al., 2016). A presença de elementos transponíveis, muito comuns no germoplasma do milho (SCHNABLE et al., 2009), também pode influenciar ou até impedir a coloração de antocianina nos grãos (ERHARD et al., 2013).

Chaikam et al. (2015) relatam que, ainda que o alelo R1-nj seja dominante sobre o alelo r1, não pigmentante, o sistema marcador R- navajo não é expresso entre 25 a 30% de germoplasma tropical. A expressão do alelo pigmentante R1-nj pode variar, significativamente, em germoplasma de origem diferente, quando cruzado com um indutor haploide, indicando a influência do germoplasma doador e, possivelmente, fatores não genéticos ou ambientais (CHASE, 1952; RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005; SILVA, 2009; ROTARENCO et al., 2010; KEBEDE et al., 2011; PRIGGE et al., 2011, CHAIKAM et al., 2014).

Para que um marcador de antocianina atue em milho, a ação de vários alelos precisa ser considerada. A produção de pigmentos de antocianina em tecidos de milho inclui os produtos de genes estruturais e reguladores. Genes estruturais, tais como A1, A2, Bz1, Bz2 e C1, codificam as enzimas biossintéticas da via metabólica. Os genes reguladores de antocianina encaixam-se em duas classes de fatores de transcrição, C1/P11 e R1/B1, os quais interagem para ativar a transcrição dos genes estruturais (CONE et al., 1986).

Além disso, encontra-se na literatura relatos de que alguns alelos inibitórios dominantes dos genes envolvidos na via antocianina, como C1-I, C2-Idf (inibidor difuso) e in-1D, causam inibição da biossíntese de antocianina no endosperma e no embrião de milho (COE et al. 1988; CHAIKAM et al., 2014). O alelo C1-I é o tipo mais encontrado e consiste em um mutante dominante do alelo C1 de tipo selvagem (COE, 1962), cujo produto de gene serve como um repressor transcricional, superando a proteína C1 funcional para locais ativadores dos genes estruturais de antocianina em genótipos heterozigotos (C1-I/C1), prevenindo a transcrição dos genes estruturais (PAZ-ARES et al., 1990). Dessa maneira, o alelo R1-nj é epistaticamente suprimido pelo alelo C1-I (GEIGER; GORDILLO, 2009; CHAIKAM et al., 2014).

Como já citado, em um cruzamento para indução de haploides, dependendo da homozigosidade ou heterozigosidade dos alelos inibidores na população fonte, a expressão R1-nj pode ser, completamente, inibida em todos os grãos ou pode separar a expressão de cor entre os grãos. Quando a inibição de cor ocorre devido à presença de inibidores dominantes como C1-I, não é possível identificar, visualmente, os grãos haploides. Além disso, quando a



expressão ocorre, mas é variável entre os grãos, haploides podem ser descartados, erroneamente. Isso reduz a eficiência da identificação haploide com base em cruzamentos de germoplasma de origem com os indutores haploides baseados em R1-nj (CHAIKAM et al., 2014).

Dessa maneira, cruzamentos com genótipos de doadores que possam transferir o gene C1, gerarão sementes nas quais a seleção com base em R1-nj não é possível. Considerando o tempo e os recursos utilizados na indução de haploides, é importante prever, efetivamente, se o germoplasma eleito para o cruzamento com o indutor possui inibidores do alelo R1-nj. Chaikam et al. (2014) demonstraram que uma combinação de dois marcadores específicos de 8 pares de bases C1-I InDel e C1-I SNP do gene C1 poderia prever com alta precisão a presença da inibição de cor no germoplasma analisado. Assim, o genótipo doador do germoplasma para o haploide, pode ser testado, anteriormente, para a presença do inibidor de coloração C1-I, evitando possíveis adversidades.

Vale ressaltar que a seleção da coloração arroxeadada é feita visualmente e manualmente, e está sujeita a erros. Tratando-se de melhorar a eficiência do processo de seleção por R1-navajo, o sucesso de automação dessa técnica é improvável, porque pode haver apenas pequenas diferenças de cor entre embriões haploides e diploides (MELCHINGER et al., 2013).

#### **2.4.2 Vigor dos haploides**

Além do marcador morfológico de antocianina, o vigor da plântula de milho pode ser um método indireto usado como parâmetro para a eliminação de falsos haploides e seleção de possíveis haploides (BATTISTELLI et al., 2013; RIBEIRO, 2016). Segundo Magoon e Khanna (1963), os haploides são caracterizados por características morfológicas diminutivas, comportamento citológico peculiar e um modo de reprodução aberrante. Battistelli et al. (2013) caracterizaram as plântulas haploides como de baixo vigor, com radículas e coleótilos menores. Em relação ao campo, Couto et al. (2013) observaram que os haploides geralmente são de tamanho reduzido devido ao volume de suas células. Vanous (2011) relata que o vigor de plântulas haploides gimnogenéticas obtidos, a partir do processo de indução in vivo, tipicamente, possuem características físicas muito diferentes das plantas diploides. No geral, estes e diversos outros autores definem as plantas haploides como menores e menos vigorosas do que suas contrapartes diploides (DE LAAT et al., 1987; CHALYK, 1994; RÖBER;

GORDILLO; GEIGER, 2005; FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012; RIBEIRO, 2016).

No entanto, a seleção de haploides através do vigor não pode ser considerada um método confiável, especialmente se as diferenças de ploidia são pequenas e muitas vezes estão sujeitas a efeitos ambientais (DWIVEDI et al., 2015).

Couto et al. (2013) também evidenciam que as características morfológicas, os pesos, os comprimentos, as espessuras e as larguras das sementes haploides não são dados confiáveis para a seleção visual dos haploides putativos, considerando sua grande variação. Além disso, os autores comprovam que os valores médios dos pesos e traços morfométricos das sementes híbridas diploides e haploides confirmados por citometria de fluxo mostram valores aproximados, indicando mais uma vez que os traços morfométricos não constituem dados confiáveis na seleção de sementes haploides. Ressaltam, ainda, que as sementes haploides são praticamente do mesmo tamanho que as sementes diploides, e é difícil diferenciá-las, no momento da seleção.

Belicuas et al. (2007) observaram que os haploides apresentaram tamanho pequeno, ausência de ligula, presença de folhas frágeis e quebradiças e apresentaram um arranjo de folhas diferente, quando comparado a um indivíduo diploide. No entanto, observou-se que várias plantas consideradas diploides por citometria de fluxo também foram de tamanho pequeno. Os autores relatam, ainda, que os parâmetros cor da semente e a altura de planta não revelaram-se como fenótipos confiáveis para discriminar os haploides de milho. Ambos os traços foram, fortemente, influenciados por condições ambientais e antecedentes genéticos, reforçando a importância de ter um método preciso e de alto rendimento para identificação de haploides.

### **2.4.3 Citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é uma metodologia utilizada em diferentes áreas que vão desde a investigação básica até ao melhoramento de plantas e indústria (DOLEŽEL, 1997). A técnica permite a medição do nível de ploidia em um estágio inicial de desenvolvimento de plântulas de forma bastante eficaz e precisa, fornecendo uma opção rápida para a determinação da ploidia. Também permite a detecção de regeneração de conjuntos mixoploides (plantas com números não desejáveis de cromossomas em células ou tecidos adjacentes).

Por meio da citometria de fluxo é possível a quantificação de inúmeras amostras por dia de forma rápida e simples, porém, detém da necessidade do citômetro de fluxo, aparelho de elevado custo (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012). Embora seja uma técnica eficiente com alto grau de precisão, a preparação de amostras de plantas de alta qualidade para análise de ploidia é um dos obstáculos que explica a sua baixa utilização no melhoramento de plantas (DWIVEDI et al., 2015).

A técnica é baseada na análise de propriedades ópticas, como dispersão da luz e fluorescência de partículas (núcleos, organelas, células e cromossomos) coradas com fluorocromos específicos 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 interceptam, uma a uma, um feixe de iluminação bastante intenso, ocorrendo um processo de dispersão da luz e ou emissão de fluorescência (CORTE-REAL et al. 2002). Dessa maneira, podem-se verificar, simultaneamente, as distribuições dos valores da frequência ou densidade de cada parâmetro. Os sinais gerados pelas partículas são convertidos em valores digitais, armazenados e exibidos na forma de histogramas (DOLEŽEL, 1997).

Com a utilização da citometria de fluxo é possível mensurar o conteúdo de DNA de núcleos (HELLER, 1973), avaliar o nível de ploidia, fazer comparações intra e interespecíficas do tamanho nuclear, estimar o tamanho do genoma avaliar o teor de DNA de cada cromossomo do complemento de uma espécie, realizar estudos do ciclo celular, e ainda realizar análises de genotoxicidade e determinação do sexo (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

Em eucariontes, o crescimento e a divisão celular são processos cíclicos. De acordo com o modelo apresentado por Howard e Pelc (1986) o processo mitótico 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, C é correspondente ao conteúdo de um conjunto haploide de cromossomos, possui assim, duas cópias de cada cromossomo. Durante a fase S o genoma é duplicado 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. Posteriormente, a mitose será concluída por meio da divisão em duas células filhas, cada uma com o conteúdo original 2C.

Numa população de células em crescimento, o número de núcleos na fase G1 é maior do que na fase G2 (HOWARD e PELC, 1986). 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 (DOLEŽEL, 1997). A citometria de fluxo apresenta como vantagens: fácil preparação da amostra; rapidez na execução, 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).

A quantificação de DNA por citometria de fluxo é uma excelente alternativa, quando comparada aos métodos clássicos de contagem cromossômica e seu emprego para a determinação do nível de ploidia em muitos acessos de espécies cultivadas tem sido bem sucedido. Em milho, a técnica de citometria de fluxo é, frequentemente, utilizada na identificação de haploides (BELICUAS, 2004; RABEL, 2008; DANG et al., 2012; GEIGER; SCHÖNLEBEN, 2011; BATTISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2013; RIBEIRO, 2016).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Área Experimental**

A primeira safra, semeada em outubro de 2015, foi realizada na área de campo do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado no município de Lavras, situada a 918m de altitude, nas coordenadas 21°14'30'' de latitude Sul e a 45°00'10'' de longitude Oeste.

As atividades de campo da segunda safra foram iniciadas em agosto de 2016, no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Agropecuária - Fazenda Muquém, de propriedade da UFLA, localizado entre os municípios de Lavras e Ijaci-MG. No entanto, devido a intempéries, todo o experimento foi perdido e foi novamente implantado em novembro, neste mesmo local.

As sementes colhidas foram avaliadas e submetidas às demais análises no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, com exceção das análises em citômetro de fluxo que foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos situado no Departamento de Agricultura desta mesma Universidade.

#### **3.2 Material genético utilizado e obtenção dos haploides**

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

diversas. Tal população foi submetida à seleção, e, na safra de 2014/2015, foram semeadas progênies indutoras S<sub>2:3</sub>. Essas progênies foram submetidas a análises de porcentagem de indução e foram também autofecundadas.

No presente trabalho, na safra 2015/2016, as sementes S<sub>2:4</sub> provenientes de oito progênies S<sub>2:3</sub> com maiores porcentagens de indução de haploides foram semeadas e recombinadas aleatoriamente. Os irmãos-germanos colhidos foram misturados e 500 delas semeadas, em agosto de 2016, de forma que todas as progênies colhidas tivessem pelo menos um exemplar em campo. Devido a intempéries, este experimento foi perdido e as sementes restantes foram levadas a campo, no dia 24 de novembro de 2016, totalizando 198 sementes.

Os indutores foram autofecundados com a finalidade de avançar a geração de endogamia, e, simultaneamente, avaliados quanto à indução de haploidia através do cruzamento com o híbrido simples 30A37PW. Esse híbrido possui ciclo precoce, grão de coloração amarela-alaranjada e textura semidura. Os indutores foram utilizados como parental masculino, uma vez que seus genitores apresentam o sistema gimnogenético de indução de haploidia. O cruzamento de cada indutor com o híbrido doador de genótipo para o haploide consistiu em um tratamento.

As primeiras espigas de todos os indivíduos indutores e testadores foram cobertas com saco plástico, antes da emissão do estilo-estigma, para garantir que este não fosse exposto ao pólen antes do momento do cruzamento, garantindo assim, a não contaminação do cruzamento com pólen indesejado. No momento do florescimento, o pólen do indutor foi coletado em saco de papel, após a cobertura do pendão. Posteriormente, parte desse pólen foi utilizada, prioritariamente, para autofecundar o indivíduo e a parte restante para a polinização da primeira espiga de uma ou duas plantas do genótipo doador, de acordo com a quantidade de pólen obtida.

É comum as linhagens indutoras apresentarem precocidade quando comparadas a genótipos tropicais (BELICUAS et al., 2007; RABEL, 2008; SILVA, 2009), e, devido a esse fator, foram semeados 400 indivíduos em duas épocas para garantir a sincronia de florescimento. Uma semeadura de 200 indivíduos foi realizada no dia 17 de novembro e os 200 demais indivíduos foram semeados junto aos indutores, no dia 24 de novembro.

O genótipo doador influencia na taxa de indução de haploides (RÔBER, GORDILLO E GEIGER, 2005; PRIGGE et al., 2011), a fim de mitigar esse efeito, foi utilizado apenas um genótipo doador em todos os cruzamentos com os indutores.

Devido a não sincronia do florescimento feminino e masculino de alguns indutores, a ponta da espiga foi cortada a fim de adiantar o florescimento feminino. Em alguns indivíduos, mesmo realizando esse procedimento, não foi possível realizar a autofecundação. Parte dos indutores apresentou pouca produção de pólen, que foi utilizado apenas para a autofecundação, não possibilitando realizar o cruzamento com o híbrido testador.

No momento da colheita, foram colhidas as espigas dos indutores e também das plantas do híbrido simples cruzadas com o indutor. As sementes provenientes da autofecundação foram armazenadas em câmara fria. As sementes provenientes dos cruzamentos dos indutores com o testador foram avaliadas quanto à taxa de indução de haploidia.

Em ambos os plantios foi realizada a adubação de base e de cobertura, de acordo com as seguintes dosagens: 350 kg/ha do formulado 08-28-16 e 450kg/ha de 30-00-20 respectivamente. Os demais tratos culturais foram conduzidos conforme as recomendações para a cultura do milho.

### **3.3 Identificação de haploides**

#### **3.3.1 Marcador morfológico R1-navajo**

As sementes colhidas dos cruzamentos realizados deveriam ter sido separadas visualmente pela expressão do marcador morfológico R1-navajo de acordo com a metodologia descrita por Chase e Nanda (1965). No entanto, as sementes obtidas não apresentaram coloração arroxeadada proveniente do marcador R1-nj. Provavelmente, houve a atuação de genes inibidores (CHAIKAM et al., 2014) que impediram a expressão do alelo R1-navajo e a síntese de antocianina, de forma que todas as sementes obtidas permaneceram totalmente amarelas.

Foram realizados pré-testes envolvendo outros métodos para seleção dos haploides, no entanto, não foi obtido sucesso na utilização da maioria deles.

#### **3.3.2 Vigor das plântulas**

Devido ao elevado número de sementes colhidas dos cruzamentos dos indutores com os híbridos simples doadores, 63.076 sementes, e a não expressão do marcador morfológico

R1-navajo, não foi possível confirmar a ploidia de todos os indivíduos. Para tornar as análises viáveis, foi necessário estabelecer um número mínimo de sementes a ser avaliado que permitisse um erro aceitável.

Estabeleceu-se a utilização de pelo menos 200 sementes provenientes do cruzamento de cada indutor com o híbrido testador. A fim de facilitar a distribuição em bandejas de germinação, foram selecionadas 207 sementes por progênie, os cruzamentos que não obtiveram esse número mínimo de sementes não foram utilizados.

Nos dias 17, 18 e 19 de maio de 2016, as 207 sementes provenientes de cada progênie foram semeadas em bandejas de germinação e mantidas em casa de vegetação a 25°C e 75% de umidade para o desenvolvimento das sementes e possível inferência da ploidia de cada indivíduo, de acordo com o vigor das plântulas. As plântulas foram submetidas à avaliação do vigor e medição da altura de planta aos sete e vinte e um dias. Devido ao comportamento de vigor e tamanho de planta não terem sido coincidentes durante as duas avaliações, não foi possível realizar inferências seguras quanto aos possíveis haploides.

Aos cinquenta dias, quando foi possível observar que as plantas apresentavam certo padrão de desenvolvimento, os indivíduos com tamanhos, visualmente, menores à metade do tamanho médio apresentado pelas demais plântulas dentro de cada progênie, foram selecionados como possíveis haploides, transplantados para vasos e submetidos à citometria de fluxo.

### **3.3.3 Citometria de fluxo**

As 124 plantas provenientes de todos os tratamentos da casa de vegetação que foram selecionadas como prováveis haploides, foram submetidas à citometria de fluxo sete dias após o transplante para vasos visando à confirmação da ploidia e exclusão dos diploides selecionados erroneamente. As análises foram realizadas no laboratório de Cultura de Tecidos, localizado no Departamento de Agricultura da UFLA.

Para a realização da técnica de citometria de fluxo foi utilizada a metodologia estabelecida por Galbraith (1983), na qual o tecido de, aproximadamente, 50mg de folhas jovens foi cortado e triturado com lâminas de bisturi em uma placa de petri contendo 1mL do tampão de extração LB01 (DOLEŽEL, 1997) modificado, para a obtenção da suspensão nuclear. Após o isolamento dos núcleos, estes foram filtrados por uma rede de nylon com cerca de 50µm, de forma a eliminar a maior parte dos resíduos obtidos. Em seguida, os

núcleos de cada suspensão foram corados com 25  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídio ( $1\text{mg mL}^{-1}$ ) e analisados no citômetro de fluxo. Para cada amostra, foram analisados no mínimo 10 mil núcleos. Os histogramas foram obtidos no citômetro de fluxo *FacsCalibur* (*Becton Dickinson*) com o programa *Cell Quest* (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*).

A estimativa da ploidia de cada amostra foi realizada de acordo com a posição do pico G1, quando comparado à posição apresentada normalmente para a cultura do milho, logo após a marca de intensidade relativa de fluorescência de  $10^2$ . Nos casos em que o pico G1 se encontrou deslocado para a esquerda dessa marca, a amostra foi considerada com o haploide.

### 3.3.4 Análises dos dados

#### 3.3.4.1 Taxa de indução

O cálculo da taxa de indução de haploidia foi realizado da seguinte forma:

Indução de haploidia = (número de haploides/número total de indivíduos avaliados) x 100

Em que:

Número de sementes haploides = sementes confirmadas como haploides pela citometria de fluxo;

Número total de indivíduos avaliados = número de fixo de 207 indivíduos.

#### 3.3.4.2 Análises Estatísticas

As análises foram realizadas utilizando-se a abordagem de modelos lineares generalizados mistos (MLGM). Para avaliação dos dados de indução de haploidia foi empregado o seguinte modelo MLGM binomial com a função de ligação *logit*:

$$\text{Logit}(p) = \log\left(\frac{\pi_i}{1 - \pi_i}\right) = \mu + p_i$$

Em que:

$\mu$  é o intercepto;

$p_i$  é o efeito aleatório do indutor  $i$ ;



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 as análises, foi utilizado o pacote lme4 (BATES et al., 2015) do software R (R CORE TEAM, 2013).

Utilizando os dados foi realizada a análise de *deviance* pelo método dos modelos lineares generalizados mistos, como comentado anteriormente, e não foi possível obter as predições BLUP devido aos resultados indicarem que a variância genética entre os indutores é nula.

### 3.3.5 Identificação do gene C1 e do alelo inibidor C1-I

Dentre os alelos inibidores dos genes regulatórios da expressão de antocianina, o mais comumente encontrado é o C1-I, e consiste em um mutante dominante do alelo ativador C1 de tipo selvagem (COE, 1962). Dessa maneira, a confirmação da existência do *locus* C1 e do alelo C1-I no genótipo utilizado é de grande importância.

A fim de identificá-los, as sequências dos alelos C1 e C1-I foram obtidas na base de dados European Molecular Biology – EMBL (números de acesso X06333.1 e X52201.1, respectivamente). As diferenças entre os nucleotídeos que compõe esses alelos foram observadas através da ferramenta de alinhamento Clustal Omega. A partir dessa informação, dois pares de primers específicos foram desenhados. Um par objetivando o anelamento em ambos os alelos, de maneira que permitisse identificação do *locus* C1, consistindo nas sequências 5'GAA GGA AGG CGT TAA GAG AG3' para o primer 'forward' e 5'CTT ATT ACA CGA GCT GAC GA3' para o primer 'reverse'. O outro par com o objetivo de anelar apenas ao alelo C1-I, consistindo nas sequências 5'CAG GTG GTC GCT GAT TGC AG3' para o primer 'forward' e 5'GGG ATG AAA ACG GGA CGG AT3' para o primer 'reverse'.

O DNA dos híbridos simples comerciais 30A37PW, o qual foi utilizado neste trabalho e não houve a expressão de antocianina, e DKB 390, utilizado como testador, foram extraídos segundo Doyle e Doyle (1997) no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Após a extração, os DNAs foram quantificados em espectrofotômetro GE Nanovue e diluídos para a concentração de 50ng/μL. Os primers também foram diluídos para a concentração de 10μM/μL.

Para as reações de PCR foram utilizados 2µL de DNA (100 ng), 1.25µL de cada primer (10 mM) componente de um par, 1µL de dNTP (10 mM), 1,5µL de MgCl (50 mM), 1,25µL da enzima Taq polimerase (5u/µL), 5µL de tampão de reação (5 X), 11,75µL de água ultrapura, com a exceção do controle negativo, no qual não foi adicionado o DNA e a quantidade de água adicionada foi de 13,75µL, ambos totalizando o volume de 25µL.

As amplificações foram realizadas, de acordo com a programação: 95°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos a 95°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com uma etapa a 72°C por 7 minutos e 4°C ∞.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1 % por eletroforese a 110V por 70 minutos.

### **3.3.6 Sequenciamento de DNA**

Devido ao par de primers específico para o gene C1 ter anelado também às duas sequências maiores que a esperada, as duas bandas correspondentes foram extraídas do gel de agarose e purificadas por meio do QIAquick® Gel Extraction Kit Cat. No.28704 (QIAGEN) e enviadas para sequenciamento de DNA.

As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1.

Em posse das sequências, as mesmas foram submetidas ao BLAST, ferramenta disponível em [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dentre as 198 sementes de indutores levadas ao campo, apenas 122 delas germinaram. Destas 122 plantas indutoras, em quatorze não foi possível realizar a autofecundação devido à não sincronia do florescimento feminino e masculino, e, em vinte e duas, não foi possível realizar o cruzamento com o híbrido testador devido à baixa produção de pólen e a prioridade ser sua utilização na autofecundação. Os indutores 29, 62, 84, 94 e 96 não produziram pólen ou o pólen produzido não era viável ou, ainda, tiveram sua viabilidade afetada por fatores externos, pois não foram obtidas sementes autofecundadas nem fruto do cruzamento com os testadores. Dessa maneira, envolvendo esses motivos, não foi possível avaliar 27 indutores.

Prigge et al. (2011), utilizando indutores derivados da linhagem KEMS, assim como os indutores utilizados no presente trabalho, 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 os germoplasmas doadores, como também houve dificuldade na produção de sementes autofecundadas do indutor. Tais observações corroboram com o ocorrido no presente trabalho.

As progênes obtidas pelo cruzamento dos indutores com o híbrido 30A37PW foram submetidas a análises para a identificação da taxa de indução de haploides de acordo com as metodologias cabíveis. No entanto, os indutores que obtiveram progênes com um número menor que 200 sementes não foram avaliados (Tabela 1). O total de indutores não avaliados, envolvendo quaisquer dos motivos, foi de 60 indutores.

O número de sementes obtidas do cruzamento de cada indutor com os indivíduos testadores está disposto na tabela 1. É possível observar que o número obtido do cruzamento de cada indutor com os indivíduos testadores varia expressivamente entre os indutores (Tabela 1), o que é explicado pelo fato de que, aqueles que produziram maior quantidade de pólen foram utilizados para polinizar mais de uma planta doadora.

Tabela 1 - Número total de sementes obtidas na progênie proveniente do cruzamento dos indutores com o híbrido 30A37PW.

Progênie	Total de sementes	Progênie	Total de sementes	Progênie	Total de sementes
1	763	38	632	79	1*
2	1074	39	851	80	1807
3	1037	40	1480	81	104*
4	545	41	658	82	604
5	21*	42	2146	85	57*
6	385	44	356	86	132*
7	132*	46	1894	87	271
8	1874	47	842	88	366
9	444	48	892	89	982
10	438	49	1145	91	1*
11	1544	50	420	92	634
12	2184	51	1164	93	432
13	822	52	79*	95	33*
14	1544	53	281	97	136*
15	1245	54	483	100	819
17	1551	55	91*	101	4*
18	982	56	1567	104	1029
19	884	58	573	105	646

... Continuação Tabela 1

20	179*	59	490	106	236
21	20*	61	1054	107	33*
22	1288	63	355	108	452
23	54*	65	587	110	732
24	769	66	2*	111	503
26	603	67	101*	112	11*
27	957	68	5*	113	273
28	1505	69	629	114	155*
30	1157	71	1272	115	742
32	236	72	127*	116	12*
33	1549	73	15*	117	1*
34	1*	74	1*	118	1383
35	51*	75	1337	119	4*
36	37*	76	623	120	413
37	125*	78	1732	121	27*
				122	157*
TOTAL 63076 sementes					

\* Não foram avaliadas por não apresentar o número mínimo de sementes necessárias.

Fonte: Do Autor (2017).

#### 4.1 Marcador Morfológico R1-navajo

Todas as sementes colhidas do cruzamento dos indutores com o híbrido doador não expressaram o marcador morfológico de antocianina R1-navajo, conforme a figura 1. Conforme já explicitado anteriormente, esse alelo marcador pode ter sua expressão, totalmente, suprimida em alguns germoplasmas, tornando impossível a identificação de haploides por esse método. A expressão do R1-nj pode ser inibida por fatores ambientais, sutileza do fenótipo mutante ou pela ação de genes presentes em germoplasma tropical (CHASE, 1969; CHAIKAM et al., 2014; CHAIKAM et al., 2016). Quando a inibição de cor ocorre devido à presença de inibidores dominantes como C1-I, não é possível identificar, visualmente, os grãos haploides (COE, 1957; CHAIKAM et al. 2014).

Nos estudos realizados por Eder e Chalyk (2002), os autores observaram que a expressão do marcador R1-navajo foi melhor em genótipos com textura de grãos dos tipos dentados e dentados x duros, quando comparados a genótipos com grãos duros. No presente estudo, o híbrido 30A37PW apresenta grãos semiduros. Röber, Gordillo e Geiger (2005), utilizando o indutor de haploidia RWS, encontraram erros na classificação dos possíveis haploides de 52% para os genótipos doadores com grãos tipo duro.

Figura 1 - Espigas provenientes do cruzamento dos indutores 8 (A), 27 (B), 30 (C) e 53(D) com o híbrido 30A37PW.



Fonte: Do Autor (2017).

Diversos autores relatam a insegurança da seleção de haploides pelo método do marcador morfológico R1-navajo (CHAIKAM et al., 2014; PRIGGE et al., 2011; MELCHINGER et al., 2013). Ribeiro (2016) observou que o marcador R1-navajo possui eficiência de apenas 1,41% na identificação das plantas haploides. Couto et al. (2013) e Belicuas et al. (2007) observaram eficiências ainda menores, de respectivamente 1% e 0,86%. Couto et al. (2015) evidenciaram a ineficiência do R1-navajo constatando uma taxa de erro de 33,50%, visto que houve uma taxa de 8,50% de haploides identificados pelo marcador e apenas de 2,85% confirmados pela citometria de fluxo.

Ribeiro (2016) observou que a expressão da coloração de antocianina foi diferente entre as duas safras estudadas, utilizando o mesmo híbrido como doador de característica semidura (GNZ9501). Na safra de verão entre 2014 e 2015, a autora obteve menor expressão do gene R1-navajo comparada com a safra 2012/2013, bem como menor intensidade de coloração conferida às sementes. De maneira geral, a autora ressalta que o marcador não fornece uma indicação precisa dos haploides, fazendo com que falsos haploides sejam selecionados, bem como, haploides não sejam identificados.

Em busca de métodos mais eficientes que o R1-navajo para a seleção de haploides, Smelser et al. (2015) utilizaram peneiras para uniformizar as sementes obtidas do cruzamento

do indutor com o doador, e pesaram cada uma delas. Os autores evidenciaram que as sementes diploides pesavam, significativamente, mais que as sementes haploides. No entanto, a eficácia da classificação com base no peso depende dos genótipos avaliados. No presente estudo, foi realizado um teste no qual 200 sementes de seis tratamentos, contidas na peneira 22, foram pesadas e as 20 mais leves submetidas à citometria de fluxo para a verificação da ploidia. No entanto, apenas um haploide foi identificado totalizando todos os tratamentos. Dessa maneira, o método de seleção baseado no peso não consistiu em uma alternativa viável para o presente trabalho.

A coloração roxa da radícula, conferida pelos genes B1 e PL1, tem sido demonstrada como uma característica eficiente para discriminar os haploides dos diploides, visto que seria observada nas fases iniciais de desenvolvimento do embrião apenas nos diploides (CHAIKAM et al., 2016; ROTARENCO et al., 2010; ROTARENCO, ADICU e SARMANIUC et al., 2009). Ribeiro (2016) observou coloração na raiz de alguns diploides. No presente estudo, foi realizado um pré-teste no qual os possíveis haploides, ou seja, plântulas sem coloração roxa na raiz foram submetidas à citometria de fluxo para a verificação da ploidia, mas todas as plântulas foram identificadas como diploides. Chaikam et al. (2016) observaram que essa característica só é eficiente em casos em que os indutores apresentam essa coloração na raiz, fazendo com que a característica seja expressa na raiz dos diploides.

Diante do exposto, é possível atribuir o insucesso na expressão do marcador morfológico R1-navajo no presente estudo a inúmeros fatores. No entanto, o mais provável deles, é que o genótipo doador utilizado, 30A37PW, por ser de origem tropical, pode portar o alelo dominante C1-I inibidor da expressão do alelo R1-nj.

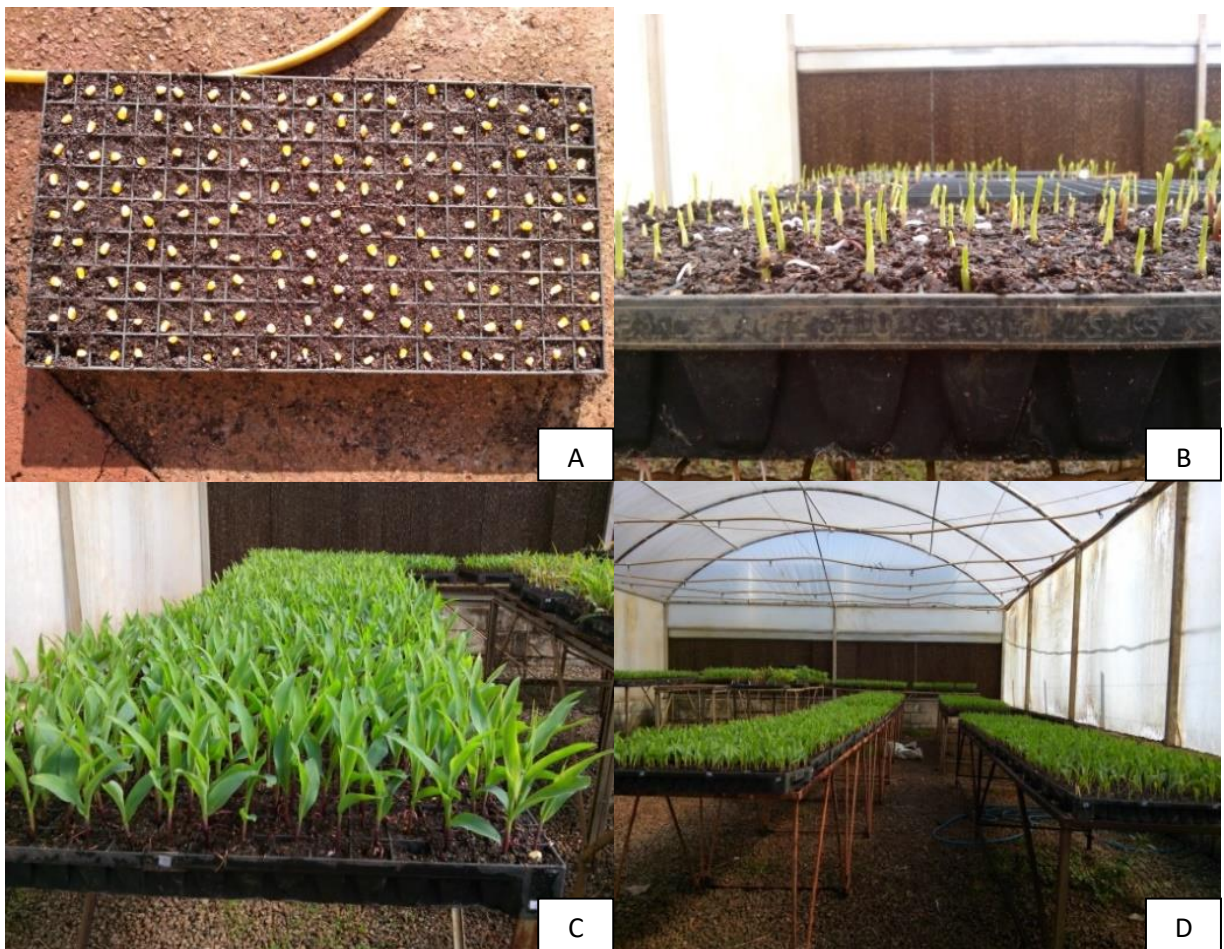
## **4.2 Vigor de plântulas**

Há relatos na literatura sobre o indivíduo haploide apresentar menor vigor e menor tamanho, quando comparado ao diploide (MAGOON e KHANNA, 1963; FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012; BATTISTELLI et al., 2013; COUTO et al., 2013; COUTO et al., 2015; DE LAAT et al., 1987; CHALIK, 1994; RÖBER, GORDILLO E GEIGER, 2005; RIBEIRO, 2016).

Partindo desse pressuposto, foram semeados 207 indivíduos de cada tratamento (Figura 2a) para a observação das características morfológicas e vigor a fim de identificar os

possíveis haploides. As plântulas de cada tratamento foram medidas aos sete (Figura 2b) e vinte e um dias. No entanto, o vigor apresentado através do tamanho da plântula não foi coincidente nas duas medições, ou seja, plântulas, consideravelmente, menores na primeira medição obtiveram tamanhos maiores na segunda medição do que algumas plântulas de maior tamanho na primeira medição. Tal comportamento não permitiu que os possíveis haploides pudessem ser separados aos 21 dias.

Figura 2 - Fotografias do plantio em casa de vegetação. (A) plantio em bandejas; (B) plântulas com sete dias; (C) plântulas com quatorze dias; (D) visão geral da distribuição dos tratamentos na casa de vegetação.



Fonte: Do Autor (2017).

A diferença de tamanho aos sete dias, conforme observa-se na figura 2b, pode ser apresentada devido à germinação desigual das sementes, na qual algumas germinam antecipadamente, ou ainda, à posição que a semente foi inserida no solo, já que algumas posições dificultam a emergência do embrião.

Devido a não coincidência de vigor nas duas medições, foi aguardado um maior tempo para que as plantas pudessem se desenvolver e amenizar as diferenças, possivelmente, conferidas pela germinação. Aos 50 dias, a maior parte das plântulas apresentava certa média de comprimento. Aquelas plântulas com comprimento abaixo da metade da média das demais contidas no mesmo tratamento foram selecionadas como possíveis haploides (Figura 3).

Figura 3 - Possíveis haploides selecionados através do tamanho apresentado aos 50 dias.



Fonte: Do Autor (2017).

Rotarencu, Adicu e Sarmaniuc (2009) e Battistelli et al. (2013) realizaram estudos com indutores de haploides maternos, e verificaram que, mesmo na presença do gene inibidor de antocianina Cl-1, é possível substituir o marcador R1-navajo pelo vigor das plantas para a discriminação dos haploides e diploides. Röber, Gordillo e Geiger (2005), Battistelli (2012) e Couto (2013) salientam que também é possível eliminar os diploides considerando a morfologia e o vigor em plantas adultas. Couto (2013) relata que plantas haploides apresentam desenvolvimento atrasado em relação aos diploides, baixo vigor, folhas com



tonalidade verde-claro. Porém, no presente estudo todas essas características não foram condizentes com os haploides analisados, ressaltando que tais características não podem ser utilizadas como único parâmetro de seleção.

Couto et al. (2013) avaliaram comprimento, peso, largura e espessura das sementes dos haploides. No entanto, esses autores observaram que essas características não foram eficientes para a discriminação. Ribeiro (2016) avaliou o comprimento de raiz das plântulas e observou que os genótipos haploides e diploides não apresentaram diferenças expressivas que permitissem distinção. No entanto, a autora utilizou, além do R1-navajo, o vigor das plântulas para considerá-las como haploides, selecionando 16 plântulas que, posteriormente, foram identificadas na citometria de fluxo como diploides. Tais estudos reforçam a insegurança do método de seleção baseado em características morfológicas e vigor de plântula.

### 4.3 Citometria de fluxo

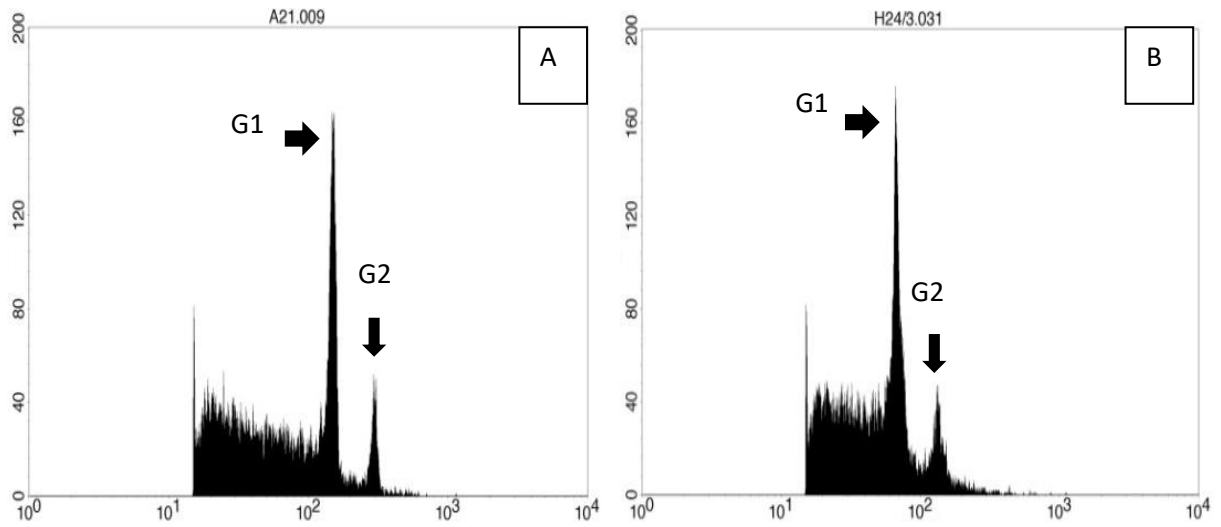
A fim de identificar efetivamente os reais haploides, calcular a taxa de indução de haploidia e avaliar o método empregado para seleção dos possíveis haploides, estes foram submetidos a análises por meio da técnica de citometria de fluxo. Os histogramas obtidos por esse método permitem identificar a ploidia dos indivíduos testados por meio da localização do pico G1 da amostra no eixo da intensidade relativa de fluorescência (Figura 4). Os diploides de milho possuem o pico G1, localizado na região de intensidade relativa de fluorescência, logo após a marca de  $10^2$  (Figura 4A). Os haploides possuem menor intensidade relativa de fluorescência, o pico G1 se encontra localizado à esquerda da marca de  $10^2$ , ou seja, deslocado em direção ao eixo x (Figura 4B).

Geralmente, faz-se a associação do histograma obtido com um histograma de uma planta padrão, por exemplo, *Vicia faba*, utilizada por Ribeiro (2016), Battistelli et al. (2013), Couto et al. (2013) e Couto et al. (2015). A utilização do padrão permite obter a quantidade de DNA contida na amostra. Ribeiro (2016) observou que os haploides obtidos apresentaram, aproximadamente, a metade da quantidade de DNA do híbrido doador, enquanto os diploides apresentaram quantidades semelhantes.

No entanto, para a cultura do milho, a citometria de fluxo é um recurso altamente utilizado e o ponto de intensidade relativa de fluorescência de cada ploidia já é bem conhecido. No presente estudo, não foi utilizado padrão de referência devido à necessidade

apenas de identificar a ploidia do indivíduo, não havendo interesse na quantidade precisa de DNA da amostra.

Figura 4 - Histogramas das ploidias detectadas por citometria de fluxo em plantas de milho. Planta diploide A21 proveniente do indutor 21 (A). Planta haploide H24/3 proveniente do indutor 24 (B). Eixo vertical = número de núcleos lidos; Eixo horizontal = intensidade relativa de fluorescência. As setas evidenciam os picos G1 e G2.

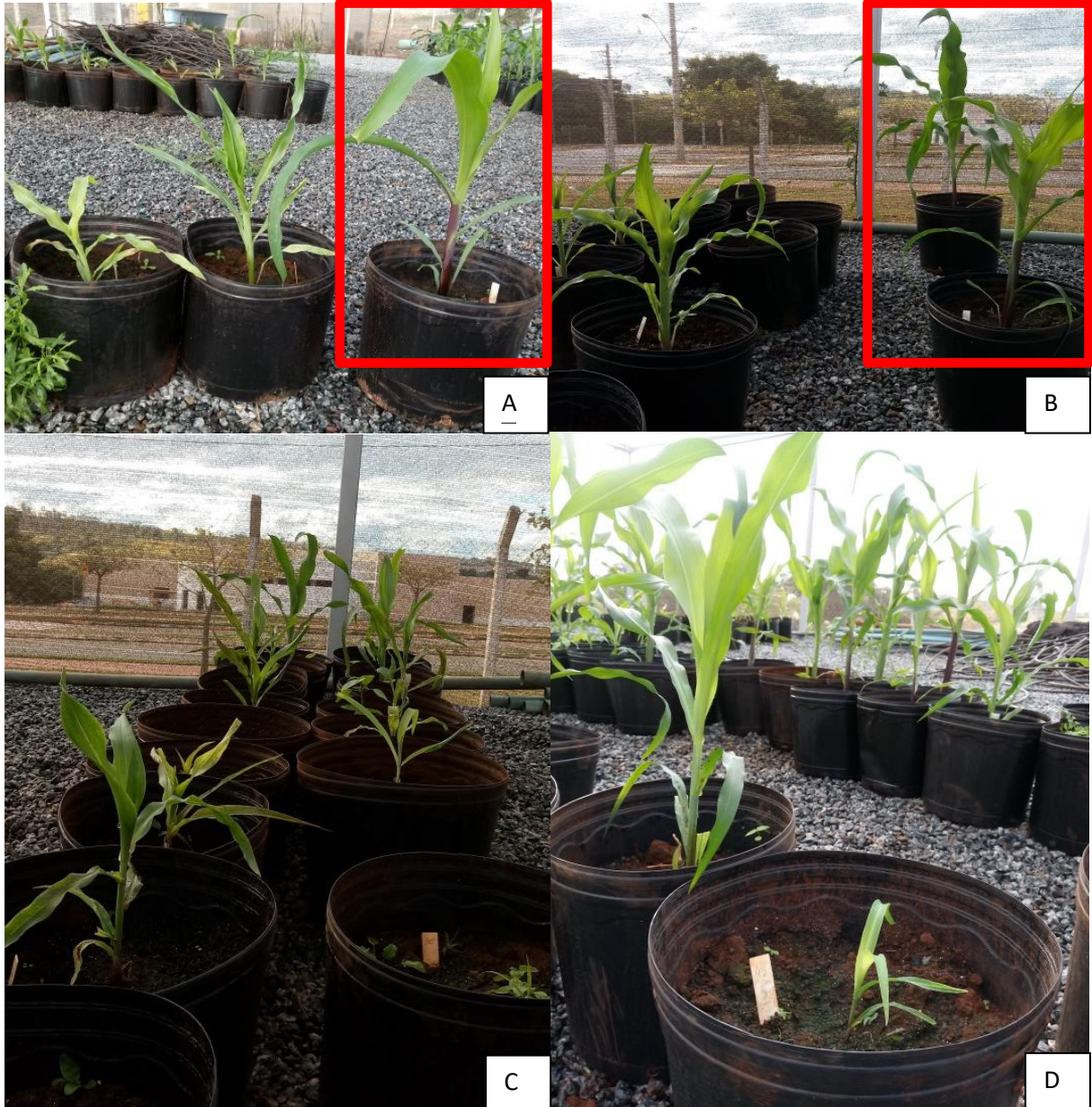


Fonte: Do Autor (2017).

Ao acompanhar o crescimento dos haploides e diploides confirmados (Figura 5), foi possível afirmar que o tamanho de planta e vigor não são parâmetros confiáveis para a inferência da ploidia. Nas figuras 5A e 5B é possível notar a diferença de tamanho entre os haploides e os diploides. No entanto, pode-se observar na figura 5C que entre os indivíduos haploides há grande variação de tamanho, assim como entre os indivíduos diploides, figura 5D. O motivo para que algumas plantas diploides tenham apresentado o fenótipo pequeno e baixo vigor não foi identificado, mas há a possibilidade de ter ocorrido alguma mutação para nanismo ou alguma deficiência na germinação, vigor ou desenvolvimento destas.

Prigge et al. (2011) e Batistelli (2013) comentam que a utilização do tamanho de planta para identificação de haploides é mais eficaz quando um híbrido simples é utilizado como genótipo induzido, que é o caso desse estudo em que foi utilizado o híbrido simples 30A37PW. Em contrapartida, no presente estudo não foi possível identificar os haploides por meio do vigor de plântulas e a figura 5 evidencia que as plantas em estágios mais avançados também não permitem a distinção assertiva de haploides e diploides por meio de características morfológicas e vigor.

Figura 5 - Indivíduos haploides confirmados comparados com plantas diploides evidenciadas pelo retângulo (A e B). Variação no tamanho entre os indivíduos haploides confirmados (C). Variação no tamanho entre os indivíduos diploides (D).



Fonte: Do Autor (2017).

#### 4.4 Taxa de indução de haploidia e análises estatísticas

O número de possíveis haploides selecionados em cada progênie pelo vigor de plântula e o número de haploides confirmados pela citometria de fluxo estão dispostos na tabela 2, junto à taxa de indução dos respectivos indutores. A taxa de indução foi calculada

utilizando-se os dados de haploides confirmados em relação ao número total de sementes avaliadas para cada tratamento.

Conforme exposto na Tabela 2, a progênie 40 apresentou o maior número de haploides confirmados, ou seja, quatro haploides. Dessa maneira, o indutor 40 foi o que apresentou a maior taxa de indução, 1,9324%. Os indutores 24, 26, 33, 39, 41 e 78 apresentaram as segundas melhores taxas de indução, 0,9662%, com dois haploides confirmados para cada indutor. Os indutores 2, 3, 11, 14, 27, 30, 49, 50, 56, 58 e 110, obtiveram um haploide confirmado cada, com taxa de indução de 0,4831%.

Os percentuais obtidos são similares aos resultados obtidos com as linhagens temperadas em 1966 e 1969. A continuidade do programa de melhoramento dessas progênies é de fundamental importância, e deve objetivar o incremento na taxa de indução, bem como a tropicalização das progênies.

Na literatura, encontram-se relatos de indutores com 6 e 15% de indução, utilizados em climas temperados (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005; PRIGGE et al., 2012) e tropicais (KEBEDE et al., 2011; PRIGGE et al., 2011).

Ribeiro (2016) encontrou taxas de indução baseadas nos haploides confirmados pela citometria de fluxo, variando entre 0,02% e 0% em relação ao total de sementes obtidas. Partindo da informação que os melhores indutores utilizados por Ribeiro (2016) consistiram nos indutores utilizados para a recombinação realizada no presente estudo, podemos observar que houve um incremento na taxa de indução dos indutores recombinados e uma possível tropicalização dos genótipos.

Tabela 2 - Número de possíveis haploides e haploides confirmados nas progênies avaliadas e taxa de indução dos respectivos indutores utilizados no cruzamento.

Progênie	Possíveis haploides	Haploides confirmados	Taxa de indução de haploidia (%)
1	5	0	*
2	3	1	0.48
3	4	1	0.48
4	1	0	*
8	1	0	*
9	1	0	*
11	2	1	0.48
12	7	0	*
13	6	0	*
14	1	1	0.48
15	1	0	*

... Continuação Tabela 2

17	3	0	*
18	4	0	*
19	1	0	*
22	2	0	*
24	5	2	0.97
26	3	2	0.97
27	3	1	0.48
28	2	0	*
30	3	1	0.48
33	5	2	0.97
39	8	2	0.97
40	7	4	1.93
41	2	2	0.97
42	2	0	*
48	2	0	*
49	4	1	0.48
50	2	1	0.48
56	6	1	0.48
58	1	1	0.48
65	1	0	*
69	1	0	*
71	4	0	*
78	4	2	0.97
80	1	0	*
89	1	0	*
92	3	0	*
104	2	0	*
105	1	0	*
108	1	0	*
110	2	1	0.48
111	1	0	*
115	2	0	*
118	2	0	*
120	1	0	*

\* Todos os possíveis haploides foram identificados como diploides.

Fonte: Do Autor (2017).

Utilizando a seleção por meio do marcador R1-navajo, Couto (2013) observou uma média de 9,16% nas taxas de indução de haploides com utilização da linhagem temperada KEMS, após a confirmação da ploidia dos indivíduos pela citometria de fluxo, tal taxa média foi reduzida para 2,85%. Battistelli (2012) obteve médias de 9,16% com a mesma linhagem.

Ribeiro (2016) relata a obtenção de taxas variando entre 0% e 7,92% com indutores derivados da linhagem KEMS. No entanto, Battistelli (2012) e Ribeiro (2016) calcularam essas taxas de indução de haploidia com os números de possíveis haploides identificados pelo marcador R1-navajo, e não por meio dos haploides confirmados. Assim, tais taxas de indução não podem ser consideradas como efetivamente reais, visto que o R1-navajo apresenta erros notáveis na identificação de haploides.

Belicuas et al. (2007) e Rabel (2008), utilizando a linhagem indutora W23, também encontraram porcentagens de indução elevadas com base na observação da expressão do marcador morfológico R1-navajo. No entanto, quando utilizaram métodos mais precisos para a confirmação da ploidia, constataram alta frequência de falsos haploides. Couto et al. (2013) selecionaram em seus estudos 397 possíveis haploides por meio do marcador R1-navajo. Porém, após a confirmação da ploidia desses indivíduos com a utilização da citometria de fluxo, apenas quatro haploides foram encontrados.

Foi efetuada a análise de *deviance* da taxa de indução de haploidia (Tabela 3). O efeito das progênes foi não significativo a 5% de probabilidade, ou seja, pode-se dizer que não há variância genética entre os indutores. Por não ter havido variância genética, os valores de BLUP e demais análises não foram calculados, já que seriam nulos também.

Tabela 3 - Resumo da análise de *deviance* da taxa de indução de haploidia proveniente de dezoito indutores.

FV	GL	<i>Deviance</i>
Progênie*	17	$1,4210 \times 10^{-14}$ **

\* Foram avaliadas apenas as 18 progênes que apresentaram haploides confirmados.

\*\* Diferenças não significativas pelo teste  $\chi^2$ , com probabilidade de 0,05.

Fonte: Do Autor (2017).

O p-valor foi 0,9999, indicando que a possibilidade das diferenças nas taxas de indução serem devido ao acaso e não um efeito dos tratamentos é de 99%. No entanto, devido à inibição do marcador R1-navajo e à não confiabilidade do método utilizado neste trabalho para a seleção dos possíveis haploides, não é correto considerar essas análises como verdadeiras. O método de seleção utilizado foi inadequado, e, com certeza, haploides foram descartados como diploides durante a seleção. No entanto, foi a alternativa viável para a situação ocorrida, mas não é indicado para ser utilizado como estratégia principal de seleção dos possíveis haploides.

Chaikam et al. (2014) e Chaikam et al. (2016) relatam que, quando ocorre a inibição total do marcador R1-navajo, é inviável proceder a separação dos haploides e diploides. Essa inviabilidade envolve até a utilização de outros métodos, já que o elevado número de sementes inviabiliza, por exemplo, a realização da citometria de fluxo de todos os indivíduos.

Em relação aos fatores que influenciam as taxas de indução, Rotarencu, Adicu e Sarmaniuc (2009) concluíram em seus estudos que o método utilizado nas polinizações e o período de polinização influenciam, efetivamente, a taxa de indução de haploides. Os autores obtiveram melhores resultados quando utilizaram a polinização manual três dias após a emissão do estilo-estigma, em comparação com a polinização aberta.

Röber, Gordillo e Geiger (2005) utilizaram vários indutores em diferentes locais, entre eles o indutor KEMS, e evidenciaram diferenças significativas entre os locais. Dessa maneira, concluíram que o ambiente pode influenciar na taxa de indução de diversas formas. Porém, Eder e Chalyk (2002) utilizaram o indutor MHI em ambiente controlado e em campo, e não encontraram diferença significativa na taxa de indução de haploides entre os ambientes.

Kebede et al. (2011) observaram uma maior taxa de indução de haploidia no inverno do México, de 7,37% de indução, quando comparado com o verão, 6,11% de indução. A principal diferença entre as estações avaliadas foi a temperatura, entretanto, os autores evidenciaram que fatores como precipitação e umidade relativa do ar não devem ser desconsiderados. Além disso, concluíram que o background genético bem como as condições ambientais durante a polinização, também foram fatores determinantes na obtenção de haploides. A etapa de indução realizada no presente estudo foi realizada no verão.

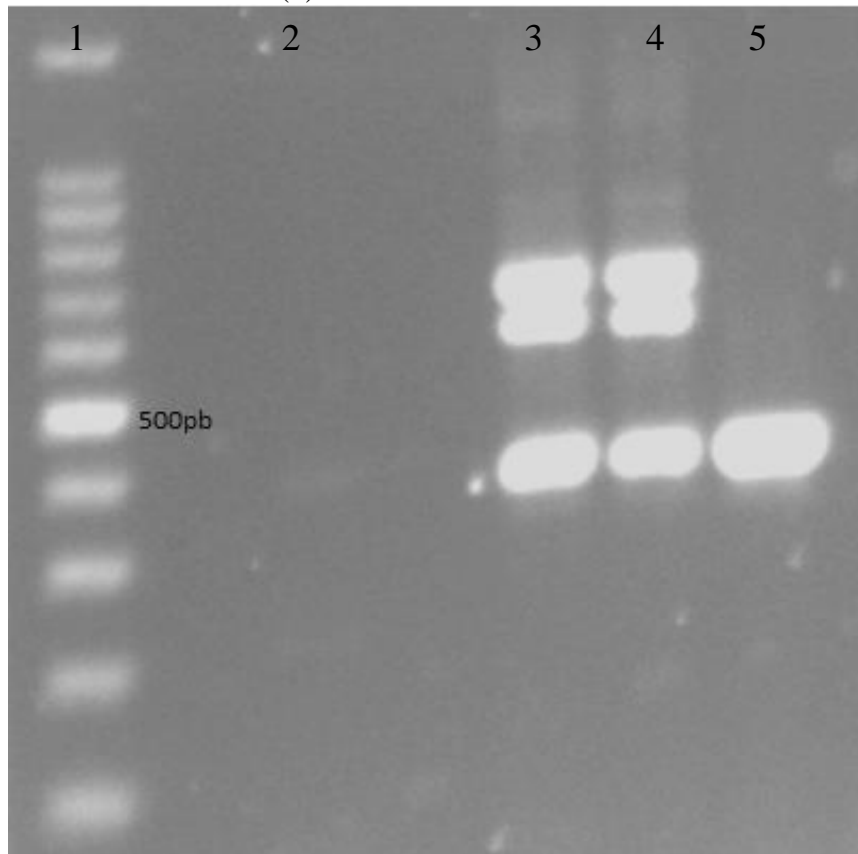
Eder e Chalyk (2002) compararam a indução gminogênica de haploidia em 20 genótipos diferentes, populações sintéticas, híbridos simples e híbridos triplos, com grãos duros, dentados e ambas as características (duro x dentado) e observaram que todos os efeitos, como geração segregante e o germoplasma feminino utilizado, bem como o tipo de grãos apresentado, influenciaram na indução de haploides. No presente estudo, o híbrido 30A37PW apresenta grãos semiduros. Röber, Gordillo e Geiger (2005) e Prigge et al. (2011) também evidenciaram que o genótipo doador influencia na porcentagem de indução de haploides.

Diante do exposto, é possível afirmar que a indução de haploides é complexa e demanda a escolha minuciosa dos critérios e métodos utilizados, visto que é influenciada por fatores externos e internos ao indutor, bem como pelo genótipo doador utilizado.

#### 4.5 Identificação do gene C1 e do alelo inibidor C1-I

Surpreendentemente, os produtos de PCR referentes ao par de primers para o *locus* C1 apresentaram três bandas para o genótipo 30A37PW e uma banda para o DKB390 (Figura 6). Pode-se observar que um dos fragmentos amplificados foi comum para os dois genótipos, 30A37PW, evidenciado pelos números 3 e 4, e DKB390, evidenciado pelo número 5. Tendo como base as sequências em bancos de dados públicos (NCBI e EMBL), o fragmento esperado para o *locus* C1, de 377 pb, foi obtido.

Figura 6 - Imagem do gel de agarose referente à identificação doo *locus* C1. DNA Ladder (1), controle negativo (2), 30A37PW amostra 1 (3), 30A37PW amostra 2 (4), DKB390 (5).



Fonte: Do Autor (2017).

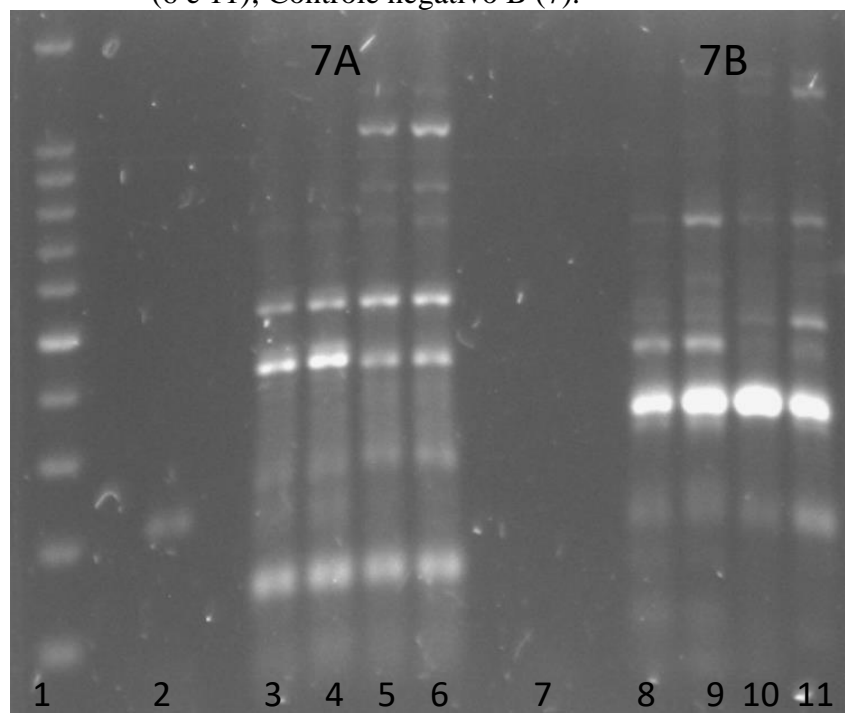
Curiosamente, duas outras bandas muito expressivas, de tamanho consideravelmente superior que o previsto, foram observadas para o genótipo 30A37PW. Considerando a intensidade de amplificação, a hipótese de amplificação inespecífica foi questionada,



conduzindo os procedimentos para a elucidação de suas sequências. Assim, foi realizado o sequenciamento de DNA destas, o qual será discutido posteriormente.

Primeiramente, utilizou-se de um par de primers para anelamento específico com a sequência C1-I. Tendo como base a sequência do alelo inibidor de C1 em banco de dados, o produto de PCR deveria apresentar 599 pb, fragmento este não evidenciado (Figura 7A). Posteriormente, foi utilizado o primer forward C1, que apresenta anelamento ao C1 e ao C1-I, juntamente com o primer reverse específico para C1-I. O produto esperado para esse fragmento consistiria em 1.067 pb e não foi evidenciado (Figura 7B). Diferentes fragmentos foram, no entanto, observados e oportunamente serão estudados. No momento, basta relatar que não há indícios de atuação do gene C1-I no fenótipo observado no endosperma das sementes de milho (ausência de pigmentação).

Figura 7 - Gel observado para o par de primers C1-I (A). Gel observado para o primer 'forward' C1 e 'reverse' C1-I (B). DNA Ladder (1); Controle negativo A (2); 30A37PW amostra 1 (3 e 8); 30A37PW amostra 2 (4 e 9); DKB390 amostra 1 (5 e 10); DKB390 amostra 2 (6 e 11); Controle negativo B (7).



Fonte: Do Autor (2017).

## 4.6 Sequenciamento de DNA

Os dois fragmentos inesperados, de tamanhos de aproximadamente 600 e 700 pb, foram submetidos ao procedimento de sequenciamento, contudo, sem resultado satisfatório para o primeiro, que ainda precisa ser concluído. O fragmento de 700 pb, denominado neste estudo de banda maior, por sua vez, tornou-se conhecido (Figura 8).

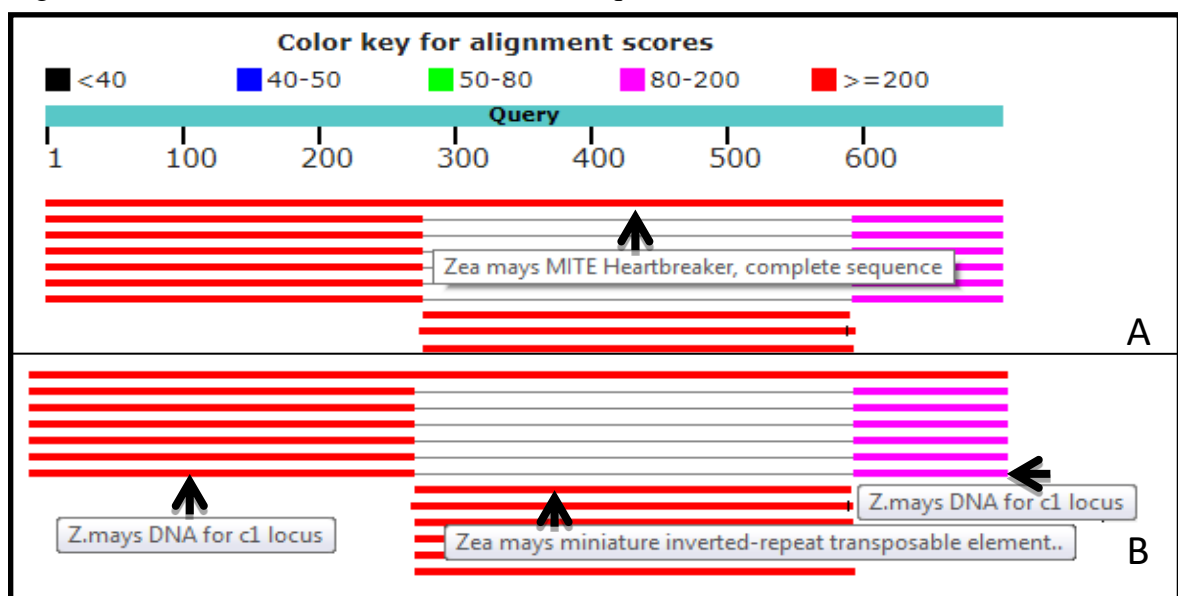
Figura 8 - Sequência obtida para o fragmento de aproximadamente 700pb.

```
GAAGGGAAGGCGTTAAGAGAGGGGCGTGGACGAGCAAGGAGGACGATGCCTTGGCCGCCTACGTC
AAGGCCCATGGCGAAGGCAAATGGAGGGAAGTGCCCCAGAAAGCCGGTAAAACCTAGCTAGTCTTT
TTATTTTCAATTTGGCATCATATATATACCCCCGAGGCAAGACCCGGAGGACGATCACGTGTGTGGGT
GCAGGTTTGCCTCGGTGCGGCAAGAGCTGCCGGCTGCGGTGGCTGAACTACCTCCGGCCCAACATC
AGGCGCGGCAACGGCCATGTTTGTTCGGCTTCTGGCAGCTTCTGGCCACCAAAAAGTTGCTGCGGA
CTGCCAAACGCTCAGCTTTTCAGCCAAATTCTATAAAAATTCGTTGGGACAAAACCATTCAAATC
AACATAAACACATAATCGGTTGAGTCGTTGTAATAGTAGAAAATCCGTCACCTTTGTAGATCCTGAGC
CCTATGAACAACTTTATCTTCCTCTACACGTAATCGTAATGATACTCAAATTTCTCCCCACAGCCAGA
TTCTCCCCACAGCCAGATTTTCAGAAAAGCTGGTCAGAACAAAGCTGAACCAACAAGCCCAACAT
CTCTACGACGAGGAGGATCTCATCATCCGCCTCCACAGGCTCCTCGGCAACAGGTCGGTGCAGTG
GCCAGTGGTGGGCTAGCTTATTACACGAAGCTGGACGA
```

Fonte: Do Autor (2017).

O sequenciamento do produto de PCR foi realizado utilizando os próprios primers que o amplificaram e a sequência obtida foi submetida ao BLAST (Figura 9).

Figura 9 - Parte dos resultados da análise da sequência da banda maior através do Blast.



Fonte: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr\\_410832623](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_410832623)

A primeira linha vermelha (Figura 9A), evidenciada pela seta, indica uma semelhança da sequência completa da banda maior a uma parte da sequência *Zea mays* MITE *Heartbreaker* (JX556412.1), que possui em sua totalidade 1530 bases. No entanto, a banda maior está contida na sequência *Zea Mays* MITE *Heartbreaker*, diferindo apenas em três nucleotídeos (Figura 10).

Figura 10 - Análise de compatibilidade entre a sequência da banda maior e da sequência *Zea mays* MITE *Heartbreaker* realizada pelo Blast.

*Zea mays* MITE *Heartbreaker*, complete sequence

Sequence ID: [JX556412.1](#) Length: 1530 Number of Matches: 1

Range 1: 290 to 983 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Pr

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1267 bits(686)	0.0	694/697(99%)	3/697(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAAGGGAAGGCGTTAAGAGAGGGGCGTGGACGAGCAAGGAGGACGATGCCTTGGCCGCCT	60		
Sbjct 290	GAA-GGAAGGCGTTAAGAGAGGGGCGTGGACGAGCAAGGAGGACGATGCCTTGGCCGCCT	348		
Query 61	ACGTCAAGGCCCATGGCGAAGGCAAATGGAGGGAAGTGCCCCAGAAAAGCCGGTAAAATA	120		
Sbjct 349	ACGTCAAGGCCCATGGCGAAGGCAAATGGAGGGAAGTGCCCCAGAAAAGCCGGTAAAATA	408		
Query 121	GCTAGTCTTTTTATTTTCATTTTGGCATCATATATATACCCCCGAGGCAAGACCCGGAGGAC	180		
Sbjct 409	GCTAGTCTTTTTATTTTCATTTTGGCATCATATATATACCCCCGAGGCAAGACCCGGAGGAC	468		
Query 181	GATCACGTGTGTGGGTGCAGGTTTGCCTCGGTGCGGCAAGAGCTGCCGGCTGCGGTGGCT	240		
Sbjct 469	GATCACGTGTGTGGGTGCAGGTTTGCCTCGGTGCGGCAAGAGCTGCCGGCTGCGGTGGCT	528		
Query 241	GAACTACCTCCGGCCCAACATCAGGCGCGGCAACGGCCATGTTTGTTTCGGCTTCTGGCA	300		
Sbjct 529	GAACTACCTCCGGCCCAACATCAGGCGCGGCAACGGCCATGTTTGTTTCGGCTTCTGGCA	588		
Query 301	GCTTCTGGCCACCAAAAGTTGCTGCGGACTGCCAAACGCTCAGCTTTTCAGCCAAATTCT	360		
Sbjct 589	GCTTCTGGCCACCAAAAGTTGCTGCGGACTGCCAAACGCTCAGCTTTTCAGCCAAATTCT	648		
Query 361	ATAAAATTCGTTGGGACAAAAACCATTCAAATCAACATAAACACATAATCGGTTGAGTC	420		
Sbjct 649	ATAAAATTCGTTGGGACAAAAACCATTCAAATCAACATAAACACATAATCGGTTGAGTC	708		
Query 421	GTTGTAATAGTAGAAATCCGTCACTTTGTAGATCCTGAGCCCTATGAACAACCTTATCTT	480		
Sbjct 709	GTTGTAATAGTAGAAATCCGTCACTTTGTAGATCCTGAGCCCTATGAACAACCTTATCTT	768		
Query 481	CCTCTACACGTAATCGTAATGATACTCAAATTCTCCCCACAGCCAGATTCTCCCCACAGC	540		
Sbjct 769	CCTCTACACGTAATCGTAATGATACTCAAATTCTCCCCACAGCCAGATTCTCCCCACAGC	828		
Query 541	CAGATTTTCAGAAAAGCTGGT CAGAACAAGCTGAACCAAACAAGCCCAACATCTCCTAC	600		
Sbjct 829	CAGATTTTCAGAAAAGCTGGT CAGAACAAGCTGAACCAAACAAGCCCAACATCTCCTAC	888		
Query 601	GACGAGGAGGATCTCATCATCCGCCTCCACAGGCTCCTCGGCAACAGGTCGGTGCAGTGG	660		
Sbjct 889	GACGAGGAGGATCTCATCATCCGCCTCCACAGGCTCCTCGGCAACAGGTCGGTGCAGTGG	948		
Query 661	CCAGTGGTGGGCTAGCTTATTACACGAAGCTGGACGA 697			
Sbjct 949	CCAGTGGTGGGCTAGCTTATTACACGA-GCTG-ACGA 983			

Fonte: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr\\_410832623](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_410832623)

*Zea mays* MITE *Heartbreaker* possui características estruturais de elementos transponíveis de repetição invertida em miniatura (MITEs) e não há nos bancos de dados uma análise de como esses elementos se movem, mas, provavelmente, consistem elementos de DNA (ZHANG et al., 2000). Segundo Schnable et al. (2009) o milho é uma espécie que apresenta o genoma composto por mais de 85% de elementos transponíveis.

A família *Heartbreaker* (*Hbr*) é uma das inúmeras famílias de MITEs e a maioria dos membros dessa família exibe mais de 90% de identidade de sequência e possui locais de inserção altamente polimórficos e existem, predominantemente, em regiões gênicas de cópia única ou poucas cópias do genoma do milho (ZHANG et al., 2000). No entanto, Zhang et al. (2000) relatam que, devido aos bancos de dados possuírem, predominantemente, sequências de genes, esses resultados não descartam a possibilidade de que os MITEs sejam igualmente representados nos vastos domínios repetitivos que compõem a maioria dos genomas de plantas.

Encontram-se, na literatura, informações que sugerem que, ao contrário das famílias de elementos mais tradicionais, a atividade do MITE não pode ser monitorada por fenótipos, como folhas listradas ou núcleos manchados ou altas frequências de reversão germinal porque os MITEs estão em genes normais e a excisão, provavelmente, não alterará a expressão (ZHANG et al., 2000). Porém, no presente trabalho é possível inferir que a atividade do MITE causou a inibição da coloração conferida pela antocianina às sementes.

A banda maior coincide com outras duas sequências conhecidas (Figura 9B), a primeira e a última seta evidenciam uma parte em vermelho e uma parte em rosa, e ambas coincidem com o *locus* C1(X06333.1). O alinhamento dessa sequência com partes da banda maior é de 99% (Figura 11).

Entre as duas partes da sequência do *locus* C1 está uma outra sequência em vermelho, identificada como elemento transponível de repetição invertida em miniatura (MITE), pertencente à família *Heartbreaker*, conhecida como *Hbr11* (AF203731.1). O alinhamento dessa sequência com a região central da banda maior é de 95% (Figura 12).

Figura 11 - Alinhamento da banda maior com a sequência *Zea mays* DNA para o locus C1.

*Z. mays* DNA for c1 locus

Sequence ID: [X06333.1](#) Length: 4060 Number of Matches: 2

Range 1: 1101 to 1373 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Pr

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
494 bits(267)	2e-135	272/274(99%)	1/274(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAAGGGAAGGCGTTAAGAGAGGGGCGTGGACGAGCAAGGAGGACGATGCCTTGGCCGCCT			60
Sbjct 1101	GAA-GGAAGGCGTTAAGAGAGGGGCGTGGACGAGCAAGGAGGACGATGCCTTGGCCGCCT			1159
Query 61	ACGTC AAGGCCCATGGCGAAGGCAAATGGAGGGAAGTGCCCCAGAAAGCCGGTAAAAC TA			120
Sbjct 1160	ACGTC AAGGCCCATGGCGAAGGCAAATGGAGGGAAGTGCCCCAGAAAGCCGGTAAAAC TA			1219
Query 121	GCTAGTCTTTTTATTTCA TTTGGGCATCATATATATACCCCGAGGCAAGACCGGAGGAC			180
Sbjct 1220	GCTAGTCTTTTTATTTCA TTTGGGCATCATATATATACCCCGAGGCAAGACCGGAGGAC			1279
Query 181	GATCACGTGTGTGGGTGCAGGTTTGC GTCGGTGCGGCAAGAGCTGCCGGCTGCGGTGGCT			240
Sbjct 1280	GATCACGTGTGTGGGTGCAGGTTTGC GTCGGTGCGGCAAGAGCTGCCGGCTGCGGTGGCT			1339
Query 241	GA ACTACCTCCGGCCCAACATCAGGCGCGGCAAC 274			
Sbjct 1340	GA ACTACCTCCGGCCCAACATCAGGCGCGGCAAC 1373			

Fonte: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr\\_410832623](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_410832623)

Figura 12 - Alinhamento da banda maior com a sequência *Zea mays* miniature inverted-repeat transposable elemento *Hbr11*.

*Zea mays* miniature inverted-repeat transposable element Hbr11

Sequence ID: [AF203731.1](#) Length: 314 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 312 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ F

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
490 bits(265)	2e-134	296/311(95%)	1/311(0%)	Plus/Minus
Query 276	GCCATGTTTGT TTTGGGCTTCTGGCAGCTTCTGGCCACCAAAAAGTTGCTGCGGACTGCCAA			335
Sbjct 312	GCC-TGTTTGT TTTGGGCTTCTGGCAGCTTCTGGCCACCAAAAAGCTGCTGCGGACTGCCAA			254
Query 336	ACGCTCAGCTTTT CAGCCAAATTTCTATAAAAATTCGTTGGGACAAAAACCATTCAAATCA			395
Sbjct 253	ACGCTCAGCTTTT CAGCCAACTTTCTATAAAAATTCGTTGGGGCAAAAAATCATCAAATCA			194
Query 396	ACATAAACACATAA TCGGTTGAGTCGTTGTAATAGTAGAAATCCGTCACTTTGTAGATCC			455
Sbjct 193	ATATAAACACATAA TCGGTTGAGTCGTTGTAATAGTAGGAATCCGTCACTTTGTAGATCC			134
Query 456	TGAGCCCTATGAACA ACTTTATCTTCTTCTACACGTAATCGTAATGATACTCAAATCTC			515
Sbjct 133	TGAGCCCTATGAACA ACTTTATCTTCTTCTCACACGTAATCGTAATGATACTTAGATTCTC			74
Query 516	CCCACAGCCAGATT CTCCCCACAGCCAGATTTT CAGAAAAGCTGGTCAGAAACAAAGCTGA			575
Sbjct 73	CCCACAGCCAGATT CTCCCCACAGCCAGATTTT TAGAAAAGCTGGTCAGAAAAAAGCTGA			14
Query 576	ACCAAACAAGC 586			
Sbjct 13	ACCAAACATGC 3			

Fonte: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr\\_410832623](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_410832623)

Erhard Jr et al. (2013) observaram que ao sequenciar o alelo C1 de um de seus genótipos, foi identificado um MITE de 363 pares de bases da família *Hbr*. Tal elemento transponível introduziu um códon sem sentido prematuro e, provavelmente, causou a disfunção do alelo C1-*Hbr* (ERHARD JR, et al., 2013).

De acordo com a coincidência da sequência da banda maior e das sequências sugeridas pelo Blast, pode-se afirmar que o elemento transponível *Zea mays* MITE *Heartbreaker*, que se alinhou diferindo apenas 1% da sequência total da banda maior (Figura 10), foi o responsável pela inibição da coloração de antocianina nas sementes provenientes do cruzamento dos indutores com o genótipo doador 30A37PW. Ou seja, o elemento transponível *Zea mays* MITE *Heartbreaker*, que também pode ser definido como o *locus* C1 juntamente com um elemento transponível inserido em posição específica, presente no genótipo 30A37PW, foi transferido aos seus descendentes causando a coloração totalmente amarela, livre de antocianina.

Devido à grande semelhança entre os alelos C1 e C1-I, a ferramenta blast também apresenta um bom alinhamento da sequência da banda maior com esses alelos, bem como com outras sequências relacionadas.

## 5 CONCLUSÕES

Não é possível, de forma viável e prática, distinguir os indivíduos haploides dos diploides nos casos em que há inibição total do marcador R1-navajo.

Nos casos em que se deseja utilizar o marcador R1-navajo, é indicado realizar testes a fim de garantir que o genótipo doador utilizado não possui genes inibidores.

São necessários estudos e desenvolvimento de técnicas alternativas ao marcador fenotípico R1-navajo para a identificação de possíveis haploides e cálculo das taxas de indução.

É possível aumentar a taxa de indução de haploides com uma geração de recombinação, como observado no indutor 40 que apresentou 1,93% de indução.

O elemento transponível *Zea mays* MITE *Heartbreaker*, presente no genótipo 30A37PW, foi transferido aos seus descendentes causando o silenciamento do gene C1, impedindo a formação de antocianina na semente e inibindo a coloração arroxeadada

## REFERÊNCIAS

- BARNABAS, B.; OBERT, B.; KOVACS, G. Colchicine, an efficient genome-doubling agent (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. **Plant Cell Reports**. v. 18, p.858-862, 1999.
- BARRET, P.; BRINKMANN, M.; BECKERT, M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 117, p. 581-594, 2008.
- BATES, D. et al. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. **Journal of Statistical Software**. v.67, n.1, p. 1-48, 2015.
- BATTISTELLI, G. M. **Estratégias para obtenção e identificação de duplo-haplóides em milho tropical**. 2012, 61p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BATTISTELLI, G.M. et al. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research** v.12, p. 4230-4242, 2013.
- BELICUAS, P.R. **Obtenção, identificação e caracterização de haploides androgenéticos em milho**. 2004. 52p. 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.156, p.95-102, 2007.
- BLAKESLEE, A.F.; Belling, J.; Farnham, M.E.; Bergner, A.D. A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. **Science**. New York. vol. 55. p. 646-647, 1922.
- BORDES, J., et al. Doubled-haploid versus single-seed descent and S1-family variation for testcross performance in a maize population. **Euphytica**, Wageningen v.154, p.41-51, 2007.
- BORDES, J., et al. Haplodiploidization of maize (*Zea mays* L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. **Agronomie**. v.17 p.291-297, 1997.
- CHAIKAM, V. et al. Analysis of effectiveness of R1-nj antochoyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin. v.128, n.1., p.159-171, 2014.
- CHAIKAM, V. et al. Development and validation of red root marker-based haploid inducers that effectively complement R1-nj (Navajo) marker-based in vivo haploid identification in maize. **Crop Science**. Madison. v.56, 2016.
- CHALYK, S.T. Creating new haploid-inducing lines of maize. **The Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.73, n.1., p.53-54, Apr.1999.
- CHALYK S.T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. **Euphytica**. Wageningen. v. 79, n. 1-2, p. 13-18, 1994.
- CHALYK, S. T., et al. Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize. **The Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 77, p. 29-30, Jan. 2003.

- CHANG, M.T.; COE, E.H. Doubled haploids. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. **Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement**. Berlin. v.63. p.127-142, 2009.
- CHASE, S. S. Monoploids in maize. Iowa State College Press, **Heterosis**, Iowa, p.389-399, 1952.
- CHASE, S. S. Androgenesis, its use for transfer of maize cytoplasm. **Journal of Heredity**, Washington, v.54, p.152-158, 1963.
- CHASE, S.S. Monoploids and monoploid - derivatives in maize (*Zea mays* L.) **The Botanical Reviews**, v.35, p117-167, 1969.
- CHASE, S. S.; NANDA, D. K. Comparison of variability in inbred lines and monoploid-derived lines of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v.5, p.275-276, 1965.
- CHEN, S.; LI, L.; LI, H. Maize Doubled Haploid Breeding. **China Agricultural University Press**. Beijing, 2009.
- CHOE, E. H., et al. Improving in vivo maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives. **Plant Breeding Review**, Bonn, n. 3, v. 131, p. 399-401, 2012.
- COE, E. H. A Line of Maize with High Haploid Frequency, **The American Naturalist**. v. 93, no. 873, p. 381-382, 1959.
- COE, E. H. Anthocyanin Synthesis in Maize-A Gene Sequence Construction. **The American Naturalist**, v. 91, n° 861, p.381-385, 1957.
- COE, E. H. Anthocyanin genetics. In: Freeling M., Walbolt, V., eds. **The Maize Handbook**. New York: Springer Verlag, p.279–281, 1994.
- COE, E. H. Spontaneous mutation of the aleurone color inhibitor in maize. **Genetics**. Menasha. v.47, no 779, 1962.
- COE, E.H.; HOISINGTON, D.A.; NEUFFER, M.G . The genetics of corn. In GF Sprague, JW Dudley, eds, Corn and Corn Improvement. **American Society of Agronomy**, Madison, WI, pp 81–259, 1988.
- CONE, K. C., BURR, F. A., BURR, B Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 83:9631–9635, 1986.
- CÔRTE REAL, M. et al. Contribuições da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v.71, p.19-33, 2002.
- COUTO, E. **Indução de haploides e duplicação cromossômica em milho**. 2013. 104p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- COUTO, E. G. O. et al. Identification of haploid maize by flow cytometry, morphological and molecular markers. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.37, p.25-31, 2013.
- COUTO, E. G. O. et al. *In vivo* haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.39, no 5 p. 25-31, 2015.
- COUTO, E.G. de O. et al. Verification and characterization of chromosome duplication in haploid maize. **Genetics and Molecular Research**, v.14, p. 6999-7007, 2015.



- DANG, N. C. **Improvement of protein quality in waxy maize (*Zea mays* L.) by double haploid and marker assisted selection techniques.** 2010. 15 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - University of Thai Nguyen, Zürich, 2010.
- 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, p.153-160, 2012.
- DE LAAT, A.M.M., GÖHDE, W., VOGELZANG, M.J.D.C.. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. **Plant Breeding Review**. Bonn. 99, 303–307, 1987.
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Olomouc, v.38, p.285-302, 1997.
- DONG, X., et al. Fine mapping of *qh1* influencing in vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin. v.126. p.1713–1720, 2013.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v.19, p.11-15, 1987.
- DWIVEDI, S. L., Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. **Biotechnology advances**. 18p. 2015.
- EDER, J.; CHALYK, S. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin. v.104, p. 703-708, 2002.
- ERHARD JR, K. F. et al. Maize RNA polymerase IV defines *trans*-generational epigenetic variation. **Plant Cell Reports**, v.25, no.3, p.808-819, 2013.
- FARIA, V.R. et al. Seleção recorrente recíproca na obtenção de híbridos interpopulacionais de milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.43, n.12, p.1749-1755, 2008.
- FORSTER, B.P.; THOMAS, W.P.S.T.B. Doubled haploids in genetics and plant breeding. **Plant Breeding Review**. Bonn. v.25, p.57-88, 2005.
- FRITSCHÉ-NETO, R.; GARBUGLIO, D. D.; BORÉM, A. In: BORÉM, A. e FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotechnologia aplicado ao melhoramento de plantas**. Viçosa. 1 edição. 335 p., 2012.
- FRITSCHÉ-NETO, R. et al. Seleção genômica ampla e novos métodos de melhoramento do milho. **Revista Ceres**. Viçosa, v. 59, p. 794-802, 2012.
- GALBRAITH, D. W. et al. Rapid Flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, New York, v.220. n. 4201, p. 1049-1051, June, 1983.
- GEIGER, H. H.; GORDILLO, G. A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. **Maydica**, Bergamo, v.54, p.485-499, 2009.
- GEIGER, H.H., SCHÖNLEBEN, M.. Incidence of male fertility in haploid elite dent maize germplasm. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**. Urbana. 85:22–32, 2011.
- GREENBLATT, I. M.; BOCK, M.. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. **Journal of Heredity**. Washington. v.58. p.9-13, 1967.

- HELLER, F.O. DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie. **Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft** v.86, p.437–441, 1973
- HO, I. et al. The use of stomatal chloroplast number for rapid determination of ploidy in maize. **Plant Breeding**. Bonn. v.105, p.203-210, 1990.
- HOWARD, A.; PELC, S. R. Synthesis of deoxyribonucleic-acid in normal and irradiated-cells and its relation to chromosome breakage. **International Journal of Radiation Biology**, Toronto, v. 49, n. 2. p. 207-218, 1986.
- HU, H. et al. The genetics basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method. **Genetics**. v. 10.1534, 2016.
- JONES, R. W. et al. Selection of haploid maize kernels from hybrid Kernels for Plant breeding using near---infrared spectroscopy and SIMCA analysis. **Applied Spectroscopy** 66:447–450, 2012.
- KELLIHER, T., et al. Maternal haploids are preferentially induced by *CENH3-tailswap* transgeniv complementation in maize. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, artigo 414, 2016.
- KERMICLE, J. L. Androgenesis and the indeterminate gametophyte (ig) mutation: influence of pollen parent on adrogenese frequency. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.47, p.207-208, 1973.
- KERMICLE, J. L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science**, New York, v.166, p.1422-1424, 1969.
- KITAMURA, S., AKUTSU, M., OKAZAKI, K.. Mechanism of action of nitrous oxide gas applied as a polyploidizing agent during meiosis in lilies. **Sexual Plant Reproduction**. v.22 p.9–14, 2009.
- KLEIBER, D., PRIGGE, V., MELCHINGER, A. E.. Haploid fertility in temperate and tropical maize germplasm. **Crop Science**. Madison. v.52. p.623–630, 2012.
- LASHERMES, P.; BECKERT, M. A genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin, v.76, p.405-410, 1988.
- LEMOS et al. Seleção entre e dentro de famílias de meio-irmãos no milho Dentado Composto visando resistência à *Spodoptera frugiperda* e à *Heliothis zea*; II ciclo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.25, n.1, jan. 1990.
- LIU, C.X. et al. Fine mapping of *qhir8* affecting in vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**. 128:2507–2515, 2015.
- LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v.77, p.18-29, 2004.
- MAGOON, M. L., KHANNA, K. R. Haploids, **Caryologia**, v.16, p. 191-235, 1963.
- MELCHINGER, A. E., et al. *In vivo* haploid induction in maize: Comparison of different testing regimes for measuring haploid induction rates. **Crop Science**. Madison, v.56, p.1127-1135, 2016.
- MELCHINGER, A. E., et al. Colchicine alternatives for chromosome doubling maize haploids for doubles haploid production. **Crop Science**. Madison. 2015. doi:10.2135/cropsci2015.06.0383

- MELCHINGER, A. E., et al. Rapid and accurate identification of *in vivo*-induced haploid seeds based on oil content in maize. **Scientific Reports**, v.3, n.2129, 2013.
- MIRANDA, L.T. et al. Oito ciclos de seleção entre e dentro de famílias de meios irmãos no milho IAC-1. **Revista Científica do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo**. Bragantia, Campinas, v.36, n.18, 1977.
- MILACH, S. C. K. **O melhoramento de milho**. Informativo Pioneer, Santa Cruz do Sul, v. 25, p. 16-17, 2007.
- NANDA, D. K.; CHASE, S. S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**., v.6, p.213-215, 1966.
- NAIR, S. K. et al. Dissection of a major QTL *qhir1* conferring maternal haploid induction ability in maize. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlim. v. 130, p. 1113-1122, 2017,
- PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, p. 429-485, 1999.
- PAZ-ARES, J., GHOSAL, D., SAEDLER, H. Molecular analysis of the C1-I allele from *Zea mays*: a dominant mutant of the regulatory C1 locus. **EMBO J** 9:315, 1990.
- 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, p.1-16, 2011.
- PRASANNA, B.M. et al. Doubled haploid (DH) technology in maize breeding: an overview. In: **Doubled Haploid Technology in Maize Breeding Theory and Practice**. Mexico, D.D.: CIMMYT. (eds), 2012.
- PRIGGE, V. et al. Doubled haploids in tropical maize: I., effects of inducers and source germplasm on *in vivo* haploid induction rates. **Crop Science**, Madison, v. 51, p. 1498-1506, 2011.
- PRIGGE, V. et al. New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. **Genetics** 111: 781–793, 2012.
- RABEL, M. **Haplóides androgenéticos em milho tropical**. 2008. 57 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2008.
- RANGEL, R.M. et al. Análise biométrica de ganhos por seleção em população de milho pipoca de quinto ciclo de seleção recorrente. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p.473-481, abr-jun, 2011.
- RAPOSO, F.V.; RAMALHO, M.A.P. Componentes de variância genética de populações derivadas de híbridos simples de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.3, p.402-413, 2004.
- R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna. 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 17 ago. 2015.
- RIBEIRO, C. B. **Estratégias para obtenção de duplo-haplóides e progênies indutoras de haploidia em milho**. 2016, 104 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

- RÖBER, F. K.; GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. In vivo haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica**, Bergamo, v.50, p.275-283, 2005.
- ROTARENCO, V. A.; ADICU, G.; SARMANIUC, M. Induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.83. 2009.
- ROTARENCO, V. et al. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana. v.84, 2010.
- SANTOS, F.S. Predição de ganhos genéticos por índices de seleção na população de milho-pipoca UNB-2U sob seleção recorrente. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.3, p.389-396, 2007.
- SARKAR, K. R. et al. Stabilization of high haploid inducer lines. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.68, n.1, p.64-65, 1994.
- SARKAR, K. R.; COE, E. H. Jr. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. **Genetics**, v. 54, p. 453-464, 1966.
- SCHMIDT, W. Hybrid maize breeding at the KWS SAAT AG. In: **Workshop of the Association of Seed Breeding Director**. Gumpenstein 2003. v. 23.p. 1-6, 2004.
- SCHNABLE, P. S. et al. The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. **Science**, v.326, p.1112-1115, 2009.
- SEITZ, G. The use of double haploids in corn breeding. In. Proceedings of the forty first annual **Illinois Corn Breeders' School**, Urbana-Campaign, Illinois USA. v.45. p. 1-7, 2005.
- SHATSKAYA, O. A. et al. Mass induction of maternal haploids in corn. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v.68, p., 1994.
- SILVA, G. J. et al. Produção de haplóides androgenéticos em milho. **Embrapa**, Dezembro, 2009.
- SOUZA, F. F.; QUEIRÓZ, M. A. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliploides de melancia. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.516, 520, 2004.
- SMELSER, A., et al. Weighing in on a method to discriminate maize haploid from hybrid seed. **Plant Breeding Review**. Bonn. v. 134, p. 283-285, 2015. doi:10.1111/pbr.12260
- STRAHWALD J.F., GEIGER H.H. Theoretical studies on the usefulness of doubled-haploids for improving to efficiency of recurrent selection in spring barley. Proceedings of the fifth Meeting of the **EUCARPIA** Section "Biometrics in Plant Breeding", p.1-12, 1988.
- TSENG, Y. New methods for haploid selection in maize. **Graduate Theses and Dissertations**. Iowa State University, paper 12918, 52p. 2012.
- VANOUS, A. E. **Optimization of doubled haploid production in maize (*Zea mays* L.)**. Graduate Theses and Dissertations. Iowa State University, paper 11974, 67p. 2011.
- WU, P. et al. Mapping of maternal QTLs for *in vivo* haploid induction rate in maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, v. 196, p. 413-421, 2014.

WU, P. et al. New insights into the genetics of haploid male fertility in maize. **Crop Science**, v. 57, p. 1-11, 2017.

XU, X. et al. Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through *in vivo* induction of a maternal haploid in maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n.4, p. 1083-1096, 2013.

ZHANG, Z. et al. Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Reports**. v.27, p.1851–1860, 2008.

ZHANG, Q. et al. Recent, extensive, and preferential insertion of members of the miniature inverted-repeat transposable element family *Heartbreaker* into genic regions of maize. **Genetics**, v.97, no.3, p. 1160-1165, 2000.

ZHAO, X., et al. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers. **Plant Physiology**, v.163, p.721-731, 2013.