



RAQUEL MARIA DE OLIVEIRA PIRES

**INDUÇÃO, DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA E AVALIAÇÃO
DE MARCADORES PARA A DETECÇÃO DE PLOIDIAS EM
LINHAGENS DE MILHO**

LAVRAS - MG

2018

RAQUEL MARIA DE OLIVEIRA PIRES

**INDUÇÃO, DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA E AVALIAÇÃO DE MARCADORES
PARA A DETECÇÃO DE PLOIDIAS EM LINHAGENS DE MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof.^a Dr.^a Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

Dr.^a Heloisa Oliveira dos Santos
Coorientadora

LAVRAS – MG

2018

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

Pires, Raquel Maria de Oliveira.

Indução, duplicação cromossômica e avaliação de
marcadores para a detecção de ploidias em linhagens de milho
/ Raquel Maria de Oliveira Pires. - 2018.

97 p. : il.

Orientador(a): Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Coorientador(a): Heloisa Oliveira dos Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. duplo-haploide. 2. indução. 3. marcadores. I. Von
Pinho, Édila Vilela de Resende. II. Santos, Heloisa Oliveira
dos. III. Título.

RAQUEL MARIA DE OLIVEIRA PIRES

**INDUÇÃO, DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA E AVALIAÇÃO DE MARCADORES
PARA A DETECÇÃO DE PLOIDIAS EM LINHAGENS DE MILHO**

**INDUCTION, CHROMOSOMAL DUPLICATION AND EVALUATION OF
MARKERS FOR THE DETECTION OF PLOIDS IN MAIZE LINES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 04 de julho de 2018.

Prof. ^a Dr. ^a MARCELA CARLOTA NERY	UFVJM
Prof. Dr. JOÃO CÂNDIDO DE SOUZA	UFLA
Prof. Dr. RENZO GARCIA VON PINHO	UFLA
Prof. Dr. JOÃO ALMIR OLIVEIRA	UFLA

Prof.^a Dr.^a Édila Vilela de Resende Von Pinho
Orientadora

Dr.^a Heloisa Oliveira dos Santos
Coorientadora

LAVRAS - MG

2018

A Deus,

Aos meus pais, Walter e Egléa,

Aos meus irmãos Vitor e Vinícius.

As minhas sobrinhas Maria Luiza e Ana Laura.

Com todo AMOR,

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas vezes em que cansada e desiludida, recorri em uma prece e fui atendida.

Aos meus pais, pelo amor, exemplo, apoio e dedicação incondicionais e por me ajudarem a tornar o que hoje, eu sou.

Aos meus irmãos, pelo carinho, incentivo e palavras de conforto quando precisei. Á minha cunhada Mariana, pelo exemplo. Ás minhas sobrinhas Malu e Lala, fontes de energia, pureza e amor incondicional.

Aos meus parentes e familiares que mesmo distantes, sempre estiveram presentes.

As amigas de sempre Ana, Gabi, Flá, Dally, Marina., por todos os momentos que já vivemos e por aqueles que ainda vamos viver. Em especial ao Vitor e a Dallyzinha que esperamos ansiosas para carregar nos braços.

A Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização de um sonho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado e pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior. A FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo incentivo e apoio à pesquisa.

A professora Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela orientação, confiança, paciência e exemplo de excelente profissional.

Aos demais participantes da banca; Marcela Carlota Nery, João Cândido de Souza, Renzo Garcia Von Pinho, João Almir Oliveira e Denise Cunha Dias pela disponibilidade, inspiração e todos os ensinamentos passados durante minha vida acadêmica.

Aos professores do Departamento de Agricultura pela contribuição à minha formação profissional. Em especial os professores do Departamento de sementes; Maria Laene Moreira de Caravilho, Renato Mendes Guimarães, João Almir Oliveira e os pesquisadores Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa e Antônio Rodrigues Vieira (sempre em memória), por se tornarem além de exemplos, grandes amigos. À minha amiga e mais nova professora do departamento, Heloisa Oliveira pelas inúmeras vezes que me socorreu em meio às aflições da tese, pela amizade e parceria.

A Dona Dalva, Geraldo, Jaque, Vivi e Iris por sempre me receberem com um sorriso e alegrarem meus dias no laboratório de sementes.

A Marli, que além de excelente secretária do departamento, se tornou uma grande amiga.

A todos que me ajudaram na condução do experimento. Inviável descrever os nomes, tamanha a quantidade de pessoas que se dispuseram a ajudar. Saibam que eu sei da ajuda de cada um, e agradeço infinitamente pela disposição. Sem vocês, isso jamais seria possível.

Ao Ulisses Figueiredo, Vander, Renato, Indalécio, Rafael, Alex e Ariadne pelas ajudas e orientações nas análises estatísticas e calma em momentos de desespero.

A Iowa State University, em especial ao professor Thomas Lubbersted e Uscha Frei e aos amigos Arthur, Henrique, Anderson e Camila, por todo ensinamento na tecnologia duplo haploide, amizade e inesquecível experiência de vida.

Aos amigos que fiz em Ames- IA- César, Beyonce, Snow, Camila, Mateus, Cássia, Jéssica, Nicole e Carlos por todos os momentos compartilhados e por se tornarem minha família durante o ano de 2017.

Aos amigos que a UFLA me proporcionou e que serão levados para toda a vida, em especial o pessoal do grupo Mangueirão e Chuveirinho, obrigada pela amizade, ajuda disponibilizada durante o doutorado, infinitos momentos e companheirismo,

Aos colegas do departamento de sementes da UFLA e do NESem pelos momentos de descontração, auxílios, sugestões e grandes aprendizados.

Aos grandes amigos de Viçosa, pela força, carinho e atenção. Em especial à Genaina, Alex e Alessandra pela presença constante, cumplicidade e amizade sincera.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho:

MEU ETERNO AGRADECIMENTO!!!

"Existe uma força mais poderosa do que a energia atômica: a força de vontade!"

Albert Einstein

RESUMO

Avanços em tecnologias, visando o melhoramento de plantas e a produção de sementes buscando-se a otimização de questões como eficiência, tempo e custo tem sido fundamentais. Uma dessas tecnologias é o uso da indução de haploidia para obtenção de linhas puras, chamadas duplo-haplóides (DH). Essa técnica consiste no cruzamento de linhagens indutoras de haploides com um genótipo doador (indução *in vivo*), identificação de possíveis haploides no estágio semente ou plântulas, duplicação cromossômica por meio do uso de agentes antimitóticos e autofecundação das plantas DH. Buscando-se a otimização das etapas envolvidas nesse processo, o objetivo no presente trabalho foi analisar a capacidade do indutor de haploidia gimnogenético KEMS por meio da taxa de indução de haploides, validar a eficiência de dois protocolos de duplicação cromossômica, conferir a capacidade das técnicas de citometria de fluxo e marcadores moleculares SSR na verificação da duplicação cromossômica e estudar ferramentas adicionais para uso como marcadores indiretos na identificação de ploidias, a fim de extrapolar o uso desses marcadores na identificação de haploides em etapa inicial do processo de obtenção de duplo-haplóides. A linhagem indutora de haploidia KEMS foi utilizada como parental masculino e cruzada com quatro híbridos (GNS3225, GNS3032, GNS3264 e DKB393). As sementes provenientes desse cruzamento, foram selecionadas de acordo com o marcador R-navajo e submetidas a dois diferentes protocolos de duplicação cromossômica. No primeiro protocolo, as sementes foram germinadas em papel de germinação por 72h a 25°C, e aquelas plântulas consideradas possíveis haploides foram submetidas ao tratamento com solução de 0,04% de colchicina e 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), por 12 horas, e mantidas no escuro a 20°C. No segundo protocolo, as sementes foram semeadas em bandejas contendo areia e vermiculita. Após 10 dias, as plântulas consideradas haploides foram imersas em solução de colchicina 0,1%, dimetilsulfóxido 0,1% (DMSO) e Tween 20 a 0,1%, e mantidas por 6 horas na presença de luz em temperatura ambiente média de 22°C. As plantas que sobreviveram aos protocolos de duplicação cromossômica foram aclimatizadas em casa de vegetação e posteriormente transplantadas para o campo. Após a autofecundação das plantas DH0, as sementes DH1 obtidas foram levadas à campo, divididas em tratamentos de acordo com os parentais e protocolos de duplicação. No estágio vegetativo V4 das plântulas DH1, tecido foliar foram amostrados para a identificação de ploidias via citometria de fluxo, análises de DNA utilizando marcadores microssatélites e estudos de caracteres anatômicos. Esses resultados foram confrontados com as características morfológicas das plantas DH1 desenvolvidas em campo, avaliadas com o uso de ferramentas descritivas. A linhagem indutora KEMS é capaz de induzir haploides. Quanto aos protocolos utilizados houve diferenças significativas na duplicação cromossômica e na taxa de sobrevivência de plantas DH0 em campo, sendo o protocolo 2 mais eficiente. No entanto, o uso de ferramentas descritivas para avaliar a uniformidade dos genótipos submetidos aos protocolos de duplicação e a segregação dos materiais duplo haploides obtidos, não foi eficiente. As técnicas de citometria de fluxo e marcadores microssatélites foram eficientes na caracterização de plantas duplicadas e a anatomia apresentou alta acurácia das variáveis estudadas diferindo indivíduos por meio de suas ploidias.

Palavras-chave: duplo-haploide, indução, duplicação, marcadores, anatomia.

ABSTRACT

Advances in technologies, aiming the improvement of plants and the production of seeds seeking to optimize issues such as efficiency, time and cost, have been fundamental. One of these technologies is the use of induction of haploid to obtain pure lines, called double-haploid (DH). This technique consists of the crossing of haploid inducing lines with a donor genotype (in vivo induction), identification of possible haploids in seeds or seedling stage, chromosome duplication through the use of antimitotic agents and self-fertilization of DH plants. In order to optimize the steps involved in this process, the objective in the present work was to analyze the capacity of the haploid gymnogenetic inducer line KEMS by means of the haploid induction rate, to validate the efficiency of two chromosome duplication protocols, to verify the capacity of the techniques flow cytometry and SSR molecular markers in the verification of chromosome duplication and to study additional tools for use as indirect markers in the identification of ploidy in order to extrapolate the use of these markers in the identification of haploids in the initial stage of the process of obtaining double-haploids . The haploid inducer line KEMS was used as a male and cross pair with four hybrids (GNS3225, GNS3032, GNS3264 and DKB393). The seeds from this crossing were selected according to the R-Navajo marker and submitted to two different chromosome duplication protocols. In the first protocol, the seeds were germinated on germination paper for 72h at 25°C, and those seedlings considered possible haploids were submitted to treatment with 0.04% colchicine solution and 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) for 12 hours, and kept in the dark at 20 ° C. In the second protocol, the seeds were sown in trays containing sand and vermiculite. After 10 days, the seedlings considered haploid were immersed in 0.1% colchicine solution, 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) and 0.1% Tween 20, and maintained for 6 hours in the presence of light at room temperature. 22°C. The plants that survived the chromosome duplication protocols were acclimatized in greenhouse and later transplanted to the field. After self-fertilization of the DH0 plants, the DH1 seeds obtained were taken to the field, divided into treatments according to the parental and duplication protocols. At the vegetative stage V4 of the DH1 seedlings, foliar tissue was sampled for the identification of ploidy via flow cytometry, DNA analyzes using microsatellite markers and anatomical character studies. These results were confronted with the morphological characteristics of the DH1 plants developed in the field, evaluated with the use of descriptive tools. The KEMS inducing lineage is capable of inducing haploids. As for the protocols used, there were significant differences in chromosome duplication and in the survival rate of DH0 plants in the field, with protocol 2 being more efficient. However, the use of descriptive tools to evaluate the uniformity of the genotypes submitted to duplication protocols and the segregation of the obtained double haploid materials was not efficient. Flow cytometry techniques and microsatellite markers were efficient in the characterization of duplicate plants and the anatomy showed high accuracy of the studied variables differing individuals through their ploidy.

Keywords: double-haploid, induction, duplication, markers, anatomy, vigor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Caracterização da expressividade variável do gene R-navajo por meio da pigmentação por antocianina em sementes de milho. A) ausência de pigmentação, B) níveis gradativos de pigmentação e C) expressão total do gene na semente ou semente roxa..... 56
- Figura 2 - Barplot de valores em porcentagem de ploidias detectadas no estágio vegetativo V4 dos diferentes híbridos em cada tratamento; 1- DKB393/Prot 1, 2- DKB393/Prot 2, 3- GNS3225/Prot 1, 4- GNS3225/Prot 2, 5- GNS3264/Prot 1, 6- GNS3264/Prot 2, 7- GNS3032/Prot 1, 8- GNS3032/Prot 2 em função do valor total de sementes DH1 semeadas em campo..... 59
- Figura 3 - Exemplo de quatro histogramas de ploidias detectadas por citometria de fluxo em plântulas DH1 de milho coletadas após processo de duplicação cromossômica no estágio vegetativo V4. A) haploide, B) haploide/diploide ou duplo haploide, C) mixoploide e D) ploidia diploide do genitor DKB393 para efeito de comparação. Eixo vertical = número de núcleos lidos; Eixo horizontal = intensidade relativa de fluorescência. As setas evidenciam os picos G1 e G2 e o padrão externo de referência. 60
- Figura 4 - Barplot de valores em porcentagem de ploidias detectadas ao final do ciclo da cultura do milho dos diferentes híbridos em cada tratamento; 1- DKB393/Prot 1, 2- DKB393/Prot 2, 3- GNS3225/Prot 1, 4- GNS3225/Prot 2, 5- GNS3264/Prot 1, 6- GNS3264/Prot 2, 7- GNS3032/Prot 1, 8- GNS3032/Prot 2, em função da quantidade de plantas DH1 que sobreviveram em campo. Valores numéricos da redução (em porcentagem) de plantas em relação ao estágio vegetativo V4 e fotografias do autor demonstrando anormalidades de plantas haploides sobreviventes..... 62
- Figura 5 - Boxplots para avaliação exploratória e inferencial de seis características morfológicas de plantas de milho (A- altura de planta, B- altura de inserção da primeira espiga, C- diâmetro do colmo, D- números de folhas verdes por planta E- número de espigas por planta e F- número de sementes por planta), provenientes de quatro genótipos submetidos a dois protocolos de duplicação, (1- DKB393/Prot 1, 2- DKB393/Prot 2, 3- GNS3225/Prot 1, 4- GNS3225/Prot 2, 5- GNS3264/Prot 1, 6- GNS3264/Prot 2, 7- GNS3032/Prot 1, 8-

GNS3032/Prot 2). A caixa representa 50% dos dados; a marca central no box indica a mediana e os pontos fora das dimensões compreendidas pelo box, os outliers. O teste para avaliação de sobreposição de outliers não foi utilizado nesse experimento.(Continua) 63

Figura 6 - Padrão eletroforético dos produtos de amplificação do primer polimórfico BNLG 1238. H) genitor DKB393, I) linhagem indutora de haploidia KEMS, 1, 2, 3, 4, 6, 6, 7, 8) duplo-haploides confirmados nos tratamentos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 respectivamente. A seta indica a presença de um diploide não duplicado representado pelas duas bandas. 68

Figure 7 - Cross-sectional cuts of maize leaves collected after a process of chromosome doubling with use of colchicine. Haploid material (A), diploid (B), Double haploid (C), triploid (D) and tetraploid (E). ELF= thickness of leaf blade, PAR= thickness of parenchyma and EP=epidermis. The bars represent 50 µm (Continue)..... 83

Figure 8 - Adaxial surface (A to E) and abaxial (F through J) of maize leaves collected after a process of chromosome doubling with use of colchicine. Haploid material (A and F), diploid (B and G), Double haploid (C and H) , triploid (D and I) and tetraploid (E and J). The bars represent 50 µm and arrows indicate stomata(Continue)..... 84

Figure 9 - The relative importance of the characteristics evaluated in the separation of the valuated materials. 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos levados para o campo na safra 2014/2015, estabelecidos de acordo com os parentais e os protocolos de duplicação cromossômica.	50
Tabela 2 - Médias ajustadas das taxas de indução de haploides identificados pelo marcador morfológico R-navajo, oriundos dos cruzamentos dos quatro híbridos com o indutor KEMS.....	55
Tabela 3 - Porcentagens de sobrevivência de plantas de milho DH0 em casa de vegetação e em campo, após submissão aos protocolos de duplicação cromossômica artificial.....	58
Tabela 4 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as características morfológicas observadas em híbridos de milho, submetidos a dois protocolos de duplicação cromossômica, determinadas com base na média dos tratamentos.	65
Tabela 5 - Altura de planta (cm); altura de inserção da primeira espiga (cm); diâmetro do colmo (cm); número de folhas verdes por planta; número de espigas por planta e número de sementes por planta, de plantas de milho DH0 avaliadas no campo provenientes dos quatro genótipos submetidos a dois protocolos de duplicação, (1- DKB393/Prot 1, 2- DKB393/Prot 2, 3- GNS3225/Prot 1, 4- GNS3225/Prot 2, 5- GNS3264/Prot 1, 6- GNS3264/Prot 2, 7- GNS3032/Prot 1, 8- GNS3032/Prot 2).....	66
Tabela 6 - Número de plantas de milho DH1 consideradas duplo-haploides pela citometria de fluxo e número de espigas colhidas dessas plantas previamente confirmadas e que sobreviveram ao final dos 120 dias da cultura em campo.	69
Table 7 - Treatments taken for the field in the harvest season 2014/2015, established in accordance with the parental and the protocols of chromosome doubling.....	79
Table 8 - Summary of ANADEV and estimates of genetic parameters in the evaluation of maize hybrids for traits, thickness of the leaf blade (ELF), thickness of the upper epidermis (ESS), thickness of the parenchyma (PAR), thickness of the lower epidermis (EEI), equatorial diameter of the stomata in the upper face (DES), polar diameter of the stomata in the upper face (DPS), Equatorial surface of the stomata in the lower face (DEI), polar diameter of the stomata of the lower phase (DPI) and stomata densities of upper surfaces (DS) and lower (DI) of the leaf.	83

Table 9 - Genotypic averages and ranking of treatments for the anatomical characteristics related to leaf blade; leaf blade thickness (ELF), thickness of the upper epidermis (ESS), thickness of the parenchyma (PAR), thickness of the lower epidermis (EEI), equatorial diameter of the stomata in the upper face (DES), polar diameter of the stomata in the upper face (DPS), polar and equatorial diameter of the stomata in the lower face (DEI) and (DPI), stomatal density of the upper surfaces (DS) and lower (DI) of maze leaves collected after a process of chromosome doubling with use of colchicine.....	86
Table 10 - Identificação do nível de ploidia de acordo com a análise de citometria e fluxo, das 32 plantas avaliadas divididas por tratamento.....	89

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	16
1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	O milho no Brasil e no mundo	18
2.2	Etapas para obtenção do milho híbrido	20
2.3	Duplo haploides: metodologia alternativa para a obtenção de milho híbrido	21
2.4	Método <i>in vivo</i> - Uso de linhagens indutoras da haploidia	23
2.5	Identificação e morfologia de haploides após a indução de haploidia	26
2.6	Morfologia de haploides	28
2.7	Etapa da duplicação cromossômica artificial em haploides de milho	29
2.8	Metodologias para identificação de plantas duplicadas	31
	REFERÊNCIAS	37
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	44
	ARTIGO 1 - INDUÇÃO DE HAPLOIDIA E USO DE FERRAMENTAS DESCRITIVAS NA ANÁLISE MORFOLÓGICA DE PLANTAS DH1 DE MILHO SUBMETIDAS A DOIS PROTOCOLOS DE DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA	44
1	INTRODUÇÃO	47
2	MATERIAL E MÉTODOS	49
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70
	ARTICLE 2 - ANATOMICAL TOOL IN THE IDENTIFICATION OF PLOIDS IN MAIZE SEEDLINGS AND POTENTIAL USE IN INITIAL STAGE OF DOUBLE HAPLOIDES OBTAINMENT PROCESS	74
1	INTRODUCTION	76
2	MATERIAL AND METHODS	78
3	RESULTS	82
4	DISCUSSION	89
5	CONCLUSIONS	93
	REFERENCES	94

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O milho se destaca como uma das commodities mais importantes do agronegócio brasileiro, posicionando o país como o terceiro maior produtor mundial desse cereal, atrás apenas dos Estados Unidos e China e segundo maior exportador (CONAB, 2017). Dentro desse cenário, o Brasil com uma área cultivada de 16,5 milhões de hectares e produção estimada de 85 milhões de toneladas de milho, é hoje um país estratégico, pois representa importância no maior desafio da humanidade nos próximos anos: garantir o alimento que o mundo necessita (CONAB, 2017).

Esse posicionamento do Brasil como país estratégico no desafio de alimentar a humanidade, considera além do eminente aumento populacional, a necessidade de aumentar a produtividade.

Dos recursos tecnológicos imprescindíveis para o aumento dessa produtividade e manutenção da competitividade do agronegócio brasileiro, investe-se muito em pesquisa genética aplicada ao melhoramento de plantas, impulsionando o desenvolvimento de novos híbridos de milho a cada dia. Atualmente no país, mais de 95% das sementes utilizadas para plantio são de milho híbrido (CONAB, 2017).

No desenvolvimento de um novo híbrido é preciso desenvolver linhagens. Essas são obtidas após sucessivas autofecundações, geralmente seis a oito. A partir desse momento, inicia-se a segunda etapa do melhoramento de milho, na qual as linhagens são cruzadas em diversas combinações e os híbridos resultantes, identificando-se as melhores combinações híbridas para produtividade e outros caracteres de interesse. Assim, após 8 a 9 anos de pesquisa, permanecem poucos produtos com consistente desempenho superior que podem chegar a ser um produto comercial. É ainda, o método mais utilizado pelos melhoristas, apesar do tempo de investimento (REN, 2017).

Das etapas citadas, o período que compreende a obtenção de genótipos homocigotos é considerado o mais demorado e dispendioso. Reduzir o tempo necessário para a produção de uma nova cultivar significa redução nos custos e antecipação dos lucros, sendo a busca de novas tecnologias capazes de diminuir esse tempo, tarefa constante nos programas de melhoramento genético.

Como alternativa, tem-se o uso de indução de haploidia para obtenção de linhas puras, chamadas duplo-haplóides (DH). Essa técnica consiste no cruzamento de linhagens indutoras de haploides com um genótipo doador, seguido da duplicação cromossômica e

autofecundação das DH, sendo uma técnica capaz de aumentar consideravelmente a competitividade e a dinâmica dos programas de melhoramento por abreviar o tempo de obtenção de novos híbridos em até 18 meses (CHAIKAM, 2017).

Uma planta haploide caracteriza-se por possuir uma única cópia de cada cromossomo característico da espécie e apresenta, no tecido somático, o número n de cromossomos típicos dos gametas do organismo. Assim, uma planta haploide é considerada em estágio esporofítico, entretanto com número de cromossomos em estágio gametofítico (PIERRE et al., 2011). A ocorrência de haploides naturais em milho ocorre em uma taxa extremamente baixa, uma em cada mil, segundo Chase (1963), não sendo suficiente para ser usada em programas de melhoramento. No entanto, dois processos podem ser utilizados para aumentar essa frequência de produção de haploides, a indução genética (*in vivo*) e a técnica de cultura de tecidos (*in vitro*), sendo a primeira mais utilizada por apresentar maior eficiência (PIERRE et al., 2011).

Um ponto chave para a aplicação da indução *in vivo* em escala comercial é a diferenciação adequada em questão de eficiência, tempo e dinheiro, de plantas haploides e diploides, tanto em estádios iniciais ou adulto das plantas, além do estabelecimento de métodos precisos de duplicação cromossômica.

Marcadores morfológicos são comumente utilizados, mas sofrem forte influência do ambiente. A citometria de fluxo por exemplo, está sendo amplamente utilizada, dada à facilidade e rapidez na preparação das amostras e na obtenção dos resultados (COUTO et al., 2013). Outra ferramenta que tem sido utilizada para a identificação de haploides são os marcadores moleculares microssatélites SSR. Esses marcadores, por serem estáveis e codominantes, possibilitam a separação dos indivíduos homocigotos dos heterocigotos. Além dessas técnicas, a anatomia por meio da observação de alterações anatômicas que vão desde o formato, número de estômatos, distribuição e aumento do tamanho celular em indivíduos com diferentes ploidias, tem sido estudada como alternativa para a diferenciação de ploidias,

A produção de linhagens duplo-haploides tem sido realizada por diversas empresas de melhoramento de milho que afirmam dominar essa tecnologia, inclusive com protocolos estabelecidos que lhes garantem percentuais satisfatórios de plantas duplicadas. No entanto, as metodologias empregadas por essas empresas não estão disponíveis à comunidade científica, havendo a necessidade de mais estudos e adaptações desses protocolos por parte das instituições públicas de pesquisas.

Estudos que comprovem a eficiência dessas técnicas de diferenciação de ploidias em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, bem como a otimização dos protocolos de

duplicação cromossômica na obtenção de plantas duplo haploides, são necessários. Dessa forma, os objetivos no presente trabalho foram: avaliar a capacidade de indução de haploidia do indutor KEMS, verificar a eficiência de dois protocolos de duplicação cromossômica quanto a obtenção de haploides duplicados, estudar o uso de caracteres morfológicos como marcadores na diferenciação de ploidias em plantas adultas, verificar a capacidade das técnicas de citometria de fluxo e marcadores moleculares SSR na confirmação de duplo-haploides e analisar a possibilidade de uso de características anatômicas como marcadores adicionais na confirmação de obtenção de duplo haploides e identificação de ploidias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O milho no Brasil e no mundo

No ranking mundial de produção de milho, Estados Unidos, China e Brasil despontam como os três maiores produtores desse cereal e juntos detêm 65% da produção desse grão, considerado hoje o principal cereal cultivado no mundo (IMEA, 2017).

Alta fonte energética e base alimentar em muitos países, o milho é cultivado em mais de 150 milhões de hectares ao redor do mundo, com uma produção global recorde em 2016/2017 de 1,04 bilhão de toneladas e consumo de 1,03 bilhão de toneladas (USDA, 2017). Esse resultado de elevada produção é fortemente influenciado pelo incremento da oferta em países da América do Sul, com destaque para Brasil e Argentina (USDA, 2017).

Com crescimento significativo de 31% em relação ao ano anterior, a produção brasileira na safra 2016/17 deve atingir 87,4 milhões de toneladas, espalhada em 16,5 milhões de hectares. Estados como Minas Gerais e Paraná despontam como os estados que apresentam as maiores áreas plantadas e conseqüentemente, expressivo aumento em produção (CONAB, 2017).

No mercado externo, o Brasil desempenha papel fundamental atendendo países com consumo crescente desse cereal como Estados Unidos e China. Em 2017, apesar da queda nas exportações em comparação com o ano anterior, o país exportou 243 mil toneladas até março de 2017, mantendo a terceira posição como o maior exportador de milho do mundo, atrás dos Estados Unidos e Argentina (USDA, 2017).

A produtividade do milho no Brasil vem atingindo excelentes ganhos nestes últimos anos, principalmente em relação à última safra 2016/17. Com expressiva participação de 45% no mercado nacional de sementes, a dinâmica de aumento de produtividade da cultura do milho está entre outros fatores, diretamente relacionada aos investimentos e utilização no

desenvolvimento de materiais de alta tecnologia, a exemplo dos materiais híbridos com genética superior.

O mercado do milho híbrido

O milho é sem dúvida o exemplo mais notável da utilização do processo de hibridação devido ao fenômeno da heterose, sendo a tentativa de produzir híbridos comerciais de milho iniciada com o botânico e geneticista norte-americano George Harrison Shull em 1909, por meio da obtenção de plantas F1 resultante do cruzamento entre linhagens autofecundadas (BUENO et al., 2006). Ele mostrou que ao autofecundar a planta eram produzidos descendentes menos vigorosos. Repetindo o processo nas seis ou oito gerações seguintes, os descendentes fixavam características agrônômicas e econômicas importantes, chamadas de linhas puras. Shull observou ainda que duas linhas puras diferentes ao serem cruzadas entre si produziam descendentes com alto vigor, chamado de vigor híbrido ou heterose, originando o milho híbrido (GUIA, 2006).

O uso comercial de sementes de milho híbrido, porém, só ocorreu anos mais tarde quando o pesquisador Jones (1918) sugeriu o cruzamento entre dois híbridos simples, surgindo o híbrido duplo. Os primeiros híbridos simples (HS) surgiram no mercado no início da década de 1960 e eram mais produtivos e uniformes que os híbridos duplos, embora com custo comercial mais elevado.

Em alguns sistemas de produção, como o americano, a adoção de sementes híbridas foi bastante rápida e o ganho em produtividade obtido com a substituição de variedades tradicionais pelos híbridos, significativo. Em 1930, quando ainda se adotava o uso de variedades de polinização aberta, a produtividade média era de 2.000 kg/ha⁻¹, passando para 6.000 kg/ha⁻¹ em vinte anos, sendo que 60% desse ganho, foi atribuído ao melhoramento genético. Hoje, quase que a totalidade da área plantada com milho nos EUA, é de milho híbrido (REN, 2017).

No Brasil, segundo país a adotar o uso dessa tecnologia, as pesquisas de melhoramento para a produção de híbridos começaram em 1932, porém o primeiro híbrido duplo foi lançado somente em 1946, e o primeiro simples em 1952 (SAWAZAKI; PATERNINANI, 2004). Com a nova realidade econômica da agricultura do milho houve a necessidade de se obter o máximo de produtividade por hectare, ainda que houvesse um alto custo na compra de insumos de qualidade. Isso resultou no abandono por parte das empresas produtoras de sementes, dos híbridos duplos, passando aos híbridos triplos, aos simples modificados e, finalmente, aos híbridos simples (SOUZA SOBRINHO, 2001).

Atualmente o milho possui expressiva importância no mercado de sementes, correspondendo a 45% desse mercado, em nível nacional. Somente, na safra 2016/2017, a área cultivada com milho foi de 16,51 milhões de hectares. Desse total, mais de 95% das sementes utilizadas para plantio foram de milho híbrido (CONAB, 2017). Segundo a Embrapa na safra 2015/16, foram disponibilizadas 477 cultivares de milho, sendo 193 cultivares convencionais e 284 cultivares transgênicas. Considerando todas as cultivares, 60,96% são híbridos simples; 21,5% são híbridos triplos, 10,23% são híbridos duplos e 7,31% são variedades. Dentre as cultivares transgênicas, 78,24% são híbridos simples, e o restante (21,76%), são híbridos triplos (ROSA et al., 2017).

Esses dados refletem os altos investimento em tecnologia, a importância dos programas de melhoramento genético relacionados ao desenvolvimento de híbridos superiores, a confiança do setor sementeiro na evolução da cultura do milho e a importância do uso de sementes de qualidade visando o aumento da produtividade. O desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de melhoramento, propiciou uma notável contribuição para o avanço da agricultura, dando suporte ao estabelecimento de uma vigorosa e competitiva indústria sementeira ao redor do mundo.

2.2 Etapas para obtenção do milho híbrido

Os melhoristas de plantas frequentemente se deparam com desafios na busca de maior produtividade para as culturas. Pesquisas que minimizem os gastos com tratamentos culturais, aplicações de fungicidas e inseticidas e que maximizem a obtenção de genótipos com maior adaptabilidade e produção de grão são fundamentais, e uma das metodologias mais empregadas é o aproveitamento do fenômeno da heterose ou vigor híbrido.

Paterniani (1974), citou inúmeras vantagens do uso do milho híbrido, entre elas a associação de características de distintos genitores, a obtenção de genótipos superiores em um prazo relativamente curto, a exploração de interações gênicas e da heterose na geração híbrida, a produção de genitores uniformes e a produção de milho híbrido comercial com reflexos favoráveis sobre a economia da região onde esse milho será produzido. No entanto segundo o mesmo autor, nos programas de melhoramento de milho há pelo menos quatro etapas para o desenvolvimento de cultivares: escolha de populações, obtenção de linhagens, avaliação da capacidade de combinação das mesmas e testes extensivos das combinações híbridas obtidas, o que requer determinado tempo.

No processo tradicional para a obtenção do milho híbrido, o melhorista inicia os trabalhos com a escolha do germoplasma que melhor atenda a seus propósitos, sendo o sucesso de um programa de melhoramento de milho que visa à obtenção de híbridos, diretamente ligado à identificação da população mais promissora para a extração de linhagens (LIMA et al. 2000). Um erro nesta etapa, e todo o processo estará comprometido, uma vez que são inúmeras e variadas, as opções de populações a serem utilizadas.

Segundo Paterniani e Campos (1999), a produção de híbridos com alto desempenho necessita do cruzamento entre linhagens elite, sendo que o processo para obtenção dessas linhagens envolve sucessivas autofecundações. Os descendentes S1 são semeados em linha e os melhores, considerando diversas características fenotípicas desejáveis, são selecionados e novamente autofecundados formando progênies. Em geral, após seis a oito autofecundações, que levam de três a quatro anos, em locais onde é possível realizar duas safras por ano, obtém-se uma nova linhagem que chega à aproximadamente 99,2% de homozigose (BUENO; MENDES; CARVALHO, 2001).

A partir de certa porcentagem de endogamia, essas linhagens entram em um processo de avaliação em cruzamentos, que visa a identificação dos híbridos com melhores características agronômicas. O cruzamento de duas linhagens endogâmicas restaura o vigor em uma combinação híbrida específica, sendo o teste de top cross, sugerido em 1927 para avaliação da capacidade de combinação das linhagens, o mais consolidado e utilizado nos dias de hoje.

A obtenção de novas linhagens é um processo relativamente simples. Milhares de linhagens podem ser criadas por ano em um programa de melhoramento, mas em apenas algumas consegue-se aliar as características “*per se*” à capacidade específica ou geral de combinação para gerar bons híbridos. Uma vez gerados, a etapa final é a produção de sementes e posterior comercialização.

2.3 Duplo haploides: metodologia alternativa para a obtenção de milho híbrido

Dentre as etapas citadas no item anterior para o desenvolvimento do milho híbrido, a obtenção de linhagens é a mais demorada e normalmente a de custos mais elevados, uma vez que para se atingir a homozigose, há a necessidade de tempo, espaço e mão de obra (PATERNIANI; CAMPOS, 1999).

Vários métodos são descritos como alternativos para a obtenção de linhagens, dentre eles citam-se o método de seleção massal que é feito por meio da seleção fenotípica dos

melhores indivíduos com base na geração F2, tendo continuidade nas gerações seguintes. No método bulk que se inicia na geração F2, as plantas são colhidas juntas e uma amostra das sementes é retirada para compor a população que dará origem à próxima geração. O método do descendente de uma semente (SSD) possibilita o avanço de gerações em condições de casa de vegetação por necessitar de menor espaço. Além do método genealógico, considerado hoje, o método mais popular entre os melhoristas de milho, uma vez que plantas na geração F2 ou S0 são selecionadas visualmente, colhidas separadamente e semeadas em linhas F2:3, onde as melhores progênies são selecionadas. O processo se repete até a geração F4:5 ou F5:6 (BARBOSA, 2009).

No entanto, em função do tempo demandado e do elevado custo para a obtenção das linhagens, considerando os métodos descritos acima, os melhoristas de plantas têm há tempos procurado alternativas que agilizem e reduzam o custo para o processo de obtenção de linhagens. Uma dessas alternativas, consiste da produção de linhagens homozigotas pelo uso de haploides duplicados, também conhecida como tecnologia de duplo-haploides ou di-haploides (PIERRE et al., 2011), a qual foi proposta pela primeira vez por Chase em 1952 para a cultura do milho, sendo hoje difundida para outras espécies como, aveia, trigo, soja e canola (BARBOSA, 2009).

Para obter indivíduos duplo-haploides, inicialmente é necessário induzir o indivíduo à condição haploide e assim, após a duplicação de seus cromossomos por meio de agentes antimitóticos, restaurar a condição diploide do indivíduo. Plantas haploides são portadoras de uma única cópia de cada cromossomo, e apresentam no tecido somático, o número n de cromossomos típicos dos gametas do organismo (PIERRE et al., 2011). Assim, uma planta haploide é considerada em estágio esporofítico com número de cromossomos de estágio gametofítico, sendo, portanto, menores e menos vigorosas do que as plantas diplóides, mais sensíveis à doenças e fontes de estresse e, sobretudo apresentam alto grau de esterilidade. A duplicação de seu número cromossômico de maneira espontânea, ou induzida pela aplicação de agentes mitóticos, a exemplo da colchicina, recupera a condição diploide e restaura a fertilidade (REN, 2017).

A ocorrência de haploides naturais na cultura no milho foi descrita pela primeira vez por Chase (1952) como extremamente baixa, sendo sua ocorrência de uma a cada mil plantas, e limitante para os programas de melhoramento genético. Entretanto, existem processos utilizados que aumentam essa frequência de produção de haploides, sendo eles a indução *in vivo* e a indução *in vitro*.

A indução *in vitro* abrange as técnicas de cultura de anteras, cultura de micrósporos, cultura de ovários e resgate de embriões. Já a indução *in vivo* utiliza os processos de cruzamentos divergentes ou uso de linhagens indutoras de haploidia. A cultura de anteras e os cruzamentos interespecíficos são metodologias consideradas eficientes em cevada, trigo, brássicas e outras espécies, mas ainda não apresentam uso potencial na cultura do milho (BÓREM, 1997).

Nos processos de indução *in vivo*, o método de cruzamentos divergentes tem sido utilizado com sucesso em culturas como milho, trigo, cevada, batata e outras. Entretanto, a indução genética (*in vivo*), por meio do uso de linhagens indutoras de haploidia e posterior duplicação cromossômica, tem sido o método mais utilizado pelas empresas multinacionais, devido à sua maior eficiência.

2.4 Método *in vivo* - Uso de linhagens indutoras da haploidia

O primeiro registro de plantas haploides de milho foi feito por Randolph em 1932. Em 1947, Chase relatou a ocorrência natural de plantas haploides de milho em populações típicas dos Estados Unidos. A partir de então, os pesquisadores entenderam rapidamente o potencial que essas plantas haploides poderiam ter na melhoria genética do milho. Por meio da aplicação da colchicina, o genoma das plantas haploides poderia ser duplicado, produzindo assim plantas diploides homozigóticas em um curto período de tempo (BLAKESLEE; AVERY, 1937, GAYEN et al., 1994). As linhas resultantes deste processo foram chamadas de haploides duplicados (DHs).

Dois métodos são comumente usados para produzir plantas haploides duplicadas: técnica de cultura de tecidos (*in vitro*) e indução genética (*in vivo*). A cultura de anteras no milho é um método caro, com baixa taxa de regeneração de plântulas e é muito dependente do genótipo utilizado (BECKERT, 1994, SHATSKAYA et al., 1994). Já a indução de haploides *in vivo* é realizada com linhagens indutoras e, em seguida, a colchicina é aplicada para induzir a duplicação cromossômica. Essas, chamadas linhagens indutoras, produzem sementes haploides quando cruzadas com outro material (doador). O processo de produção de haploides duplicados pelo uso de linhagens indutoras é simples, eficiente e barato. (COUTO et al., 2013)

Para a indução de haploides *in vivo* em milho, dois sistemas podem ser utilizados induzindo a obtenção de haploides de origem materna (gimnogenéticos) ou paterna (androgenéticos), dependendo do tipo de linhagem empregada. No caso do sistema

giminogenético, a linhagem indutora é utilizada como genitor masculino e fonte de pólen (doadora), assim o genoma dos grãos haploides originários, será de origem materna e serão chamados de haploides maternos (CHOE, 1959). Se a linhagem indutora utilizada for usada como fêmea, então os haploides gerados serão de origem paterna. Neste caso, o citoplasma será derivado da linhagem indutora (KERMICLE, 1969).

Esforços tem sido feitos no desenvolvimento de linhagens indutoras para aumentar a eficiência do método de duplo haploide por meio da melhoria das taxas de indução. Inicialmente, taxas de indução de até 3,2% foram relatadas por Coe (1959) em cruzamentos com uma linhagem chamada Stock 6 que gera haploides de origem materna ou giminogenéticos e é utilizada como genitor masculino nos campos de indução. Uma outra linhagem, conhecida como Wisconsin 23 (W23), gera haploides androgenéticos, utilizada nos campos de indução como progenitor feminino. A taxa de indução é relativamente menor, variando de 1 a 3% (KERMICLE, 1969). Lashermes e Beckert (1998) avançaram ainda mais desenvolvendo uma linhagem indutora, chamada WS14, com taxas de indução variando de 3 a 5 %. Esta linhagem foi proveniente do cruzamento da W23ig com Stock 6. Sarkar et al. (1994) e Shatskaya et al. (1994) obtiveram taxas de indução ainda maiores ao combinarem Stock 6 com germoplasma indiano e russo, respectivamente.

Uma das linhagens indutoras mais eficazes usadas hoje em dia é chamada RWS, desenvolvida pela Universidade de Hohenheim e que apresenta taxa média de indução de 8% (RÖBER et al., 2005). Outras linhagens indutoras comercialmente disponíveis com altas taxas de indução são as PHI-1,2,3,4, que foram desenvolvidas pela empresa privada romena Procera. Suas taxas de indução variam de 10% a 16%, apresentam boa expressão dos genes marcadores e melhores características agrônômicas. Os autores trabalharam o cruzamento da linhagem MHI como fonte de características de plantas favoráveis e boa taxa de indução, com a linhagem Stock 6, fonte dos genes marcadores B1 e P11, os quais permitem que os haploides sejam identificados pela falta de antocianina em plântulas (ROTARENCO et al., 2010).

Uma linhagem indutora é assim caracterizada como uma planta capaz de quebrar/bloquear a dupla fertilização e eventualmente, produzir sementes haploides (DANG et al., 2012). Na fertilização normal de um óvulo, um dos núcleos reprodutivos do grão de pólen fertiliza a oosfera, formando a célula ovo ou zigoto, esta por diferenciação, origina o embrião. O outro núcleo reprodutivo se funde com os núcleos polares, formando uma célula triploide, que após se dividir mitoticamente, origina o endosperma, tecido de reserva das sementes.

Os mecanismos e razões que explicam a indução e ocorrência do embrião haploide em milho não são completamente compreendidos. Com base nos resultados de Röber et al. (2005), anormalidades na microesporogênese e na fertilização podem ser a razão para tal fato ocorrer.

Para o caso de indutores gimnogenéticos, em que o indutor é o doador de pólen, a exemplo da Stock 6, há indícios de que para a formação de plantas haploides, dois núcleos espermáticos são desenvolvidos com diferentes velocidades (BYLICH; CHALYK, 1996). Como resultado, somente um dos núcleos espermáticos atinge o estágio pronto para a fertilização. A existência de somente um núcleo espermático normal em um grão de pólen pode ser a razão para a quebra da fertilização dupla e o desenvolvimento de sementes com embriões haploides. Até o momento não existem estudos que confirmem essa hipótese. Também, pode ser que os indutores com anomalias reprodutivas, como a ocorrência de microsporócitos aneuploides (CHALYK et al., 2000) ou um aumento na taxa de heterofertilização (ROTARENCO; EDER, 2003) sejam capazes de induzir a embriogênese haploide pela não penetração de um dos núcleos reprodutivos na oosfera.

Já o controle genético do sistema androgenético tem recebido muita atenção. Os haploides androgenéticos, de origem paterna, segundo Kermicle (1973), podem ser gerados por influência de uma mutação espontânea em razão da presença do alelo recessivo, gametófito indeterminado (ig). O alelo recessivo desse gene induz a produção de haploides a partir do gameta masculino e causa algumas alterações no desenvolvimento do saco embrionário (LASHERMES; BECKERT, 1988). Quando ocorre uma megasporogênese normal, ocorrem três mitoses sucessivas resultando em um saco embrionário com oito núcleos. Sob a ação do gene ig, algumas megasporogêneses sofrem quatro ou mais mitoses, resultando em um saco embrionário com uma quantidade anormal de núcleos, com 16 núcleos ou mais. Por essas divisões mitóticas adicionais, o indivíduo mutante que apresenta o alelo ig1 exibe uma heterofertilização, poliembrionia e variação no nível de ploidia do endosperma depois da fertilização. Segundo Lin (1981), provavelmente, os sacos embrionários com oosfera degenerada favorecem o desenvolvimento de um núcleo reprodutivo de grão de pólen, sem que tenha ocorrido a fertilização, dando origem a um embrião haploide.

Apesar do processo de indução não ser ainda bem compreendido, várias iniciativas foram realizadas com o intuito de aumentar a frequência de indução de haploides com indutores melhorados. Esse desenvolvimento aumentaria a eficiência da técnica duplo haploide, pois reduziria o tempo necessário para selecionar um número adequado de grãos haploides e diminuiria o número de cruzamentos necessários para obtê-los. Uma possível

desvantagem de se obter linhagens indutoras com taxas de indução elevadas é que pode se tornar difícil manter uma linha de indutor, uma vez que quando auto-polinizada, parte de seus grãos seriam haploides e visualmente indistinguíveis dos grãos diploides.

Desde 2007, no programa de milho do CIMMYT tem-se trabalhado com a otimização da tecnologia DH, especialmente, para ambientes tropicais e subtropicais, em parceria com a Universidade de Hohenheim, na Alemanha (PRASANNA, 2012). Linhagens tropicais com taxas que variam de 8 a 10% de indução de haploidia já foram desenvolvidas com essa parceria (PRIGGE et al., 2011). Além disso, desenvolveram uma linhagem indutora tropical de raiz vermelha que possibilita que plântulas haploides sejam selecionadas com precisão antes da duplicação, devido à ausência da coloração vermelha (CHAIKAM et al., 2017). Dessa maneira, é possível a obtenção de linhagens tropicais adaptadas às condições brasileiras com taxas relevantes de indução e que permitam a utilização e difusão em ampla escala dessa tecnologia.

2.5 Identificação e morfologia de haploides após a indução de haploidia

Sementes haploides, geradas por meio do uso de linhagens indutoras, são separadas de sementes diploides através do uso de uma combinação de marcadores dominantes presentes no endosperma, embrião e caule (NANDA; CHASE, 1966; CHASE, 1963; RÖBER, 1999; EDER; CHALYK, 2002). O marcador fenotípico e alelo dominante R1-nj do gene de "cor vermelha" R1, conduz à produção de antocianinas na camada de aleurona (tecido de endosperma) localizado na região superior da semente referida como coroa. Também provoca produção de antocianina no escutelo (tecido embrionário). Quando linhagens indutoras homocigotas para este gene são cruzadas com doadores não pigmentados, esses marcadores permitem a diferenciação de sementes haploides e diploides. Haploides possuem embrião branco e endosperma roxo, enquanto as diploides possuem embrião e endosperma roxos. O tamanho e a intensidade da pigmentação dependem do genótipo do doador.

O endosperma é formado por um tecido triploide, sendo um conjunto haploide do parental masculino e dois do parental feminino. Já o embrião é formado por um tecido diploide. Como o marcador morfológico R-Navajo é dominante em um cruzamento, esse será expresso no endosperma. No caso de um embrião haploide, o marcador não será expresso, pois o embrião não contém o genoma da linhagem indutora que carrega o alelo marcador. O alelo marcador R1-nj tem penetrância incompleta e expressividade variável, não fornecendo uma indicação precisa das sementes haploides (BELICUAS et al., 2007). Além disso, é

recomendável analisar e separar sementes haploides após a colheita, uma vez que a etapa de secagem gera uma coloração mais escura no embrião, contribuindo para uma seleção errada de haploides (PRIGGE et al., 2011).

Além do marcador R-navajo, mais comumente usado, 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 pela citometria de fluxo (DOLEZEL, 1997; BARRET; BRINKAMANN; BECKERT, 2008; DANG et al., 2012; CHOE, 2012). Métodos indiretos envolvem a caracterização citoanatômica e morfológica, como por exemplo a diferenciação das plantas haploides e diploides com base na coloração das raízes e do coleóptilo (os genes B1 e P11 em conjunto e adicionais ao gene R1-nj, são responsáveis pela pigmentação independente da luz, das raízes e do coleóptilo em plântulas F1), (ROTARENCO; DICU; SARMANIUC, 2009), vigor de planta (BATISTELLI et al., 2013; RIBEIRO, 2016), pesagem (SMELSER, 2015), tolerância à herbicidas (TSENG, 2012), triagem baseada em infravermelho próximo reflectância espectroscopia – NIRS (TSENG, 2012; JONES, 2012), marcador glossy 1 (BORDES et al., 2006), marcador vermelho de raiz (CHAIKAM et al., 2017), análise anatômica de estômatos (CHOE et al., 2012), e, ainda, número de cloroplastos nas células guarda (HO, 1990), consistem em alguns deles.

Outro método para a diferenciação de grãos haploides sendo desenvolvido, baseia-se no fato de que os embriões haploides têm menor concentração de óleo do que embriões diploides F1, devido ao menor tamanho de seus embriões. Essa característica permite a diferenciação automatizada de grãos, o que tornaria o processo muito mais barato e mais rápido. A Universidade de Hohenheim por exemplo, lançou duas linhagens indutoras, UH600 e UH601, que contêm altas taxas de óleo (~10%) e boas taxas de indução (~8%) (MELCHINGER et al., 2013).

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 e (iv) deve ter a possibilidade de êxito com a automação.

2.6 Morfologia de haploides

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. Couto et al. (2013) observaram que os haploides geralmente são de tamanho reduzido devido ao volume de suas células. Vanous (2011) relata que as plântulas haploides gimnogenéticas obtidas, a partir do processo de indução in vivo, possuem características físicas muito diferentes das plantas diploides. No geral, estes e diversos outros autores definem as plantas haploides como menores e menos vigorosas em comparação com as diploides (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005; FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012; RIBEIRO, 2016).

No entanto, de acordo com Dwivedi (2015) a seleção de haploides por meio do vigor não pode ser considerada um método confiável, especialmente se as diferenças de ploidia são pequenas e muitas vezes estão sujeitas aos efeitos ambientais. Couto et al. (2013) também evidenciaram 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 em função da grande variação. Além disso, os autores observaram que os valores médios dos pesos e traços morfométricos das sementes híbridas diploides e haploides confirmados por citometria de fluxo mostraram valores aproximados, indicando mais uma vez que os traços morfométricos não constituem dados confiáveis na seleção de sementes haploides. Ressaltaram, ainda, que as sementes haploides são praticamente do mesmo tamanho que as sementes diploides, dificultando a diferenciação entre elas 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 que várias plantas consideradas diploides por citometria de fluxo também foram de tamanho pequeno. Os autores relataram, ainda, que os parâmetros relacionados à cor da semente e a altura de planta não se revelaram como fenótipos confiáveis para discriminar os haploides de milho. Ambos os traços foram fortemente, influenciados por condições ambientais e genótipos,

reforçando a importância de se ter um método preciso e de alto rendimento para identificação de haploides.

No entanto, em trabalho recentemente publicado, Chaikam et al. (2017) sugerem um novo sistema de diferenciação de haploides e diploides baseado em características de comprimento do coleótilo, comprimento da raiz e número de raízes seminais em plântulas, contemplando ainda a necessidade de outras avaliações baseadas nas características iniciais das plântulas capazes de diferenciar estes materiais.

2.7 Etapa da duplicação cromossômica artificial em haploides de milho

A duplicação cromossômica costumava ser uma restrição à produção de linhagens duplo-haploides em escala comercial, em razão da baixa eficiência dos protocolos de duplicação e da duplicação espontânea ocorrer em baixa frequência, geralmente a uma taxa de 0 a 10%, dependendo do genótipo utilizado (BELICUAS, 2012).

Plantas haploides contêm somente uma cópia de cada cromossomo em suas células. Em seus tecidos reprodutivos, divisões celulares meióticas não são regulares, uma vez que os pares de cromossomos homólogos não podem ser formados, não permitindo a produção normal de células gaméticas masculinas e femininas. Dessa maneira, plantas haploides são estéreis. Assim, o objetivo da duplicação cromossômica é que as plantas haploides possuam fertilidade, de maneira que elas possam ser autofecundadas e gerar as linhagens duplo-haploides (DH).

Para isso, alguns métodos de duplicação cromossômica foram desenvolvidos e consistem basicamente em colocar a plântula ou semente em contato com os inibidores mitóticos ou até mesmo injetar uma quantidade ideal de inibidores como a colchicina, agentes antimicrotúbulos ou herbicidas antimicrotúbulos, pronamida, óxido nitroso, carbanatos, benzamidas, ácidos benzóicos, entre outros, nas plantas de interesse (DEIMLING et al., 1997).

O bloqueador antimitótico colchicina ($C_{22}H_{25}N$) é um alcalóide extraído de sementes e bulbos de uma liliácea e é um dos agentes mais utilizados em protocolos de duplicação cromossômica. Atua no final da prófase mitótica, se ligando à tubulina e impedindo a polimerização dos microtubos que compõem as fibras do fuso, levando a não separação das cromátides-irmãs e a consequente não migração dos cromossomos para os pólos da célula. Células que anteriormente eram x (haploides) passam a ser $2x$ (diploides) (BELICUAS et al., 2007). Segundo Castillo et al. (2009) três fatores principais influenciam na duplicação

cromossômica por meio de colchicina: tempo, concentração e genótipo (BELICUAS et al., 2007).

Trabalhos relacionados à duplicação cromossômica em milho, são escassos na literatura e os protocolos relatados ao serem reproduzidos, não possibilitam alcançar os resultados esperados (PIERRE et al., 2011). Zabirowa et al. (1996), por exemplo, injetaram na planta, a solução de colchicina a cerca de 3 a 5 mm do ápice da planta. Após a injeção, as plântulas eram mantidas no escuro a 18°C por dois dias, para serem em seguida, transplantadas para o campo. No entanto, o maior avanço no protocolo de duplicação foi realizado por Deimling; Rober; Geiger (1997). Esses autores cortaram as raízes das plântulas haploides, deixando-as submersas em solução contendo colchicina (0,06%) e dimetilsulfóxido (DMSO) (0,5%) por 12h a 18°C no escuro,

Chalyk (2000), comparou a eficiência dos métodos citados e avaliaram também a porcentagem de linhagens DH com pendão fértil, para verificar se a fertilidade das plantas é alterada após a exposição das mesmas ao agente químico de duplicação. Esse autor concluiu que o método proposto por Deimling, Rober e Geiger (1997) permitiu maior obtenção de haploides férteis duplicados, com taxa de duplicação de 32 a 38%. Esses resultados foram confirmados anos mais tarde por Batistelli et al. (2013) cuja taxas de duplicação variaram de 59% a 80%

Couto et al. (2015) testaram dois protocolos de duplicação. O primeiro deles foi sugerido por Prasanna, Chaikam e Mahuku (2012), por meio do qual foi realizada a imersão das plantas por 12 horas em solução contendo 0,04% de colchicina e 0,5% de DMSO, a 20°C e no escuro. No segundo protocolo, somente as raízes foram submersas em solução contendo 0,1% de colchicina, 0,1% de DMSO e 0,1% de Tween 20, por um período de 6 horas, na presença de luz, em temperatura média de 22°C. Os autores observaram maior taxa de plantas duplicadas quando da utilização do segundo protocolo, 69,33%, quando comparado ao protocolo 1, de 51,32%.

Empresas produtoras de sementes têm utilizado essa tecnologia e parecem conseguir percentuais satisfatórios de plantas duplicadas. No entanto, as metodologias empregadas por essas empresas não estão disponíveis à comunidade científica, havendo a necessidade de mais estudos e adaptações desses protocolos os quais possam ser utilizados por outras instituições.

2.8 Metodologias para identificação de plantas duplicadas

Com o objetivo de aumentar a eficiência e a acurácia na identificação da ploidia em plantas, metodologias alternativas vêm sendo desenvolvidas e testadas em diferentes espécies de plantas e são usadas como ferramentas complementares à análise morfológica, a exemplo da citometria de fluxo, uso de marcadores moleculares de DNA e mais recentemente a anatomia foliar.

Inicialmente usada para a contagem e análise de células sanguíneas humanas, a citometria de fluxo apresentou o primeiro sucesso em vegetais quando Heller (1973), trabalhou com plantas de feijão e observou várias aplicações dessa técnica, entre elas a análise do conteúdo de DNA e o estudo de níveis de ploidia das células. Anos mais tarde, HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER (2001), verificaram outras características, como a caracterização de híbridos somáticos e a verificação do conteúdo de DNA de cada cromossomo do complemento de uma espécie, além da possibilidade de realização de comparações inter e intraespecíficas do tamanho nuclear (RABEL, 2008; LI et al., 2009; BATTISTELI et al., 2013; COUTO et al., 2013, 2015).

A citometria de fluxo permite a quantificação de dezenas de amostras por dia, além de ser uma técnica bastante precisa e um método não destrutivo, capaz de detectar mixoploidias (FRITSCHÉ-NETO; GARBUGLIO; BORÉM, 2012). Envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem em suspensões líquidas. Essas partículas em suspensão movem-se no tampão de extração, no interior de um capilar, e são introduzidas no aparelho citômetro, no interior de uma câmara de fluxo preenchida por um fluido e que apresenta uma velocidade muito superior à da suspensão. Os sinais de cada partícula vão se acumulando em tempo real na forma de histogramas mono ou bi paramétricos que são visualizados em computador. Dessa forma, pode-se verificar simultaneamente as distribuições dos valores de frequência e/ou densidade de cada parâmetro utilizado (DOLEZEL, 1997).

Para a interpretação dos histogramas, deve-se compreender que para a formação/desenvolvimento de uma planta, dois processos estão envolvidos: crescimento e diferenciação. A partir do embrião ou zigoto, ambos os processos agem conjuntamente produzindo um indivíduo adulto, sendo a diferenciação um termo qualitativo e o crescimento um termo quantitativo, uma vez que o crescimento está relacionado a mudanças de tamanho e, ou massa, e a diferenciação a um processo de especialização celular.

Nos eucariontes, o crescimento e a divisão celular são processos cíclicos. As células antes de entrarem no processo mitótico, passam por um ciclo interfásico que é uma sequência de eventos que ocorre entre o final de uma divisão e início de outra, ou seja, um preparo para a próxima divisão. Basicamente, o tempo entre cada mitose encontra-se dividido em três fases: G1, S e G2, com duração variável entre espécies. A quantidade de DNA medida em picogramas de uma célula haploide é C . Assim, nos estádios G1 e G2, a célula apresenta $2C$ e $4C$ de DNA respectivamente. Durante o período de crescimento celular, conhecido como G1, a célula está aumentando de tamanho e uma célula diploide apresenta duas cópias de cada cromossomo $2C$. Na fase S ocorre a replicação do DNA, apresentando assim, um conteúdo $4C$ celular. Na fase G2 há um novo crescimento celular em que o conteúdo de DNA é mantido $4C$ (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2013). Em seguida, ocorre a mitose, denominada fase M, onde cada núcleo possuirá novamente conteúdo $2C$ de DNA (RAMALHO; FERREIRA; OLIVEIRA, 2012).

Quando as células estão em desenvolvimento, o número de núcleos na fase G1 é maior do que na G2 (HOWARD; PELC, 1986). Assim, quando os citômetros quantificam o nível de ploidia das células, os histogramas apresentam picos de maior intensidade no canal referente à fase G1 do ciclo celular, enquanto, a fase G2 apresenta picos de menor intensidade. A quantificação do nível de ploidia por esse método é realizada pela leitura da intensidade da fluorescência emitida por cada núcleo, corados com fluorocromos específicos para DNA, e transformada em um ponto no histograma. As ploidias são estimadas comparando-se os picos G1 de uma amostra, com o pico de uma amostra de planta padrão com nível de ploidia conhecido, a exemplo da comumente utilizada para essa técnica: *Vicia faba* ($2C$: 26,9 pg) (DOLEZEL; BARTOS, 2005). Esse procedimento permite mensurar o tamanho do genoma nuclear em picogramas (pg) de DNA e/ou em pares de bases (Mbp); sendo que 1 pg de DNA corresponde a 978 Mpb (DOLEZEL et al., 2003).

O emprego da citometria de fluxo para a determinação de ploidia em muitos acessos de espécies cultivadas foi bem-sucedido, mas é na cultura do milho, na tecnologia duplo-haploide, que ela é mais empregada (BELICUAS et al., 2004; DANG et al., 2012, GEIGER; SCHONLEBEN, 2011).

Battistelli (2013) após duplicar artificialmente plântulas de milho, identificou por citometria de fluxo, plantas com vários níveis de ploidia, tais como haploides, haploides/diploides, diploides e diploides/tetraploides. Os mesmos autores utilizaram a citometria de fluxo e marcadores moleculares microssatélites para confirmar a ploidia de indivíduos DH. Observaram que todas as plantas confirmadas como haploides pela citometria

de fluxo foram, também, assim identificadas por meio dos SSR. Couto et al. (2013) realizaram cruzamentos entre a linhagem indutora de haploidia W23 e o híbrido P30F90 e após selecionar os prováveis haploides, detectaram por meio de citometria de fluxo, quatro haploides androgenéticos em milho.

Assim, a técnica de citometria de fluxo tem sido utilizada para a identificação de indivíduos haploides de milho devido sua rapidez e acurácia. Em experimentos com duplo-haploides, a citometria de fluxo permite que plântulas vigorosas e detectadas como diploides nos histogramas sejam descartadas antes da etapa de campo, diminuindo tempo e espaço. Esse descarte facilita as próximas etapas, maximizando os cuidados no campo com as plântulas haploides que foram duplicadas. Além disso, a citometria de fluxo permite a análise da eficiência do protocolo de duplicação cromossômica, uma vez que é possível confirmar se a resposta das plântulas à duplicação foi positiva (BATTISTELLI, 2013; COUTO et al., 2013; DANG et al., 2012).

Em alguns estudos genéticos utilizou-se marcadores morfológicos determinados por mutações simples em um gene particular gerando alterações fenotípicas de fácil identificação no organismo. Apesar das contribuições para o estabelecimento dos princípios do mapeamento genético e das análises de ligações gênicas, o número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica, os efeitos deletérios das mutações e a baixa confiabilidade dos resultados, limitam sua utilização (GUIMARÃES; MOREIRA, 1999).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do DNA, que culminou no surgimento dos vários tipos de marcadores moleculares disponíveis atualmente. A principal vantagem é a possibilidade de analisar intrinsecamente o genótipo de um indivíduo sem a necessidade da ocorrência da expressão fenotípica e, conseqüentemente, excluindo-se a influência do ambiente, além de permitirem uma ampla amostragem do genoma de um indivíduo (TOPPA; JADOSKI, 2013).

Dos marcadores moleculares que se baseiam na análise do DNA genômico, estão o RFLP ou polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, o RAPD ou polimorfismo de DNA amplificados ao acaso, o AFLP ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, e os Microsatélites (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Dentre esses, os microsatélites ou SSR têm sido preferidos a outros tipos de marcadores, em função da agilidade da técnica de PCR, além de apresentarem frequência relativamente alta no genoma, inclusive intragênicos (AKKAYA; BHAGWAT; CREGAN, 1992).

Esses SSR correspondem a um grupo de marcadores de amplificação, o qual utiliza a técnica denominada de polymerase chain reaction (PCR). Essa técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de múltiplas cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A síntese de DNA é iniciada por meio desta enzima a partir de um pequeno segmento chamado primer e permite a posterior visualização em gel de agarose ou poliacrilamida sob eletroforese (BORÉM; CAIXETA, 2009). Além disso, as sequências de DNA que flanqueiam esses marcadores são geralmente, conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de primers específicos que amplificam fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Assim, cada SSR constitui um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo (SILVA, 2009).

Os microssatélites apresentam-se como uma das classes de marcadores promissoras para a utilização nos programas de melhoramento, uma vez que são marcadores co-dominantes e multialélicos, sendo capazes de distinguir indivíduos homocigotos de heterocigotos e fornecer um elevado nível de informações genéticas por loco. Mesmo em genótipos de milho que possuem base genética estreita, por meio dos marcadores SSR é possível detectar alto número de alelos por loco (RABEL, 2008). Além disso, são altamente reproduzíveis e estáveis dentro de uma determinada espécie, permitindo o intercâmbio de informações entre diferentes grupos de pesquisa, o que facilita sua utilização na seleção assistida e na integração de mapas genéticos.

Em vários trabalhos tem sido descrita a aplicação desses marcadores na caracterização, confirmação e análise de introgressão gênica em haploides de milho. Belicuas et al. (2007), Rabel (2008) e Couto et al. (2013) realizaram a identificação de haploides em milho com o uso desses marcadores. Já Battisteli (2013) verificou que duplo-haploides detectados em citometria de fluxo poderiam ser identificados por meio dos marcadores SSR e Couto et al., (2013) utilizaram SSR para confirmação da obtenção de linhagens duplo-haploides.

Além dessas técnicas, a anatomia, por meio da observação de alterações anatômicas que vão desde formato, número de estômatos, distribuição e aumento do tamanho celular em indivíduos com diferentes ploidias, tem sido estudada como alternativa para a identificação de possíveis haploides. Já foi relatado que o número de estômatos pode estar associado aos diferentes níveis de ploidia em plantas de café (Mishra, et al., 1997). Para essa espécie, quanto maior o número de estômatos maior a ploidia. No entanto, estudos de identificação e caracterização de diferentes ploidias, utilizando como ferramenta a análise anatômica em tecidos foliares de milho, ainda são escassos.

Vantagens da tecnologia duplo-haploide em comparação com o método tradicional

O sucesso de um programa de melhoramento que visa a produção de híbridos comerciais de milho está na obtenção de linhagens elite. Dentre todas as etapas, essa é considerada a mais demorada, e a tecnologia dos duplo-haploides surge como forma de reduzir tempo na obtenção dessas linhagens (BORDES et al., 2006). Além disso, a diminuição dos custos com mão de obra, utilização de menor área experimental e antecipação dos lucros em programas comerciais de melhoramento do milho, têm tornado essa técnica promissora.

Uma outra vantagem dessa técnica está relacionada à rápida produção de linhagens homozigóticas, permitindo assim uma melhor exploração da variabilidade genética e aumento da eficiência da seleção, pois com plantas homozigotas a variância aditiva será máxima, os efeitos de dominância e epistasia neutralizados e as vantagens na seleção de características quantitativas, superiores. No caso de linhagens, à medida que ocorre a autofecundação, o que se tem de heterozigotos irá segregar. Na sétima ou oitava geração de autofecundação, a linhagem obtida será homozigota, ou seja, não haverá mais variância de dominância porque a heterozigose será mínima (BORDES et al., 2006).

Para melhor explicar isso, no processo normal de autofecundação em espécies diploides, considerando apenas dois pares de locos independentes segregando entre os genitores com genótipo AAbb e aaBB, o genótipo recessivo aabb ocorre com uma probabilidade de ser encontrado na frequência de 1/16, em uma população F₂. Entretanto com a indução da haploidia e posterior duplicação cromossômica, o mesmo genótipo ocorrerá com frequência de ¼ na população. Isso se dá pela ausência dos heterozigotos, prevalecendo assim, apenas os genótipos AABB, AAbb, aaBB e aabb (PIERRE et al., 2011). Segundo Prasanna (2012), por isso, pode-se também acelerar o desenvolvimento de híbridos superiores pela rápida piramidação de alelos favoráveis para caracteres poligênicos como a produtividade e a resistência a estresses ambientais.

Outra grande vantagem dessa tecnologia, porém ainda pouco explorada, é que com as autofecundações sucessivas no método tradicional, há o aumento da ocorrência de recombinações entre os genes ligados, o que diminui a possibilidade de manter combinações favoráveis existentes nas linhagens genitoras, ou seja, na geração F_∞, todas as linhagens resultantes serão recombinantes, inclusive nos genes ligados. No caso dos duplo-haploides, a recombinação de genes ligados ocorre em uma única meiose, ou seja, naquela que deu origem ao gameta responsável pela formação da planta DH, assim, grande parte dos locos ligados não será recombinada e a chance de manter as combinações favoráveis existentes nas linhagens parentais é maior (PIERRE et al., 2011). Bernardo (2009), demonstrou esse fato ao estudar

entre quais gerações F1 ou F2, seria melhor para se obter os DH, e constatou que a geração F2 é mais eficiente, devido à maior recombinação. As plantas duplo-haploides derivadas da geração F2, foram 4 a 6% mais eficientes que a geração F1, segundo o mesmo autor.

Além da vantagem da eliminação dos indivíduos heterozigotos, outra vantagem está relacionada com a precisão experimental, na qual essa tecnologia permite ao melhorista realizar o test-cross com linhagens homozigotas em vez de fazê-lo utilizando-se de material que ainda apresenta segregação (PIERRE, 2011). Além disso, a eficiência e precisão da seleção para alguns caracteres agronômicos pode ser melhor (GEIGER; GORDILLO, 2009), especialmente quando combinada com o uso de marcadores moleculares (PRASANNA, 2012), estudos de associação de QTLs e introgressão de genes (FORSTER; THOMAS, 2005), estudos de genômica funcional e citogenética molecular e engenharia genética (WIJNKER et al., 2007).

No entanto, dentre todas as vantagens e àquela que torna o uso dessa tecnologia atrativa, está a redução significativa do tempo para obtenção de linhagens quando se compara o método DH com o método tradicional. De acordo com a empresa Pioneer Sementes (2010), esse processo permite reduzir em ao menos 18 meses, o tempo necessário para a obtenção de novas linhagens.

Em passado recente, a baixa eficiência nas técnicas de obtenção de duplo-haploides limitava essa ferramenta para uso em grande escala. Desde então, essa tecnologia recebeu a atenção de empresas de sementes de todo o mundo.

Contudo, grande parte do conhecimento referente a obtenção de linhagens indutoras e de suas taxas de indução, protocolos de duplicação cromossômica, e sistemas de marcadores para avaliação e detecção de sementes haploides, ainda não são de domínio público, havendo a necessidade de mais pesquisas principalmente para atender demandas de diferentes instituições que têm investido no mercado de sementes híbridas de milho.

REFERÊNCIAS

- AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v. 132, n. 4, p. 1131-1139, 1992.
- BARBOSA, M. P. M. **Avaliação do desequilíbrio de ligação e da origem genética em duplohaploides de milho**. 2009. 62 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- BATISTELLI, G. M. et al. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 4230-4242, 2013.
- 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**, v. 117, p. 581-594, 2008.
- BECKERT, M. Advantages and disadvantages of the use of in vitro /in situ produced DH maize plants. **Biotechnology in agriculture and forestry**, v. 25, p.201-213, 1994.
- BELICUAS, P. R. **Estudo da herança dos caracteres stay-green, produção e seus componentes em milho utilizando delineamento III e mapeamento QTL**. 2012. 97 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiraz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BELICUAS, P. R.; GUIMARÃES, C. T.; PAIVA, L. V.; DUARTE, J. M.; MALUF, W. R.; PAIVA, E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Springer Science Business**, v. 1, p.1-8, 2007.
- BERNARDO, R. Should maize doubled haploids be induced among F1 or F2 plants? **Theoretical and applied genetics**, v. 119, p. 255-262, 2009.
- BLAKESLEE, A. F.; AVERY, A. Methods of Inducing Doubling of Chromosomes in Plants. **Journal of Heredity**, v. 28, p. 393-411, 1937.
- BYLICH, V. G.; CHALYK, S. T. Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploidinducing capacity in ZMS line. **Maize Genetics Cooperation**, v. 70, p. 33, 1996.
- BORDES, J. et al. Doubled haploid vesus S1 family recurrent selection for testcross performance in a maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 1063-1072, 2006.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 532 p.
- BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Ed). **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: Editora da UFV, 1997. 453 p.
- BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas**. Lavras, MG: UFLA, 2001. 282 p.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. de. **Melhoramento de Plantas: Princípios e procedimentos**. Lavras, MG: UFLA, 2006. 319 p.

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

CHAIKAM, V.; LOPEZ, L. A.; MARTINEZ, L.; BURGUEÑO, J.; BODDUPALLI, P. M. Identification of in vivo induced maternal haploids in maize using seedling traits. **Euphytica**, v.213, p. 177, 2017.

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

CHALYK, S. T. Obtaining fertile pollen in maize maternal haploids. *Maize Genetics Cooperation*, v. 74, n. 1, p. 17-18, 2000.

CHASE, S. S. Androgenesis, its use for transfer of maize cytoplasm. **The Journal of Heredity**, v. 54, n. 5, p. 152-158, 1963.

CHASE, S. S. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomic Journal**, v. 5, p. 263-267, 1952.

CHASE S. S. Techniques for isolating monoploid maize plants. *Journal of Botany*, v. 34, p. 582, 1947.

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

CHOE, E. H. Improving in vivo maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives. **Plant Breeding Review**, n. 3, v. 131, p. 399-401, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 22 mar. 2017.

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

COUTO, E. G. de O. et al. Verification and characterization of chromosome duplication in haploid maize. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 6999-7007, 2015.

DANG, N. C. et al. Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, v. 183, n. 1, p. 153-160, 2012.

DEIMLING, S.; RÖBER, F.; GEIGER, H. H. Methodik und genetic der in- vivo-haploideninduktionbeimais. **Vortr Pflanzenzüchtung**, v. 38, p. 203-224, 1997.

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

- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.
- DOLEZEL, J. BARTOS, J. VOGLMAYR, H. GREILHUBER, J. Nuclear DNA and genome size of trout and human. **Cytometry**, v. 51, n. 2, p.127-128, 2003.
- DWIVEDI, S. L. Haploids: Constraints and opportunities in plan breeding. **Biotechnology advances**. 18p. 2015.
- EDER, J.; CHALYK, S. T. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 703-708, 2002.
- ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **USDA.gov - United States Department of Agriculture**. Disponível em: [.http://usda.gov](http://usda.gov). Acesso em: 25 set. 2017.
- FAO. Food and Agriculture Organization. Food Outlook. March 2017. Milk and Milk products. 104p. Disponível em: www.fao.org
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.
- FORSTER, B. P.; THOMAS, W. T. B. Doubled haploids in genetics and plant breeding. **Plant Breeding Reviews**, v. 25, n. 3, p. 57-88, 2005.
- FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos**. Viçosa: Editora da UFV, 2013.
- FRITSCHÉ-NETO, R.; GARBUGLIO, D. D.; BORÉM, A. Duplo-haploides. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Ed.). **Biotecnologia aplicado ao melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2012. p. 267-301.
- GAYEN, P.; MADAN, J. K.; KUMAR, R.; SARKAR, K. R. Chromosome doubling in haploids through colchicine. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 68, p. 65, 1994.
- GEIGER, H. H.; GORDILLO, G. A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. **Maydica**, v. 54, n. 1, p. 485-499, 2009.
- GEIGER, H. H.; SCHONLEBEN, M. Incidence of male fertility in haploid elite dent maize germplasm. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 85, n. 7, p. 35, 2011.
- GUIA DO MILHO. Tecnologia do campo à mesa. **Conselho de informação sobre biotecnologia**. 2006. Disponível em: http://www.cib.org.br/pdf/guia_do_milho_CIB.pdf> Acesso em: 10 jul. 2017.
- GUIMARÃES. C. R, MOREIRA, M. A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.), **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, '999. p. 715-740.

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.

HERPICH, M. T. **Obtenção de linhagens duplo-haploids de milho**. 2012. 58p. Dissertação (mestrado em genética e melhoramento de plantas). UEM- Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

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

HO, I. 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.

IMEA- INSTITUTO MATO-GROSSENSE DE ECONOMIA AGROPECUÁRIA. **Custo de produção do milho** – safra 2015/2016. Cuiabá: Imea, 2017.

JONES, D. F. The effects of inbreeding and crossbreeding upon development. **Bulletin of the Connecticut Agricultural Experimental Station**, v. 207, p. 5-100, 1918.

JONES, R. W. Selection of haploid maize kernels from hybrid Kernels for Plant breeding using near-infrared spectroscopy and SIMCA analysis. **Applied Spectroscopy**, v.66, p. 447–450, 2012.

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

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

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

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

LIMA, M. W. O. P.; SOUZA, E. A.; RAMALHO, M. A. P. Procedimentos para a escolha de populações de milho para a extração de linhagens. **Bragantia**, v. 59, n. 2, p. 153-158, 2000.

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

MAGOON, M. L., KHANNA, K. R. Haploids, **Caryologia**, v.16, p. 191-235, 1963.

NANDA, D. K.; CHASE, S. S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Science*, v.6, p. 213-215, 1996.

MELCHINGER, A. E.; SCHIPPRACK, W.; WÜRSCHUM, T.; CHEN, S.; TECHNOW, F. Rapid and accurate identification of in vivo induced haploid seeds based on oil content in maize. **Scientific Reports, Nature**, v. 3, p.1–5, 2013.

PATERNIANI, E. Effective maize pollen dispersed in the field. **Euphytica**, v. 23, n. 1, p. 129-134, 1974.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BOREN, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 429-478.

PIERRE, P. M. O.; CHAMMA DAVID, L. M.; COUTO, E. G. O.; SILVA, T. N. e RAMALHO, M. A. Duplo-haploides: estratégias para a obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2011.

PIONEER SEMENTES. Double haploids. Disponível em: <http://www.pioneersementes.com.br/ArtigosDetalhe.aspx?Id=90>. Acesso em: 20 de novembro de 2017.

PRASANNA, B. M.; CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice. Mexico: CIMMYT, 2012.

PRIGGE, V.; SÁNCHEZ, C.; DHILLON, B. S.; SCHIPPRACK, W.; ARAUS, J. L.; BANZIGER, M.; MELCHINGER, E. A. Doubled haploids in tropical maize: effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. **Crop Science**, v. 51, p. 1498-1506, 2011.

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

RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. 3. ed. Lavras: Ed. UFLA, 2012. 305 p.

RANDOLPH, L. F. Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 18, n. 1, p. 222–229, 1932.

REN, J.; WU, P.; TRAMPE, B.; TIAN, X.; LUBBERSTEDT, T.; CHEN, S. Novel technologies in doubled haploid line development. **Plant Biotechnology Journal**, v.15, p. 1361–1370, 2017.

RIBEIRO, C. B. **Estratégias para obtenção de duplo-haploides e progênies indutoras de haploidia em milho**. 2016, 104 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016

RÖBER, F. K.; GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. In Vivo Haploid Induction in Maize – Performance of New Inducers and Significance of Doubled Haploid Lines in Hybrid Breeding, **Maydica**, v. 50, p. 275 -283, 2005.

RÖBER F. K. **Fortpflanzungsbiologische und genetische Untersuchungen mit RFLP-Markern zur in-vivo-Haploideninduktion bei Mais**. 1999. Dissertation- University of Hohenheim. Grauer Verlag, Stuttgart. 1999.

ROSA, W. B.; JUNIOR, J. B. D.; QUEIROZ, S. B.; PEREGO, I.; MATTEI, E. Desempenho agrônômico de cinco híbridos de milho submetidos à aplicação de fungicida em diferentes estádios fenológicos. **Revista Engenharia na Agricultura**, v.25, p.428-435, 2017.

ROTARENCO, V. A.; DICU, G.; STATE, D.; FUIA, S. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 84, p. 15, 2010.

ROTARENCO, V. A.; ADICU, G.; SARMANIUC, M. Induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 83, n. 1, p. 12-13, 2009.

ROTARENCO, V. A.; EDER, J. Possible effects of heterofertilization on the induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 77, n. 2, p.134-156, 2003.

SARKAR, K. R.; PANDEY, P.; GAYEN, J. K.; MANDAN, R.; KUMAR, J. K. S.; SACHAN. Stabilization of high haploid inducer lines. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 68, p. 64-65, 1994.

SAWAZAKI, E.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z. Evolução dos cultivares de milho no Brasil. In: GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V. **Tecnologias de produção do milho**. 20.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v.1, p.13-53, 2004.

SHATSKAYA, O. A., ZABIROVA, E. R.; SHCHERBAK, V. S.; CHUMAK, M. V. Mass induction of maternal haploids in corn. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 68, p. 51, 1994.

SILVA, G. J. et al. **Produção de haplóides androgenéticos em milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2009. 48 p.

SMELSER, A. Weighing in on a method to discriminate maize haploid from hybrid seed. **Plant Breeding Review**, v. 134, p. 283-285, 2015.

SOUZA SOBRINHO, F. Divergência genética de híbridos simples e alternativas para a obtenção de híbridos duplos de milho. 2001. 96p. Tese (Doutorado em genética e melhoramento de plantas). UFLA – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n.1, p.1-5, 2013.

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.

WIJNKER, E. et al. Reverse breeding: reproduction of F1 hybrids by RNAi-induced asynaptic meiosis. **Chromosome Research**, v. 15, n. 2, p. 87- 88, 2007.

ZABIROVA, E. R.; CHUMAK, M.V.; SHATSKAIA, O. A.; SCHERBAK, V. S. Technology of the mass accelerated production of homozygous lines, **Russian. Kukuza i Sorgo**, v. 4, n. 1, p. 17-19, 1996.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

**INDUÇÃO DE HAPLOIDIA E USO DE FERRAMENTAS DESCRITIVAS NA
ANÁLISE MORFOLÓGICA DE PLANTAS DH1 DE MILHO SUBMETIDAS A DOIS
PROTOCOLOS DE DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA**

RESUMO

O sucesso da tecnologia duplo-haploide depende do aperfeiçoamento das quatro etapas que envolvem a sua obtenção; indução de haploidia, identificação de haploides, duplicação cromossômica e a autofecundação das linhagens obtidas para produção de sementes e verificação de segregação nos materiais. Assim, os objetivos no presente trabalho foram; analisar a capacidade do indutor de haploidia gimnogenético KEMS por meio da taxa de indução de haploides, validar a eficiência de dois protocolos de duplicação cromossômica quanto a taxa de sobrevivência e autofecundação de plantas DH0 em campo; verificar a uniformidade de características fenotípicas em plantas DH1 em campo por meio do uso de ferramentas descritivas e confirmar a capacidade das técnicas de citometria de fluxo e marcadores moleculares SSR na verificação de plantas duplicadas. A linhagem indutora de haploidia KEMS foi utilizada como parental masculino e cruzada com quatro híbridos (GNS3225, GNS3032, GNS3264 e DKB393). As sementes provenientes desse cruzamento, foram selecionadas de acordo com o marcador R-navajo e submetidas á dois diferentes protocolos de duplicação cromossômica. No primeiro protocolo, as sementes foram germinadas em papel de germinação por 72h a 25°C, e aquelas plântulas consideradas como sendo possíveis haploides foram submetidas ao tratamento com solução de 0,04% de colchicina e 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), por 12 horas, e mantidas no escuro a 20°C. No segundo protocolo, as sementes foram semeadas em bandejas contendo areia e vermiculita. Após 10 dias, as plântulas consideradas haploides foram imersas em solução de colchicina 0,1%, dimetilsulfóxido 0,1% (DMSO) e Tween 20 a 0,1%, e mantidas por 6 horas na presença de luz em temperatura ambiente média de 22°C. As plantas que sobreviveram aos protocolos de duplicação cromossômica foram aclimatizadas em casa de vegetação e posteriormente transplantadas para o campo. Após a autofecundação das plantas DH0, as sementes DH1 obtidas foram semeadas em campo, divididas em tratamentos de acordo com os parentais e protocolos de duplicação. No estágio vegetativo V4 das plântulas DH1, amostras de tecido foliar foram coletadas para identificação de ploidias via citometria de fluxo e análises de DNA utilizando marcadores microssatélites. Esses resultados foram confrontados com as características morfológicas das futuras plantas DH1 desenvolvidas em campo, avaliadas com o uso de ferramentas descritivas. As análises estatísticas foram realizadas usando-se a abordagem de modelos lineares generalizados mistos, sendo que após verificar as diferenças significativas por meio de análise de “deviance”, foi realizado agrupamento com base na distância de Mahalanobis. Nas análises exploratórias e inferenciais dos dados, foram usados como recursos gráficos o barplot e boxplot por meio do programa estatístico R, e a análise de variância, o teste Student-Newman-Keuls, as correlações de Pearson foram realizadas utilizando-se o software estatístico GENES. A linhagem indutora de haploidia KEMS apresenta capacidade de indução em clima tropical. O protocolo 2 foi mais eficiente na duplicação cromossômica e possibilitou maior número de plantas DH0 duplicadas sobreviventes e maior número de plantas autofecundadas, podendo ser recomendado em programas de melhoramento. Não foi observada uniformidade de características fenotípicas de plantas submetidas aos protocolos de duplicação, o uso de ferramentas descritivas na análise morfológica de plantas adultas de milho não foi eficiente. A citometria de fluxo pode ser utilizada para se obter mais informações assim como os marcadores moleculares SSR podem ser utilizados na comprovação da herança gimnogenética da linhagem KEMS e também na identificação das plantas duplo-haploides de milho. O protocolo dois foi mais eficiente na obtenção de sementes duplo haploides e deve ser recomendado em programas de obtenção de duplo haploides.

PALAVRAS-CHAVE: duplo-haploides, indução, duplicação, análise morfológica.

ABSTRACT

The success of double-haploid technology depends of the improvement of the four steps involved in obtaining it; induction of haploidi, identification of possible haploids, chromosome duplication and self-fertilization of the lines obtained for seed increment and verification of segregation in the materials. Thus, the objective in the present study were; to evaluate the induction capacity of KEMS inductive lineage in tropical climate; to evaluate two protocols of chromosome duplication regarding the survival rate and self-fertilization of DH0 plants in the field; verify uniformity of phenotypic characteristics in field DH1 plants; validate the use of descriptive tools in the morphological analysis of DH1 plants obtained and observe the efficiency of the chromosome duplication protocols in obtaining duplicate seeds. Four hybrids were crossed with the KEMS haploid inducer. The seeds from this crossing were selected according to the R-Navajo marker and submitted to two different chromosome duplication protocols. In the first protocol, the seeds were germinated on germination paper for 72h at 25oC, and those seedlings considered possible haploids were submitted to treatment with 0.04% colchicine solution and 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) for 12 hours, and kept in the dark at 20 ° C. In the second protocol, the seeds were sown in trays containing sand and vermiculite. After 10 days, the seedlings considered haploid were immersed in 0.1% colchicine solution, 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) and 0.1% Tween 20, and maintained for 6 hours in the presence of light at room temperature 22°C. The plants that survived the chromosome duplication protocols were acclimatized in greenhouse and later transplanted to the field. After self-fertilization of the DH0 plants, the DH1 seeds obtained were taken to the field, divided into treatments according to the parental and duplication protocols. At the vegetative stage V4 of the DH1 seedlings, leaf tissue samples were collected to identify ploidy via flow cytometry and DNA analyzes using microsatellite markers. These results were confronted with the morphological characteristics of the future DH1 plants developed in the field. Statistical analyzes were performed using the generalized linear modeling approach, and after verifying the significant differences by means of deviance analysis, a grouping based on Mahalanobis distance was performed. In the exploratory and inferential analyzes of the data, the barplot and boxplot were used as graphical resources through the statistical program R, and the analysis of variance, Student-Newman-Keuls test, Pearson's correlations were performed using the statistical software GENES. It was observed that the hybrids used influence the induction of haploids, however they do not influence the chromosome duplication rate of the protocols tested. Protocol 2 was more efficient in chromosome duplication and allowed a greater number of surviving duplicate DH0 plants and a greater number of self-fertilized plants. No uniformity of phenotypic characteristics of plants submitted to duplication protocols was observed, in the same way that the use of descriptive tools in the morphological analysis of adult maize plants was not efficient. Flow cytometry can be used to obtain more information as well as SSR molecular markers can be used to prove the KEMS lineage's genetic inheritance and also to identify double-haploid maize plants.

KEY-WORDS: double-haploid, induction, duplication, morphological analysis.

1 INTRODUÇÃO

A busca por maior produtividade para as culturas é hoje o grande desafio para os melhoristas de plantas. Em programas de melhoramento de milho, investimentos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver híbridos com características que atendam às demandas dos agricultores e da indústria de grãos. No entanto, a grande limitação biológica ainda consiste no tempo para obtenção de plantas, uma vez que a exploração do fenômeno da heterose ou vigor híbrido, é um processo dispendioso que envolve sucessivas gerações de autofecundações (REN, 2017).

A tecnologia duplo-haploide (DH) tem ganhado importância para o desenvolvimento de híbridos nos programas de melhoramento, uma vez que diminui o tempo para obtenção de linhagens homozigotas em até três gerações, reduz custos e acelera a introgressão de características de interesse agrônomico em genótipos de interesse (PRIGGE et al., 2012).

O desenvolvimento de linhagens homozigóticas permite melhor exploração da variabilidade genética e aumenta a eficiência de seleção. Plantas em homozigose terão a variância aditiva máxima, os efeitos de dominância neutralizados, e as vantagens na seleção de características quantitativas, superiores (MELCHINGER et al., 2013). Além disso, a diminuição dos custos com mão de obra, utilização de menor área experimental e antecipação dos lucros em programas comerciais de melhoramento do milho têm tornado essa técnica um grande sucesso.

Na cultura do milho, o método *in vivo* é o mais utilizado para obtenção de linhagens duplo-haploides sendo quatro as etapas principais: indução de haploidia, identificação de possíveis haploides, duplicação cromossômica e a autofecundação das linhagens obtidas para a produção de sementes e verificação de segregação (PRASANNA et al., 2012).

No entanto, o sucesso dessa metodologia ainda é dependente de alguns fatores como uso de indutores com elevada capacidade de indução, de um sistema preciso de identificação e diferenciação de sementes haploides e diploides, bem como de protocolos eficientes e reproduzíveis de duplicação cromossômica (CHAIKAM ET al., 2017).

Esforços tem sido feitos no desenvolvimento de linhagens indutoras para aumentar a eficiência do método de duplo haploide por meio da melhoria das taxas de indução. 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. A partir dessas duas linhagens surgiram outras com taxas de indução variáveis inclusive melhor adaptadas às condições tropicais. (CHALYK, 1999; ROTARENCO et al.,

2010; PRASANNA; CHAIKAM; MAHUKU, 2012). O CIMMYT por exemplo, apresenta indutores de origem tropical conhecidos hoje como TAIL 8 e TAIL 9 com taxas que variam de 8 a 12% (CHAIKAM et al., 2016). Outras linhagens indutoras comercialmente disponíveis com altas taxas de indução são as PHI-1,2,3,4, que foram desenvolvidas pela empresa privada romena Procera. Suas taxas de indução variam de 10% a 16%, apresentam boa expressão dos genes marcadores e melhores características agronômicas.

Sementes haploides, geradas por meio do uso de linhagens indutoras, são separadas de sementes diploides através do uso de uma combinação de marcadores dominantes presentes no endosperma, embrião e radícula (NANDA; CHASE, 1966; CHASE, 1963; RÖBER, 1999; EDER; CHALYK, 2002). Na metodologia de duplos-haploides, é comum a utilização do gene marcador R1navajo 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).

Outra etapa que tem sido uma restrição à produção de linhagens duplo-haploides em escala comercial, em razão da baixa eficiência dos protocolos de duplicação e da duplicação espontânea ocorrer em baixa frequência, e que ainda hoje apresenta entraves, é a etapa de duplicação cromossômica. Trabalhos relacionados à duplicação cromossômica em milho, são poucos na literatura e os protocolos relatados ao serem reproduzidos, não possibilitam alcançar os resultados esperados (PIERRE et al., 2011). Chalik (2000), obteve haploides férteis duplicados em uma taxa que variou de 32 a 38%. Esse resultado foi anos mais tarde confirmado por Batistelli et al. (2013) que obteve taxas de duplicação que variavam de 59% a 80%. No entanto, informações seguras a respeito de técnicas laboratoriais que confirmem e identifiquem a duplicação cromossômica são ainda escassas.

Assim, os objetivos no presente trabalho foram; analisar a capacidade do indutor de haploidia gimnogenético KEMS por meio da taxa de indução de haploides, validar a eficiência de dois protocolos de duplicação cromossômica quanto a taxa de sobrevivência e autofecundação de plantas DHO em campo; verificar a uniformidade de características fenotípicas em plantas DH1 em campo por meio do uso de ferramentas descritivas e confirmar a capacidade das técnicas de citometria de fluxo e marcadores moleculares SSR na verificação de plantas duplicadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Em Cravinhos, SP, na safreinha de 2012, foram realizados cruzamentos entre as plantas de quatro híbridos simples (DKB393, GNS 3225, GNS 3264, GNS 3032) e suas gerações F2, com o indutor de haploidia KEMS, utilizado como parental masculino uma vez que essa linhagem apresenta o sistema gimnogenético de indução de haploidia. As sementes provenientes desses cruzamentos foram transferidas para Lavras-MG e as etapas seguintes foram realizadas nas dependências da Universidade Federal de Lavras, no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia, no Laboratório Central de Sementes e no Centro de Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia da UFLA, localizado em Ijaci, MG.

As autofecundações dos indivíduos foram realizadas na área experimental do Departamento de Agricultura da UFLA. A área encontra-se a 918 m de altitude média, a 21°14 de latitude Sul e 45°00 de longitude. O clima local é do tipo Cwa (subtropical, com verão chuvoso e inverno seco) com temperatura média anual de 19,5°C, segundo a classificação de Köppen. O solo foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo, de textura argilosa e declividade de 9%.

As sementes provenientes dos cruzamentos citados anteriormente foram visualmente separadas pela coloração do endosperma e embrião. Sementes com endosperma roxo e embrião branco foram consideradas haploides por meio do marcador R-navajo, conforme metodologia descrita por Chase e Nanda (1965).

O número total de sementes haploides foi contabilizado e utilizado em análises estatísticas para cálculos de indução de haploidia da linhagem KEMS. Além disso, essas sementes haploides selecionadas foram divididas e submetidas a dois protocolos de duplicação cromossômica.

No primeiro protocolo de duplicação, nomeado de protocolo 1, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 2% e colocadas para germinar, por 72 horas, em papel de germinação umedecido com temperatura controlada de 25°C. Após a germinação, para eliminar os falsos haploides, aquelas plântulas vigorosas com até 3 cm na parte aérea e 4 cm de raiz, foram classificadas como diploides e descartadas. Após essa etapa, as plântulas identificadas como possíveis haploides foram submetidas ao tratamento com solução de 0,04% de colchicina e 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), por 12 horas, e mantidas no escuro a 20°C de acordo com metodologia descrita por Prasanna, Chaikam e Mahuku (2012).

No protocolo identificado como número 2, as sementes selecionadas também foram desinfestadas com hipoclorito 2% e logo após semeadas em bandejas contendo areia e

vermiculita (na proporção de 1:1). Após 10 dias as plântulas mais vigorosas foram selecionadas como diploides e descartadas. As plantas haploides foram então retiradas das bandejas e as raízes lavadas em água para retirada da areia e vermiculita e na sequência foram submetidas ao protocolo de duplicação. As raízes das plantas consideradas haploides foram imersas em solução de colchicina 0,1%, dimetilsulfóxido 0,1% (DMSO) e Tween 20 a 0,1%, e mantidas por 6 horas na presença de luz em temperatura média de 22°C de acordo com metodologia de Paul Newell e citado por COUTO et al. (2013)

Após o tratamento com colchicina, as plântulas provenientes de ambos os protocolos de duplicação, denominadas DH0, foram transferidas para a casa de vegetação em copos plásticos onde permaneceram por 20 dias. Decorridos os 20 dias, as plântulas foram transplantadas para ambiente protegido com cobertura de lona plástica transparente, a fim de verificar a taxa de sobrevivência das plantas submetidas à duplicação. Nesse momento, para facilitar a identificação dos materiais, a disposição dos blocos foi estabelecida de acordo com os parentais e os protocolos de duplicação cromossômica. Aquelas plantas DH0 que sobreviveram no campo, produziram pólen e possuíam estilo-estigma em sincronismo, foram autofecundadas.

As espigas DH1 após autofecundação das plantas DH0 duplicadas, foram colhidas, quando as sementes atingiram o ponto de maturidade fisiológica, debulhadas e secadas à temperatura ambiente até 12% de grau de umidade. Nesse momento, a fim de serem utilizadas em etapa posterior, as espigas DH1, respeitando a disposição dos blocos estabelecida anteriormente, tiveram suas sementes misturadas e divididas em tratamentos, conforme apresentados na Tabela 1. Essas sementes foram armazenadas em câmara fria a 10°C, até a realização dos próximos experimentos.

Tabela 1 - Tratamentos levados para o campo na safra 2014/2015, estabelecidos de acordo com os parentais e os protocolos de duplicação cromossômica.

Identificação dos materiais		
Tratamentos	Híbridos	Protocolos
1	DKB393	1
2	DKB393	2
3	GNS3225	1
4	GNS3225	2
5	GNS3264	1
6	GNS3264	2
7	GNS3032	1
8	GNS3032	2

Fonte: Do autor (2018)

Na safra 2014/2015, as sementes DH1 de cada tratamento, foram semeadas em campo e o delineamento experimental empregado foi o de blocos casualizados com oito tratamentos ao acaso com quatro repetições cada. As parcelas foram compostas por linhas de 10 metros de comprimento, com espaçamento entre linhas de 80 cm e entre plantas de 25 cm, e semeadura de uma semente por cova. A adubação na semeadura foi de 450 kg do formulado 8-28-16 e a adubação de cobertura foi realizada conforme o recomendado para a cultura do milho na região. O controle de plantas daninhas foi realizado manual e semanalmente.

Durante o florescimento, para prevenir cruzamentos indesejados, as espigas foram protegidas com sacos plásticos, antes da emissão dos estilo-estigmas. Todas as plantas que produziram pólen e que possuíam estilo-estigma em sincronismo foram autofecundadas para a manutenção e uso das sementes em experimentos futuros.

A partir desse momento, todas as plântulas DH1 formadas passaram a ser individualmente identificadas e rastreadas, a fim de confrontar os resultados obtidos na análise de citometria de fluxo e DNA por meio de marcadores microssatélites SSR, com as características morfológicas das futuras plantas DH1 em campo.

Para isso, no estágio vegetativo V4 o qual corresponde ao desenvolvimento de quatro folhas, amostras de tecido foliar foram coletadas. Para as avaliações de quantidade de DNA, a porção mediana das folhas jovens completamente desenvolvidas foi cortada em segmentos de aproximadamente 3 cm de comprimento e embaladas em papel alumínio devidamente identificado por planta. Os papéis alumínio com as folhas, permaneceram em caixa de isopor contendo gelo triturado reciclável até o momento de transporte para o Laboratório de Cultura de Tecidos de plantas do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Em função da quantidade de material, as análises de citometria de fluxo foram feitas de forma escalonada.

Para tanto, amostras do tecido foliar jovem de milho foram trituradas sob gelo, em placas de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a obtenção da suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997), a qual foram adicionadas 2,5 µL de RNase e corada com 25 µL de iodeto de propídeo (1 mg mL⁻¹). A espécie *Vicia faba* (quantidade de DNA de 26,9 pg/2C) foi utilizada como padrão externo de referência e para cada amostra foram analisados no mínimo 10 mil núcleos. Cada suspensão foi analisada no citômetro de fluxo FacsCalibur (Becton Dickinson). Os histogramas obtidos foram avaliados pelo software WinMDI 2.8 (2009) para a avaliação dos picos de DNA. A estimativa do conteúdo de DNA nuclear (pg) de cada amostra foi realizada, por meio da comparação da posição do seu pico G1 com o pico G1 do padrão

interno ou externo de referência. Pela quantidade de DNA foi possível fazer inferências a respeito do nível de ploidia dos genótipos avaliados.

Para as análises com o marcador SSR, parte do tecido foliar que não foi utilizada para avaliação em citometria de fluxo e que estava embalada em papel alumínio devidamente identificado por planta, foi utilizada, bem como amostras de folhas de plantas de dois genitores (a linhagem indutora KEMS e do híbrido DKB393). A extração foi realizada de acordo com Doyle e Doyle (1997). Após o precipitado ser secado, foi diluído com 50µL de água ultrapura com 2 µL de RNase (10mg mL⁻¹), mantendo-se a temperatura de 37 °C por 1 hora. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro GE Nanovue.

Para a revelação dos géis utilizou-se o método de coloração com nitrato de prata. Após a verificação do polimorfismo dos genitores, o primer polimórfico BNLG238 foi usado para detectar os haploides gimnogenéticos e os diploides não duplicados, detectados na citometria de fluxo (COUTO et al., 2013).

As reações de PCR consistiram de 20 ng de DNA, 0,5 µM de primer, 100 µM de dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,6), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ e 1 U da enzima Taq polimerase, em um volume total de 25 µL. As amplificações utilizadas foram realizadas de acordo com a programação: uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por dez ciclos a 94°C por 20 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 20 segundos, com a redução da temperatura de anelamento a 1°C a cada ciclo até atingir 56°C, seguidos por mais 20 ciclos com a temperatura de anelamento a 56°C e uma etapa final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de acrilamida 10% por eletroforese a 110 V por 90 minutos.

Além disso, todas as plantas DH1 formadas, tiveram seus caracteres morfológicos avaliados ao final de aproximadamente 120 dias do ciclo da cultura, conforme descrito abaixo:

Altura de planta: medida da distância entre o nível do solo até a inserção da folha bandeira, realizada em sentido ascendente com o auxílio de uma trena graduada em cm. Altura de inserção da primeira espiga: medida da distância entre o nível do solo até o ponto de inserção da primeira espiga formada em sentido ascendente também com o auxílio de uma trena graduada em cm. Diâmetro do colmo: medido acima do nível do solo no segundo internódio da planta com ajuda de um paquímetro. Número de folhas verdes: em ocasião do florescimento, foi determinado o número de folhas verdes por planta. Número de espigas por planta: contabilizadas no momento da colheita manual e número de sementes por planta: onde a contagem foi realizada após a colheita manual em ocasião do processo de debulha.

Características qualitativas como coloração das folhas, anormalidades nos pendões e estilo-estigma e deformidades das plantas, também foram avaliadas e acrescentadas como observações.

Durante o desenvolvimento das sementes foi feito o acompanhamento da solidificação do endosperma por meio da linha de leite, sendo que a colheita foi realizada em espigas no estágio de desenvolvimento ML5 (100% do endosperma sólido). Na a colheita, as espigas agora chamadas de DH2 de cada planta foram colhidas individualmente, respeitando-se as divisões de blocos e tratamentos, despalhadas e debulhadas manualmente. As sementes DH2, foram então submetidas à secagem natural até 12% de umidade, contabilizadas e armazenadas em câmara fria a 10°C.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se gerações como repetições e as proporções observadas foram avaliadas usando-se a abordagem de modelos lineares generalizados mistos (MLGM), de forma análoga ao proposto por Nunes, Morais e Bueno Filho (2004). Nesse caso, foi empregado o MLGM binomial com a função de ligação logit, conforme descrito a seguir:

$$\frac{R_{ijk}}{p_{ijk}} \sim \frac{\text{Binomial}(m_{ijk}, \pi_{ijk})}{m_{ijk}}$$

$$\log \left[\frac{\pi_{ijk}}{1 - \pi_{ijk}} \right] = \mu + p_i + h_j + g_k + ph_{ij} + p_{ijk}$$

Onde:

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

μ : intercepto;

p_i : efeito fixo do protocolo i ;

h_j : efeito fixo do híbrido j ;

g_k : efeito fixo da geração k ;

ph_{ij} : efeito fixo da interação do híbrido j com o protocolo i ;

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

Os MLGMs foram ajustados com estimação dos efeitos fixos e aleatórios, bem como dos componentes de variância, via maximização da função de verossimilhança restrita (REML). Para isso, utilizou-se o pacote lme4 do programa R (versão 2.14) (BATES; MAECHLER; BOLKER, 2011). A significância dos efeitos do modelo foi verificada via análise de “deviance”, com aplicação do teste estatístico de χ^2 (qui-quadrado), a 5% de probabilidade (CORDEIRO; DEMÉTRIO, 2007). Nos efeitos em que se evidenciaram

diferenças significativas, realizou-se agrupamento com base na distância de Mahalanobis, pelo método do vizinho mais próximo e estabelecido o ponto de corte usando o método de reamostragem bootstrap (MOURÃO JÚNIOR, 2001).

Nas análises exploratórias e inferenciais dos dados, foram usados como recursos gráficos o barplot e boxplot através do programa estatístico R (versão 2.7.1), com o objetivo de quantificar as ploidias em porcentagem por tratamento e observar a variabilidade das características morfológicas dentro e entre os tratamentos, além de enxergar a presença ou ausência de indivíduos com características extremas (outliers).

O gráfico de caixa é baseado nas estimativas das separatrizes, que são a mediana e os quartis, e insere informações de um conjunto de dados dentro de um gráfico (KRZYWINSKI e ALTMAN, 2014). Os valores discrepantes em relação aos demais, devem ser estudados com mais cuidado podendo representar genótipos divergentes. No presente trabalho, aqueles dados considerados extremos não foram descartados, uma vez que pela rastreabilidade individual e análise de citometria de fluxo, representaram plantas com ploidias diferenciadas.

A análise de variância, o teste Student-Newman-Keuls e as correlações de Pearson foram realizadas utilizando-se o software estatístico GENES, a 5% de significância (CRUZ, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a contagem inicial do número de haploides, apenas a metodologia de avaliação da coloração do endosperma e do embrião foi considerada. Nos programas de melhoramento, esse parâmetro é o mais utilizado, sendo a média de indução de haploidia importante para as tomadas de decisões em programas de melhoramento de indutores e para obtenção de linhagens duplo-haploides. Dessa maneira, são apresentadas as médias calculadas das taxas de indução de haploides nos quatro híbridos (Tabela 2). O agrupamento foi realizado por meio da distância de Mahalanobis.

Tabela 2 - Médias ajustadas das taxas de indução de haploides identificados pelo marcador morfológico R-navajo, oriundos dos cruzamentos dos quatro híbridos com o indutor KEMS.

Híbridos	Taxa de indução (%)
DKB 393	3,84 d
GNS 3225	5,68 c
GNS 3264	9,11 b
GNS 3032	15,40 a
Média	8,50

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

Fonte: Do autor (2018)

Esse agrupamento foi realizado, uma vez que nas análises de “deviance” (dados não apresentados) observou-se que os híbridos influenciaram a taxa de indução de haploides. No entanto, as gerações dos híbridos não apresentaram diferenças significativas. Esse resultado está de acordo com o que foi descrito anteriormente por Battistelli (2012), quando o autor observou que mesmo com uma geração de endogamia, não há interferência na indução de haploides no cruzamento da linhagem indutora Kems e híbridos tropicais. Além disso, utilizar gerações mais tardias não faz sentido na tecnologia DH, já que o objetivo é acelerar o processo de obtenção de linhagens. Por outro lado, ao utilizar a geração F2 na indução de haploides, haveria um ciclo a mais na etapa de melhoramento, o que, teoricamente, aumentaria a variabilidade genética das linhagens obtidas, mas também aumentariam o tempo e os custos (SLEPER e BERNARDO, 2016).

Ainda em comparação com o observado por Battistelli (2012), a média da taxa de indução de haploides selecionados pelo marcador R-navajo no presente trabalho, foi de 8,5%, valor acima do observado pelo autor que utilizou a mesma linhagem e obteve média de 7,1% e do observado por Shatskaya et al. (1994) que obtiveram valores de porcentagens variando de 6,3% a 8%. Mesmo sendo uma linhagem temperada e pelo valor de indução apresentado acima, o indutor Kems foi eficiente na produção de sementes em clima tropical, apesar do consenso geral em relação ao contínuo desenvolvimento de indutores tropicais com maior adaptabilidade.

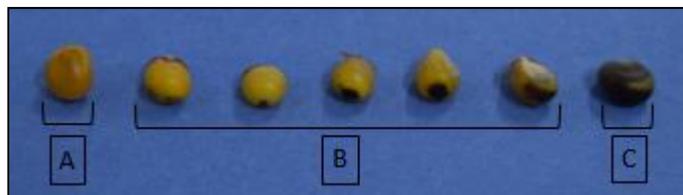
Foram observadas diferenças nas taxas de indução entre os híbridos, sendo a maior observada para o híbrido GNS 3032 e a menor para o híbrido DKB 393. Essas diferenças entre os genótipos nas taxas de indução de haploides em milho já foram relatadas por diversos autores (BATTISTELLI, 2012; RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005). Segundo Prigge et al. (2011), o germoplasma utilizado e o genótipo tem significativa influência na indução de haploides, além de fatores como época e método de polinização.

Adicional, a indução de haploidia é uma característica dependente da ocorrência da fecundação e que pode ser afetada por fatores ambientais como temperatura, umidade, nutrição da planta, entre outros. No campo, as plantas estão sujeitas a diferentes condições de estresse que interferem na polinização e na fertilização e, conseqüentemente, na produtividade (THAKUR et al., 2010; ZINN; TUNCOZDEMIR; HARPER, 2010). Altas temperaturas por exemplo, induz no milho a produção de uma proteína chamada HSPs, as quais podem interferir no desenvolvimento dos tecidos reprodutivos masculinos e femininos da planta, evidenciando um desbalanceamento da indução de haploidia.

Ren (2017), relata que o resultado da taxa de indução, dada a característica do gene R-navajo de expressividade variável e penetrância incompleta, além de ser afetado pelas condições ambientais e genótipo utilizado, também pode ser influenciado pela seleção indevida dos haploides. A expressividade variável refere-se à existência de grande variação fenotípica entre indivíduos com o mesmo genótipo, como pôde ser observado nessa avaliação, na qual a pigmentação das sementes haploides selecionadas variou na forma e no tamanho (Figura 1). Assim, algumas sementes haploides podem não terem sido selecionadas por causa da ausência do marcador morfológico no endosperma, diminuindo a taxa de indução, da mesma forma que falsos haploides podem superestimar a taxa ao serem selecionados, o que explicaria por exemplo, a alta taxa de indução do híbrido GNS 3032 em relação aos demais.

Isso confirma a necessidade de novas técnicas complementares as que hoje são utilizadas, a fim de otimizar a identificação e diferenciação dos falsos haploides dos potenciais haploides.

Figura 1 - Caracterização da expressividade variável do gene R-navajo por meio da pigmentação por antocianina em sementes de milho. A) ausência de pigmentação, B) níveis gradativos de pigmentação e C) expressão total do gene na semente ou semente roxa.



Fonte: Do autor (2018).

Após a separação das sementes haploides pelo marcador fenotípico, sementes com pigmentação somente no endosperma e embrião branco (Figura 1B) foram submetidas a dois protocolos de duplicação cromossômica. Esses protocolos por serem bem divergentes, permitiram inúmeras comparações iniciais como por exemplo; o protocolo 1 possuía uma metodologia mais prática, diferindo apenas na concentração de colchicina. Nele, as plântulas

após a germinação foram submetidas à solução de duplicação, e então lavadas, plantadas em substrato e levadas para casa de vegetação. O protocolo 2 por sua vez, possuía uma metodologia mais trabalhosa, uma vez que foram necessários dez dias para o crescimento suficiente das plantas e para que as suas raízes fossem submetidas à solução de duplicação. Além disso, após atingir o tamanho ideal, as plântulas foram retiradas das bandejas e lavadas com água para a eliminação da areia e vermiculita das raízes, que dificultavam a entrada da colchicina nas plantas. Essa etapa foi trabalhosa e exigiu cautela para que as raízes fossem bem limpas e não destruídas antes da etapa de duplicação.

Essa distinção entre os protocolos, independente do híbrido utilizado, pode ser observada na Tabela 3 por meio da porcentagem de sobrevivência das plantas após à duplicação cromossômica, tanto em casa de vegetação como em campo. Considerando todas as sementes dos quatro híbridos submetidos aos dois protocolos e em ambas as etapas, observou-se uma média de 86% de sobrevivência de plantas após a etapa de duplicação cromossômica em casa de vegetação para o protocolo 1 e de 76,8% para o protocolo 2 e uma média de 62,3% de sobrevivência de plantas no campo no protocolo 1 e 79,35 no protocolo 2. Essa redução entre as etapas casa de vegetação e campo, já era esperada uma vez que algumas plantas transplantadas não suportaram as diferenças entre os ambientes e morreram. Adicional a isso, a colchicina influencia na taxa de mortalidade de plantas tratadas, menos adaptadas.

Apesar dessa redução, o valor obtido no campo foi superior ao encontrado por Battistelli (2012), que obteve 62% de sobrevivência de plantas e também ao encontrado por Dang et al. (2012), que obtiverem 65,7% de sobrevivência quando utilizaram haploides duplicados de milho.

Nesse trabalho, os protocolos de duplicação cromossômica interferiram na sobrevivência das plantas e mesmo com uma metodologia mais trabalhosa em relação ao protocolo 1, o protocolo 2 foi estatisticamente mais eficiente em relação a porcentagem de plantas que sobreviveram, após a etapa de duplicação em campo.

Tabela 3 - Porcentagens de sobrevivência de plantas de milho DH0 em casa de vegetação e em campo, após submissão aos protocolos de duplicação cromossômica artificial.

Sobrevivência de plantas DH0 após duplicação (%)				
Híbridos	Em casa de vegetação		Em campo	
	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 1	Protocolo 2
DKB393	86,5 bA	74,9 bB	60,9 bB	86,6 aA
GNS3225	82,6 bA	76,8 bB	66,9 aB	79,8 bA
GNS3264	82,8 bA	73,1 bB	57,1 bB	76,0 bA
GNS3032	92,0 aA	82,3 aB	64,3 aB	75,0 bA
Média	85,97	76,77	62,3	79,4

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

**Médias entre os protocolos, separados em casa de vegetação e campo seguidas pela mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade

Fonte: Do autor (2018).

As plantas que sobreviveram aos protocolos de duplicação cromossômica em campo, não apresentaram desenvolvimento e crescimento sincronizado. No entanto, para testar a eficiência da duplicação, todas as plantas DH0 que sobreviveram no campo, produziram pólen e possuíam estilo-estigma em sincronismo, foram autofecundadas, o que correspondeu a 30,9% das plantas sobreviventes no protocolo 1 e 65,2% das plantas no protocolo 2. Ressalta-se que a maioria das plantas que produziu muito pólen não possuía estilo-estigmas receptivos, ou apresentavam desenvolvimento tardio de espigas, o que foi verificado principalmente em plântulas submetidas ao protocolo 1. Isso contribuiu com o baixo valor do total de plantas autofecundadas pertencentes a esse protocolo e conseqüentemente menor produção de espigas e sementes.

As espigas DH1 colhidas após autofecundação das plantas DH0 duplicadas, foram separadas de acordo com os parentais e protocolos de duplicação e suas sementes, misturadas, contabilizadas e armazenadas até a etapa seguinte do experimento conforme os tratamentos descritos nos materiais e métodos.

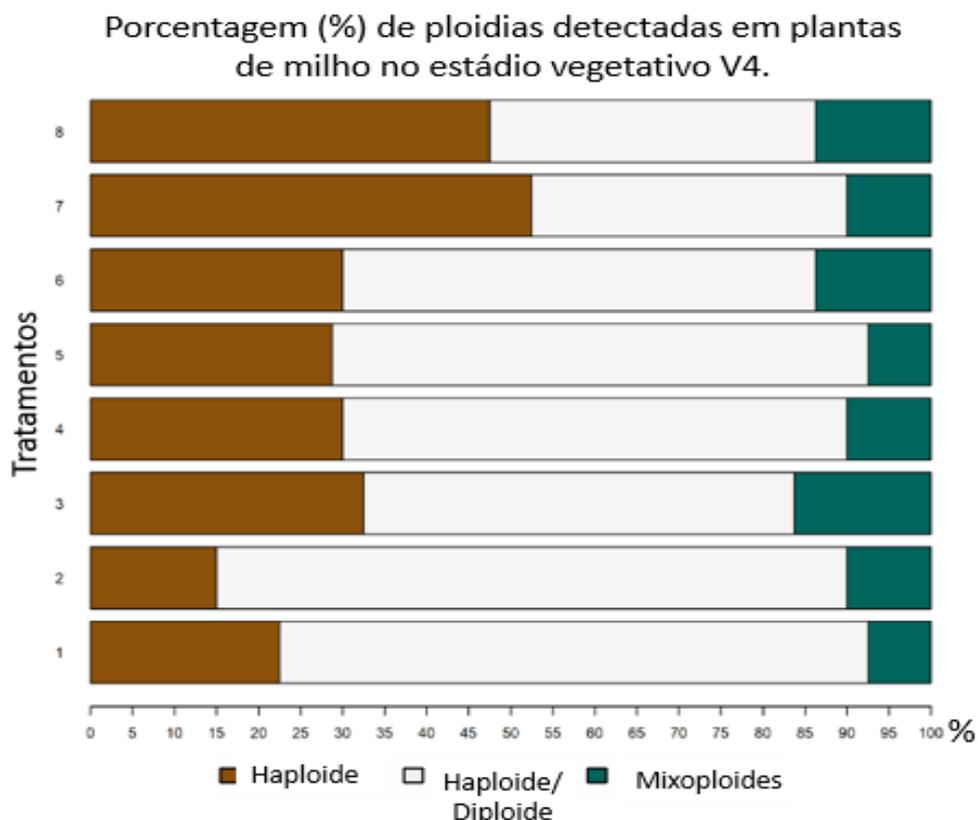
Para a quantidade de sementes DH1 colhidas, não foram observadas diferenças significativas entre as fontes de variação avaliadas (híbridos, gerações, protocolos), nem mesmo nas médias ajustadas pelo agrupamento de Mahalanobis. A porcentagem média ajustada da quantidade de sementes DH1 colhidas de plantas DH0 autofecundadas para os quatro híbridos foi 58%.

Como descrito anteriormente, a etapa de autofecundação das plantas duplicadas e a quantificação de sementes colhidas são importantes em experimentos que visam obtenção de duplo-haploides. A identificação das ploidias dessas sementes pela quantificação de DNA e a confirmação por meio dos marcadores moleculares SSR são informações complementares e auxiliam na confirmação da técnica utilizada. Para isso, as sementes DH1 de cada tratamento foram semeadas no campo e tiveram suas ploidias detectadas no estágio vegetativo V4, o qual corresponde ao desenvolvimento de quatro folhas.

Nesse momento, cada semente passou a ser rastreada a fim de confrontar esses resultados individuais com o comportamento dessas futuras plantas no campo ao final de 120 dias do ciclo da cultura.

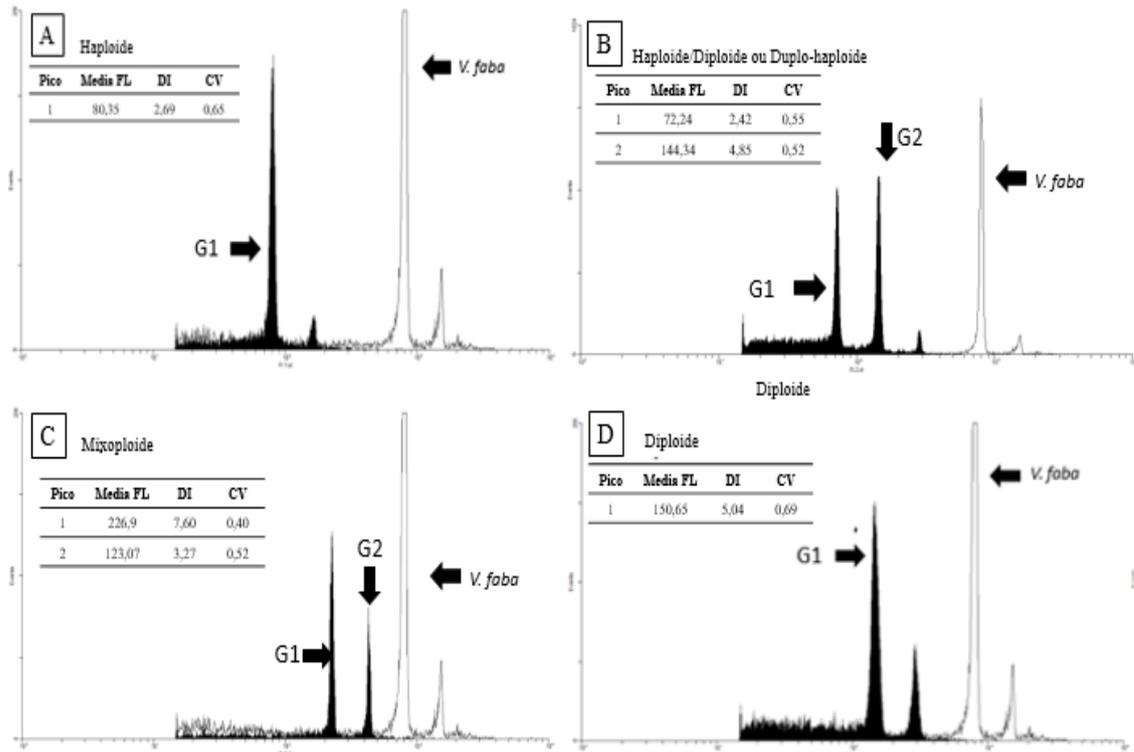
Os valores em porcentagem das ploidias observadas em cada tratamento podem ser visualizados na Figura 2. Ressalta-se que todas as ploidias foram caracterizadas por meio da comparação, em histogramas, dos picos das plantas duplicadas com o pico do padrão externo utilizado (Figura 3).

Figura 2 - Barplot de valores em porcentagem de ploidias detectadas no estágio vegetativo V4 dos diferentes híbridos em cada tratamento; 1- DKB393/Prot 1, 2- DKB393/Prot 2, 3- GNS3225/Prot 1, 4- GNS3225/Prot 2, 5- GNS3264/Prot 1, 6- GNS3264/Prot 2, 7- GNS3032/Prot 1, 8- GNS3032/Prot 2 em função do valor total de sementes DH1 semeadas em campo



Fonte: Do autor (2018)

Figura 3 - Exemplo de quatro histogramas de ploidades detectadas por citometria de fluxo em plântulas DH1 de milho coletadas após processo de duplicação cromossômica no estágio vegetativo V4. A) haploide, B) haploide/diploide ou duplo haploide, C) mixoploide e D) ploidia diploide do genitor DKB393 para efeito de comparação. Eixo vertical = número de núcleos lidos; Eixo horizontal = intensidade relativa de fluorescência. As setas evidenciam os picos G1 e G2 e o padrão externo de referência.



Fonte: Do autor (2018)

Observou-se em todos os tratamentos três classes distintas de ploidades com destaque para a elevada porcentagem do número de plantas haploides em todos eles. Considerando que as condições do ambiente foram as mesmas para todos os tratamentos instalados em campo, diminuindo então o efeito ambiental e considerando a ação da colchicina, duas possibilidades podem ser estudadas quanto a esses valores de haploides encontrados mesmo após uma geração de endogamia. A primeira diz respeito ao processo de duplicação artificial em si, citado por inúmeros autores como baixo, ineficiente e muitas das vezes irreprodutível (Belicuas, 2007), na qual fatores como tempo de exposição ao agente duplicador e concentração, impedem a restauração da condição diploide e mantem as plântulas na condição haploide. Isso foi observado no presente trabalho, uma vez que os protocolos usados ainda se encontravam em fase de testes quanto às suas eficiências.

Outra possibilidade é que o processo de duplicação cromossômica pelo uso da colchicina foi limitado pelo aparecimento de quimeras. Nem sempre todas as células do tecido tratado se poliploidizam, o que pode levar à formação de quimeras, ou seja, tecidos ou plantas com setores duplicados e outros não duplicados, o que explicaria o alto número de haploides pós duplicação no presente trabalho, assim como do elevado número de plantas mixoploides (SCHIFINO-WITTMANN e AGNOL, 2004). Resultados similares quanto ao aparecimento de haploides e mixoploides após duplicação cromossômica foram relatados por Battistelli et al. (2012) e Couto et al. (2015).

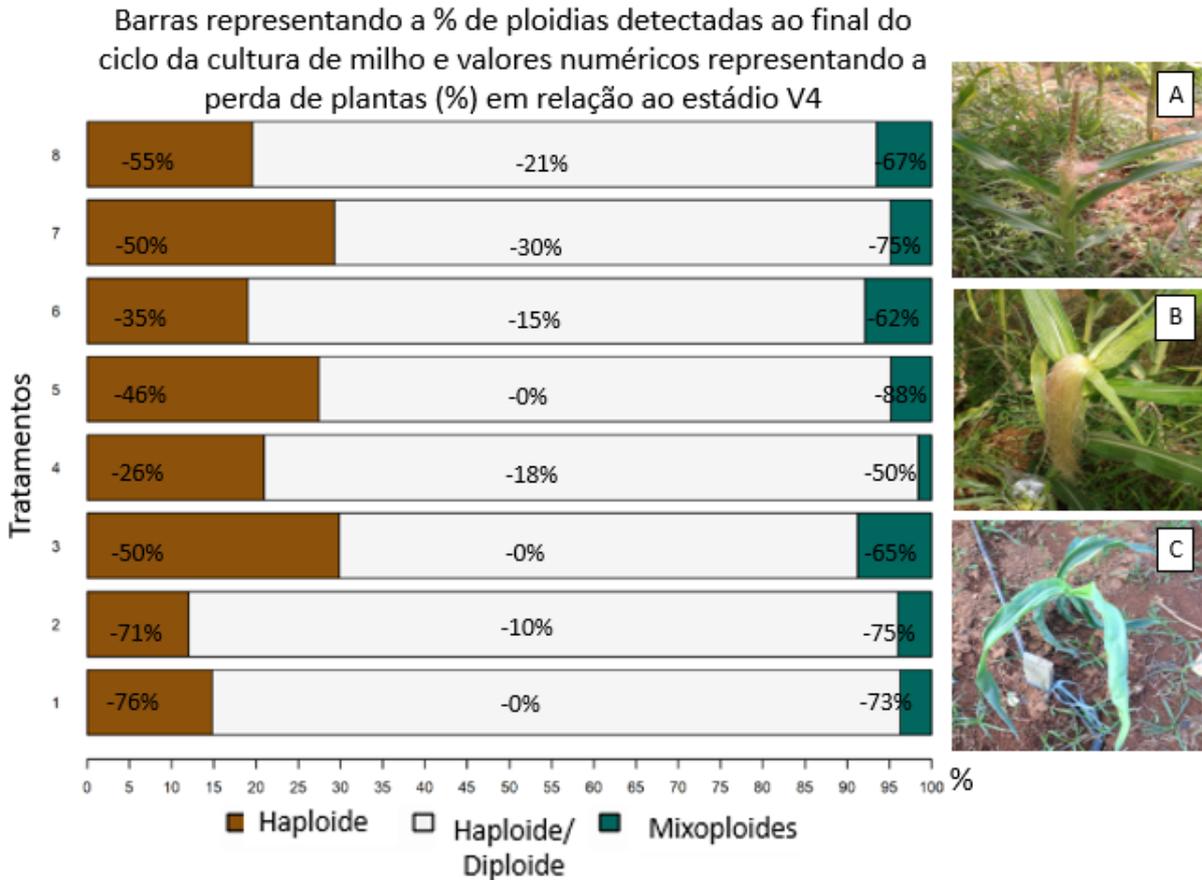
De acordo com Dooghe et al. (2011), o sucesso de um procedimento de duplicação cromossômica se encontra no limite entre a toxicidade e a eficácia, uma vez que concentrações reduzidas ou curtos períodos de exposição podem resultar em elevadas taxas de sobrevivência, entretanto sem promover a duplicação cromossômica, ou, elevadas concentrações e períodos de exposição além de resultarem na mortalidade, também podem causar a reduplicação dos cromossomos, ocasionando a formação de células com níveis de ploidias indesejáveis.

Analisando a afirmação de Dooghe et al. (2012) e a Figura 4, observou-se que algumas das situações citadas pelos autores ocorreram pós duplicação cromossômica. Em função do rastreamento individual, observou-se que em todos os tratamentos muitas das plantas identificadas como haploides no estágio inicial da planta (V4), morreram antes de completar o ciclo da cultura. As perdas foram significativas com valores variando de 26% no tratamento 4 a 76% no tratamento 1. Os valores referentes às perdas em relação ao estágio anterior V4, estão demonstrados no gráfico em valores negativos de porcentagem, demonstrando a redução verificada entre as duas avaliações (Figura 4). Aquelas que não morreram apresentaram características como, desenvolvimento atrasado em relação as outras plantas, produção de grãos no pendão, fenômeno conhecido como “tassel seeds” (Figuras 4A e 4B) e folhas verdes mais claras (Figura 4C) respectivamente. Belicuas et al. (2007) ainda descreveram que os haploides em campo apresentaram folhas frágeis, quebradiças e arranjo de folhas diferente quando comparado a um indivíduo diploide, o que não foi verificado no presente trabalho.

Como a colchicina atua inibindo a polimerização das fibras do fuso durante a divisão mitótica e conseqüentemente impedindo a separação das cromátides irmãs aos polos opostos das células, tem-se como resultado a duplicação dos números de cromossomos, ou seja, aquelas plantas selecionadas inicialmente como haploides pelo uso do marcador R-navajo, duplicariam a quantidade de cromossomos celulares como esperado no processo de obtenção de duplo-haploides o que foi observado em grande quantidade no presente trabalho. Porém, e

por fatores já mencionados anteriormente que afetam a otimização dessa duplicação, se mais de um ciclo de divisão for interrompido, os indivíduos terão seus genomas gaméticos alterados sem que haja a inclusão de genomas diferentes. Isso foi mencionado por Dooghe et al. (2011) e constatado no presente trabalho, além da mortalidade observada também de plantas mixoploides em todos os tratamentos.

Figura 4 - Barplot de valores em porcentagem de ploídias detectadas ao final do ciclo da cultura do milho dos diferentes híbridos em cada tratamento; 1- DKB393/Prot 1, 2- DKB393/Prot 2, 3- GNS3225/Prot 1, 4- GNS3225/Prot 2, 5- GNS3264/Prot 1, 6- GNS3264/Prot 2, 7- GNS3032/Prot 1, 8- GNS3032/Prot 2, em função da quantidade de plantas DH1 que sobreviveram em campo. Valores numéricos da redução (em porcentagem) de plantas em relação ao estágio vegetativo V4 e fotografias do autor demonstrando anormalidades de plantas haploides sobreviventes.



Couto et al, (2015), trabalhando com 4 híbridos e dois protocolos diferentes de duplicação, afirmam que o comportamento daqueles genótipos submetidos ao mesmo protocolo de duplicação cromossômica seja similar, da mesma forma que o comportamento dentro de cada genótipo e Batistelli et al. (2013) comentam que uma alternativa para

identificar se realmente as plantas identificadas como duplo haploide sejam realmente DH ou resultantes de cruzamentos seria a utilização de marcadores moleculares ou então a semeadura das sementes e posterior observação da ocorrência ou não de segregação entre as plantas. Caso haja segregação para as características da planta, seria constatado que não se tratava de linhagens homozigotas DH.

Pensando nisso, e em decorrência do rastreamento individual estabelecido, todas as plantas dos tratamentos que sobreviveram ao final dos 120 dias tiveram suas características morfológicas avaliadas. Na análise exploratória e inferencial dos dados, usou-se como recurso o gráfico boxplot com o objetivo de observar a variabilidade dentro e entre os genótipos, além de enxergar a presença ou ausência de indivíduos com características extremas (Figura 5).

Figura 5 - Boxplots para avaliação exploratória e inferencial de seis características morfológicas de plantas de milho (A- altura de planta, B- altura de inserção da primeira espiga, C- diâmetro do colmo, D- números de folhas verdes por planta E- número de espigas por planta e F- número de sementes por planta), provenientes de quatro genótipos submetidos a dois protocolos de duplicação, (1- DKB393/Prot 1, 2- DKB393/Prot 2, 3- GNS3225/Prot 1, 4- GNS3225/Prot 2, 5- GNS3264/Prot 1, 6- GNS3264/Prot 2, 7- GNS3032/Prot 1, 8- GNS3032/Prot 2). A caixa representa 50% dos dados; a marca central no box indica a mediana e os pontos fora das dimensões compreendidas pelo box, os outliers. O teste para avaliação de sobreposição de outliers não foi utilizado nesse experimento.(Continua)

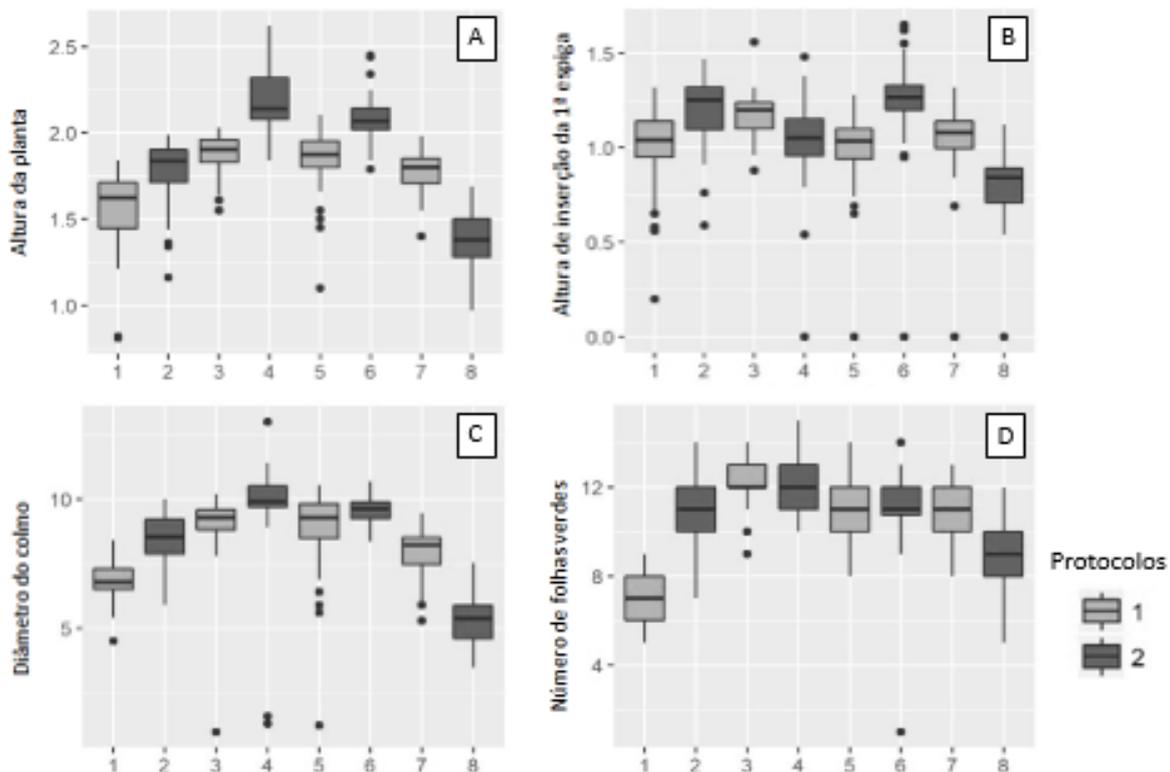
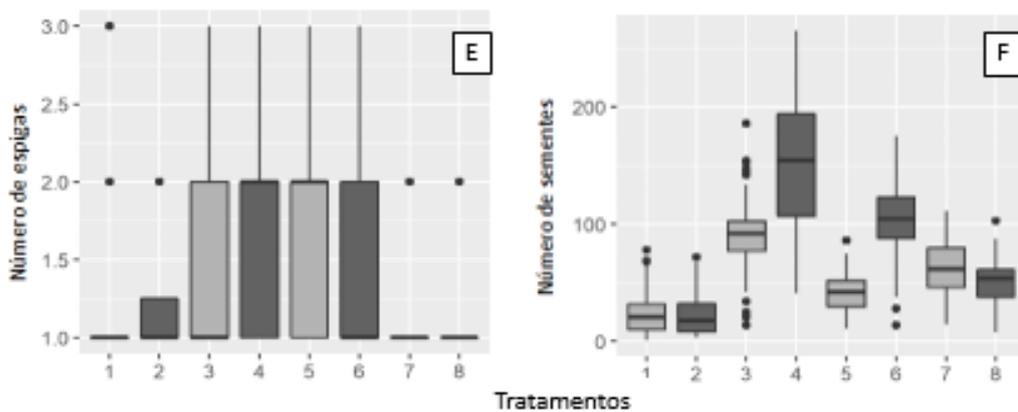


Figura 5 - Boxplots para avaliação exploratória e inferencial de seis características morfológicas de plantas de milho (A- altura de planta, B- altura de inserção da primeira espiga, C- diâmetro do colmo, D- números de folhas verdes por planta E- número de espigas por planta e F- número de sementes por planta), provenientes de quatro genótipos submetidos a dois protocolos de duplicação, (1- DKB393/Prot 1, 2- DKB393/Prot 2, 3- GNS3225/Prot 1, 4- GNS3225/Prot 2, 5- GNS3264/Prot 1, 6- GNS3264/Prot 2, 7- GNS3032/Prot 1, 8- GNS3032/Prot 2). A caixa representa 50% dos dados; a marca central no box indica a mediana e os pontos fora das dimensões compreendidas pelo box, os outliers. O teste para avaliação de sobreposição de outliers não foi utilizado nesse experimento (Conclusão).



Fonte: Do autor (2018)

A priori, no campo e contradizendo as afirmações de Couto et al. (2015), essa uniformidade dentro dos genótipos foi observada somente para algumas características morfológicas. A distribuição simétrica dos dados em relação à mediana, o que caracteriza menor variabilidade, foi vista principalmente nas características altura de inserção da primeira espiga, número de folhas verdes e número de sementes (Figuras 5B, 5D e 5F). Já a maior variabilidade, foi observada para os caracteres altura de planta e diâmetro do colmo (Figuras 5A e 5C). Essa afirmação está de acordo com o que foi constatado visualmente no campo, uma vez que plantas que pertenciam ao mesmo genótipo apresentaram tamanho variável e alta segregação, algumas inclusive, com características extremas, representadas graficamente pelos valores discrepantes em relação à mediana e confirmadas pelas ploidias individuais.

Uma consideração importante é que muitas plantas haploides sobreviventes apresentaram características semelhantes às plantas consideradas haploides/diploides principalmente em relação à característica altura de planta. Na Figura 5A, pelo boxplot no

tratamento 1 por exemplo observou-se somente uma planta discrepante em relação à média, no total de oito haploides identificados pela citometria. Situação similar foi observada nos tratamentos 2, 3, 5, 6 e 7, nos quais verificou-se poucos valores discrepantes, em comparação com os valores reais de haploides identificados pela citometria, (6, 15, 17, 12 e 12 plantas haploides respectivamente).

O mesmo foi verificado para as plantas previamente identificadas como poliploides/mixoploides. Plantas com dosagem gênica acima de duplicada, segundo estudos apresentam como efeitos morfológicos o aumento do tamanho das células devido ao maior volume nuclear e conseqüentemente maior altura, é o chamado “efeito giga” (SATTLE, 2016). Isso pode ser observado ainda na Figura 5A, onde somente o tratamento seis apresentou caracteres discrepantes acima da média, o que destoa do que foi identificado pela citometria de fluxo por meio da qual contabilizou mais de 3 mixoploides/poliploides em cada tratamento. Essas observações contradizem a afirmação de Batistelli et al. (2013), uma vez que o autor cita que o vigor de plantas seria uma característica potencial na diferenciação de ploidias de plantas em estágio mais avançado de desenvolvimento, quando os genótipos induzidos são híbridos simples.

Comportamentos similares foram identificados nas demais características nas quais verificou-se alta correlação com altura de planta (Tabela 4). Para o caráter quantidade de sementes colhidas, por exemplo (Figura 5F), observou-se que o tratamento 4, no qual foram contabilizadas treze plantas haploides e uma planta poliploide pela citometria de fluxo, descritivamente pelo box plot apresentou características semelhantes às plantas haploides/diploides, uma vez que mesmo haploides e conhecidos pelo alto grau de esterilidade, produziram alto número de sementes (das 13 plantas haploides, 10 apresentaram pendão fértil e foram autofecundadas). Na literatura, autores destacam que plantas haploides podem produzir pendão fértil. Assim, plantas haploides avaliadas eram plantas macho-férteis (CHASE, 1974; GEIGER; SCHÖNLEBEN, 2011), produzindo também pólen fértil.

Tabela 4 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as características morfológicas observadas em híbridos de milho, submetidos a dois protocolos de duplicação cromossômica, determinadas com base na média dos tratamentos.

	Altura	Inserção	Diâmetro	Folhas	Espigas	Sementes
Altura	1	0,6542	0,9617*	0,7621*	0,814*	0,8694*
Inserção		1	0,7529*	0,5356	0,2748	0,2082
Diâmetro			1	0,7786*	0,8086*	0,6129
Folhas				1	0,6287	0,6313
Espigas					1	0,5905

* : Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t

Outras considerações podem ser feitas observando ainda a distribuição dos dados nos gráficos boxplots. Uma delas diz respeito às diferenças existentes entre os genótipos em cada característica morfológica. Essa distinção, confirmada pela análise de variância na Tabela 5 é mais expressiva para a característica altura de planta (Figura 5D), onde observou-se pelo teste de Student-Newman-Keuls ao nível de 5%, diferenças significativas entre todos os genótipos estudados, sendo o genótipo GNS3225 submetido ao protocolo 2 considerado de maior altura média e o genótipo GNS3032 também submetido ao protocolo 2, como o de menor altura média. Essa mesma tendência foi observada para a variável diâmetro do colmo, sendo que para essas duas características houve a mais alta correlação (Tabela 4).

Tabela 5 - Altura de planta (cm); altura de inserção da primeira espiga (cm); diâmetro do colmo (cm); número de folhas verdes por planta; número de espigas por planta e número de sementes por planta, de plantas de milho DH0 avaliadas no campo provenientes dos quatro genótipos submetidos a dois protocolos de duplicação, (1- DKB393/Prot 1, 2- DKB393/Prot 2, 3- GNS3225/Prot 1, 4- GNS3225/Prot 2, 5- GNS3264/Prot 1, 6- GNS3264/Prot 2, 7- GNS3032/Prot 1, 8- GNS3032/Prot 2).

Genótipos	Características Morfológicas					
	Altura	Inserção	Diâmetro	Folhas	Espigas	Sementes
DKB393/Prot 1	1,57 g	1,02 c	6,86 e	7,01 d	1,06 d	23,22 f
DKB393/Prot 2	1,74 e	1,21 a	8,64 c	11,01 b	1,25 c	23,15 f
GNS3225/Prot 1	1,81 d	1,17 b	9,12 b	12,21 a	1,32 c	91,17 c
GNS3225/Prot 2	2,19 a	1,05 c	9,79 a	12,01 a	1,69 a	150,74 a
GNS3264/Prot 1	1,85 c	1,01 c	8,94 b	10,80 b	1,65 a	41,79 e
GNS3264/Prot 2	2,07 b	1,25 a	9,56 a	11,22 b	1,41 b	104,27 b
GNS3032/Prot 1	1,68 f	1,06 c	7,94 d	11,17 b	1,14 d	63,64 d
GNS3032/Prot 2	1,38 h	0,79 d	5,31 f	8,90 c	1,05 d	50,72 e
CV (%)	8,10	15,91	13,16	12,92	33,00	41,45

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018)

Outra característica importante ao observar as variáveis morfológicas na Figura 5, são os gráficos box plots daqueles genótipos submetidos aos mesmos protocolos de duplicação que não apresentaram linearidade, ou seja, não foram similares entre si. Essa afirmação novamente contradiz Couto et al. (2015), que sugerem comportamento similar daqueles genótipos submetidos ao mesmo protocolo de duplicação cromossômica.

Pelo exposto acima, a verificação de uniformidade dos indivíduos por meio de marcadores morfológicos de plantas em estágio adulto, não deve ser considerada, uma vez

que pode ocasionar a classificação equivocada de determinados genótipos em relação ao nível de ploidia. Além disso, a confirmação daquelas plantas previamente identificadas como duplo haploides (haploides/diploides) por meio da citometria de fluxo, como verdadeiramente duplicadas em campo, por meio de observações de uniformidade e segregação dos indivíduos, foi dificultada pelo elevado número de plantas no campo, bem como pela similaridade das características dos DH, com plantas diploides. A confirmação se essas plantas eram híbridos ou DH, seria melhor visualizada por meio da segregação desses materiais.

Uma vez que a avaliação das características morfológicas em campo não foi suficiente para a discriminação de indivíduos duplo haploides e diploides, recorreu-se como ferramenta adicional, a análise molecular com marcadores microssatélites, uma vez que essa análise já tinha sido realizada no estágio vegetativo V4 das plantas de milho, e somente seria usada em caso necessário de comprovação de ploidia previamente definida.

Para tanto os indivíduos considerados haploides/diploides de cada tratamento foram submetidos a análise molecular com marcadores microssatélites (Figura 6). Observou-se que o primer polimórfico BNLG238 foi eficiente em confirmar a herança gimnogenética da linhagem KEMS, já que os haploides por serem hemizigotos apresentam apenas uma banda no gel, proveniente do genitor híbrido e confirmar também a presença dos duplo-haploides, uma vez que por terem também herança gimnogenética, apresentaram apenas uma banda conforme observado na Figura 6.

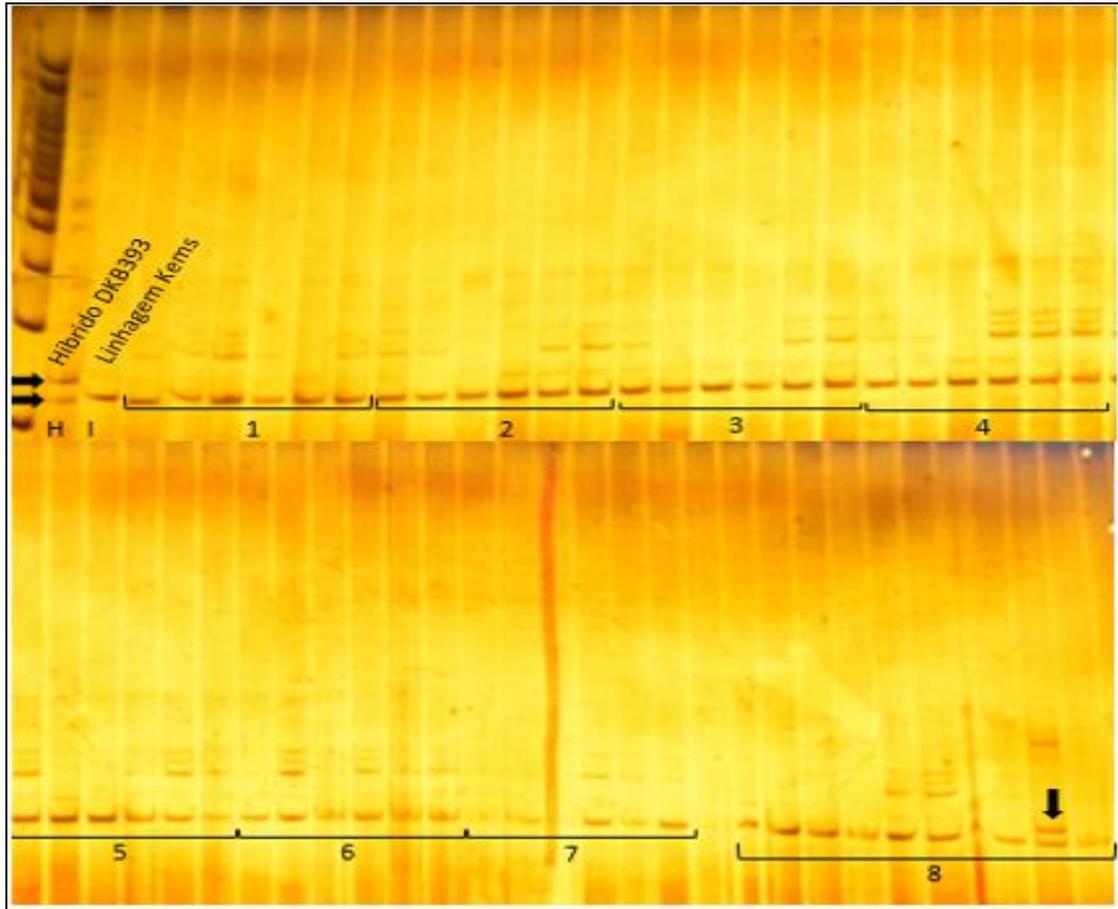


Figura 6 - Padrão eletroforético dos produtos de amplificação do primer polimórfico BNLG 1238. H) genitor DKB393, I) linhagem indutora de haploidia KEMS, 1, 2, 3, 4, 6, 6, 7, 8) duplo-haploides confirmados nos tratamentos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 respectivamente. A seta indica a presença de um diploide não duplicado representado pelas duas bandas.

Os resultados obtidos são coerentes com os observados por Couto et al. (2012), que utilizaram marcadores microssatélites para comprovar a herança androgenética de haploides provenientes do cruzamento de um híbrido tropical com a linhagem W23. Outros autores têm utilizado os marcadores microssatélites em pesquisas com plantas duplicadas de diferentes espécies, além do milho (LI et al., 2009; BATTISTELLI, 2012; BASTOS, 2016).

Assim, os marcadores microssatélites, por serem codominantes, permitem a fácil visualização e identificação dos indivíduos homozigotos. Desse modo, é possível distinguir os diploides, heterozigotos, dos haploides e duplo-haploides, homozigotos.

Como o objetivo é a obtenção de sementes duplo haploides, na Tabela 6 encontram-se os números de espigas colhidas por tratamento. O número total de espigas colhidas de plantas confirmadas como duplo haploides é significativamente alto, totalizando 118, sendo que o maior número foi observado nos tratamentos submetidos ao protocolo 2 de duplicação. Isso

confirma que uma geração de endogamia na obtenção de maior quantidade de sementes duplo haploides, deve ser considerada nos programas de melhoramento.

Tabela 6 - Número de plantas de milho DH1 consideradas duplo-haploides pela citometria de fluxo e número de espigas colhidas dessas plantas previamente confirmadas e que sobreviveram ao final dos 120 dias da cultura em campo.

Tratamento	Número de plantas	Número de espigas DH
DKB393/Prot 1	44	8
DKB393/Prot 2	42	22
GNS3225/Prot 1	35	9
GNS3225/Prot 2	48	19
GNS3264/Prot 1	42	11
GNS3264/Prot 2	46	16
GNS3032/Prot 1	27	10
GNS3032/Prot 2	34	23
Total	318	118

Fonte: Do autor (2018).

Informações a respeito da quantidade de sementes duplo haploides obtidas são escassas e as empresas e instituições privadas que dominam essa tecnologia optam por não divulgarem seus resultados.

4 CONCLUSÕES

A linhagem indutora de haploidia KEMS apresenta capacidade de indução em clima tropical.

O protocolo 2, realizado em bandeja e mantido sob luz após duplicação, foi mais eficiente na duplicação cromossômica e possibilitou maior número de plantas DH0 duplicadas sobreviventes e maior número de plantas autofecundadas, podendo ser recomendado em programas de melhoramento.

Não foi observada uniformidade de características fenotípicas de plantas submetidas aos protocolos de duplicação, da mesma forma que o uso de ferramentas descritivas na análise morfológica de plantas adultas de milho não foi eficiente.

A citometria de fluxo pode ser utilizada para se obter mais informações assim como os marcadores moleculares SSR podem ser utilizados na comprovação da herança gimnogenética da linhagem KEMS e também na identificação das plantas duplo-haploides de milho.

REFERÊNCIAS

- BATES, D.; MAECHLER, M.; BOLKER, B. Lme4: linear mixed-effects models using S4 classes. Version 0.999375-42. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=lme4>>. Acesso em: 21 jun. 2013.
- BATTISTELLI, G. M. **Estratégias para obtenção e identificação de duplohaploides em milho tropical**. 2012. 61p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BATTISTELLI, G.M.; VON PINHO, R.G.; JUSTUS, A.; COUTO, E.G.O.; BALESTRE, M. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. **Genetics and Molecular Research**. 2(4):4230-4242, 2013.
- BELICUAS, P.R., et al. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v.156, p.95-102, 2007.
- CHAIKAM, V. et al. Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. TAG. **Theoretical and applied genetics**. Theoretische und angewandte Genetik, v. 128, n. 1, p. 159–171, 2015.
- CHAIKAM, V.; LOPEZ, L. A.; MARTINEZ, L.; BURGUEÑO, J.; BODDUPALLI, P. M. Identification of in vivo induced maternal haploids in maize using seedling traits. **Euphytica**, v.213, p. 177, 2017.
- 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, n. 4, p. 275-276, Sept./Oct. 1965.
- CORDEIRO, G. M.; DEMÉTRIO, C. G. B. **Modelos lineares generalizados**. Santa Maria: UFSM, 2007. v. 1, 165 p.

COUTO, E. G. O.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; VEIGA, A. D.; CARVALHO, M. R.; BUSTAMANTE, F. O.; NASCIMENTO, M. S. Verification and characterization of chromosome duplication in haploid maize. **Genetics and Molecular Research** 14 (2): 6999-7007 (2015).

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

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

DOLEŽEL, J. 1997. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics** 38 (3): 285-302.

DHOOGHE E, VAN LAERE EK, EECKHAUT T, LEUS L AND VAN HUYLENBROECK J (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 104: 359-373.

DANG, N. C. et al. Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays*. L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 183, n. 1, p. 153-160, Jan. 2012.

KRZYWINSKI, M.; ALTMAN, N. Points of Significance: Visualizing samples with box plots. **Nature Methods**, v. 11, n. 2, p. 119-120, 2014.

MELCHINGER, A. E. et al. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled- haploid production. **Crop Science**, v. 56, n. 2, p. 559–569, 2016b.

MELCHINGER, A. E. et al. In vivo haploid induction in maize: Identification of haploid seeds by their oil content. **Crop Science**, v. 54, n. 4, p. 1497–1504, 2014.

MELCHINGER, A. E.; SCHIPPRACK, W.; WÜRSCHUM, T.; CHEN, S.; TECHNOW, F. Rapid and accurate identification of in vivo induced haploid seeds based on oil content in maize. **Scientific Reports, Nature**, v. 3, p.1-5, 2013.

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

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

PRASANNA, B. M.; CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. **Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice.** Mexico: CIMMYT, 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**, v. 51, n. 4, p. 1498–1506, 2011.

PRIGGE, V. SCHIPPRACK, W., MAHUKU, G., ATLIN, G. N., MELCHINGER, A. E. Development of in vivo haploid inducers for tropical maize breeding programs. **Euphytica**, Wageningen, v. 185, n. 2, p. 481-490, Mar. 2012.

REN, J.; WU, P.; TRAMPE, B.; TIAN, X.; LUBBERSTEDT, T.; CHEN, S. Novel technologies in doubled haploid line development. **Plant Biotechnology Journal**, v.15, p. 1361–1370, 2017.

RÖBER, F. K.; GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. In vivo haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica**, Bergamo, v. 50, n. 3/4, p. 275-283, Feb. 2005.

ROTARENCO, V. et al. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 84, n. 3, p. 1–7, 2010.

SATTLER, M.C.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**, v.243, n.2, p. 281-296, 2016.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Gametas não-reduzidos no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, v.31, p.169-175, 2001.

SHATSKAYA, O. A. et al. Mass induction of maternal haploids in corn. **Maize Genetics Cooperation Newsletter** . 68:51, 1994.

SLEPER, J. A.; BERNARDO, R. Recombination and genetic variance among maize doubled haploids induced from F1 and F2 plants. **Theoretical and Applied Genetics**, 2016.

THAKUR, P. et al. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 67, n. 3, p. 429-443, Jan. 2010.

TSENG, Y. New methods for haploid selection in maize. **Graduate Theses and Dissertations**. Iowa State University, paper 12918, 52p. 2012.

ZINN, E. K.; TUNC-OZDEMIR, M.; HARPER, J. F. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 7, p. 1959-1968, Mar. 2010.

ARTICLE 2

**ANATOMICAL TOOL IN THE IDENTIFICATION OF PLOIDS IN MAIZE
SEEDLINGS AND POTENTIAL USE IN INITIAL STAGE OF DOUBLE
HAPLOIDES OBTAINMENT PROCESS**

(Artigo elaborado segundo norma da revista “Industrial crops and products”)

ABSTRACT

Studies that optimize the haploid technique in the removal of maize lines are necessary. Between the stages that mostly requires attention and it is directly related to the success of the technology is the correctly separation of induced haploids and diploids. Morphological markers are commonly used but have strong influence of the environment, and laboratory methods have been developed and may be more efficient. Thus, the present work had the objective to study the use of the anatomical analysis tool, through the analysis of the characteristics of young maize leaf for use as the indirect markers in the identification of ploidy. The hybrids were crossed with the KEMS haploid inducer. The seeds crossed, were selected according to the R-navajo marker and submitted to two different protocols of chromosome duplication. Plants that survived to the duplication protocols were acclimated in greenhouse and then transferred to the field. After the self-pollination of the DH0 plants, the DH1 seeds were taken to the field, divided into treatments according to the parentals and duplication protocols. At the vegetative stage V4 of the plants, leaf tissue samples were collected to the evaluation of the amount of DNA and identification of ploidy and anatomical analysis. The nuclear DNA review (pg) of each sample was performed for the comparison in histograms of the position of G1 peak to the G1 peak of the internal or external reference standard. Statistical analyzes for all anatomical sequences were performed by assigning components of variance and predicting random expressions using a mixed model approach (REML / BLUP). A high accuracy came to validate an anatomical tool, through the variables studied in this work, as a marker in the differentiation of ploidy in maize plants, and it can be used in results selection programs. The anatomy made in some letters is a non-destructible technique and, together with a flow cytometry technique, can be used as an indirect method in haploid cutting programs at the initial stage of the identification of seedlings.

Key-words: double haploids, markers, anatomy, ploidy, flow cytometry.

1 INTRODUCTION

The success of a breeding program that aims at the production of maize commercial hybrids lies in the fact of obtaining elite lineages. Among all the steps, this is considered to be the most time-consuming and costly, and the technology of double haploid emerges as a way of reducing time in obtaining these lineages (Bordes et al., 2006).

The rapid production of homozygotic lineages allows a better exploitation of genetic variability and increases the efficiency of selection. Homozygous plants will have the maximum additive variance, the effects of dominance and epistasis, and the advantages in the selection of quantitative, superior characteristics (Melchinger et al., 2013). In addition, the decrease of the costs with labor, use of smaller experimental area and anticipation of profits in commercial programs for maize breeding have made this technique a great success.

The production of double- haploid lineages involves four main steps: *in vivo* induction of haploidy, identification of possible haploids, chromosome doubling and the self-fertilization of lineages obtained for increment of seeds (Prasanna et al., 2012). However, the success of this methodology is still dependent on the use of inductors with high capacity of induction, a precise system of identification and differentiation of haploid and diploid seeds, as well as efficient and reproducible protocols of chromosome doubling (Chaikam et al., 2017).

The doubling of the chromosome number spontaneously or induced by the application of mitotic agents e.g., colchicine, retrieves the diploid condition and restores fertility (Ren et al., 2017). The action mechanism of colchicine involves the irreversible connection to tubulin dimers, causing a conformational change and preventing the polymerization of mitotic spindle, and as a result, the newly duplicated chromosomes are not separate and the core reorganizes with the number of duplicated chromosomes (Eeckhaut et al., 2004). However, not all cells of the treated tissue polyploidize, which can lead to the formation of chimeras, i.e., tissues or plants with duplicate sectors and others unduplicated ones (Schifino-Wittmann and Agnol, 2003) called mixoploids. Truly duplicated lines resulting from this process are called duplicate or double haploids (DHs).

There are several methods for certification of polyploidization, being flow cytometry the most used one (Dhooghe et al., 2011). Flow cytometry is a reliable and fast method, because it allows the analysis of a large number of cells and of different tissues (Fritsche-Neto et al., 2012). In experiments with double haploids, flow cytometry allows vigorous seedlings and detected as diploids in the histograms are discarded before the step of field, reducing time and

space. In addition, flow cytometry allows the analysis of the efficiency of the protocol of chromosome doubling, since it is not possible to confirm if the response of seedlings to duplication was positive (Battistelli, 2013; Couto et al., 2013; Dang et al., 2012).

Another tool that is being studied as a marker in the differentiation of ploidies in plants is the leaf anatomy, being the leaf considered the component with greater ability to adapt to environmental conditions. Highly flexible, leaf anatomy is influenced by environmental factors, such as, irradiation (leaves of sunlight/shade, Lambers et al., 1998), nutrients (Jokela et al., 1998), drought (Bosabalidis and Kofidis, 2002) and ozone (Oksanen et al., 2001; Oksanen et al., 2004). Changes in the leaves characteristics, such as those related to the thickness of the leaf blade, parenchymas, epidermis and number of stomata for example, and that are highly associated with the photosynthetic potential of plants, are used in studies of genetic selection by the use of morphological and anatomical markers. Additionally, they are highly heritable characteristics, i.e., can be passed to their offspring (Ramalho et al., 2008).

The cytoanatomic characterization is a methodology that allows the identification of haploid and supposed polyploidy in plants subjected to chromosome doubling. The study of measurement and comparison of stomata, based on the principle that the length of the same normally increases with the number of chromosomes, is the most commonly cited in the literature (Vichiato et al., 2006).

The number of stomata in association with other leaf anatomical characteristics, has already been mapped to different levels of ploidy in studies with coffee plants (Mishra et al., 1997). For this species, the greater the number of stomata the higher the ploidy. In the case of *Coffea canephora*, a reduction in the stomatal density is higher in the tetraploid level for some cultivars (Mishra et al., 1997). Padoan et al. (2013), observed in Citrus that the size and density of stomata varied according to ploidy level, where the triploids showed a higher number of stomata when compared to diploid plants. A similar result was observed by Rocha (2014), who stated to be possible the use of anatomical markers for purposes of selection of citrus with different levels of ploidy.

Ploidy is well studied from the point of view of genetics and genomic perspective, but the morphological and anatomical aspects related to these differences in the amount of DNA, remain poorly studied in maize plants. Analyzing the anatomical characteristics of young leaves of maize, capable of discriminating the different ploidies and extrapolate these results in diploid and haploid discrimination on the optimization of the process of obtaining double haploid is of extreme importance.

Thus, the objective of this work was to study the use of anatomical tool, through the analysis of the characteristics of young leaves of maize for use as indirect markers in the identification of ploidy, and through future studies, to extrapolate the use of this marker in the identification of haploids in the initial stage of the process of obtaining double haploid.

2 MATERIAL AND METHODS

The cross field occurred in Cravinhos SP, in the sowing of 2012 among four simple hybrids (DKB393, GNS 3225, GNS 3264, GNS 3032) with the inducer of haploidy KEMS, used as male parental. The seeds from these crosses were brought to Lavras and the following steps were carried out at the premises of the Federal University of Lavras, Cytogenetics Laboratory of the department of biology, and at the Federal University of Viçosa in the laboratory of plant anatomy and morphology in the Department of Biology. For installation of the field where the self-fertilizations of materials were carried out the experimental area of the Department of Agriculture was used, located in the municipality of Ijaci, MG.

The seeds after separated by staining of the embryo and endosperm and selected as possible haploids, passed by the chromosome duplication processes, where in the first protocol of duplication, identified as Protocol 1, the seeds were disinfected with 2% hypochlorite and placed to germinate, for 72 hours, in germination paper moistened with controlled temperature of 25°C. After germination, to eliminate the false haploid, those vigorous seedlings with up to 3 cm in the aerial part and root 4 cm, were classified as diploid and discarded. After this step, the seedlings identified as possible haploids were subjected to treatment with a solution of 0.04% colchicine and 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO), for 12 hours, and kept in the dark at 20°C.

In the protocol identified as number 2, the selected seeds were disinfected with 2% hypochlorite and soon after, sown in trays containing sand and vermiculite (at a ratio of 1:1). After 10 days, the most vigorous seedlings were selected as diploids and discarded. The haploid plants were then removed from the trays and washed in water to remove the sand and vermiculite and to be subjected to the protocol of duplication. The roots of plants considered haploid were immersed in a solution of colchicine 0.1%, 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) and Tween 20 to 0.1%, and maintained for 6 hours in the presence of light at an average temperature of 22°C.

After treatment with colchicine, the seedlings from both protocols of duplication, called DH0, were transferred to the greenhouse and then transplanted to a protected environment.

Those plants DH0 that survived in the field, produced pollen and had style-stigma in sync, were self-fertilized for maintenance, multiplication and future studies of their seeds. The

cobs DH1, harvested after self-fertilization of duplicated DH0 plants, were harvested at physiological maturity of seeds and threshed and dried at ambient temperature until 12% of moisture. At this moment, in order to be used at a later stage, the cobs DH1 of each progeny harvested seeds were mixed and divided into treatments, as best seen in Table 7. Until the completion of the new phase of the experiment, these seeds were stored in cold chamber at 10°C.

Table 7 - Treatments taken for the field in the harvest season 2014/2015, established in accordance with the parental and the protocols of chromosome doubling.

Materials Identification		
Treatments	Hybrids	Protocols
1	DKB393	1
2	DKB393	2
3	GNS3225	1
4	GNS3225	2
5	GNS3264	1
6	GNS3264	2
7	GNS3032	1
8	GNS3032	2

Fonte: From author (2018).

In the harvest season 2014/2015, the total number of seeds DH1 for each treatment, was taken to the field and the experimental design was a randomized complete blocks with eight treatments with four replications. Each block was composed by lines of 10 meters of length, with spacing of 80 cm between rows and among plants of 25 cm, and sowing of a seed per hole. The collection of leaf material occurred in young stage of the plant maize, with 4 replicates collected at random within each treatment.

In the case of leaf anatomy, 5 replicates were performed for each repetition in the laboratory, five blades of 10 sections each, were made, and the top five fields were photographed and subsequently measured. The following were measured: thickness of the leaf blade (ELF), thickness of the parenchyma (PAR), thickness of the upper epidermis (EES) and lower epidermis (EEI), polar diameter of the stomata in the upper face (DPS) and lower (DPI), equatorial diameter of the stomata of superior face (DES) and lower face (DEI) and stomatal density on the upper surface (DS) and lower (DI). For that, in the vegetative stage V4 which corresponds to the development of four leaves, leaf tissue samples were collected.

For that, in the vegetative stage V4 which corresponds to the development of four leaves, leaf tissue samples were collected.

For both evaluations, the medial portion of the young leaves fully developed, was cut into segments of approximately 3 cm in length and wrapped in aluminum paper duly identified per

plant. Aluminum papers remained in a polystyrene box containing recyclable crushed ice, until the time of transportation to the laboratory of tissue culture of plants of the Department of Agriculture of UFLA.

At the opening of each envelope of aluminum, part of the samples of leaf tissue was used for the quantification of DNA and part to the anatomical analysis. Therefore, young leaf tissue samples of maize were crushed under ice, in Petri plates containing 1 mL of cold buffer LB01, to obtain nuclear suspension (Dolezel, 1997), which was added 2,5µL RNase and stained with 25 µL of propidium iodide (1 mg mL⁻¹). The species *Vicia faba* (quantity of DNA of 26.9 pg/2C) was used as an external standard of reference and for each sample at least 10 thousand cores were analyzed. Each suspension was analyzed in flow cytometry FacsCalibur (Becton Dickinson). The histograms obtained were evaluated by the WinMDI software 2.8 (2009) for the evaluation of the peaks of DNA. The estimate of the nuclear DNA content (pg) of each sample was performed by comparing the position of the peak G1 with the peak G1 of the internal standard or external reference.

For this comparison the following expression was used:

$$Q = \left(\frac{E}{S}\right) \times R, \text{ on what:}$$

Q is the quantity of DNA of the evaluated sample (pg/2C).

E is the position of the G1 peak of the sample.

S is the position of the peak G1 reference standard and

R is the quantity of DNA of the standard sample (26.9 pg/2C).

By the quantity of DNA it was possible to make inferences about the ploidy level of the evaluated genotypes.

As mentioned, the other part of the samples of leaf tissue was immediately fixed in FAA₅₀, (formaldehyde: acetic acid: ethanol, 5:5:90) for 48 h. Then, the samples were removed from the fixative solution, rinsed and stored in 70% ethanol solution (Johansen, 1940). At this moment the samples were transported to the Laboratory of Anatomy and morphogenesis of Plant Biology Department of the Federal University of Viçosa, where permanent slides were made using portions of the leaf that were dehydrated in ethyl series included in historresin (methacrylate), according to the manufacturer's recommendations. Transverse sections of leaf were sectioned in automatic advance rotary microtome (model RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) with 5 µm thick, arranged on histological slides and stained with toluidine blue (O'Brien et al., 1964), to the limbal micro morphometry.

For the stomata evaluations, fragments of the central part of the leaf blade were sectioned from material stored in alcohol 70%. The samples were clarified by means of the technique of Diaphanization, described by Zsogon (2014) and modified for the species, having been clarified in methanol for 48 hours and then in lactic acid for 6 hours in water bath for 98 °C and assembled into lactic acid. After the staining procedure, the samples were immersed in ethanol 80, 70 and 50%, and later were rinsed in distilled water. The histological slides with leaf fragments were mounted on glycerol-jelly Images of the slides of cross cuts and diaphanization were obtained under a light microscope (model AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera (model Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) and a microcomputer with the program to capture images Axion Vision, having been digitized and stored in a microcomputer. For the analysis, 10 distinct fields of each sample were measured by means of Image-Pro ® Plus software (version 4.1, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA).

The analyzes were performed for all characters with the estimation of variance components and the prediction of random effects using the approach of mixed models, the method of restricted maximum likelihood/best linear unbiased prediction (REML/BLUP) (Resende, 2002, 2007). For this, the following statistical model was used:

$$y = Xr + Za + Wp + e$$

Where:

y : vector of data;

R: vector of the effects of repetition (assumed as fixed) added to the overall average;

A: vector of genotypic effects among treatments (random), being $a \sim \text{NMV}(0, I\sigma_g^2)$. σ_g^2

is the variance associated with genotypic among treatments;

p: vector of genotypic effects among treatments (random), being $p \sim \text{NMV}(0, I\sigma_p^2)$. σ_p^2

is the variance associated with the parcels effects;

e: vector of random errors, and $e \sim \text{NMV}(0, I\sigma_e^2)$. σ_e^2 is the variance associated with the residual effects;

X, Z and W: incidence matrices for r, and p, respectively.

The heritability in the average of treatments (h_m^2) and accuracy were estimated, and the significance of the random effects as the genotypic variance among treatments (σ_g^2) were

tested by the *teste de razão da verossimilhança*)Likelihood Ratio Tests - LRT) where the analyses of deviance were obtained for each character evaluated (Resende, 2007).

These statistical analyzes were performed using the software SELEGEN-REML/BLUP (Resende, 2007).

3 RESULTS

For all the evaluated characteristics the accuracy was classified as very high (Resende and Duarte, 2007), with values above 87.0%. On average, the heritability (h_m^2) of the characteristics was also high with values above 84.0%, what indicates good reliability of data (Table 2). The heritabilities of treatments ranged from 76.0% (EES) to 98.0% (DEI) among the evaluated characteristics, which demonstrates that in the anatomic evaluation in this experiment, the largest part of the variation observed is due to genetic causes to the detriment of environmental variations (Falconer and Mackay, 1996).

The genotypic variance was highly significant by the LRT test and likelihood ratio for the characters related to the thickness of the leaf blade (ELF), stomatal density of both the upper surface (DS), as well as the lower surface (DI), thickness of the parenchyma (PAR), thickness of the upper epidermis (EES) and lower epidermis (EEI), polar and equatorial diameter of upper epidermis (DES and DPS) and lower (DEI and DPI), according to LRT ($P < 0.01$), characterizing these characteristics as good candidates to be inserted in a breeding program as markers. It was possible to realize that the characteristics related to the thickness of the lamina and those related to the stomata were the ones that showed higher heritability, followed by the thickness of the parenchyma. The thickness of the epidermis, even with high heritability, were lower (Table 8).

Table 8 - Summary of ANADEV and estimates of genetic parameters in the evaluation of maize hybrids for traits, thickness of the leaf blade (ELF), thickness of the upper epidermis (EES), thickness of the parenchyma (PAR), thickness of the lower epidermis (EEI), equatorial diameter of the stomata in the upper face (DES), polar diameter of the stomata in the upper face (DPS), Equatorial surface of the stomata in the lower face (DEI), polar diameter of the stomata of the lower phase (DPI) and stomata densities of upper surfaces (DS) and lower (DI) of the leaf.

Parameters	ELF	EES	PAR	EEI	DES	DPS	DEI	DPI	DS	DI
VG _{between} ($\hat{\sigma}_g^2$)	0,0002 35**	0,0000 11**	0,0000 92**	0,0000 07**	0,0000 13**	0,0000 1**	0,0000 24**	0,0000 11**	44,5392 06**	286,2 0**
LRT among treatments	82,36	14,84	60,19	28,25	134,79	125,70	200,61	189,59	20,36	67,65
VG _{within} ($\hat{\sigma}_p^2$)	0,0000 02 ^{ns}	0,0000 01 ^{ns}	0,0000 01 ^{ns}	0,0000 00 ^{ns}	0,8338 ns	1,285 6 ^{ns}				
LRT within treatment	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,07	0,00	0,01	0,00 94,9*
h ² _{mg} (%)	93,2**	76,2**	91,0**	84,2**	96,8**	96,2**	98,1**	97,3**	84,8**	*
AC _{gen} (%)	96,6	87,3	95,4	91,8	98,4	98,1	99,0	98,7	92,1	97,4

** Significant and ^{ns} Non significant by the likelihood ratio test (LTR), with 1% of probability.

The anatomical differences observed were obtained through anatomical cuts and diaphanization of samples. It was possible to observe a difference in leaf blade as the thickness (Figure 7) and quantity and size of the stomata (Figure 8).

Figure 7 - Cross-sectional cuts of maize leaves collected after a process of chromosome doubling with use of colchicine. Haploid material (A), diploid (B), Double haploid (C), triploid (D) and tetraploid (E). ELF= thickness of leaf blade, PAR= thickness of parenchyma and EP=epidermis. The bars represent 50 μ m (Continue).

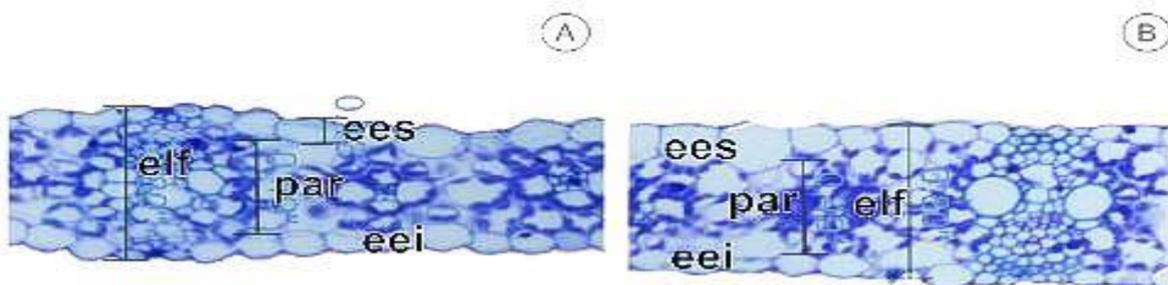


Figure 7 - Cross-sectional cuts of maze leaves collected after a process of chromosome doubling with use of colchicine. Haploid material (A), diploid (B), Double haploid (C), triploid (D) and tetraploid (E). ELF= thickness of leaf blade, PAR= thickness of parenchyma and EP=epidermis. The bars represent 50 μ m (Conclusion).

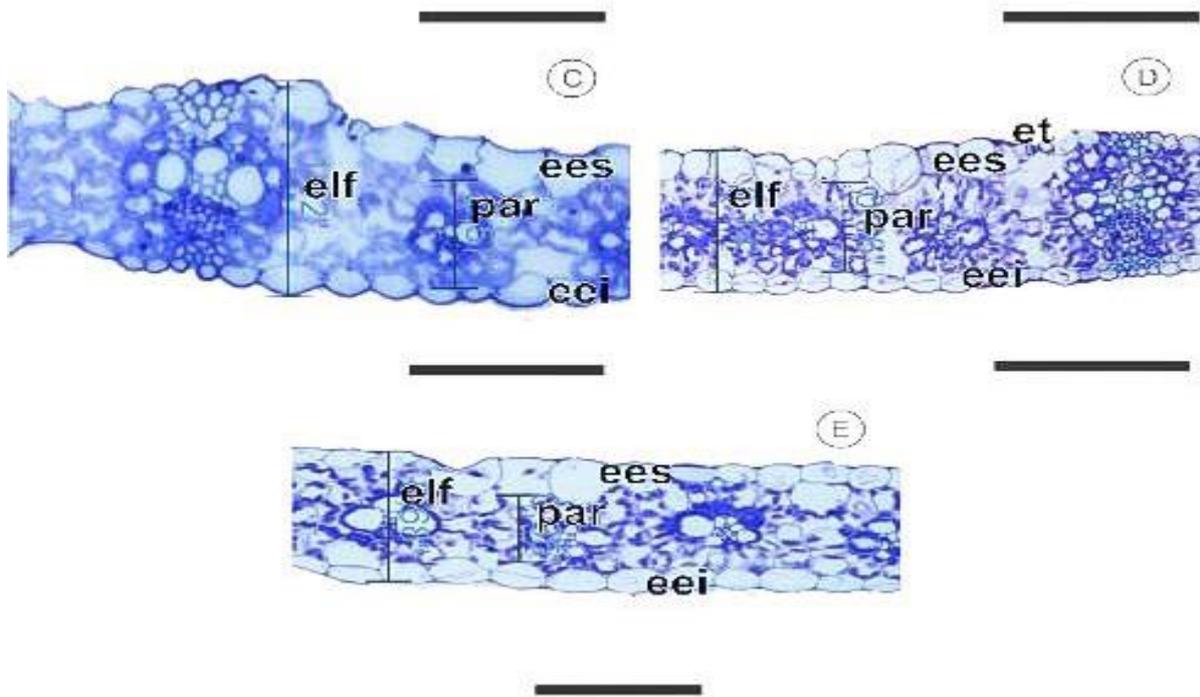


Figure 8 - Adaxial surface (A to E) and abaxial (F through J) of maze leaves collected after a process of chromosome doubling with use of colchicine. Haploid material (A and F), diploid (B and G), Double haploid (C and H), triploid (D and I) and tetraploid (E and J). The bars represent 50 μ m and arrows indicate stomata (Continue).

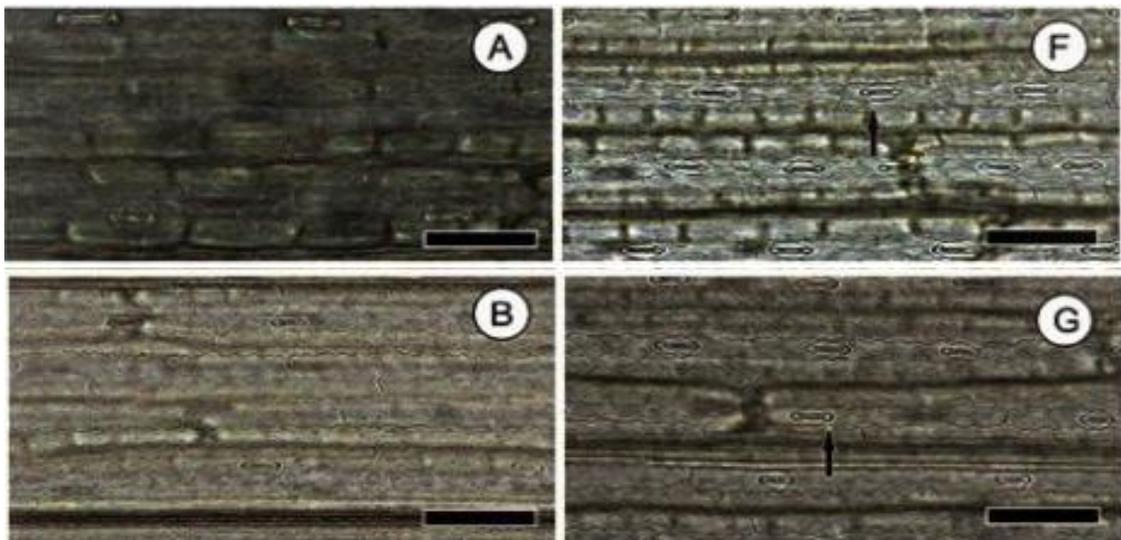
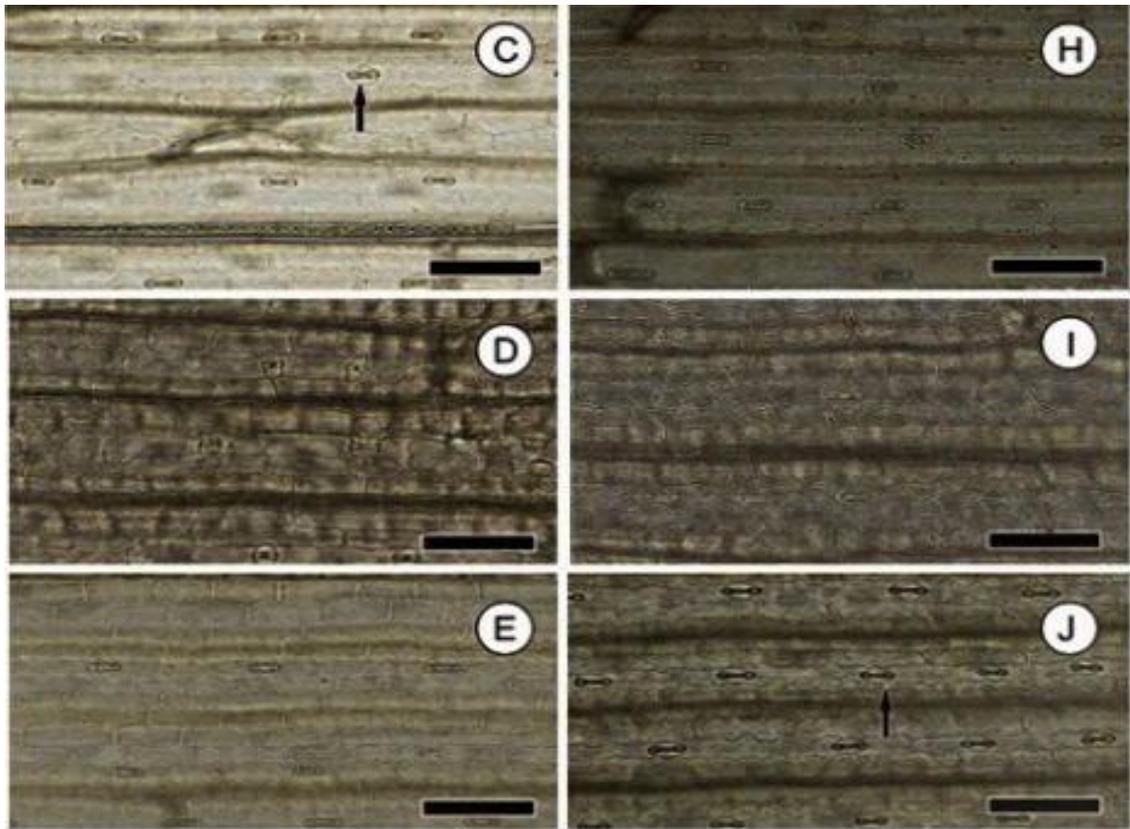


Figure 8 - Adaxial surface (A to E) and abaxial (F through J) of maize leaves collected after a process of chromosome doubling with use of colchicine. Haploid material (A and F), diploid (B and G), Double haploid (C and H) , triploid (D and I) and tetraploid (E and J). The bars represent 50 μ m and arrows indicate stomata(Conclusion).



Fonte: Do autor (2018)

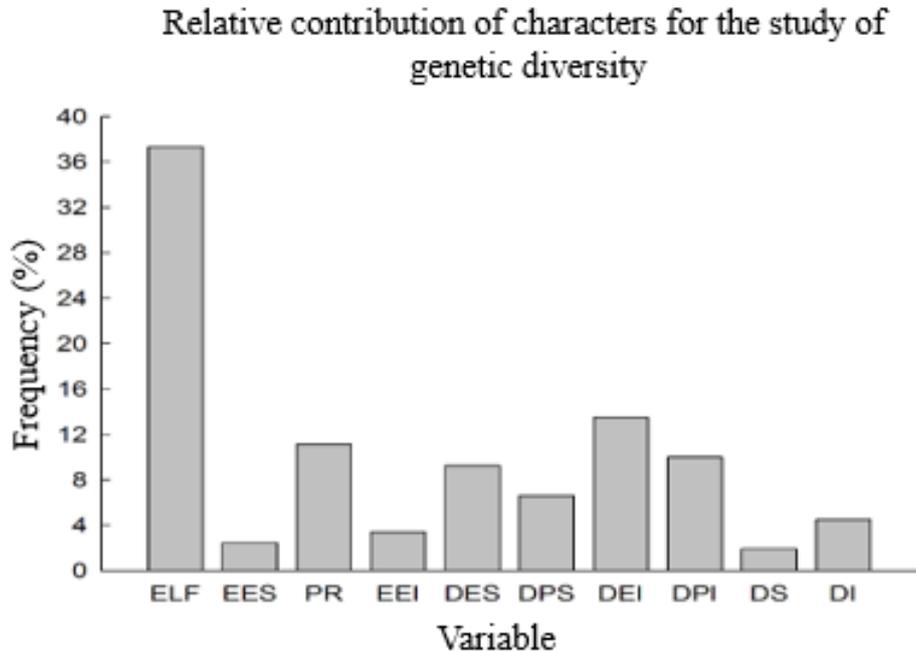
In Table 9, it is observed that the treatment 7 presented the highest values of ELF, ESS, EEI and held until the third position in the ranking for PR, DEI, DS. While the treatment 6 occupied until the second position to ELF, ESS, PR, DPS and DPI. The treatments 1 and 5 occupied the last two positions to ELF, EES, PR, EEI, DES, DPS, DEI and DPI.

Table 9 - Genotypic averages and ranking of treatments for the anatomical characteristics related to leaf blade; leaf blade thickness (ELF), thickness of the upper epidermis (ESS), thickness of the parenchyma (PAR), thickness of the lower epidermis (EEI), equatorial diameter of the stomata in the upper face (DES), polar diameter of the stomata in the upper face (DPS), polar and equatorial diameter of the stomata in the lower face (DEI) and (DPI), stomatal density of the upper surfaces (DS) and lower (DI) of maize leaves collected after a process of chromosome doubling with use of colchicine.

ELF		EES		PAR		EEI		DES	
Trat.	\bar{X} BLUP								
7	0,1375	7	0,0305	6	0,0858	7	0,0234	8	0,0378
6	0,1334	6	0,0284	7	0,0843	3	0,0215	3	0,0075
3	0,1237	2	0,0284	3	0,0761	8	0,0208	1	0,0075
8	0,1211	3	0,0284	8	0,0760	6	0,0189	4	0,0075
2	0,1112	8	0,0261	4	0,0664	2	0,0188	2	0,0075
4	0,1062	4	0,0249	2	0,0654	4	0,0173	7	0,0075
1	0,0954	5	0,0238	1	0,0621	1	0,0160	6	0,0075
5	0,0932	1	0,0218	5	0,0586	5	0,0155	5	0,0075
Aver	0,1152	-	0,0266	-	0,0719	-	0,0190	-	0,0113
DPS		DEI		DPI		DS		DI	
Trat.	\bar{X} BLUP								
8	0,0315	8	0,0433	8	0,0325	5	60,5125	5	110,2138
6	0,0270	3	0,0369	6	0,0284	1	51,5084	1	93,7531
3	0,0260	7	0,0326	3	0,0277	7	51,4221	4	93,4814
5	0,0238	6	0,0320	2	0,0240	6	51,2206	7	82,2563
7	0,0233	1	0,0300	5	0,0235	4	49,0210	6	78,8012
4	0,0233	2	0,0291	4	0,0235	3	46,3618	2	73,8440
2	0,0230	5	0,0288	7	0,0226	2	43,5809	3	70,7177
1	0,0213	4	0,0286	1	0,0214	8	37,8325	8	51,1355
Aver	0,0249	-	0,0326	-	0,0255	-	48,9325	-	81,7754

Source: From author (2018).

Figure 9 The relative importance of the characteristics evaluated in the separation of the valuated materials.



Source: From author (2018).

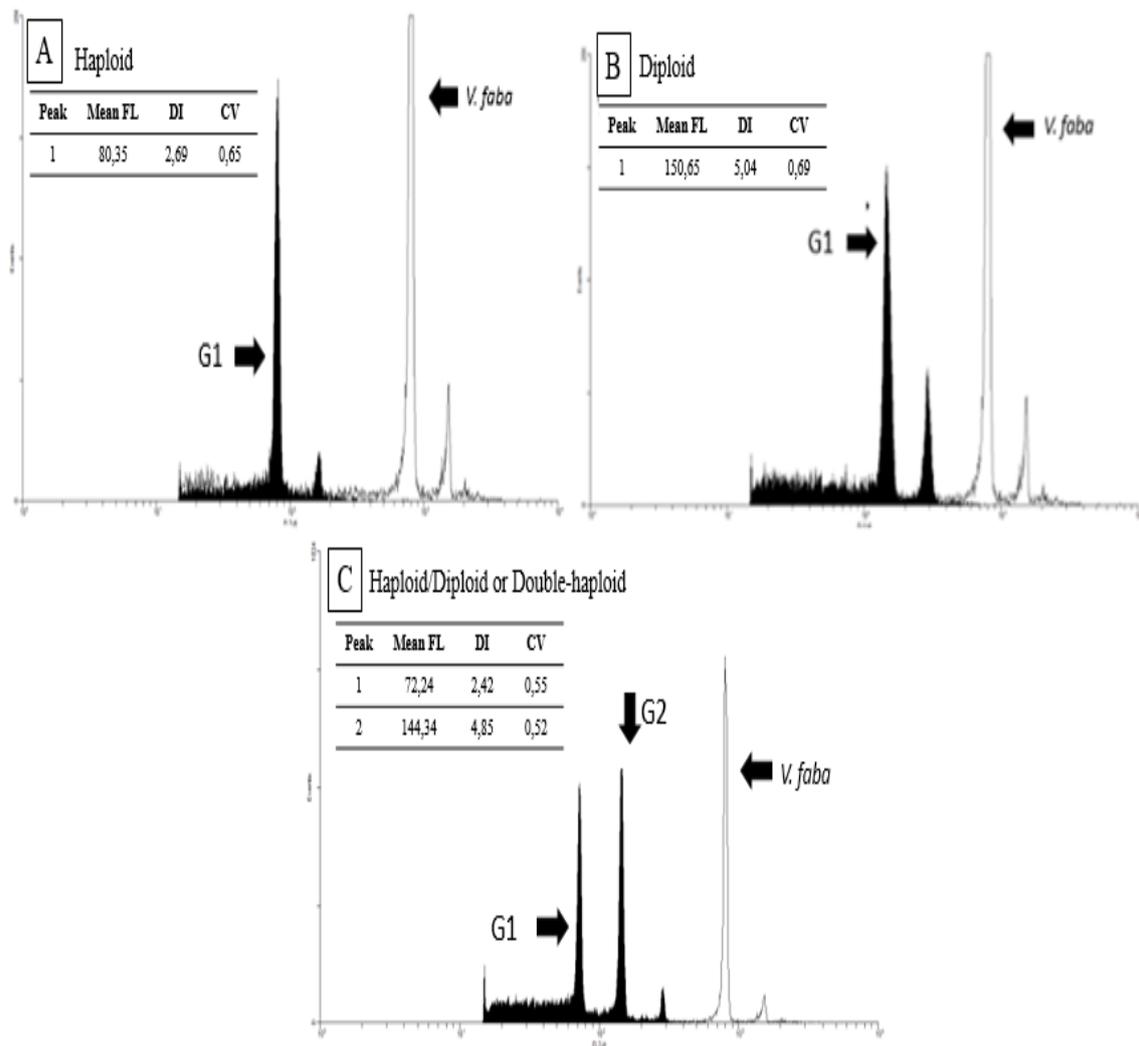
In parallel to the anatomical analyzes and with the aim of inferring the real ploidies observed in the tested materials, the DNA quantification was performed by flow cytometry technique in 32 selected plants (Table 4). The histograms obtained by this method allows for the identification of the ploidy level of the individuals tested through the location of the G1 peak of the sample on the axis of the relative intensity of fluorescence (Figure 10). The dominant peaks generated in the histograms are relative to the quantity of DNA of the cores in the G1 phase of the cell cycle. The estimate of the ploidy level is done by comparing the G1 peaks of the histogram of a sample with the peak of a plant-standard with known ploidy (Dolezel, 1997).

Maixe diploids have the peak G1, located in the region of relative intensity of fluorescence, soon after the mark of 10^2 (Figure 10A). The haploids have lower relative intensity of fluorescence and the peak G1 is located to the left of the mark of 10^2 , i.e., dislocated in the direction of the x axis (Figure 10B). Whereas the triploids and the tetraploids have still greater intensity than the diploids, locating at the right of the mark of 10^2 and with higher peaks (figures not shown). Whereas the Double haploid plants, are those that have ploidies haploid/diploid type (Figure 10C).

Usually, an association of the histogram obtained with a histogram of a standard plan is performed, for example, *Vicia faba*, used by Ribeiro (2016), Battistelli et al. (2013) and

Couto et al. (2015). The use of standard allows to obtain the quantity of DNA contained in the sample.

Figure 10 - Histograms of ploidies detected by flow cytometry in maize plants collected after a process of chromosome doubling with use of colchicine. A. Diploid Plant B. Haploid Plant. C. Double haploid Plant. Vertical axis = number of read cores; horizontal axis = relative intensity of fluorescence. The arrows show the peaks G1 and G2 and the external standard of reference.



Source: From author (2018).

Table 10 - Identificação do nível de ploidia de acordo com a análise de citometria e fluxo, das 32 plantas avaliadas divididas por tratamento.

Treatments	Ploidies found
1	Haploid Haploid Haploid Double haploid
2	Haploid Diploid Diploid Diploid
3	Diploid Diploid Haploid Diploid
4	Haploid Diploid Diploid Haploid
5	Haploid Haploid Haploid Haploid
6	Diploid Diploid Diploid Diploid
7	Diploid Diploid Diploid Diploid
8	Triploid Triploid Diploid Tetraploid

Source: From author (2018).

4 DISCUSSION

It was possible through the analysis of mixed model to verify the existence of variability in the anatomical characteristics, i.e., there is a difference among the tested materials ($P < 0.01$) (Table 1). In addition, these variables showed a quality required for insertion in a breeding program, with the aim of separation of evaluated materials (Silva et al. 2017). The heritability and accuracy obtained were high in accordance with the classification made by Resende (2007) (Table 1). The fact of the evaluated anatomical characteristics have potential for use in selection programs is of extreme importance, since these characteristics

may be associated with the photosynthetic potential of plants, i.e., the productive capacity of plant material, leaves, roots and seeds.

The thickness of the leaf blade (ELF), has a crucial role not only in the capacity of carbon fixation by the chloroplasts of the palisade parenchyma, but also by the internal storage of CO₂ by sponge parenchyma (Martins et al., 2014). While the stomata are the channels of influence of CO and the flow of water vapor. For the plants to be effective, they must balance the gaseous exchanges carried out through these structures to maximize the absorption of CO₂ for photosynthesis and minimize the loss of water through transpiration. Thus increasing the efficiency of the use of the water and consequently the plasticity of the plant in the face of environmental changes. A program that aims at obtaining hybrids with greater adaptive capacity, seems a major bottleneck of agriculture through the global climate changes (Cochrane et al., 2014).

The stomata behavior, therefore, controls the volume of CO₂ in the intercellular spaces of the leaf for photosynthesis. Even if the maize as plant of C₄ metabolism is able through the mechanisms of CO₂ concentration, to maintain an adequate quantity of C for photosynthesis (Taiz and Zaiger, 2015), the stomatal density and the size of the stomata are important characteristics to maximize efficiency. Once that, in spite of the area of the pores of the stomata represent less than 3% of the total area of the leaf, about 98% of all the absorbed CO₂ and water lost occurs by these pores (Lawson et al, 2014).

The anatomical characteristics of the stomata define the stomatal conductance (*g_s*), theoretical maximum (Dow et al., 2014), i.e., the functionality of the same and also influence the speed of response. The *maximum g_s* relates to the size and density of stomata, which can be influenced by the environment of growth (Hetherington and Woodward, 2003; Franks and Farquhar, 2007). However, as in this study, all the plants were grown in the same environment, we can consider that the density and the pattern of size, influenced by the atmospheric concentration of CO₂, water availability (Gray et al., 2000) and light (Gay and Hurd, 1975), varied according to the genetic characteristics of each tested hybrid. This reinforces the importance of the anatomical characters as early markers of separation of hybrids used in this study.

Experimental evidences showed that the density of stomata is negatively correlated with the stomata size (Hetherington and Woodward, 2003; Franks and Beerling, 2009). The interaction/correlation among stomata size and density, and the impact on stomatal function has received much attention, particularly with reference to the evolution of the performance and plasticity in plants (Franks and Farquhar, 2007). Evidence from several studies have also

suggested that smaller stomata respond faster than larger stomata, an observation that has been explained in the context of relations surface-volume and the requirement for ck to boost the movement (Drake et al. 2013).

The selection of plants grown with changes in the density of stomata to increase the performance of plants has been widely exploited (Lawson et al., 2014, Jones, 1977, 1987), with limited success. The increase of the stomatal density can increase the g_s and the photosynthetic rate can become 30% greater in conditions of high brightness (Schlüter et al., 2003).

The increase of photosynthesis can encourage the increase in weight, as already mentioned. Increase in the weight of seed has also been associated with induced polyploidy (Yoon et al., 2016). What can potentiate the vigor and germination of seeds, favoring the formation of a more homogeneous stand. However, the manipulation of functional stomate responses is clearly more complicated, requiring a thorough understanding of the metabolism of the manipulated plant.

The use of these anatomical characteristics of the leaf is widely used for identifying the levels of ploidy in many species of plants, such as alfalfa (Bingham, 1968), *Gossypium* (Krishnaswamy and Andal, 1978), *Dactylis* (Santen and Casler, 1986), the ryegrass (Speckman et al., 1965), wheat (Wang et al., 1989) and *Bromus inermis* (Tan and Dun, 1973; Lea et al., 1977). In coffee the density of stomata decreased while its size increased with an increase in the ploidy level, with the lower density found in the tetraploids and higher in the diploids (Mishra et al., 1997). Genotypic differences in stomatal frequency and length of the guard cells were also observed in barley (Miskin and Rasmussen, 1970), soybean (Chia and Brun, 1975) Triticale (Teare et al., 1971; Sapra et al., 1975). These studies demonstrate the possibility of the use of anatomical markers with mechanism for identification of ploidy.

In the present, it is verified the contribution of the ten variables evaluated in separate studied plants and coincides with what is reported in the literature in relation to the great importance of the stomata. Carefully observing the relative contribution of each trait, it is verified that the variables associated to the stomata represent, altogether, approximately 50% of the contribution of separation (Figure 3).

The high contribution of leaf blade is due to its constitution. The leaf blade is composed by parenchyma, in which chloroplasts and spaces for CO_2 storage are located, in addition of course, all the other components of the leaf. Therefore its relevance is easily understandable and the importance of variables related to the stomata is also evident, reinforcing what is already described in several academic articles.

In addition it is possible to suggest that the anatomic variables, as possible markers were efficient on grouping even partially the hybrids (Tables 2 and 3). Behavior that reinforces what has been described above, where the traits were efficient anatomical markers for various crops. The treatments that showed higher averages for the analyzed variables were classified as diploids (Table 3), in general with averages exceeding the haploids (Table 2).

The increase in ploidy level may be the main driving force to facilitate the plants breeding, as it provides important phenotypic effects, such as increasing the size of the cells and organs, and sometimes a larger force and biomass, and additional molecular and phenotypic variation that may arise soon after the formation of the polyploids. This behavior can be attributed to the effect "gigantism", in which plants with higher ploidy may have increased the size of their structures (Vichiato et al., 2007). The treatments 6 and 7 (diploids), for the characteristics related to leaf blade (ELF and PAR), showed higher averages to the haploids (Table 2). However the effect "gigas" was not observed to hybrids tri and tetraploids, as reported in *bulbophyllum ipanemense* Farinaci (2001).

Significant effects on the ploidy level, and the anatomical and morphological characteristics, such as leaf dry mass and thickness of the epidermis, have already been reported in Brassicas (Baker et al., 2017) and characteristics such as leaf thickness and photosynthetic rate, for rice (Giuliani et al., 2013). The increase in the leaves thickness and total mass of plants may result in greater energy expenditure, however, as the maize is a plant of Kranz anatomy, there is not so much spent on histodifferentiation of juxtaposed layers of palisade parenchyma, since these cells are found around the cells of the sheath of the beam. Therefore the gain in leaf thickness would contribute not only to the increase of the total mass of the leaf, but also to the increase of empty spaces. These spaces play an important role in the CO₂ reserve for photosynthesis and because it does not require energy to histodifferentiation, being less costly in terms of energy.

The size of the cells and the thickness of the components were positively correlated with the ploidy level also in potatoes (Stupar et al., 2007). With the increase of the genome, the gigantism in cells and organs is widely observed and associated with the increments in the photosynthetic rate (Zhou et al., 2015). The increase of photosynthesis is attributed to the increase of the tissues, increased capacity for storage of CO₂, and increase of *gs*. The size of the epidermal cells, cells, can also be associated with the ploidy level of the material under observation (Yoon et al., 2016). In addition to the increase in the activity of multiple enzymes such as hydrolases and expansins (Warner et al. 1987).

The effect "giga" was also related in previous studies with modifications of cell wall through a loosening, which enables a higher rate of growth of plants and phenotypic changes. This loosening is assigned to a higher expression of genes of expansin enzyme in rice (Lee and Choi, 2005; Ma et al., 2013), tobacco (Li et al., 2013; Xu et al., 2014) and Arabidopsis (Hu et al., 2013; Goh et al., 2014). The role of expansins would be to induce the extent of cell wall, generating larger cells, higher plants and longer roots. So in these cases, the cell expansion associated with the ploidy is related to the increase of molecular signaling for synthesis of genes of expansin and may lead to an increase in weight of structures, as in tomato (Cheniclet et al., 2005).

5 CONCLUSIONS

The thickness of the leaf blade and the size of the stomata are highly heritable traits in maize.

The obtained high accuracy validates the anatomical tool through the variables studied in the present work, as a marker in the differentiation of ploidies in maize plants, which may be employed in programs for selection of hybrids.

The anatomy made in young leaves of maize is a non-destructible technique and in conjunction with the technique of flow cytometry, can be used as indirect method in programs to obtain double haploids, in the initial stage of identification of seedlings.

REFERENCES

- Battistelli, G.M., Von Pinho, R.G., Justus, A., Couto, E.G.O., Balestre, M., 2013. Production and identification of doubled haploids in tropical maize. *Maize Genetics and Breeding* 12 (4): 4230-4242.
- Bingham, E.T., 1968. Stomatal chloroplasts in alfalfa at four ploidy levels. *Crop Science*, Madison, v.8, p. 509-510.
- Bordes, J., Charmet, G., de Vaulx, R.D., Pollacsek, M., Beckert, M., Gallais, A., 2006. Doubled haploid versus S1 family recurrent selection for testcross performance in a maize population. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 112, p. 1063-1072.
- Bosabalidis, A.M., Kofidis, G., 2002. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive Cultivars. *Plant Science*. 163: 375-379.
- Chaikam, V., Lopez, L.A., Martinez, L., Burgueño, J., Boddupalli, P.M., 2017. Identification of in vivo induced maternal haploids in maize using seedling traits. *Euphytica*. 213:177.
- Cheniclet, C., Rong, W. Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J. P., Renaudin, J.P., 2005. Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiology*. 139:1984–1994.
- Chia, A.J., Brun, W.A., 1975. Stomatal size and frequency in soybeans. *Crop Science*., 15:309-13.
- Cochrane, J. A., Hoyle, G. L., Yates, C. J., Wood, J., Nicotra, A.B., 2014. Evidence of population variation in drought tolerance during seed germination in four *Banksia* (Proteaceae) species from Western Australia. *Australian Journal of Botany*. 62, 481–489.
- Couto, E.G.O., Pinho, E.V.R.V., Pinho, R.G.V., Veiga, A.D., Bustamante, F.O., Dias, K.O.G., 2015. In vivo haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. *Ciência e agrotecnologia*. vol.39 no.5.
- Couto, E.G.O., Pinho, E.V.R.V., Pinho, R.G.V., Carvalho, M.R., Bustamante, F.O., Nascimento, M.S., 2015. Verification and characterization of chromosome duplication in haploid maize. *Genetics and Molecular Research* 14(2):6999-7007.
- Dang, N.C., Munsch, M., Aulinger, I., Renlai, W., Stamp, P., 2012. Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 183(2):153-160.
- Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., Huylenbroeck, J.V., 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 104:359_373.
- Dolezel, J., 1997. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. In: LELLEY, T. Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement. Vienna : WUV-Universitätsverlag. p.80-90.

- Dow, G.J., Bergmann, D.C., Berry, J.A., 2014. An integrated model of stomatal development and leaf physiology. *New Phytologist*, 201: 1218–1226.
- Drake P.L., Froend, R.H., Franks, P.J., 2013. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany*, 64: 495–505
- Eeckhaut, T.G.R., Werbrouck, S.P.O., Leus, L.W.H., Van Bockstaele, E.J., Debergh, P.C., 2004. Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Vol.78, No.3, pp.241-246.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. *Introduction to quantitative genetics*. Burnt Mill, Harlow, UK.: Longarm.
- Farinaci, J.S., 2001. Variabilidade genética em algumas espécies de *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) de campos rupestres. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia, Campinas, 47 p.
- Franks, P.J., Beerling, D.J., 2009. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 10343–10347.
- Franks, P.J., Farquhar, G.D., 2007. The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant Physiology* 143: 78–87.
- Fritsche-Neto, R., Garbuglio, D. D., Borém, A., 2012. Duplo-haploides. In: Borém, A., Fritsche-Neto, R. (Ed.). *Biotechnologia aplicado ao melhoramento de plantas*. Viçosa, MG: UFV. p. 267-301.
- Gay, A.P., Hurd, R.G., 1975. The influence of light on stomatal density in the tomato. *New Phytologist*, 75: 37-46.
- Giuliani, R., Koteyeva, N., Voznesenskaya, E., Evans, M.A., Cousins, A.B., Edwards, G.E., 2013. Coordination of leaf photosynthesis, transpiration, and structural traits in rice and wild relatives (genus *Oryza*). *Plant Physiology* 162, 1632–1651.
- Goh, H., Sloan, J., Malinowski, R., Fleming, A., 2014. Variable expansin expression in *Arabidopsis* leads to different growth responses, *Journal Plant Physiology*. 171: 329–339.
- Gray, J.E., Holroyd, G.H., Van der Lee, F.M., Bahrami, A.R., Sijmons, P.C., Woodward, F.I., Schuch, W., Hetherington, A.M., 2000. The HIC signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature*. 408(6813):713-6.
- Hetherington, A.M., Woodward, F.I., 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*. 424: 901–908.
- Hu, Y., Zhu, N., Wang, X., Yi, Q., Zhu, D., Lai, Y., Zhao, Y., 2013. Analysis of rice Snf2 family proteins and their potential roles in epigenetic regulation. *Plant Physiology Biochemistry*. 70 33–42.

- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill, 523 p.
- Jokela, A., Sarjala, T., Huttunen, S., 1998. The structure and hardening status of Scots pine needles at different potassium availability levels. *Trees* 12 , 490–498.
- Jones, H.G., 1977. Transpiration in barley lines with differing stomatal frequencies. *Journal of Experimental Botany*. 23: 162–168.
- Jones, H.G., 1987. Breeding for stomatal characters. In E Zeiger, GD Farquhar, IR Cowan, eds, *Stomatal Function*. Stanford University Press, Stanford, CA, pp 431–443.
- Krishnaswami, R., Andal, R., 1978. Stomatal chloroplast number in diploids and polyploids of *Gossypium*. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences, B* 87 : 109 – 112.
- Lambers, H., Chapin, F.S., Pons, T.L., 1998. *Plant physiological ecology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Lawson, T., Blatt, M.R., 2014. Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiology*. 164: 1556–1570.
- Lea, H.Z., Dunn, G.M., Koch, D.W., 1977. Stomatal diffusion resistance in three ploidy levels of smooth bromegrass. *Crop Science*. 17, 91-93.
- Lee, Y., Choi, D., 2005. Biochemical Properties and Localization of the β -Expansin OsEXPB3 in Rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular and Cells*, vol. 20, No. 1, pp. 119-126.
- Li, F., Han, Y., Feng, Y., Xing, S., Zhao, M., Chen, Y., Wang, W., 2013. Expression of wheat expansin driven by the RD29 promoter in tobacco confers waterstress tolerance without impacting growth and development. *Journal of Biotechnology*. 163, 281–291.
- Ma, N., Wang, Y., Qiu, S., Kang, Z., Che, S., Wang, G., Huand, J., 2013. Overexpression of Os EXPA8, a root-specific gene, improves rice growth and root system architecture by facilitating cell extension. *Plos One* 8:e75997.
- Martins, S.V.C., Galmés, J., Cavatte, P.C., Pereira, L.F., Ventrella, M.C., DaMatta, F.M., 2014. Understanding the low photosynthetic rates of sun and shade coffee leaves: Bridging the gap on the relative roles of hydraulic, diffusive and biochemical constraints to photosynthesis. *Plos One* 9, e95571.
- Melchinger, A.E., Schipprack, W., Würschum, T., Chen, S., Technow, F., 2013. Rapid and accurate identification of in vivo-induced haploid seeds based on oil content in maize. *Scientific Reports* v3:2129.
- Mishra, M.K., 1997. Stomatal Characteristics at Different Ploidy Levels in *Coffea* L. *Annals of Botany*, v. 80, n. 5, p.689–692.
- Mishkin, M.K., Rasmussen, D.C., 1970. Frequency and distribution of stomata in barley. *Crop Science*. 10: 575-578.
- O'Brient, T., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *O Protoplasma*. 59, 367-373.

- Oksanen, E.J., 2001. Increasing tropospheric ozone level reduced birch (*Betula pendula*) dry mass within a five years period. *Water, Air and Soil Pollution*, v.130, p.947-952.
- Oksanen, E., Häikiö, E., Sober, J., Karnosky, D., 2004. Ozone-induced H₂O₂ accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. *New Phytologist*, 161, 791–799.
- Padoan I, D., Mossad I, A., Chiancone I, B., Germana I, M.A., Khan, P.S.S.V., 2013. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, v.25 no.4.
- Prasanna, B.M., Chaikam, V., Mahuku, G., 2012. Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice. CIMMYT, Mexico.
- Ramalho, M., Santos, J.B., Pinto, C.B., 2008. *Genética na agropecuária UFLA, Lavras*, 463p.
- Ren, R., Wu, P., Tian, X., Lübberstedt, T., Chen, S., 2017. QTL mapping for haploid male fertility by a segregation distortion method and fine mapping of a key QTL qhmf4 in maize, v.130, 7, pp 1349–1359.
- Resende, M.D.V., Duarte, J.B., 2007. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 37, n. 3, p. 182–194.
- Resende, M.D.V., 2002. *Genética biométrica e estatística: no melhoramento de plantas perenes*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.
- Resende, M.D.V., 2007. *Software SELEGEN – REML/BLUP: Sistema estatístico e seleção computadorizada via modelos lineares mistos*. Embrapa Florestas, Colombo, 359p.
- Ribeiro, C.B., 2016. *Estratégias para obtenção de duplo-haploides e progênes indutoras de haploidia em milho*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 104 p.
- Rocha, S., 2014. *Caracterização de híbridos triploides espontâneos de citros*. Dissertação de mestrado. Instituto Agrônomo de Campinas- IAC, Campinas, SP, 46p.
- Santen, E.V., Casler, E.V., 1986. Evaluation of indirect ploidy indicators in *Dactylis C.* subspecies. *Crop Science*. 26:848–852.
- Sapra, V.T., Hughes, J.L., Sharma, G.C., 1975. Frequency, size and distribution of stomata in triticale leaves. *Crop Science*. 15: 356-358.
- Schifino-Wittmann, M.T., Dall’Agnol, M., 2003. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas, *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, v. 9, n. 1-2, p. 155-164.
- Schluter, U., Muschak, M., Berger, D., Altmann, T., 2003. Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. *Journal of Experimental Botany*, v. 54, n. 383, p. 867-874.

Silva, M.R., Pinheiro, R.V., Christoforo, A.L., Panzerad, T.H., Lahr, F.A.R., 2017. Hybrid Sandwich Particleboard Made with Sugarcane, Pínus Taeda Thermally Treated and Malva Fibre from Amazon, *Materials Research*, vol.21 no.1 .

Speckmann, J., G.J. PostJr, J., Dijkstra, H., 1965. The length of stomata as an indicator for polyploidy in rye-grasses. *Euphytica*. v.14, n.3, pp 225–230.

Stupar, R.M., Bhaskar, P.B., Yandell, B.S., Rensink, W.A., Hart, A.L., Ouyang, S., Veilleux, R.E., Busse, J.S., Erhardt, R.J., Buell, C.R., Jianget, J., 2007. Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics* ,176, 2055–2067.

Taiz, L., Zeiger, E., 2015. *Plant Physiology*, 5.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 782 p.
Tan, G.Y., Dunn, G., 1973. Relationship of stomatal length and frequency and pollen grain diameter to ploidy level in *Bromus inermis leyss*. *Crop Science* 13: 332-334.

Teare, I.D., Peterson, C.J., Law, A.G., 1971. Size and frequency of leaf stomata in cultivars of *Triticum aestivum* and other *Triticum* species. *Crop Science*., 11: 496-498.

Vichiato, M.R.V., Vichiato, M., Moacir, P., Castro, D.M., Dutra, L.F., 2007. Indução e identificação de tetraplóides em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) *Revista Ciência Agronômica*, v.38, n.4, p.385-390.

Wang, Z.Y., Khan, W.A., Bickers, D.R., Mukhtar, H., 1989. Protection against polycyclic aromatic hydrocarbon-induced skin tumor initiation in mice by green tea polyphenols. *Carcinogenesis* 10: 411–415.

Warner, D.A., Ku, M.S., Edwards, G.E., 1987. Photosynthesis, leaf anatomy, and cellular constituents in the polyploid C(4) grass *Panicum virgatum*. *Plant Physiology*, 84:461–466.

Xu, Q., Xu, X., Shi, Y., Xu, J., Huang, B., 2014. Transgenic tobacco plants overexpressing a grass PpEXP1 gene exhibit enhanced tolerance to heat stress. *Plos One* 9:e100792.

Yoon, S., Aucar, S., Hernlem, B.J., Edme, S., Palmer, N., Sarath, G., Mitchell, R., Blumwald, E., Tobias, C.M., 2017. Generation of Octaploid Switchgrass by Seedling Treatment with Mitotic Inhibitors. *BioEnergy Research*. v.10, n.2, pp 344–352.

Zhou, Y., Kang, L., Liao, S., Pan, Q., Ge, X., and Li, Z., 2015. Transcriptomic analysis reveals differential gene expressions for cell growth and functional secondary metabolites in induced autotetraploid of Chinese woad (*Isatis indigotica* Fort.). *Plo One* 10(3): e0116392.

Zsogon, A., Negrini, A.C.A., Peres, L.E.P., Nguyen, H.T., Ball, M.C., 2014. A mutation that eliminates bundle sheath extensions reduces leaf hydraulic conductance, stomatal conductance and assimilation rates in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Phitologisty*. 205: 618–626.