

**OBTENÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
DE HAPLÓIDES ANDROGENÉTICOS EM MILHO**

**PEDRO RADI BELICUAS**

**2004**

58497

049957

**PEDRO RADI BELICUAS**

**OBTENÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
HAPLÓIDES ANDROGENÉTICOS EM MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de  
Processos Técnicos da**

**Biblioteca Central da UFLA**

Belicuas, Pedro Radi

Obtenção, identificação e caracterização de haplóides androgenéticos em milho  
/ Pedro Radi Belicuas. -- Lavras : UFLA, 2004.

52 p. : il.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Milho. 2. Haplóide androgenético. 3. Gametófito indeterminado - Ig. 4. Distância genética. 5. Marcadores SSR. 6. Citometria de fluxo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.15

-630.24

**PEDRO RADI BELICUAS**

**OBTENÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
HAPLÓIDES ANDROGENÉTICOS EM PLANTAS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Agroquímica / Agrobioquímica, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 06 de agosto de 2004.

Dr. Edilson Paiva

Embrapa Milho e Sorgo

Prof. Wilson Roberto Maluf

UFLA

Dra. Claudia Teixeira Guimarães

Embrapa Milho e Sorgo



Prof. Luciano Vilela Paiva  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

## **DEDICO**

**Aos meus pais, Miguel Antonio Belicuas e Maria Radi Belicuas pelo amor, amizade, apoio, incentivo, confiança e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos de minha vida.**

**Amo vocês.**

## **OFEREÇO**

**Aos meus pais, Miguel e Maria, às minhas irmãs, Andréa e Fabiana, à minha afilhada Giulia e aos meus sobrinhos Caio e Pedrinho, que mesmo distantes, estão sempre torcendo por mim.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química por propiciarem o desenvolvimento dos meus estudos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Luciano Vilela Paiva, pelo apoio, por me orientar e por abrir diversas portas em minha vida profissional.

Ao Dr. Edilson Paiva pelos ensinamentos transmitidos, apoio e total liberdade na condução dos experimentos e pela oportunidade desse trabalho.

À Dra. Cláudia Teixeira Guimarães, pelo convívio, pelos conhecimentos passados e pela ajuda nas análises.

Ao Dr. Jair Moura Duarte pelas valiosas sugestões e correções que, sem dúvida, ajudaram a enriquecer este trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto de Carvalho pelo valioso auxílio nas análises de citometria de fluxo.

À Sissi, uma pessoa muito especial, pelo carinho, compreensão, amizade, cumplicidade e também pelas sugestões, correções e por tornar minha vida muito mais agradável.

À EMBRAPA Milho e Sorgo por possibilitar a execução deste trabalho.

Aos pesquisadores do CNPMS, Doutores: Newton, Lilian, Sidney, Jurandir, Ivanildo pelos ensinamentos e pelo apoio.

À dupla Bira e Lili, pela amizade, convivência, pelos momentos agradáveis e pela paciência nos "raros" momentos de mau-humor.

Aos amigos do NBA, Valicente, Edna, Célio, Ivana, Cíntia, Fernanda, Marcus, Ana Luiza, Jaciara, Wanderson, Nate, Martineli e Denise pelo convívio agradável. Ao Bira e ao Miguel pelos ensinamentos e pela ajuda fundamental na realização dos ensaios.

À estagiária Ana Carolina pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do LCBM, Magnólia, Marcelo, Nilson, Juliana, Daniela, Paula, Sanzio e Anderson.

Aos colegas do laboratório de sementes do CNPMS, Toniquinho e Mônica pela ajuda na germinação das sementes.

Aos amigos de república Petterson e Patrick e aos amigos Paulão e Nilson pelo convívio de vários anos, ajuda, incentivo, colaboração e companheirismo.

Aos amigos da Agroquímica, Paulão, Priscila, João, Ana Paula, Miriam e Xulita.

Aos professores do Departamento de Química, em especial aos amigos Mauro e Guerreiro.

Aos amigos Zuleide, Anne, Ruy, Cleiton, pelo convivência harmoniosa durante esse período.

A todos que estiveram presentes e contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	03
2.1 Importância do milho híbrido .....	03
2.2 Obtenção de linhagens endogâmicas .....	04
2.3 Sistema gametófito indeterminado ( <i>ig</i> ).....	07
2.4 Utilização de marcadores moleculares no melhoramento vegetal.....	09
2.4.1 Marcadores SSR ou microsatélite .....	11
2.4.2 Uso de marcadores SSR para o estudo de distância genética .....	13
2.5 Citometria de fluxo .....	13
2.5.1 Análise de ploidia com o citômetro de fluxo .....	14
2.6 Contagem cromossômica .....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1 Obtenção de haplóides .....	18
3.2 Contagem cromossômica .....	19
3.3 Extração do DNA.....	21
3.4 Marcadores SSR.....	22
3.4.1 Seleção dos marcadores SSR.....	22
3.4.2 Marcadores SSR fluorescentes .....	23
3.5 Citometria de fluxo .....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1 Obtenção de haplóides .....	27

4.2 Contagem cromossômica .....	28
4.3 Modificação do método de extração de DNA.....	30
4.4 Teste de haploidia com marcadores SSR.....	31
4.5 Validação do diagnóstico dos marcadores SSR.....	32
4.5.1 Contagem cromossômica .....	34
4.5.2 Citometria de fluxo .....	34
4.6 Marcador morfológico e características das plantas haplóides ..	34
4.7 Distância genética .....	41
5 CONCLUSÕES .....	46
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

## RESUMO

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

O processo tradicional de obtenção de híbridos envolve a geração de linhagens endogâmicas que são obtidas por autofecundações sucessivas. Uma das alternativas disponíveis para este processo na cultura do milho é a técnica de obtenção de linhas homozigóticas instantâneas pelo uso de haplóides duplicados utilizando uma mutação conhecida como gametófito indeterminado (*ig*) que, entre outros efeitos, gera haplóides de origem paterna. Com o objetivo de avaliar o processo de obtenção de linhagens homozigóticas a partir de linhagens indutoras de haploidia nas condições tropicais de cultivo, e comparar os métodos de confirmação de haplóides verificando a eficiência e aplicabilidade dos mesmos, foram realizados cruzamentos entre a linhagem W23♀, que carrega o gene *ig*, e o híbrido simples BRS1010♂. As sementes obtidas desses cruzamentos foram separadas conforme o marcador morfológico indicador de haploidia (endosperma roxo, embrião descolorido) e germinadas sob condições controladas. O teste de identificação de haplóides foi realizado com dois marcadores microssatélites (SSR) (mmc0021 e mmc0081) previamente selecionados como polimórficos entre os parentais do cruzamento. Quatro indivíduos foram identificados via SSR como haplóides entre os 462 indivíduos que apresentavam o marcador fenotípico indicador de haploidia. A haploidia destes quatro indivíduos foi confirmada pela contagem cromossômica e pela citometria de fluxo. As quatro plantas haplóides apresentaram fenótipo característico, pelo tamanho reduzido, entretanto, algumas plantas diplóides também apresentaram o mesmo fenótipo semelhante aos haplóides, o que demonstra que a seleção fenotípica tanto da semente quanto da planta no campo é de baixa eficiência não discriminando bem os indivíduos. Para a exata identificação dos haplóides os marcadores SSR se mostraram eficientes e de maior aplicabilidade em relação à contagem cromossômica e à análise por citometria de fluxo. O estudo de distância genética foi realizado para verificar se durante o processo de geração de indivíduos haplóides a distribuição dos alelos das plantas que deram origem a esses haplóides ocorreu ao acaso. Para tanto, foi realizada a genotipagem das linhagens genitoras do híbrido e dos haplóides gerados, utilizando 13 marcadores SSR marcados com fluorescência.

---

\* Comitê Orientador: Dr. Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Dr. Edilson Paiva (Co-Orientador) – Embrapa Milho e Sorgo, Dra Cláudia Teixeira Guimarães – Embrapa Milho e Sorgo, Dr. Jair Moura Duarte – Syngenta Seeds.

Observou-se que dois dos quatro haplóides apresentaram distribuição dos alelos semelhante ao híbrido ficando a uma distância genética de aproximadamente 50% das linhagens originais do híbrido. Os outros dois haplóides gerados apresentaram uma composição alélica mais próxima de uma das linhagens que originaram o híbrido divergindo geneticamente em 17% e 33% desta linhagem. Estes dados mostram que a distribuição dos alelos no momento da geração dos haplóides ocorreu aleatoriamente seguindo, aparentemente, uma distribuição normal, em que dois dos haplóides obtidos apresentaram constituição genética bem próxima a uma das linhagens que deu origem ao híbrido.

## ABSTRACT

**BELICUAS, P. R. 2004. Generation, identification and characterization of androgenetic haploids in maize. 52p Dissertation (Master in Agronomy - Agrochemistry / Agrobiochemistry) – Federal University of Lavras, Lavras MG.**

The traditional process of obtaining hybrids involves inbred lines generation in which successive selfing is accomplished. One of the available alternatives for this process in maize breeding culture is the technique of instantaneous inbred lines obtained through the use of doubled haploids using a mutation known as indeterminate gametophyte (*ig*) that, among other effects, generates paternal haploids. In order to evaluate, under tropical conditions, the process of obtaining homozygotic lines starting from inducer lines and to compare the efficiency and applicability of haploid identification methods, crossings were made among the inbred line W23♀, which carries the *ig* gene, and the single-cross hybrid BRS1010♂. The seeds obtained from those crossings were separated according to the morphologic marker haploid indicator (purple endosperm, colorless embryo) and germinated under controlled conditions. The test for haploid identification was carried out with two microsatellite markers (SSR) (mmc0021 and mmc0081) previously selected as polymorphic among the crossing parents. Four individuals were identified as haploids through SSR among the 462 individuals that presented the indicative morphologic marker of haploidy. Haploidy of the four individuals was confirmed by counting chromosomes and by flow cytometry. The four haploid plants presented a characteristic reduced size. However, some diploid plants also presented reduced size phenotypes similar to the haploids, showing that the phenotypic seed selection as well as plant selection of reduced size presented a low efficiency. For accurate haploid identification the SSR markers proved to be more efficient and practical when compared to the chromosomes counting and flow cytometry analysis. A genetic distance study was carried out with the objective of finding if, in the process of generating haploid individuals, there was a random distribution of the alleles of the plants that gave origin to them. For that, a fingerprinting of hybrid genitor lines and of the generated haploids was made using 13 SSR markers. It was observed that two out of four haploids presented a similar allele distribution to those of the hybrid, with a genetic distance of approximately 50% of the original hybrid lines. The other two generated

---

\* Guidance Committee: Dr. Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Dr. Edilson Paiva (Co-adviser) – Embrapa Milho e Sorgo, Dra. Cláudia Teixeira Guimarães – Embrapa Milho e Sorgo, Dr. Jair Moura Duarte – Syngenta Seeds.

haploids presented an allelic composition closer to one of the lines that originated the hybrid, diverging genetically in 17% and 33% of that line. These data showed that allele distribution in the moment of the generation of the haploids happens at random apparently being followed by a normal distribution, in which two of the obtained haploids presented very close genetic constitution to one of the lines that generated the hybrid.

# 1 INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos dos melhoristas de plantas é o aumento de produtividade das culturas e nessa busca uma das metodologias mais utilizadas é o emprego da superioridade dos genótipos heterozigóticos em relação aos demais, ou seja, o aproveitamento do vigor híbrido. A cultura do milho exemplifica bem este fato. A partir da descoberta do milho híbrido, no início do século passado, sua adoção pelos agricultores americanos foi bastante rápida, sendo atualmente cultivado em praticamente 100% das áreas comerciais dos EUA. O ganho em produtividade obtido com a substituição das variedades tradicionais pelos híbridos nos EUA foi extraordinário. No Brasil, o segundo país a adotar híbridos de milho, aconteceu o mesmo.

Apesar do grande sucesso no emprego dos híbridos, algumas etapas de sua obtenção são bastante trabalhosas. O processo tradicional de produção envolve a geração de linhagens endogâmicas obtidas por autofecundações sucessivas.

Uma alternativa para a geração de linhagens endogâmicas disponível na cultura do milho é a técnica de obtenção de linhagens homozigóticas instantâneas pelo uso de haplóides duplicados (di-haplóides). Kermicle (1969) relatou a ocorrência de uma mutação espontânea que ele chamou de gametófito indeterminado (*ig*) na linhagem Wisconsin-23 (W23). Os haplóides gerados por influência deste alelo *ig* são de origem paterna, ou seja, são androgenéticos. No processo de fecundação o núcleo espermático inicia o processo de divisão celular no citoplasma da célula ovo em detrimento ao núcleo da oosfera, formando um embrião haplóide.

A grande vantagem deste método é a diminuição no tempo de obtenção das linhagens homozigóticas, ficando esta economia em torno de três a quatro

gerações em relação ao método tradicional. Outra vantagem é a redução de área utilizada assim como uma menor demanda de mão de obra e de recursos para a obtenção das linhagens.

A correta identificação dos indivíduos haplóides e duplo-haplóides é uma etapa fundamental no processo. Esta identificação pode ser realizada por meio de marcadores morfológicos de coloração que são expressos nas sementes, contudo a expressão desse marcador é fortemente influenciada pelo ambiente. Para a exata confirmação da geração destes haplóides podem ser utilizadas técnicas alternativas como contagem cromossômica, citometria de fluxo e marcadores moleculares.

A contagem cromossômica é uma técnica antiga que não necessita de equipamentos e reagentes de alto custo, contudo exige habilidade na confecção das lâminas, além de ser uma técnica bastante trabalhosa e demorada. A citometria de fluxo é uma técnica relativamente nova, bastante precisa e que permite a quantificação de dezenas de amostras por dia, porém tem como desvantagem a necessidade do citômetro de fluxo e o elevado custo das análises. Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites representam uma importante ferramenta na identificação dos haplóides, uma vez que são multialélicos e co-dominantes, já se possui, publicamente disponível, um elevado número deles identificados para o milho. Além disso, é uma técnica simples, rápida e precisa, pois acessa diretamente o genótipo não sofrendo influência do ambiente.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o processo de obtenção de linhagens homózigóticas a partir de uma linhagem indutora de haploidia nas condições tropicais de cultivo, e comparar os métodos de confirmação de haplóides verificando a eficiência e a aplicabilidade dos mesmos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância do milho híbrido

A superioridade dos genótipos heterozigotos em relação aos demais foi descoberta na cultura do milho no início do século XX. A partir de então vários estudos foram conduzidos viabilizando a produção e utilização comercial de sementes híbridas de milho. A técnica de exploração do vigor híbrido por meio de cruzamentos de linhagens complementares com alta endogamia proporcionou ao milho híbrido lugar de destaque entre as contribuições da ciência para a sociedade, tendo contribuído para expressivos aumentos na produtividade dessa importante gramínea em todo o mundo (Sprague & Dudley, 1988; Hallauer, 1990).

Nos EUA, onde existe o maior número de relatos sobre a estimativa da contribuição dos híbridos para a cultura do milho, o aumento de produção observado foi extraordinário, passando de 25 milhões de toneladas em 1870, para 75 milhões em 1906 e alcançando cerca de 150 milhões de toneladas já em 1976. Em 1999, os EUA já produziam mais de 220 milhões de toneladas de milho, gerando uma renda anual de 20 bilhões de dólares (Troyer & Mascia, 1999). Hoje a produção americana já passa de 280 milhões de toneladas. Em termos de produtividade, a média americana antes de 1930 era de aproximadamente 2000 kg/ha, passando para cerca de 6200 kg/ha na década de 80. Desse aumento, 58% foram atribuídos aos ganhos proporcionados pelo melhoramento genético do milho (Cardwell, 1982). No Brasil os resultados sobre a contribuição do melhoramento genético do milho também são expressivos, mostrando ganhos genéticos superiores a 1% ao ano (Fernandes & Franzon, 1997; Arias & Ramalho, 1998).

## 2.2 Obtenção de linhagens endogâmicas

Apesar do grande sucesso no emprego dos híbridos, algumas etapas de sua obtenção são bastante elaboradas e onerosas, podendo em alguns casos, inviabilizar o seu emprego, especialmente para pequenas empresas. Inicialmente é preciso enfatizar que numa população de plantas alógamas, como o milho, todos os indivíduos são geneticamente equivalentes a híbridos simples, pois são oriundos da união ao acaso de dois gametas de indivíduos diferentes. Assim, a produção de cada planta, isto é, dos diferentes indivíduos geneticamente equivalentes a híbridos simples, segue uma distribuição normal. A perpetuação das combinações que se situam na extremidade superior da distribuição é o objetivo da técnica de híbridos simples. Para isto, uma possibilidade seria a utilização da propagação vegetativa, que em milho não é uma opção viável em virtude do grande número de plantas requeridas por área a ser cultivada, e pela dificuldade de se propagar milho vegetativamente. Desse modo, uma alternativa seria a produção de linhagens endogâmicas complementares que permitam a obtenção contínua da combinação híbrida desejada.

O método denominado padrão é o mais utilizado na obtenção de linhagens endogâmicas, sendo os demais variações deste (Paterniani & Campos, 1999). Nesse método é realizada uma autofecundação da população fonte de linhagens, os descendentes de cada planta autofecundada são semeados em linhas formando uma família, seleciona-se visualmente as melhores famílias e escolhem-se os melhores indivíduos dentro dessas famílias para serem novamente autofecundados. O processo se repete até se atingir a homozigose relativamente completa em  $S_6$ , ou em geração mais avançada de autofecundação (Miranda Filho & Viégas, 1987).

O método genealógico é usado nos casos em que a seleção é efetuada dentro de uma população derivada de duas linhagens previamente selecionadas,

de acordo com a capacidade combinatória, seguido da aplicação do método padrão. Além de muito trabalhosos, esses métodos demandam ampla utilização de mão de obra e área de terra para sua realização.

Uma alternativa disponível na cultura do milho é a técnica de obtenção de linhagens homozigóticas instantâneas pelo uso de haplóides duplicados (di-haplóides). Esse método tem sido estudado, pois representa uma forma de reduzir o tempo de obtenção de linhagens em duas a três vezes em relação aos métodos tradicionais. Os haplóides em milho ocorrem naturalmente a uma taxa menor que um para cada mil sementes formadas (Chase, 1963), contudo alguns métodos podem ser utilizados para aumentar sua freqüência. Um desses métodos baseia-se no uso de linhagens indutoras, que podem gerar haplóides maternos ou paternos, dependendo do tipo de linhagem empregada. É uma metodologia de baixo custo que não depende do uso de reagentes ou equipamentos caros. Outro método utiliza a cultura de anteras para a geração de haplóides, porém este é um método mais elaborado, portanto mais trabalhoso, de menor expressão com relação à quantidade de haplóides gerados e de custo mais elevado (Shatskaya et al., 1994).

Grande parte das linhagens indutoras conhecidas atualmente são derivadas de duas outras linhagens, a W23 (Kermicle, 1969) que gera haplóides androgenéticos e a Stock 6 (Coe, 1959) que gera haplóides gimnogenéticos. Essas linhagens induzem em torno de 3% de plantas haplóides dependendo da constituição genética a qual elas são submetidas. O mecanismo de indução de haplóides ainda não é bem compreendido (Eder & Chalyk, 2002; Rotarenco & Eder, 2003), porém várias hipóteses têm sido relatadas para explicar a geração de haplóides de origem materna (Chase, 1969; Bylich & Chalyk, 1996; Kato, 1999; Rotarenco & Eder, 2003). Para a identificação dos haplóides pode-se utilizar um sistema de marcador morfológico de pigmentação com antocianina amplamente descrito por Nanda & Chase, (1966). Nesse sistema o gene R-

navajo (*R1-nj*) é utilizado para distinguir haplóides de diplóides, pois ele promove uma pigmentação tanto no endosperma quanto no embrião (Figura 1A). Sementes que apresentam coloração roxa no endosperma e com o embrião descolorido são selecionadas como haplóides (Figura 1B).

O endosperma é um tecido triplóide, sendo um conjunto haplóide do genoma do parental masculino e dois do feminino. Já o embrião é um tecido diplóide. Como o marcador é dominante, em um cruzamento ele sempre será expresso no endosperma e, no caso de um embrião haplóide, o marcador não estará presente, pois este tipo de embrião não contém o genoma da linhagem indutora que carrega o alelo R-navajo.

Alguns estudos foram realizados para se obter linhagens capazes de induzir a haploidia em taxas maiores, entre eles Lashermes et al. (1988); Shatskaya et al. (1994); Chalyk (1999) e Eder & Chalyk (2002). Esses autores relatam ter conseguido linhagens que induzem até 10% de haplóides maternos ou gimnogenéticos, porém com grande variação de acordo com o genótipo materno empregado. Através de uma modificação na linhagem W23, formando um trissômico terciário, Kindiger & Hamann (1993) aumentaram a frequência de indução de haplóides androgenéticos para até 8%.

Todos esses resultados mostram que é viável gerar haplóides através de linhagens indutoras, contudo esses trabalhos foram conduzidos com genótipos selecionados em condições temperadas de cultivo e não foram encontrados dados na literatura referente à indução de haploidia com genótipos tropicais de milho. Essas linhagens indutoras temperadas têm muita dificuldade de adaptação e cultivo em regiões tropicais, o que constitui uma séria limitação à sua utilização em larga escala nas nossas condições.

O sistema de indução de haploidia tem sido bastante empregado em empresas privadas para obtenção de linhagens macho-estéreis de forma bastante

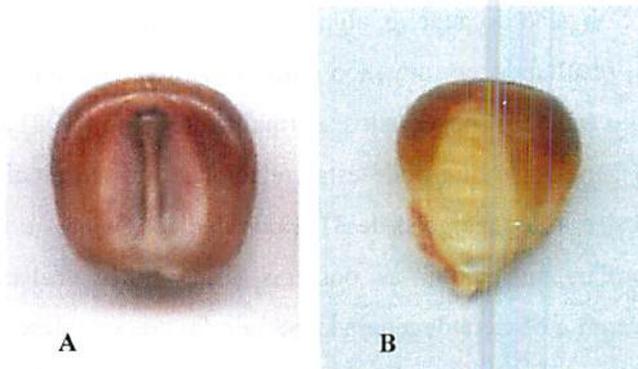


FIGURA 1. Padrão de coloração do marcador morfológico controlado pelo sistema R-navajo. (A) endosperma e embrião roxo (B) endosperma roxo e embrião sem coloração, indicando haploidia.

rápida. Os citoplasmas macho-estéreis de interesse foram introgrididos na linhagem W23. Com apenas duas gerações de cruzamento, os haplóides identificados constituem as linhagens originais com o adicional do citoplasma macho-estéril recebido do genitor materno.

### 2.3 Sistema gametófito indeterminado (*ig*)

Kermicle (1969) relatou a ocorrência de uma mutação espontânea que ele chamou de gametófito indeterminado (*ig*) na linhagem Wisconsin-23 (W-23) de milho. Os haplóides gerados por influência deste alelo *ig* são de origem paterna, ou seja, são androgenéticos. Esse gene está localizado no braço longo do cromossomo três a 90 cM do locus *lg*<sup>2</sup>, o mais distal do braço curto (Kermicle & Demopulos-Rodriguez, 1980) e causa algumas alterações no desenvolvimento do saco embrionário.

Em uma megasporogênese normal, ocorrem três mitoses sucessivas, resultando em um órgão reprodutivo com oito núcleos chamado de saco

embrionário. Sob ação do gene *ig*, algumas megasporogêneses sofrem quatro ou mais mitoses, resultando em um saco embrionário com 16 núcleos ou mais ao invés dos oito núcleos observados normalmente (Lin, 1981). Outro efeito causado pelo gene *ig*, e que pode estar relacionado à ocorrência de haplóides androgenéticos, é a degeneração de 31% dos núcleos polares e dos núcleos da região micropilar, que inclui as oosferas (Lin, 1981). Talvez esses sacos embrionários com a oosfera degenerada possam favorecer o desenvolvimento de um núcleo reprodutivo do grão de pólen sem a ocorrência de fertilização, dando origem a um embrião haplóide.

O mutante *ig* não condiciona um processo em particular. Sua interferência ocorre anteriormente à formação do saco embrionário e altera a atividade de outros genes durante a formação deste, portanto seus efeitos pleiotrópicos parecem ser independentes não tendo relações uns com os outros (Lin, 1981; Huang & Sheridan, 1996).

Huang & Sheridan (1996), utilizando microscopia eletrônica de transmissão, relataram que a divisão dos núcleos na formação do saco embrionário sob ação do *ig* é assíncrona e confirmaram o resultado que indica a ocorrência, em alguns casos, de divisões além da terceira mitose. Essas mitoses adicionais causam uma modificação no nível de ploidia do endosperma em desenvolvimento, ficando este em torno de dois até nove conjuntos haplóides de cromossomos, confirmando a observação feita por Kermicle (1971). Esse último autor também já havia relacionado o elevado nível de ploidia com a formação de endospermas defeituosos.

Como consequência do comportamento anormal durante a divisão dos núcleos e de migrações desordenadas destes dentro do saco embrionário, as células da região micropilar mostram uma grande similaridade, ficando as sinérgidas e as oosferas indistinguíveis em dois terços dos sacos embrionários sob ação do *ig* (Huang & Sheridan, 1996). Entre as várias células desta região, a

maioria funciona como sinérgida na recepção do tubo polínico e do gameta masculino, porém uma ou mais células da região micropilar podem ter a função de oosfera (Huang & Sheridan, 1996), resultando em mais de 6% de casos de poliembrião (Kermicle, 1969). Embora essas células micropilares percam a estrutura característica que distinguem sinérgidas de oosferas, elas aparentemente podem funcionar como ambos os tipos de célula (Huang & Sheridan, 1996). A formação de sementes poliembriônicas e com endospermas defeituosos sofre influência apenas da constituição *ig* do parental feminino (Kermicle, 1971). O contrário é observado no processo de geração de indivíduos haplóides androgenéticos que, além da influência de constituição *ig* do genótipo feminino, sofre forte influência também do genótipo masculino como um todo, independentemente da sua constituição *ig* (Kermicle, 1969; Kindiger & Hamann, 1993).

A formação de sacos embrionários sob ação do gene *ig* tem sido alvo de amplos estudos, contudo pouca informação se tem sobre o mecanismo de indução de haplóides androgenéticos sob o efeito desse gene. Kindiger & Hamann (1993) acreditam que ocorre uma degeneração da oosfera e um conseqüente desenvolvimento do núcleo espermático do grão de pólen no citoplasma da célula ovo formando assim um indivíduo haplóide androgenético, porém ainda não há estudo aprofundado a esse respeito.

#### **2.4 Utilização de marcadores moleculares no melhoramento vegetal**

Os marcadores moleculares representam uma importante ferramenta para o melhoramento de plantas, principalmente os baseados em DNA, pois fornecem um elevado grau de polimorfismo e não são afetados pelas condições ambientais e nem pelo estágio de desenvolvimento da planta, permitindo assim uma identificação precoce e precisa da característica estudada (Lanza et al.,

2000). Por apresentarem ampla capacidade de cobertura do genoma, os marcadores mostram-se como valiosas ferramentas para avaliação da diversidade genética, manutenção dos bancos de germoplasma e seleção de genótipos em programas de melhoramento. Além disso, os marcadores moleculares têm sido utilizados na identificação de cultivares, na proteção dos direitos da propriedade intelectual dos melhoristas, na confirmação da pureza genética e na construção de mapas genéticos (Souza, 2001).

O primeiro marcador de DNA utilizado em plantas foi o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). O polimorfismo é obtido de diferenças no tamanho molecular dos fragmentos de DNA genômico digeridos com enzimas de restrição, e observado por hibridização destes fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A base genética do polimorfismo obtido pelo RFLP resulta de mutações nestes sítios de restrição tais como, inserções, deleções e substituições de bases entre esses sítios (Beckman & Soller, 1986).

Com o advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), divulgada por Karl Mullis, em meados dos anos 80, a biologia molecular sofreu um grande avanço. A técnica baseia-se na amplificação exponencial de fragmentos de DNA a partir de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), que delimitam a seqüência de DNA alvo, na presença da enzima DNA polimerase. Vários tipos de marcadores moleculares são derivados da PCR, o que permitiu avanços significativos das pesquisas nas áreas da genética e da biologia molecular.

Uma das primeiras técnicas baseadas em PCR foi a de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams et al., 1990) que consiste na utilização de *primers* pequenos e de seqüências arbitrárias para estudos genéticos diversos, não necessitando de conhecimento prévio das seqüências de interesse. Os



marcadores RAPD têm sido utilizados em estudos de *fingerprinting* genômicos, na análise da estrutura e da diversidade genética, estudos filogenéticos e na construção de mapas de ligação de ampla cobertura genômica. (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A simplicidade da técnica aliada aos custos reduzidos tornaram-na apropriada para o uso em espécies pouco estudadas geneticamente. As grandes desvantagens desta técnica são a baixa reprodutibilidade em função das condições de amplificação e a natureza dominante do marcador fornecendo baixo conteúdo informativo por loco. Para superar essas desvantagens surgiram outros marcadores como os baseados em SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microsatélites que se destacam por sua confiabilidade, reprodutibilidade, por ser co-dominante, multialélico e de fácil execução (Smith et al., 1997).

#### 2.4.1 Marcadores SSR ou microsatélite

Os microsatélites são sequências de um a seis nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes em *tandem* ao longo da molécula de DNA, amplamente distribuídas nos genomas eucariotos, que são flanqueadas por regiões conservadas (Rafalski et al., 1996). Essas sequências flanqueadoras são amplamente conservadas dentro e entre diferentes espécies do mesmo gênero, possibilitando sua transferência entre espécies.

A identificação dos microsatélites é um processo trabalhoso e de elevado custo, envolvendo a construção de bibliotecas genômicas, seleção de clones contendo os microsatélites, sequenciamento em larga escala desses clones, desenho dos *primers* específicos e sua confirmação por PCR (Rafalski et al., 1996). No entanto, para o milho, um grande número de *primers* SSR devidamente caracterizados e mapeados ao longo de todo o genoma encontram-se publicamente disponíveis no *Maize Genome Database* (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>).

Os locos de microsatélite são altamente variáveis, multialélicos e com um elevado conteúdo informativo de polimorfismo. Os diversos alelos encontrados em locos SSR são resultado de uma variação nos números de elementos simples repetidos nas ilhas de microsatélite, assim cada segmento amplificado de tamanho diferente, representa um alelo diferente do mesmo loco (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Esses marcadores apresentam um elevado poder discriminatório e, normalmente, poucos locos garantem a completa diferenciação dos genótipos de interesse. Li et al. (2001) conseguiram separar 88 das 90 linhagens e cultivares de feijão-caupi estudadas com apenas cinco *primers* de microsatélite. O mesmo número de *primers* SSR foi necessário para Senior et al. (1998) obterem *fingerprintings* únicos para cada uma das 94 linhagens de milho estudadas.

Os microsatélites também são indicados para o estudo de determinação de parentesco mostrando estabilidade ao longo de várias gerações (Russel et al., 1997). Apenas 2,2% de locos com herança não mendeliana foram observados por Smith et al. (1997) ao avaliarem 131 locos microsatélites em 13 conjuntos de genitores e seus respectivos híbridos em milho. Os marcadores SSR são úteis na detecção da heterozigosidade de um loco específico, o que é importante para o acompanhamento da pureza genética e do nível de endogamia em programas de obtenção de linhagens (Smith et al., 1997; Senior et al., 1998; Prasad et al., 2000).

A estabilidade da herança mendeliana dos locos microsatélites e sua codominância, permitindo a fácil identificação dos indivíduos heterozigotos, o torna uma alternativa interessante para diferenciação de indivíduos haplóides dos F<sub>1</sub>s heterozigotos quando da utilização de linhagens indutoras de haploidia para obtenção de linhagens homozigóticas.

## 2.4.2 Uso de marcadores SSR para o estudo de distância genética

Os marcadores moleculares também representam uma importante ferramenta no estudo da diversidade genética. O resultado final dos ensaios com marcadores moleculares é um padrão característico de bandejamento conhecido como *fingerprinting* de DNA ou impressão digital genética. Cada indivíduo possui uma seqüência característica de nucleotídeos que compõem seu DNA. A detecção das diferenças entre essas seqüências por polimorfismo de fragmentos de DNA revela um padrão único, uma impressão digital genética que pode ser usada na identificação de indivíduos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Nesse contexto, os marcadores SSR têm sido utilizado na obtenção de *fingerprinting* de genótipos de milho. Os SSR apresentam um alto grau de polimorfismo, alta precisão, confiabilidade e repetibilidade além de serem de simples execução experimental (Smith et al., 1997; Senior et al., 1998).

Reif et al. (2003) estimaram a distância genética em populações tropicais de milho e concluíram que os marcadores SSR oferecem um confiável e efetivo meio para avaliar diversidade dentro e entre populações de milho. A mesma observação sobre os microssatélites foi feita por Li et al. (2001) ao estudarem a similaridade genética entre cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Padilha (2002) discriminou 35 linhagens de milho com apenas dois locos de microssatélite, ressaltando a eficiência do método.

## 2.5 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi originalmente desenvolvida no final dos anos 50 para a contagem e análise de células sanguíneas. A hematologia e a imunologia celular foram, sem dúvida, as duas áreas da biologia que impulsionaram o desenvolvimento da tecnologia da citometria de fluxo (Côrte-

Real et al. 2002). Devido à evolução dos aparelhos e ao surgimento de novas moléculas fluorescentes, a citometria de fluxo foi expandida para outras áreas como a citogenética vegetal e microbiana (Dolezel, 1997).

A técnica de citometria de fluxo envolve a análise das propriedades óticas de partículas, como dispersão da luz e fluorescência, tais partículas fluem numa suspensão líquida. A medição em fluxo permite análises em altas velocidades, em torno de  $10^2$  a  $10^3$  partículas por segundo, e garante que as estruturas analisadas sejam selecionadas aleatoriamente em toda a amostra (Dolezel, 1997). Uma suspensão líquida contendo as estruturas celulares é introduzida no centro da câmara de fluxo que se encontra preenchida por um fluido envolvente (*sheath fluid*) em fluxo de alta velocidade. Por meio de um fenômeno físico conhecido por focagem hidrodinâmica, as estruturas são colocadas em movimento, uma a uma, sob fluido laminar no fluxo (Dolezel, 1997). Essas estruturas passam por um feixe luminoso intenso (lâmpada de vapor de mercúrio ou lasers), ocorrendo um processo de dispersão de fótons ou de emissão de fluorescência, no qual a intensidade depende das características da partícula (Côrte-Real et al., 2002). Os fótons são posteriormente recebidos e analisados por um fotodiodo e por tubos fotomultiplicadores, que convertem e amplificam os sinais luminosos em pulsos analógico-digitais que são processados por analisadores em vários canais. Os sinais de cada partícula acumulam-se em histogramas e são observados no monitor do aparelho.

### 2.5.1 Análise de ploidia com o citômetro de fluxo

Nos eucariotos, o crescimento e a divisão celular é um processo cíclico, onde o tempo de cada mitose é dividido em três fases: G1, S e G2. Durante a fase G1, período de crescimento celular, uma célula diplóide apresenta conteúdo de DNA celular igual a 2C, ou seja, possui duas cópias de cada cromossomo. Na

fase S ocorre uma duplicação do material genético e posteriormente, na fase G2, ocorre nova fase de crescimento celular onde o conteúdo de DNA nuclear é 4C. A partir desta fase a célula está pronta para dividir-se em duas células filhas (mitose), onde cada núcleo possuirá, novamente, o conteúdo de DNA original, 2C. Numa população de células em crescimento, o número de núcleos na fase G1 é maior do que na fase G2. Dessa forma, os histogramas obtidos pelos citômetros de fluxo em uma análise de ploidia apresentam picos de maior intensidade no canal referente à fase G1 do ciclo celular do que os picos referentes a fase G2.

A quantificação do DNA de uma célula baseia-se na quantidade de fluorescência emitida pelo núcleo quando esse é corado com um fluorocromo específico para o DNA. Para essa quantificação os núcleos devem ser isolados, pois alguns fluorocromos apresentam dificuldade de penetração na membrana citoplasmática (Loureiro & Santos, 2004). Esse procedimento elimina interferências de DNA citoplasmático e de fluorescências não específicas de moléculas como as clorofilas (Dolezel, 1991). Os corantes utilizados ligam-se especificamente e estequiometricamente ao DNA. Alguns deles ligam-se também a moléculas de RNA, portanto para uma determinação mais precisa é necessário a utilização de RNase no preparo da suspensão (Price & Johnston, 1996).

As medições do conteúdo de DNA nuclear não são perfeitas e apresentam variações que, geralmente, estão relacionadas com o método de isolamento dos núcleos, com a coloração específica para o DNA e com a leitura no citômetro de fluxo (Marie & Brow, 1993). Essas variações são expressas na forma do coeficiente de variação (CV). Marie & Brow (1993) consideram que o CV é um critério muito importante na validação das medições citológicas e definem um intervalo de valores entre 1 e 2% para análises de precisão e 3% para análises de rotina.

A quantificação do nível de ploidia por citometria de fluxo é realizada pela análise da intensidade de fluorescência emitida pelos núcleos corados com fluorocromos específicos para DNA. Os picos dominantes gerados nos histogramas são relativos a quantidade de DNA dos núcleos na fase G1 do ciclo celular. A estimativa do nível de ploidia é feita comparando os picos G1 do histograma de uma amostra com o pico de uma planta padrão com ploidia conhecida (Dolezel, 1997). A análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear é uma excelente alternativa aos métodos clássicos de contagem cromossômica. Comparativamente, a citometria de fluxo apresenta as seguintes vantagens: é mais conveniente, pois a amostra é de fácil preparação; é mais rápida processando dezenas de amostras em um dia; não necessita de células em divisão, é um método não destrutivo e é capaz de detectar mixoploidia. (Loureiro & Santos, 2004).

A citometria de fluxo tem sido usada para a detecção do nível de ploidia em trabalhos de melhoramento vegetal de várias culturas olerícolas como o alho (Puddephat et al., 1999), as brássicas (Cogan et al., 2001), a abóbora (Ananthakrishnan et al., 2003), em culturas anuais como o lúpulo (Roy et al., 2001), ornamentais como *Syringa vulgaris* (Rose et al., 2000) e frutífera como a bananeira (van Duren et al., 1996).

## 2.6 Contagem cromossômica

A investigação sobre o número de cromossomos de milho teve início desde os trabalhos pioneiros de Kuwada no início do século passado (Perecin, 1979), tendo ele concluído que o número haplóide é igual a 10.

Para a realização da contagem cromossômica são necessárias preparações citológicas com alta frequência de metáfases. Para tanto, é necessário o estabelecimento de uma rotina de obtenção de raízes apresentando

meristemas com alto índice mitótico. Na maioria das vezes, sementes recém-germinadas são as melhores fontes dessas raízes, mas no caso de espécies que apresentem raízes muito pequenas ou de difícil germinação, outros métodos de indução de raízes devem ser tentados com enraizamento de estacas em vasos ou meios de cultura específicos. Diversos pré-tratamentos para acúmulo de metáfase têm sido descritos em plantas, tais como a combinação de agentes inibidores do fuso mitótico e da síntese protéica, bem como o emprego de hidroxiuréia para a sincronização do ciclo celular das células meristemáticas (Cuco et al., 2003).

A colchicina é um inibidor mitótico muito utilizado para indução de duplicação cromossômica e em pré-tratamentos para a confecção de lâminas de mitose. Ela se liga a tubulina e inibe a formação dos microtúbulos que compõem as fibras do fuso, não havendo assim a migração dos cromossomos para os pólos da célula, permitindo que esses cromossomos permaneçam na forma mais condensada na placa metafásica da célula, onde a visualização ao microscópio ótico é favorecida. Para que essa visualização ocorra é necessário diferenciar os cromossomos do restante da célula. Para tanto, um método muito utilizado é o de Feulgen, no qual o DNA reage com uma solução de ácido clorídrico que retira as bases púricas e forma agrupamentos aldeídos na desoxirribose, e na presença de fucsina básica descorada pelo anidrido sulfuroso, conhecido como reativo de Schiff, ele combina com os radicais aldeído formando um composto vermelho insolúvel. Esse método de coloração possui uma proporcionalidade entre a intensidade da coloração e a quantidade de DNA presente na célula.

Vários são os trabalhos que utilizam o método de contagem cromossômica para verificar o nível de ploidia de um determinado material, alguns desses utilizam a contagem cromossômica para identificação de indivíduos haplóides, como Kermicle (1969) e Kindiger & Hamann (1993).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção de haplóides

A linhagem temperada indutora de haploidia Wisconsin-23 (W23) - Universidade de Wisconsin, Madison - que carrega o alelo mutante *ig* e também alelos do sistema R-navajo responsáveis pela pigmentação de antocianina tanto no endosperma como no embrião, foi cruzada com o híbrido simples BRS1010 desenvolvido pelo programa de melhoramento EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, utilizando o híbrido como doador de pólen. O híbrido simples BRS1010 foi plantado em quatro datas diferentes durante os meses de julho e agosto de 2003 (31/07, 08/08, 20/08 e 29/08), para facilitar a sincronia de cruzamento, a linhagem W23 foi plantada no início do mês de setembro (01/09 e 05/09). As quatro parcelas do híbrido constituíram-se de uma linha de cinco metros com espaçamento de 20 cm entre plantas com área total de 2,5 m<sup>2</sup>. As duas parcelas da linhagem constituíram-se de uma linha de 10 metros com o mesmo espaçamento das parcelas anteriores, totalizando assim cinco metros quadrados por parcela (Figura 2). Todos os cruzamentos foram realizados nos canteiros experimentais do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da EMBRAPA, com altitude média de 732 metros, latitude de 44°15' oeste e longitude 19°28' sul em Sete Lagoas, MG.

As sementes obtidas desses cruzamentos foram colhidas, secadas e separadas conforme o marcador morfológico indicador de haploidia (sistema *R-navajo*) (Nanda & Chase, 1966). De cada espiga, foram separadas as sementes que apresentavam coloração arroxeadada no endosperma e não apresentavam pigmentação roxa no embrião. Essas sementes foram identificadas e fotografadas com câmera digital para o registro do marcador morfológico.



FIGURA 2. Canteiro de cruzamentos com 4 linhas do híbrido BRS1010 ♂ e duas linhas da linhagem W23 ♀. EMBRAPA – Sete Lagoas – MG, Outubro/2003.

### 3.2 Contagem cromossômica

Para a realização da contagem cromossômica, as sementes obtidas e selecionadas morfológicamente conforme item 3.1 foram germinadas em papel *germtest* com temperatura e luminosidade controlada (30°C, por oito horas com luz e 20°C, por 16 horas sem luz, umidade relativa 94%). Quando as radículas apresentavam de três a quatro centímetros de comprimento, suas pontas foram coletadas a um centímetro do ápice e colocadas em solução de colchicina 0,02% (m/v) por duas horas e trinta minutos a 29°C (Viccini, 1998). Em seguida, as pontas das raízes foram lavadas em água deionizada por 10 minutos e armazenadas em solução fixadora metanol-ácido acético (3:1) a 4°C por no mínimo 4 horas, até a hora de confecção das lâminas. Todas as pontas de raízes armazenadas mantiveram a identificação referente à semente da qual ela foi

originada para realizar a comparação entre os diferentes métodos de identificação de haplóides e para a identificação da planta no campo.

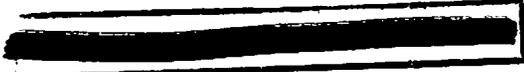
Para o preparo das lâminas de mitose, de acordo com Carvalho (1995), as pontas de raízes foram retiradas da solução fixadora e lavadas três vezes em água deionizada, por 10 minutos cada. Em seguida, as pontas de raízes foram incubadas por 11 minutos em solução de ácido clorídrico 1mol/L a 60°C. As pontas de raízes hidrolisadas na etapa anterior foram lavadas com água deionizada gelada e em seguida com água deionizada a temperatura ambiente. As pontas das raízes foram incubadas no Reativo de Schiff por aproximadamente 30 minutos até que sua região meristemática adquirisse uma coloração arroxeada ou avermelhada. O Reativo de Schiff foi preparado segundo McMannus (1948), e consiste em um grama de fucsina básica dissolvida em 200 mL de água deionizada, fervida por um minuto. Após resfriada a 52°C a solução foi filtrada e adicionada a 20 mL de ácido clorídrico 1mol/L. Após resfriamento a temperatura ambiente (25°C), foi adicionado um grama de metabissulfito de sódio. A solução foi colocada em recipiente de cor âmbar bem fechado por 24 horas em local escuro. Em seguida, foram adicionados dois gramas de carvão ativado, a solução foi agitada e novamente filtrada.

Após a coloração, as raízes passaram por cinco lavagens com água deionizada de 10 minutos cada. Com um estilete foi retirada a região meristemática das pontas das raízes que foi esmagada com ácido acético 45% (v/v) entre uma lâmina e uma lamínula. A lamínula foi retirada com nitrogênio líquido e a lâmina foi seca ao ar, na bancada, protegida de pó. A lâmina perfeitamente seca foi montada com água glicerinada 50% (v/v) e observada ao microscópio ótico Axioplan (Zeiss®) com aumento total de 1000 vezes. A imagem foi capturada com a câmara Hyper HAD (Sony®), auxiliada pelo *software* KS300 (Kontron Elektronik®).

### 3.3 Extração do DNA

As plântulas, que tiveram as pontas de raízes removidas para o preparo de lâminas de mitose utilizadas para a contagem cromossômica, foram transferidas para bandejas com substrato constituído de terra vegetal adubada e mantidas em casa de vegetação por cinco dias, depois foram plantadas nos canteiros experimentais em definitivo. De 10 a 15 dias depois do transplante, elas se encontravam com três a quatro pares de folhas, fase em que foi retirado o material para a extração do DNA. A extração foi realizada em microtubos segundo uma modificação do método descrito por Saghai-Marooof et al. (1984), em que um volume de 600µL de tampão CTAB (CTAB 2% (m/v); 0,2 mol/L Tris-HCl; 1,4 mol/L NaCl; 0,02 mol/L EDTA; 2% β-Mercaptoetanol (v/v)) foram adicionados à aproximadamente 500 mg de material vegetal moído em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A mistura foi mantida em banho maria a 65°C durante uma hora, com homogeneização a cada 15 minutos. Em seguida, foi realizada lavagem com igual volume de solução de clorofórmio-octanol (24:1), com homogeneização constante por 20 minutos. O material foi centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para outro microtubo onde foram adicionados 1000 µL de isopropanol a -20°C. Os microtubos foram mantidos a -20°C por 45 a 60 minutos. Posteriormente, os microtubos foram novamente centrifugados a 16.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e o precipitado lavado com 300 µL de etanol 70% (v/v) gelado. Os tubos sofreram nova centrifugação por 3 minutos a 16.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em centrífuga a vácuo por cinco minutos e ressuspensão em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; pH 8,0) adicionado de 0,5 µL de RNase (10 mg/mL).

Foi realizada a quantificação do DNA por amostragem, em gel de agarose 0,8% (m/v) em tampão TAE (Tris-acetato 40 mmol/L; EDTA 1



mmol/L; pH 8,0), utilizando um padrão de DNA de concentração conhecida. Após a eletroforese realizada a 100V durante uma hora, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene®). O DNA estoque e o DNA diluído, na concentração de trabalho de 10 ng/µL, foram armazenados a 4°C.

O DNA dos genitores dos cruzamentos, a linhagem W23 e o híbrido BRS1010, também foi obtido seguindo o protocolo modificado de Saghai-Maroo (1984), como descrito acima. Folhas coletadas de dez plantas diferentes de cada um dos pais, totalizando 30 gramas de tecido fresco, foram usadas para a extração em larga escala do DNA. Os volumes das soluções foram ajustados à quantidade de tecido foliar. Nesta extração foram realizadas duas lavagens com solução de clorofórmio-octanol (24:1).

### **3.4 Marcadores SSR**

#### **3.4.1 Seleção dos marcadores SSR**

Foram testados 122 marcadores SSR na linhagem W23 e no híbrido BRS1010, com o objetivo de identificar aqueles que apresentavam polimorfismo satisfatório entre os genitores, ou seja, que amplificassem alelos de tamanhos suficientemente diferentes para um diagnóstico visual fácil entre os genitores para os testes de identificação das plantas haplóides. As informações desses marcadores encontram-se publicamente disponíveis no *Maize Genome Database* (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador modelo 9600 (Applied Biosystems®), em volume final de 10 µL, contendo 30 ng de DNA, solução tampão (10 mmol/L Tris-HCl (pH 8,0); 50 mmol/L KCl, 0,01%

(m/v) gelatina; 2,0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 125 µmol/L de cada um dos dNTPs; 0,6 µmol/L de cada um dos iniciadores e uma unidade (1 U) da enzima Taq DNA polimerase. Os ciclos de reação de PCR consistiram de uma desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, nove ciclos de 94°C por 20 segundos, 68°C por 20 segundos com a redução de 1°C a cada ciclo e 72°C por 20 segundos; seguidos de 25 ciclos de amplificação a 94°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos. Finalmente, a reação foi submetida a um período de extensão a 72°C por 5 minutos. Os fragmentos amplificados foram resolvidos em géis de agarose 4% (m/v) com eletroforese a 110V por duas horas e trinta minutos. O gel foi tratado com brometo de etídio (1 mg/mL), visualizado em UV e fotografado pelo Eagle-Eye II (Stratagene®). Os géis foram avaliados considerando o grau de polimorfismo dos alelos amplificados, a qualidade da amplificação e, no caso de heterozigotos, a não coincidência de bandas com o mesmo peso molecular entre os parentais. Os marcadores selecionados nesta etapa foram utilizados nos testes de identificação de haplóides, onde as reações de amplificação obedeceram aos mesmos critérios citados acima.

#### **3.4.2 Marcadores SSR fluorescentes**

Os marcadores SSR marcados com fluorescência foram empregados na genotipagem dos haplóides e das linhagens que deram origem ao híbrido BRS1010 com o objetivo de estudar a distância genética entre eles. Para tanto, foram utilizados 13 marcadores SSR, cada um marcado com uma das três moléculas fluorescentes: azul (6-FAM), verde (HEX) e amarelo (NED) (Applied Biosystems®). Esses 13 iniciadores foram previamente selecionados por apresentarem polimorfismo entre as linhagens que deram origem ao híbrido BRS1010 (Padilha, 2002). As reações de amplificação foram realizadas isoladamente para cada fluorescência em um volume final de 10 µL, contendo

30 ng de DNA, solução tampão (20 mmol/L Tris-HCl (pH 8,4), 50 mmol/L KCl, 1,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>); 125 μmol/L de cada um dos dNTPs; 0,2 μmol/L de cada um dos iniciadores e uma unidade (1 U) da enzima Taq DNA polimerase. As demais condições da reação de amplificação obedeceram aos parâmetros descrito no item 3.4.1, incluindo os ciclos de temperatura e o tempo para a reação de PCR.

Os produtos finais da reação de PCR foram diluídos de acordo com as fluorescências. As proporções utilizadas foram de 1:25, 1:15 e 1:10 para 6-FAM, HEX e NED, respectivamente. Após a diluição, foram formados grupos compostos por produtos de PCR marcados com fluorescências diferentes. De cada grupo foram retirados 3,0 μL que foram misturados a 0,7 μL de formamida, 0,5 μL do corante (blue dextran 50 mg/ml; EDTA 25 mmol/L) e 0,3 μL do padrão GS-500 ROX (Applied Biosystems®). As amostras foram desnaturadas a 95°C durante três minutos e mantidas no gelo até sua aplicação no gel desnaturante de poliacrilamida (5% Long Ranger Gel Solution (Cambrex®); Uréia 6 mol/L; Tris 100 mmol/L; Ácido bórico 100 mmol/L; EDTA 2 mmol/L.). Foram aplicados dois microlitros da amostra desnaturada e os produtos amplificados foram separados por eletroforese a 2000 V durante duas horas no equipamento ABI prism 377 (Applied Biosystems®). As bandas polimórficas resultantes foram analisadas visualmente e foi construída uma matriz considerando os dados binários, onde o valor 1 (um) foi atribuído para a presença do alelo e o valor 0 (zero) para a sua ausência. A partir desta matriz binária dos dados moleculares, foi calculado o coeficiente de similaridade entre os pares de genótipos utilizando o índice de coincidência simples, seguindo a fórmula:

$$S_{ij} = \frac{a + d}{a + b + c + d}, \text{ onde}$$

- a = presença de banda nos indivíduos i e j;
- b = presença de banda no indivíduo i e ausência no indivíduo j;
- c = ausência de banda no indivíduo i e presença no indivíduo j;
- d = ausência de banda no indivíduo i e j.

O agrupamento dos genótipos foi realizado a partir da matriz de dissimilaridade pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average*), utilizando o programa Statistica versão 4.3 (Stat Soft, Inc 1993).

### 3.5 Citometria de fluxo

Para as análises no citômetro de fluxo, foram utilizadas folhas jovens dos genitores (híbrido BRS1010 e a linhagem W23) e dos descendentes provenientes do cruzamento entre eles. As folhas foram coletadas no canteiro experimental, lavadas em água corrente e mantidas em água deionizada a quatro graus Celsius até o momento de serem processadas.

Utilizou-se a metodologia de extração e coloração da suspensão nuclear conforme as recomendações do fabricante utilizando o tampão DNA Staining Solution Partec®. Fragmentos de dois centímetros quadrados de folha foram cortados com auxílio de uma lâmina, retirando-se a nervura principal. Com o auxílio de uma pinça o material foi transferido para placas de Petri com 500 µL de tampão de extração e coloração. A suspensão nuclear foi filtrada após dois minutos de incubação em uma tela de 40 µm de diâmetro, em um microtubo, acrescentando-se mais 1500 µL do tampão. Após cinco minutos de incubação, a suspensão nuclear foi filtrada em telas de 20 µm em tubos específicos para leitura no citômetro de fluxo.

A quantificação da ploidia das amostras  $F_1$  e das plantas genitoras de referência foi realizada comparando-se as posições dos respectivos picos na fase  $G_1$  do ciclo celular. Esses picos são gerados de acordo com a leitura do comprimento de onda emitido pelo corante DAPI que se liga ao DNA em regiões ricas em adenina e timina.

As preparações foram analisadas em um citômetro de fluxo modelo PAS III Partec®, equipado com lâmpada HBO de arco de mercúrio 100 W para excitação em UV e com o parâmetro SSC-Blue para análise em 488 nm.

Os histogramas obtidos foram analisados estatisticamente com ferramentas do programa FlowMax Partec® para a determinação da ploidia. Descartaram-se amostras cujo coeficiente de variação foi superior a 3%. Nos histogramas, os picos  $G_1$  dos núcleos das plantas genitoras, utilizadas como padrão diplóide ( $2n$ ), foram calibrados para leitura no canal 100. Todo o procedimento de análise de ploidia com citômetro de fluxo foi realizado no laboratório de citogenética da Universidade Federal de Viçosa.

antocianina (Coe 1994), mascarando assim a expressão do marcador fenotípico. Contudo, Eder & Chalyk (2002) trabalhando com indução de haplóides maternos em linhagens da Europa Central, constataram que a expressão do gene *R1-nj* em embriões de grãos tipo duro foi maior do que em grãos do tipo dentado e do que em híbridos provenientes de genótipos com endospermas duro e dentado. Segundo Kermicle (1971), sementes diminutas ou com endosperma deprimido apresentam expressão inferior do marcador fenotípico. Assim, pode-se inferir que o marcador sofre grande influência do ambiente e do *background* genético ao qual ele é submetido.

Kermicle (1969) relatou que a indução de haplóides androgenéticos em plantas de milho sob ação do gene *ig* varia entre 1 a 3%. Com uma modificação da linhagem W23 propoposta por Kindiger & Hamann (1993), gerando um trissômico terciário, esta frequência aumentou para até 8%. Considerando esses dados de frequência de obtenção de haplóides entre 1 a 8%, foram escolhidas 50 espigas, das 87 obtidas, que apresentaram porcentagem menor do que 25% de sementes com coloração arroxeadada no endosperma e sem coloração no embrião (Tabela 1). De cada uma destas 50 espigas foram escolhidas, aleatoriamente, até 10 sementes, totalizando assim 425 sementes. Estas foram divididas em quatro lotes, fotografadas, e germinadas em intervalos de tempo espaçados em uma semana como forma preventiva para evitar que alguma adversidade compromettesse o experimento como um todo.

#### **4.2 Contagem cromossômica**

Por ser um método relativamente simples e barato, a idéia inicial do projeto era fazer a contagem cromossômica de todos os indivíduos provenientes dos cruzamentos entre o híbrido e a linhagem. Contudo, esse procedimento mostrou-se pouco prático e eficiente pela quantidade de plantas envolvidas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção de haplóides

A linhagem indutora de haploidia W23 apresentou-se muito frágil diante das condições tropicais de cultivo sendo muito sensível ao fotoperíodo e susceptível ao ataque de fungos e ao calor, prejudicando o desenvolvimento das plantas e a produção de sementes que é um fator limitante na obtenção de haplóides, pois quanto maior a produção de sementes, maior a probabilidade de ocorrência de haplóides.

Dos cruzamentos realizados entre a linhagem indutora W23 ♀ e o híbrido simples BRS1010 ♂, foram obtidas 87 espigas. Para que ocorresse sincronia no florescimento, o híbrido foi plantado em quatro datas diferentes, espaçadas em uma semana durante o mês de agosto de 2003. A coincidência de florescimento entre a linhagem e o híbrido ocorreu entre plantios espaçados em 25 dias, ou seja, o híbrido que forneceu pólen para os cruzamentos foi aquele plantado quase um mês antes da linhagem indutora.

As sementes destas 87 espigas foram selecionadas visualmente e separadas conforme o marcador fenotípico de coloração. As porcentagens das prováveis sementes haplóides, segundo o marcador fenotípico, variaram de 0 a 51%. Esta ampla variação na porcentagem deve-se, em parte, a difícil visualização da expressão de antocianina tanto no embrião quanto no endosperma.

O híbrido simples BRS1010 foi originado do cruzamento de uma linhagem com endosperma dentado e outra do tipo duro, sendo classificado como semi-duro. Os grãos de milho com endosperma do tipo duro possuem alguns genes dominantes, *C1-I*, *C2-Idf* e *In1-D*, que inibem a síntese de

TABELA 1. Porcentagem de sementes com marcador morfológico indicador de haploidia – endosperma roxo e embrião descolorido – em 50 espigas obtidas do cruzamento entre W23 ♀ e BRS1010 ♂.

Espiga	Sementes		Porcentagem de possíveis haplóides	Espiga	Sementes		Porcentagem de possíveis haplóides
	Com marcador de haploidia	Outras			Com marcador de haploidia	Outras	
1	26	101	20.4%	37	9	96	8.5%
2	14	269	4.9%	41	30	162	15.6%
3	11	228	4.6%	44	3	15	16.6%
4	52	200	20.6%	45	11	141	7.2%
5	93	269	25.7%	46	48	157	23.4%
8	18	157	10.2%	49	16	160	9.1%
9	14	171	7.5%	49A	8	115	6.5%
11	6	44	12.0%	51	29	129	18.3%
13	13	59	18.1%	52	4	139	2.8%
14	4	115	3.4%	55	75	351	17.6%
16	6	295	2.0%	56	26	122	17.6%
17	73	279	20.7%	57	14	106	11.6%
18	39	128	23.4%	58	5	41	10.8%
19	11	79	12.2%	59	16	156	9.3%
20	14	147	8.7%	66	7	204	3.3%
21	8	109	6.8%	68	30	178	14.4%
22	68	285	19.3%	70	19	84	18.4%
24	18	196	8.4%	72	8	131	5.8%
25	16	137	10.4%	74	107	339	24.0%
28	4	146	2.6%	75	22	409	5.1%
29	4	153	2.5%	77	10	185	5.1%
31	7	48	12.7%	80	37	321	10.3%
33	2	145	1.4%	82	7	54	11.5%
34	38	167	18.5%	86	32	133	19.4%
35	3	294	1.0%	87	41	214	16.1%

De cada uma das sementes germinadas, foram coletadas três pontas de raízes, gerando assim uma grande quantidade de material para a confecção das lâminas. No processo de preparo das lâminas, o material vegetal que é espalhado por esmagamento ocasionava, em alguns casos, perda de alguns cromossomos das células ou mistura com os de outras células, dificultando assim, a contagem cromossômica e o diagnóstico final. Kermicle (1971) encontrou dificuldades na confecção de algumas lâminas para contagem cromossômica relatando a perda de algumas amostras por não obter lâminas com clara visualização dos cromossomos.

Devido a esses problemas, esta análise foi realizada somente nas plantas previamente identificadas como haplóides através dos marcadores SSR como forma de confirmação dos resultados obtidos.

#### **4.3 Modificação do método de extração de DNA**

A modificação do método descrito por Saghai-Marooft et al. (1984), utilizando apenas uma etapa de lavagem com solução de clorofórmio-octanol (24:1) mostrou-se bastante eficiente para o uso do DNA extraído em reações de amplificação com marcadores SSR, tanto para os primers marcados com fluorescência quanto para os não marcados. A quantificação do DNA extraído foi realizada por amostragem, escolhendo sete amostras de cada um dos quatro lotes de plantas para a quantificação em gel de agarose 0,8% (m/v). As amostras analisadas continham em média 100 ng/ $\mu$ L de DNA e foram diluídas dez vezes para atingirem a concentração de trabalho de 10 ng/ $\mu$ L.

#### 4.4 Teste de haploidia com marcadores SSR

O teste para a identificação de indivíduos haplóides androgenéticos com marcadores moleculares do tipo SSR nada mais é do que um teste de paternidade onde o indivíduo que apresentar no gel somente o alelo do genitor masculino, ou seja, do híbrido BRS1010, corresponde ao haplóide androgenético e os indivíduos diplóides heterozigotos apresentarão duas bandas, uma referente ao alelo materno, a linhagem W23, e outra referente ao alelo paterno, o híbrido BRS1010. Para tanto, foi realizada uma seleção com 122 marcadores SSR para a escolha daqueles que apresentassem polimorfismo entre os indivíduos genitores. Dentre esses, o mmc0022, localizado no cromossomo 3 e mmc0081, localizado no cromossomo 5 apresentaram bandas polimórficas entre os genitores com tamanhos e definição suficientemente boas para a análise em gel de agarose 4% (m/v).

Das 425 sementes que foram germinadas, foram obtidas 462 plantas. Essa diferença observada entre sementes germinadas e plantas obtidas no campo é devido à ação do gene *ig* que além de induzir haploidia, também provoca, em alguns casos, a indução de poliembrião nas sementes geradas sob seu efeito (Kermicle, 1971). Assim, entre as 425 sementes levadas para germinação, 21 não germinaram; sete germinaram, porém não se desenvolveram no campo; 59 apresentaram poliembrião dupla; e três resultaram em poliembrião tripla. Essa alta frequência de sementes que não germinaram (4,9%) pode estar ligada à perda de embrião resultante de uma falha na célula ovo que se desenvolve sem fertilização (Eder & Chalyk, 2002).

Todas as plantas que desenvolveram no campo, incluindo as provenientes de sementes poliembriônicas, participaram da avaliação com os primers SSR selecionados anteriormente (mmc0022 e mmc0081), conforme representado na Figura 3. Quatro indivíduos foram identificados como haplóide

entre os 462 analisados, são eles 216, 494, 660 e 664. Essas quatro plantas apresentaram bandas no gel que coincidiam em tamanho apenas com a banda do genitor masculino, ou seja, apresentavam somente o alelo correspondente ao híbrido BRS1010, caracterizando-se assim como um haplóide androgenético (Figura 4). As outras plantas analisadas apresentavam duas bandas no gel, uma correspondendo à linhagem indutora W23 e outra ao híbrido BRS1010, mostrando assim que elas vieram de um cruzamento entre os genitores.

A frequência de indução de haploidia foi de 0,87% considerando os 462 indivíduos analisados. Contudo, conforme descrito por Kermicle (1969), ao contrário da maioria das angiospermas, os indivíduos provenientes de sementes poliembriônicas em milho não estão associados à ocorrência de haplóides. Em trabalho de obtenção de linhagens indutoras de haploidia derivadas da W23, Kindiger & Hamann (1993) afirmam que por meio da seleção para linhagens com baixos níveis de poliembriõnia, ocorre um acréscimo da frequência global de haplóides androgenéticos gerados, mostrando haver uma incompatibilidade entre poliembriõnia e indução de haploidia, mesmo sendo ambas as características controladas pelo gene gametófito indeterminado. Nenhuma das quatro plantas haplóides encontradas derivou-se de sementes poliembriônicas o que confirma as afirmações anteriores. Levando em conta esses dados e descartando as 127 plantas derivadas de sementes poliembriônicas, a frequência de haplóides obtidos passa a ser de 1,19%.

#### **4.5 Validação do diagnóstico dos marcadores SSR**

Para a confirmação e validação dos resultados de diagnóstico dos haplóides obtidos com os marcadores moleculares SSR, foram utilizadas as técnicas de contagem cromossômica e citometria de fluxo.

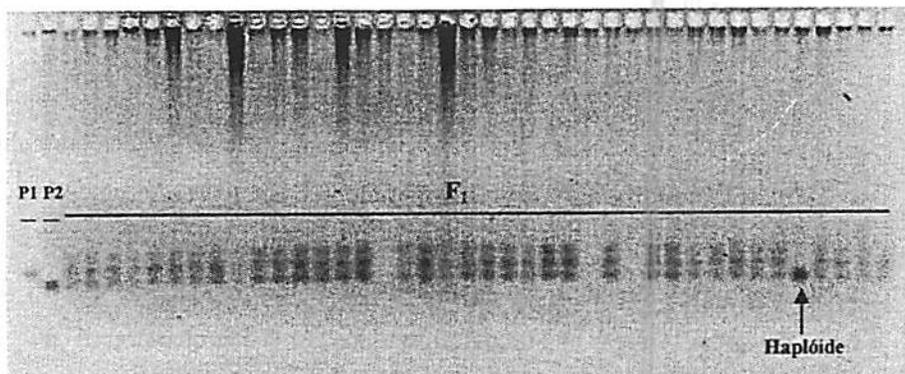


FIGURA 3. Identificação de haplóides androgenéticos realizado com indivíduos descendentes do cruzamento entre a linhagem indutora de haploíδια W23 ♀ (P1) e o híbrido simples BRS1010 ♂ (P2), utilizando o primer de microssatélite mmc0022. Observar que o indivíduo haplóide tem banda coincidente apenas com a banda do híbrido P2.



FIGURA 4. Padrão de amplificação com os marcadores SSR mmc0022 e mmc0081 em gel de agarose 4% (m/v). W23: linhagem indutora; HIB: BRS1010; 801 e 804A: F<sub>1</sub> / heterozigotos; 216, 494, 660 e 664: haplóides.

#### **4.5.1 Contagem cromossômica**

As pontas de raízes que foram coletadas na fase inicial do experimento, logo após a germinação das sementes, e que estavam conservadas em solução fixadora foram utilizadas para a confecção das lâminas de mitose. Foram preparadas somente as lâminas correspondentes às plantas 216, 494, 660 e 664, identificadas previamente como haplóides pelo teste com marcadores SSR (item 4.4). Todas as plantas analisadas apresentavam 10 cromossomos em suas células, confirmando seu estado haplóide. A Figura 5 mostra os cromossomos da célula de duas destas plantas haplóides.

#### **4.5.2 Citometria de fluxo**

Inicialmente foram coletadas amostras de 90 plantas para a análise do nível de ploidia no citômetro de fluxo. As amostras analisadas correspondiam às plantas do primeiro lote de sementes germinado. Nenhuma dessas 90 plantas apresentava células haplóides quando comparadas com o padrão diplóide. Esse resultado corrobora com os marcadores SSR que também não acusaram indivíduos haplóides entre as plantas do primeiro lote. Posteriormente, foram analisadas as plantas identificadas como haplóides pelos marcadores moleculares (Figuras 6 e 7) e todas elas apresentavam a metade da quantidade do material genético dos indivíduos genitores, utilizados como padrão diplóide (Figura 8).

#### **4.6 Marcador morfológico e características das plantas haplóides**

A seleção das sementes, possíveis haplóides, com base no marcador morfológico mostrou-se de baixa eficiência. As 425 sementes que foram levadas para a germinação apresentavam o marcador indicador de haploidia, coloração

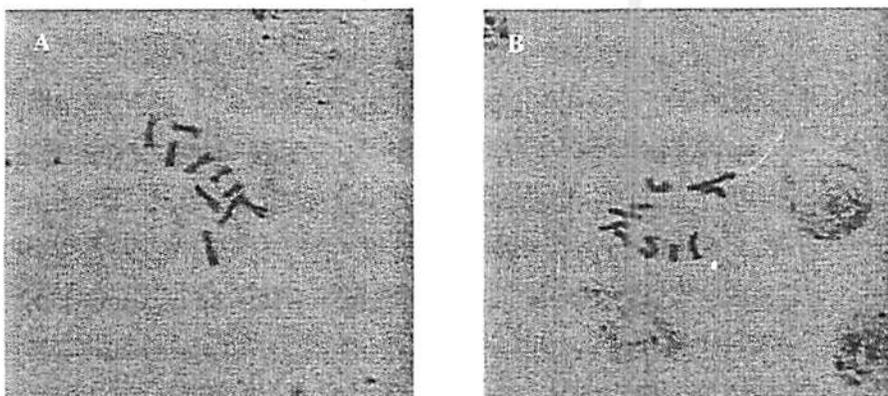


FIGURA 5. Fotomicrografia das lâminas de mitose mostrando os cromossomos das plantas haplóides androgenéticas de milho 216 (A) e 494 (B), provenientes do cruzamento entre W23 ♀ e BRS1010 ♂. Aumento total 1000 X.

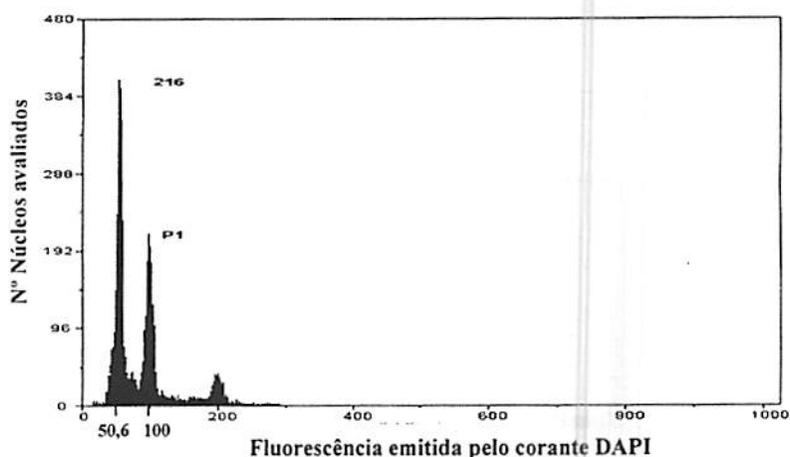
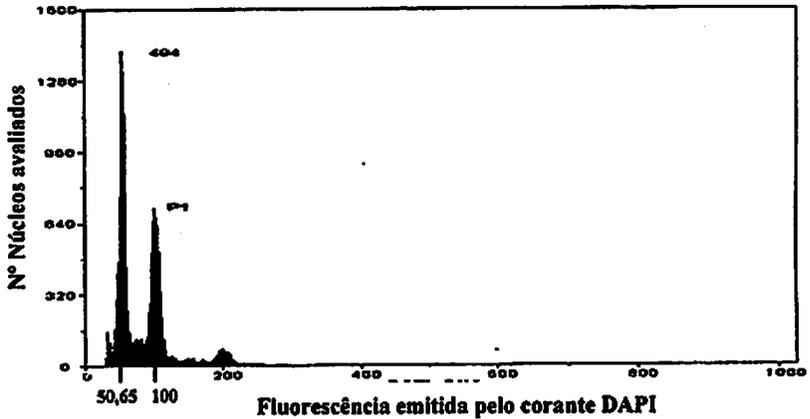
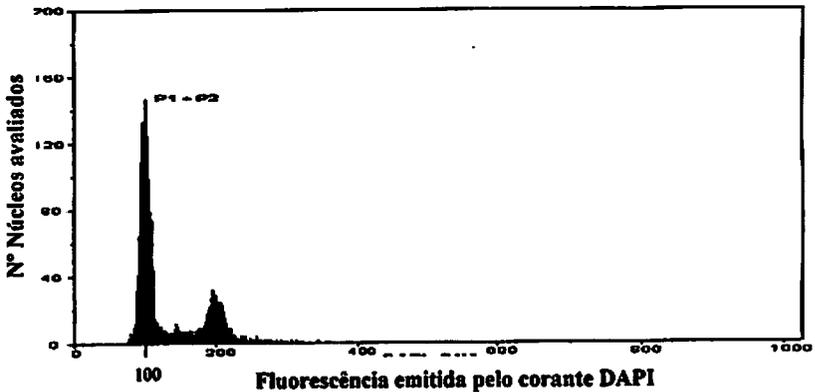


FIGURA 6. Histograma obtido por citometria de fluxo de suspensões nucleares de tecidos foliares de plantas genitoras diplóide (P1) e haplóide (216). Observar que o pico G1 da planta diplóide P1, no canal 100, e o pico G1 do haplóide 216 no canal 50,6 referente à intensidade de fluorescência emitida pelo corante DAPI que corresponde à quantidade de DNA do núcleo.



**FIGURA 7.** Histograma obtido por citometria de fluxo de suspensões nucleares de tecidos foliares de plantas genitores diplóide (P1) e haplóide (494). Observar que o pico G1 da planta diplóide P1, no canal 100, e o pico G1 da planta haplóide 494 no canal 50,65 referente à intensidade de fluorescência emitida pelo corante DAPI que corresponde à quantidade de DNA do núcleo.



**FIGURA 8.** Histograma obtido por citometria de fluxo de suspensões nucleares de tecidos foliares de plantas genitores (P1 e P2) de milho diplóide ( $2n$ ). Observar que os picos G1 das duas plantas estão sobrepostos no canal 100 referente à intensidade de fluorescência emitida pelo corante DAPI que corresponde à quantidade de DNA do núcleo.

arroxeadas no endosperma e embrião descolorido. Contudo, somente quatro destas sementes eram realmente haplóides como foi comprovado pelos marcadores SSR, pela citometria de fluxo e pela contagem cromossômica.

Grande parte das sementes obtidas do cruzamento entre o híbrido BRS1010 e a linhagem indutora W23 foram sementes diminutas com endosperma defeituoso dificultando muito o diagnóstico. Foi observado que, por ser a linhagem temperada de difícil adaptação às condições tropicais, e também provavelmente devido ao efeito da constituição genética do genitor masculino, a seleção dos possíveis haplóides por meio do marcador morfológico de coloração das sementes não foi eficiente para essa discriminação. Portanto, pode-se considerar que não ocorreu uma seleção prévia dos possíveis haplóides e sim uma escolha das sementes totalmente ao acaso, o que corrobora com a frequência de haplóides obtidos, considerando essa casualidade, que foi de 1,19%, ficando dentro da faixa de frequência descrita por Kermicle (1969) para a linhagem W23.

As quatro sementes que deram origem aos haplóides eram normais na forma e no tamanho (Figura 9). Duas delas, 660 e 664, vieram da mesma espiga e as outras duas, 216 e 494, de outras duas espigas independentes. As frequências de sementes com o marcador morfológico de coloração nessas espigas foram de 3,3%, 6,8% e 9,1% respectivamente. As plantas originadas destas sementes apresentam-se como uma miniatura das plantas diplóides normais (Figuras 10 e 11), fato este também observado por Rotareno (2000) em um trabalho comparativo entre características de milho haplóide e diplóide. Foi observada também, a existência de plantas com tamanho reduzido como os haplóides, porém com constituição diplóide heterozigótica (Figura 12). Esse tipo de planta confirma a necessidade de se fazer uma identificação precisa desses haplóides para que não ocorra a seleção de indivíduos  $F_1$  diplóide heterozigóticos como haplóides, uma vez que algumas plantas de tamanho

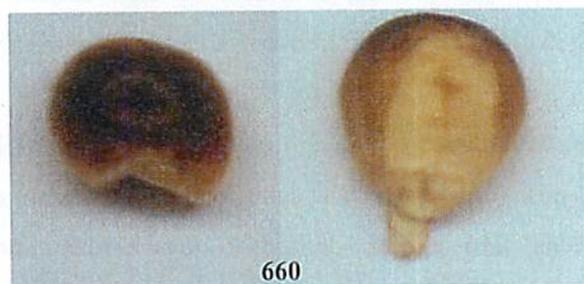


FIGURA 9. Sementes selecionadas por meio dos marcadores morfológicos de coloração (sistema R-navajo) que deram origem às plantas haplóides - EMBRAPA - Sete Lagoas - MG, Fevereiro/2004.



FIGURA 10. Plantas haplóides obtidas do cruzamento entre W23 ♀ x BRS1010 ♂. A – Planta haplóide 216; B – Planta haplóide 494 – EMBRAPA - Sete Lagoas – MG, Abril/2004.

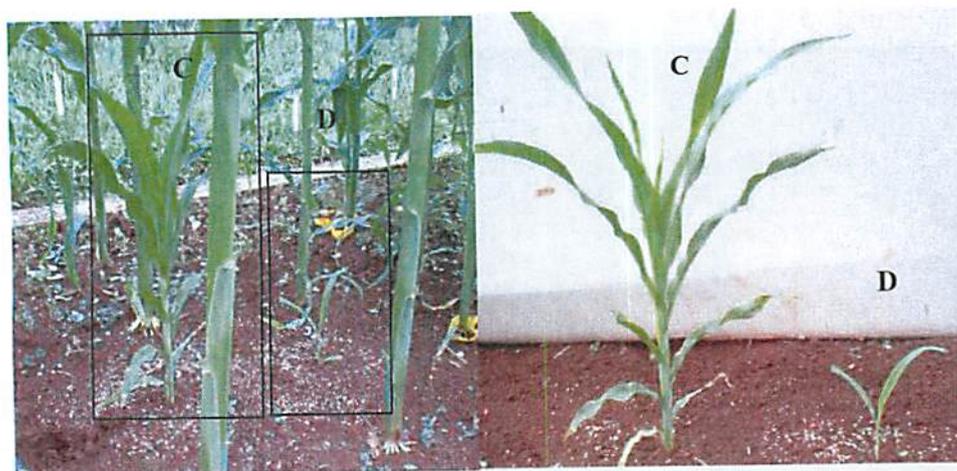


FIGURA 11. Plantas haplóides obtidas do cruzamento entre W23 ♀ x BRS1010 ♂. C – Planta haplóide 660; D – Planta haplóide 664. EMBRAPA - Sete Lagoas – MG, Abril/2004.



FIGURA 12. Foto comparativa da planta haplóide (A) e da planta diplóide (B), ambas germinadas na mesma época. EMBRAPA - Sete Lagoas – MG, Abril/2004.

reduzido também foram geradas por uma semente que apresentava o marcador morfológico de coloração característico dos haplóides.

#### **4.7 Distância genética.**

O ensaio de distância genética foi desenvolvido com o objetivo de averiguar se no processo de geração de indivíduos haplóides ocorre uma distribuição aleatória dos alelos do híbrido que deu origem a esse haplóide ou se ocorre um “favorecimento” na distribuição destes alelos em relação a alguma linhagem genitora constituinte deste híbrido.

Para tanto, foi realizada uma genotipagem nas linhagens L3 e L2283, as quais são genitoras do híbrido BRS1010, e nos quatro indivíduos haplóides anteriormente identificados (Figura 13). Apesar do número reduzido, os treze marcadores utilizados para o estudo de distância genética estavam distribuídos ao longo de oito dos 10 cromossomos do milho, o que de certa forma representa uma boa cobertura do genoma. Os géis foram analisados visualmente e os dados de presença e ausência dos alelos foram utilizados para calcular o complemento do índice de coincidência simples (Tabela 2), determinando a distância genética entre os haplóides, o híbrido simples BRS1010 e as suas linhagens genitoras. O dendograma obtido a partir destes dados está representado na Figura 14.

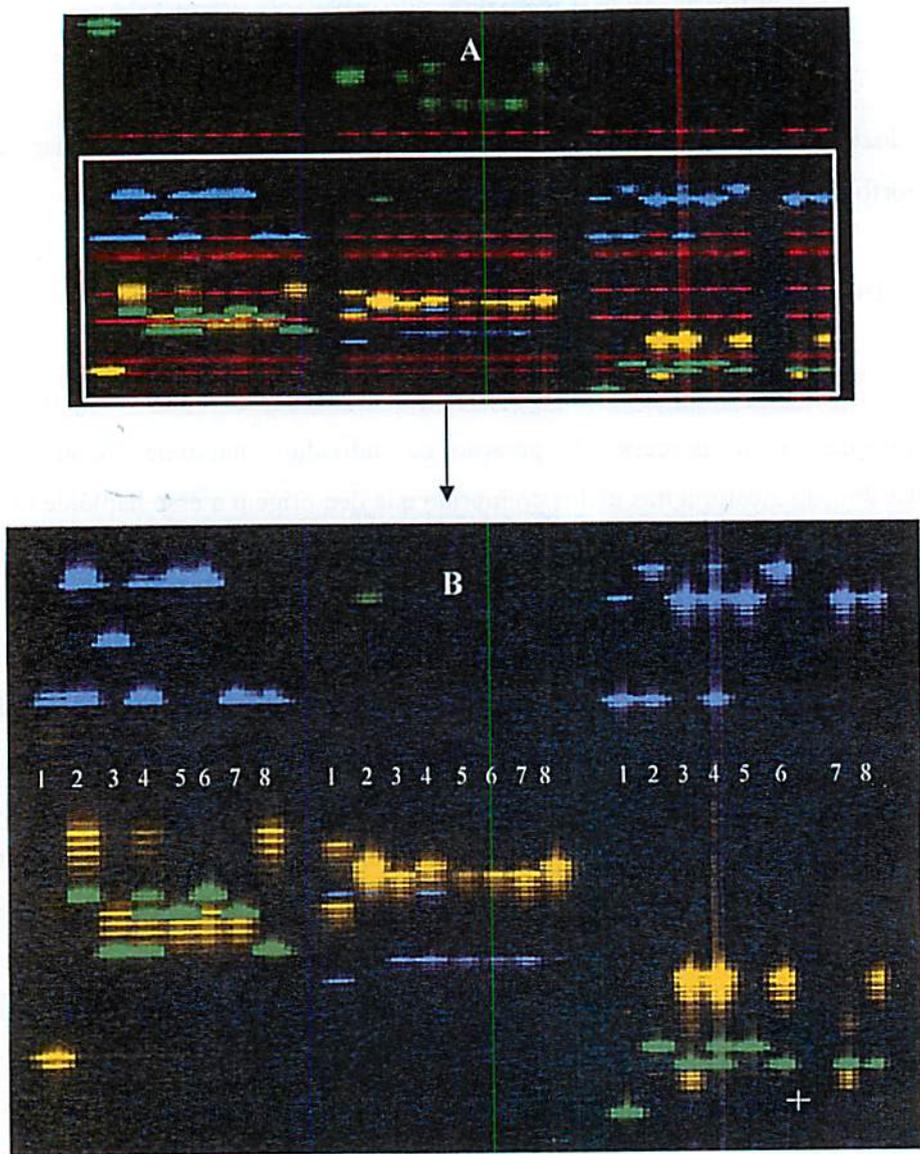
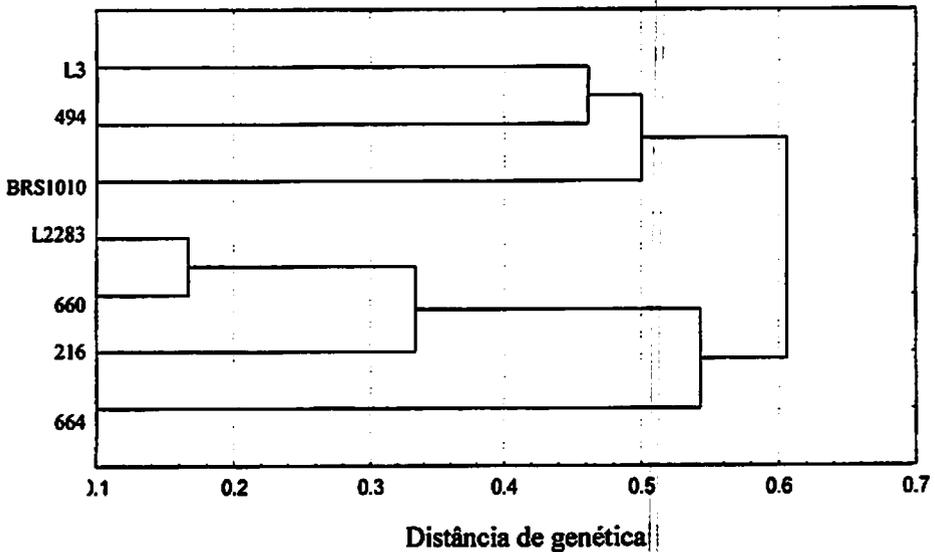


FIGURA 13. Padrão de bandas SSR para reação multiplex utilizando primers fluorescentes analisados pelo sequenciador automático ABI-377 na genotipagem dos seguintes indivíduos: 1- W23; 2-L3; 3- L2283; 4 – BRS1010; 5 – haplóide 216; 6 – haplóide 4949; 7 – haplóide 660; 8 – haplóide 664. Figura 13 B ampliação da Figura 13 A.

**TABELA 2. Matriz de distância genética calculada pelo complemento do índice de coincidência simples.**

	Linhagem L3	Linhagem L2283	Híbrido BRS1010	Haplóide 216	Haplóide 494	Haplóide 660	Haplóide 664
Linhagem L2283	1.00000						
Híbrido BRS1010	0.50000	0.50000					
Haplóide 216	0.66667	0.33333	0.50000				
Haplóide 494	0.46154	0.53846	0.50000	0.50000			
Haplóide 660	0.83333	0.16667	0.50000	0.33333	0.50000		
Haplóide 664	0.53846	0.46154	0.50000	0.66667	0.69231	0.5000	



**FIGURA 14. Dendrograma de quatro haplóides androgenéticos (216, 494, 660 e 664), o híbrido BRS1010 as linhagens L3 e L2283 que deram origem ao híbrido, revelados pela análise de agrupamento UPGMA com base no complemento do índice de coincidência simples.**

Espera-se que, em híbridos simples, os indivíduos apresentem metade dos alelos de uma linhagem genitora e metade da outra, então, em uma distribuição ao acaso, a maioria dos indivíduos haplóides gerados de híbridos simples deveria apresentar uma composição genética equidistante do híbrido, com metade dos alelos de cada um dos genitores. Seguindo uma distribuição normal dos alelos, alguns haplóides ficariam nas extremidades da curva, ou seja, apresentariam uma frequência bem maior de alelos de apenas uma das linhagens que deram origem ao híbrido, assim uma pequena parte dos haplóides se assemelharia às linhagens genitoras originais. Essa distribuição normal foi, de certa forma, observada em nossos resultados. Apesar de estar agrupada mais próxima da linhagem L2283, o haplóide 664 apresenta uma divergência genética de 46% para esta linhagem, ficando aproximadamente equidistante geneticamente das duas linhagens genitoras. O mesmo ocorre com o haplóide 494, porém este está agrupado mais próximo da linhagem L3. Os haplóides 216 e 660 estão mais próximos da linhagem L2283, sendo suas divergências genéticas de 33% e 17% respectivamente (Figura 15).

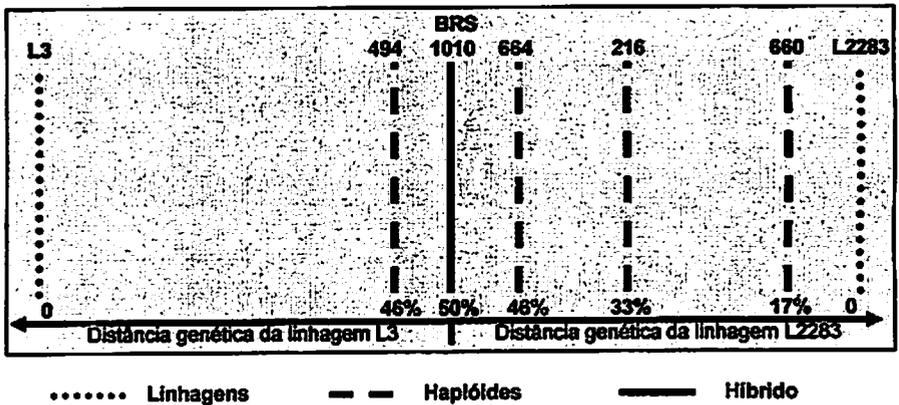


FIGURA 15 Figura representativa da distância genética entre as linhagens originais do híbrido, L3 e L2283, o híbrido BRS1010, e os haplóides 216, 494, 660 e 664, originados do híbrido BRS1010.

Observa-se que dois dos quatro haplóides ficaram com a composição genética bem próxima ao do híbrido e dois haplóides tenderam mais para uma das linhagens genitores, sendo um deles, o 660, bem parecido geneticamente com a linhagem L2283. Esses dados nos mostram que a distribuição dos alelos para a geração das plantas haplóides ocorreu aleatoriamente e que os haplóides gerados possuem combinações genéticas diferentes entre si, possibilitando a formação de linhagens distintas. Provavelmente, se o número de haplóides gerados fosse maior, teríamos grande parte dos indivíduos com composição genética equidistantes das duas linhagens genitoras. Porém, teríamos também alguns haplóides bem mais próximos das duas linhagens que originaram o híbrido. Essas afirmações têm grande implicação no melhoramento de milho, pois ao observar um indivíduo superior em uma população, pode-se em poucas gerações, por meio da indução de haplóides, obter linhagens que quando novamente combinadas forneçam um híbrido com características bem próximas ou até mesmo superiores às observadas naquele indivíduo.

## 5 CONCLUSÕES

A linhagem W23 é efetiva na geração de haplóides androgenéticos, induzindo a uma taxa de 1,19% no genótipo tropical do híbrido BRS1010 utilizado como genitor masculino.

Todas as plantas identificadas como haplóides apresentavam porte reduzido, sendo que algumas plantas diplóides heterozigóticas também apresentaram esta mesma característica.

O sistema de identificação de haplóides por meio de marcadores morfológicos de coloração da semente (R-navajo) não se mostrou eficiente para discriminação dos mesmos. Para essa identificação os marcadores SSR se mostraram eficientes e de maior aplicabilidade em relação à contagem cromossômica e a análise por citometria de fluxo.

A distribuição dos alelos no momento da geração dos indivíduos haplóides ocorreu aleatoriamente. Foram obtidos dois haplóides mais próximos geneticamente à linhagem L2283, porém todos os indivíduos se mostraram geneticamente diferentes entre si, sendo essa uma condição fundamental para a geração de linhagens por meio desse processo.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANTHAKRISHNAN, G.; XIA, X.; ELMAN, C.; SINGER, S.; PARIS, H. S.; GAL-ON, A.; GABA, V. Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by in vitro organogenesis. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 21, p. 739-746, 2003.

ARIAS, E. R. A.; RAMALHO, M. A. P. Maize genetic progress in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil, from 1986/87 to 1993/94. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 33, n. 9, p. 1549-1554, 1998.

BECKMAN, J. S.; SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphism in plant genetic improvement. *Oxford Surveys of Plant Molecular; Cell Biology*, Oxford, v. 3, p. 196-250, 1986.

BYLICH, V. G.; CHALYK S. T. Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploid – inducing capacity in ZMS line. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, Urbana, v. 70, 1996.

CARDWELL, V. B. Fifty years of Minnesota corns production: Source of yield increase. *Agronomy Journal*, Madison, v. 74, n. 6, p. 984-990, nov., 1982.

CARVALHO, C. R.. *Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (Zea mays L.)* 1995. 127 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CHALYK, S. T. Creating new haploid – inducing lines of maize. *Maize genetics Cooperation Newsletter*, Urbana, v. 73, 1999.

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

CHASE, S. S. Monoploids and monoploids derivatives of maize (*Zea mays* L.). *The Botanical review; interpreting botanical progress*, New York, v. 35, p. 117-167, 1969.

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

COE, E. H. Anthocyanin genetics. In: FREELING M; WALBOT V. (eds) **The Maize Handbook**. Springer-Verlag, New York, pp 279-281. 1994.

COGAN, N.; HARVEY, E.; ROBINSON, H.; LYNN, J.; PINK, D.; NEWBURY, H. J.; PUDDEPHAT, I. The effects of anther culture and plant genetic background on *Agrobacterium rhizogenes* – mediated transformation of commercial cultivars and derived doubled haploid *Brassica oleracea*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, p. 755-762, 2001.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUZA, M.; SILVA, M.; LEÃO, C. Contributos da citologia analítica para estudos da biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 71, p. 19-33, 2002.

CUCO, S. M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M. L. C.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com altas frequências de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 363-370, 2003.

DOLEZEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis : PCA**, Sussex, v. 2, p. 143-154, 1991.

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

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

→ FERNANDES, J. S. C.; FRANZON, J. F. Thirty years of genetic progress in maize (*Zea mays* L.) in a tropical environment. **Maydica**, Bergamo, v. 42, n.1, p. 21-27, 1997.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 220.

→ HALLAUER, A. R. Methods used in developing maize inbred lines. **Maydica**, Bergamo, v. 35, n. 1, p. 1-16, 1990.

HUANG B.; SHERIDAN, W. F. Embryo sac development in the maize *indeterminate gametophyte1* mutant: Abnormal nuclear behavior and defective microtubule organization. *The Plant Cell*, Rockville, v. 8, p. 1391-1407, 1996.

KATO, A. Single fertilization in maize. *The Journal of Heredity*, New York, v. 90, n. 2, p. 276-280, 1999.

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

KERMICLE, J. L. Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize, *American Journal of Botany*, Baltimore, v. 58, n. 1, p. 1-7, 1971.

KERMICLE, J. L.; DEMOPULOS-RODRIGUEZ, J. Location of *indeterminate gametophyte* (ig) on chromosome 3. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, Urbana, v. 54, p. 84-85, 1980.

KINDIGER, B.; HAMANN, S. Generation of haploids in maize: A modification of the indeterminate gametophyte (ig) system. *Crop Science*, Madison, v. 33, p. 342-344, 1993.

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

LASHERMES, P.; GAILLARD, A.; BECKERT, M. Gynogenetic haploid plants analysis for agronomic and enzymatic markers in maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 76, p. 570-572, 1988.

LI, C. D.; FATOKUN, C. A.; UBI, B.; SINGH, B. B.; SCOLES, G. J. Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. *Crop Science*, Madison, v. 41, p. 189-197, 2001.

LIN, B. Megagametogenetic alterations associated with the indeterminate gametophyte (ig) mutation in maize. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v. 41, n. 3, p. 557-563, 1981.

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

MARIE, D.; BROW, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v. 78, p. 41-51, 1993.

MCMANNUS, J. F. A. Histological and histochemical use of periodic acid. **Stain Technology**, Baltimore, v. 23, p. 99-108, 1948.

MIRANDA FILHO, J. B.; VIÉGAS, G. P. Milho híbrido. In: PATERNIANE, E.; VIÉGAS, G. P. **Melhoramento e produção do milho**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 277-340.

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

PADILHA, L. **Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. 2002. 85 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras – Lavras, MG.

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

PERECIN, M. L. R. A. **Estudo dos cromossomos somáticos de milho (*Zea mays* L.) e de suas regiões heterocromáticas**. 1979. 138p. Tese (Livredocência em Citologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Piracicaba, SP.

PRASAD, M.; VARSHNEY, R. K.; ROY, J. K.; BALYA, H. S.; GUPTA, P. K. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 3/4, p. 584-592, 2000.

PRICE, H.; JOHNSTON, J. Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. In JAUHAR, P. **Methods of Genome Analysis in Plants**, CRC Press, New York, p. 115-131, 1996.

PUDDEPHAT, I. J.; ROBINSON, H. T.; SMITH, B. M.; LYNN, J. Influence of stock plant pretreatment on gynogenic embryo induction from flower buds of onion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, v. 57, p. 145-148, 1999.

RAFALSKI, D. J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. *Nonmammalian genomic analysis: a practical guide*. New York, 1996. p. 75-134.

REIF, J. C.; MELCHINGER, A. E.; XIA, X. C.; WARBURTON, M. L.; HOISINGTON, D. A.; VASAL, S. K.; SRINIVASAN, G.; BOHN, M.; FRISCH, M. Genetic distance based on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize populations. *Crop Science*, Madison, v. 43, p. 1275-1282, 2003.

ROSE, J. B.; KUBBA, J.; TOBUTT, K. R. Chromosome doubling in sterile *Syringa vulgaris* x *S. pinnatifolia* hybrids by in vitro culture of nodal explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Boston, v. 63, p. 127-132, 2000.

ROTARENCO, V. A. The comparative characteristic of the correlation between the traits of maize diploids and haploids. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, Urbana, v.74, 2000.

ROTARENCO, V. A.; EDER, J. Possible effects of heterofertilization on the induction of maternal haploids in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, Urbana, v.77, 2003.

ROY, A. T.; LEGGETT, G.; KOUTOULIS, A. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 20, p. 489-495, 2001.

RUSSEL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARMINO, G.; MACAULAY, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome*, Ottawa, v. 40, n. 4, p. 442-450, 1997.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceeding of National Academic Science of the United States of America Biological Science*, New York, v. 81, n. 24, p. 8014-8018, 1984.

SENIOR, M. L.; MURPHY, J. P.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Utility of SSRs for determining genetics similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Science*, Madison, v. 38, n. 4, p. 1088-1098, 1998.



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

SMITH, J. S. C.; CHIN, E. C. L.; SHU, H.; SMITH, O. S.; WALL, S. J.; SENIOR, M. L.; MITCHEL, S. E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin, v. 95, n. 1/2, p. 163-173, 1997.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 939-1010.

SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. **Corn and corn improvement**. Madison. American Society of Agronomy, 1988. 986p.

TROYER, A. F.; MASCIA, P. N. Key technologies impacting corn genetic improvement – past, present and future. **Maydica**, Bergamo, v. 44, n.1, p. 55-68 1999.

Van DUREN, M.; MORPURGO, R.; DOLEZEL, J.; AFZA, R. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by in vitro techniques. **Euphytica**, Dordrecht, v. 88, n. 1; p. 25-34, 1996.

VICINI, L. F. **Variações cromossômicas induzidas por radiação gama em milho (*Zea mays* L.) via grão de pólen**. 1998. 145 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K.; RAFALSKY, J. A.; TINGEY, S. U. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.