



JURANDIR PEREIRA SEGUNDO

**AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE INDUÇÃO DE
HAPLOIDES UTILIZANDO O MARCADOR
R1-nj, EM DIFERENTES GERMOPLASMAS DE
MILHO**

LAVRAS – MG

2014

JURANDIR PEREIRA SEGUNDO

**AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE INDUÇÃO DE HAPLOIDES
UTILIZANDO O MARCADOR *R1-nj*, EM DIFERENTES
GERMOPLASMAS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Vânia Helena Techio

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Segundo, Jurandir Pereira.

Indução de haploides utilizando o marcador R1-nj em diferentes
germoplasmas de milho / Jurandir Pereira Segundo. – Lavras :
UFLA, 2014.

55 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Vânia Helena Techio.

Bibliografia.

1. Duplo-haploides. 2. Marcador morfológico. 3. Linhagens
indutoras gimnogenéticas. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 633.1523

JURANDIR PEREIRA SEGUNDO

**AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE INDUÇÃO DE HAPLOIDES
UTILIZANDO O MARCADOR *R1-nj*, EM DIFERENTES
GERMOPLASMAS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de julho de 2014.

Dra. Livia Maria Chamma Davide Universidade Federal da Grande Dourados

Dra. Lisete Chamma Davide UFLA

Dra. Vânia Helena Techio
Orientadora

LAVRAS – MG

2014

A todos meus familiares, que me apoiam e torcem por mim, principalmente aos meus pais, Jurandir e Francisca que fizeram de mim a pessoa que sou hoje.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora Aparecida, aos quais devo tudo. Que me carregaram nos braços nos momentos mais difíceis de minha trajetória e que me fizeram acreditar que é possível chegar mais longe.

Ao arcanjo Miguel, ao qual fui entregue, que me guia e protege.

Aos meus pais, Jurandir P. Nascimento e Francisca Apda A. Nascimento por tudo que fazem por mim, pelo apoio, por serem referências como pessoas na minha vida. Sem vocês não sei se conseguiria!

A minha esposa Aldeise, pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão.

Aos meus irmãos, Rafael e Gabriella, pelo apoio.

Aos meus avós, Maria e Gabriel, pelo grande carinho e preocupação.

A todos meus familiares, que estavam junto comigo a cada passo.

Aos amigos que fiz, durante a caminhada, em especial, Juliano, Daniela, Felipe, Fabiano, Davi e André.

À Helix Sementes Ltda. Pela oportunidade, em especial ao Jânio Delboni, Dr. Urbano C. Ribeiral, Cláudio Zago e Paulo M. Ribas. Sem me esquecer de Lucas Lira pela brilhante ideia! E a todos que de uma forma ou de outra me ajudaram e me ajudam.

À UFLA pela grande oportunidade.

A todos os professores pelos conhecimentos passados, pelo crescimento pessoal e profissional.

À Dra. Vânia H. Techio, pela paciência, que sei que, muitas vezes, testei e retestei e por me abastecer de conhecimento.

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra me ajudaram na realização desse trabalho.

Muito obrigado!!!

“A mente que se abre a uma ideia jamais voltará a seu tamanho normal”

Albert Einstein

RESUMO

Empresas do ramo de sementes vêm buscando alternativas para diminuir o tempo e o custo no desenvolvimento de novas linhagens. Um dos métodos utilizados para alcançar esse objetivo é a obtenção de duplo haploides com base na duplicação de cromossomos de plantas haploides. No milho, para se obter haploides, pode ser utilizado o indutor *in vivo*, que permite produzir haploides de origem paterna (androgenéticos, usados como receptores de pólen) ou de origem materna (gimnogenéticos, usados como polinizadores). Existem muitas técnicas para identificação de indivíduos haploides, tais como: marcadores morfológicos, citometria de fluxo, marcadores de DNA e outros. Objetivou-se neste trabalho analisar a taxa de indução de haploidia e a produção de sementes em diferentes germoplasmas de milho utilizando o marcador morfológico R1-nj. Utilizou-se uma linhagem indutora gimnogenética de clima temperado obtida na Universidade de Hohenheim, Alemanha para polinizar três germoplasmas de milho (Tropical Flint, StiffStalk e Tuxpeño). O indutor foi semeado 10, 15, 20 e 25 dias depois do plantio das fêmeas visando à coincidência entre o pendão do indutor e os estilos-estigmas das plantas receptoras. Após a colheita, as espigas foram debulhadas e os indivíduos haploides selecionados, visualmente, por meio da pigmentação por antocianina produzida pelo gene R1-nj. Sementes com o endosperma pigmentado e embrião sem pigmentação foram selecionadas como haploides. Os germoplasmas de milho avaliados apresentaram diferentes taxas de indução. A linhagem indutora pode ser usada nas condições avaliadas. A população Tropical Flint apresentou a maior produção de sementes. O peso de sementes não é um dado confiável para selecionar haploides. O marcador R1-nj foi mais visível no germoplasmas Tuxpeño.

Palavras-chave: Duplo-haploides. Marcador morfológico. Linhagens indutoras gimnogenéticas.

ABSTRACT

Enterprises of the field of seeds have been seeking alternatives to decrease time and cost on the development of new lines. One of the methods used to achieve this objective is the obtaining of double haploids based on the duplication of haploid plant chromosomes. On maize, to obtain haploids, the *in vivo* inducer may be used, which allows the production of paternally derived haploids (androgenetic, used as pollen receptors) or motherly derived haploids (gimnogenetic, used as pollinators). There are many techniques for identifying haploid individuals, such as: morphologic markers, flow cytometry, DNA markers and others. The objective in this work was to analyze the haploid induction rate and the production of seeds in different maize germplasms using the R1-nj morphologic marker. A gimnogenetic inducing line, from a temperate climate obtained at the University of Hohenheim, Germany, was used to pollinate three maize germplasms (Tropical Flint, StiffStalk and Tuxpeño). The inducer was sown 10, 15, 20 and 25 days after planting the females, aiming at coinciding the tassel of the inducer and the estilos-estigmas of the receiving plants. After the harvest, the ears were hulled and the haploid individuals were visually selected by means of anthocyanin pigmentation produced by the R1-nj gene. Seeds with pigmented endosperm and non-pigmented embryo were selected as haploids. The evaluated maize germplasms presented different induction rates. The inducing line may be used in the evaluated conditions. The Tropical Flint population presented higher seed production. The weight of the seeds is not a trustworthy data to select the haploids. The R1-nj marker was most visible on the Tuxpeño germplasm.

Keywords: Double haploids. Morphologic marker. Gimnogenetic inducing lines.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Origem Distribuição e Importância do milho	13
2.2	Melhoramento do milho	16
2.3	Obtenção de duplo-haploides em milho e suas aplicações potenciais.	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Local do Experimento	34
3.2	Material Botânico	34
3.3	Condução	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

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.

Em 1909, George Harrison Shull sugeriu um método de melhoramento de milho visando à produção de milho híbrido, que apresentou uma notável contribuição para o avanço da agricultura mundial, dando suporte ao desenvolvimento de uma vigorosa e competitiva indústria de sementes (MIRANDA FILHO; VIÉGAS, 1978; PATERNIANI, 1993). O método do milho híbrido baseia-se na produção de linhagens endogâmicas, que são obtidas após sucessivas autofecundações, onde o pólen de cada planta é coletado da parte masculina (pendão) e depositado sobre a parte feminina (estigma) da mesma planta. Em geral, após seis a sete autofecundações, que levam de três a quatro anos nos locais onde é possível realizar duas safras por ano, obtém-se uma nova linhagem (BUENO; MENDES; CARVALHO, 2001). Têm-se como vantagens da utilização de híbridos de milho a associação de características de distintos genitores, a exploração de interações gênicas e da heterose na geração híbrida e a produção de genótipos uniformes (PATERNIANI, 1974). No entanto, em um programa para o desenvolvimento de milho híbrido, a etapa mais onerosa e demorada é a obtenção e a avaliação das linhagens endogâmicas.

Em função da demora e do custo para obtenção das linhagens, os melhoristas, há muito tempo, têm procurado alternativas que agilizem e reduzam o custo desse processo. Uma delas é o emprego da obtenção de duplo-haploides. Isto é, o indivíduo diploide é levado ao nível de haploide e por meio da duplicação cromossômica, feita com ajuda de agentes antimitóticos a condição diploide é restabelecida. Dentre as vantagens podemos citar que com os

haploides há um ganho significativo de tempo na obtenção de linhagens endogâmicas, pois em programas convencionais são necessários em torno de dez a doze anos desde a obtenção da população base ao lançamento do híbrido comercial. Com a obtenção de duplo-haploides podemos diminuir o tempo de dez a doze anos para seis a sete anos. Com os duplo-haploides podemos obter linhagens com características mais próximas das apresentadas pelos parentais que deram origem à população, uma vez que sofrem menos recombinação e segregação do que quando comparado com os métodos tradicionais (HECKENBERGER; BOHN; MELCHINGER, 2005). De acordo com Chase e Nanda (1965), linhagem obtida pelo método de duplo-haploides apresenta menor variância causada por mutações.

O trabalho pioneiro a esse respeito foi publicado por Chase (1952). Embora o processo apresentasse grande potencial, a sua implementação em maior escala não foi realizada, em razão da baixa eficiência das diferentes técnicas de obtenção de duplo-haploides. Essa baixa eficiência está relacionada às baixas taxas de indução conseguidas, utilizando os diferentes métodos de obtenção de duplo-haploides (indutor *in vivo*, cultura de anteras entre outros) e a baixa taxa de indivíduos duplicados conseguida pelos protocolos de duplicação pouco eficientes da época.

Dessa forma, isso limitou, até a década de 90, a utilização da ferramenta em grande escala, em programas convencionais de melhoramento. Nessa época foram obtidos indutores *in vivo* com maior taxa de indução, metodologias mais eficientes na produção de haploides *in vitro* e protocolos de duplicação mais eficientes.

A partir de então, a obtenção de duplo-haploides recebeu a atenção de pesquisadores em todo o mundo. Antes de Chase (1952), já havia relatos sobre haploides. O primeiro foi em 1920 e a primeira angiosperma haploide foi uma planta anã de algodão (DUNWELL, 2010).

No milho a metodologia mais utilizada é dos indutores *in vivo* em função do baixo custo e da não dependência de reagentes ou equipamentos caros (BELICUAS, 2004). Originalmente essas linhagens indutoras são de clima temperado e, quando trazidas para o clima tropical, podem ter suas taxas de indução afetadas, negativamente, pela interação com o ambiente (FRITSCHENETO; BORÉM, 2013). Outro fator que pode influenciar na taxa de indução são os germoplasmas a serem induzidos.

A tecnologia do duplo-haploide é uma ferramenta recentemente inserida no programa de melhoramento de milho da empresa. Apesar de notarmos uma boa taxa de plantas induzidas, não há estudo interno com embasamento científico que nos mostre as reais taxas de indução da linhagem nas condições em que a cultivamos.

Diante desses fatos objetivou-se neste estudo avaliar as taxas de indução de haploides gimnogenéticos e a produção de sementes em diferentes germoplasmas de milho na região de Patos de Minas – MG.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origem Distribuição e Importância do milho

Acredita-se que o milho que conhecemos hoje tenha se originado há, aproximadamente, 7.000 anos, numa área ao sul da Cidade do México, fruto da domesticação do teosinto (provável ancestral do milho) realizada pelos nativos da região. O Teosinto é uma planta com muitos perfilhos e inflorescências (espigas) localizadas nos nós superiores da planta.

Em 5 de novembro de 1492, Colombo observou, claramente, pela primeira vez, a existência de milho na costa norte de Cuba (MANGELSDORF, 1974). Embora possa ter havido contatos anteriores de europeus com o Novo Mundo e seja possível que o milho tenha alcançado o Velho mundo em época anterior (JEFFREYS, 1987), foi Colombo, aparentemente, quem levou grãos de milho ao regressar à Espanha, na sua primeira viagem, na primavera de 1493.

Havia muitas rotas no Atlântico e de Sevilha, na Espanha, o milho foi levado para Síria, no final do ano de 1500, segundo registros históricos, em seguida foi para a Itália e Grécia. Ainda em 1500, existem registros históricos do milho em São Tomé, sul da Índia, Tailândia e Japão. Em meados de 1500 a 1600, Portugal e Espanha introduziram a cultura em todas as partes do mundo por onde passaram, sendo utilizado, principalmente, como alimento para escravos. Houve registros de milho crescendo no oeste da África, sul da África e Somália, espalhando por terras do sul da Índia e Tailândia, sendo introduzido no leste da Índia e Filipinas. Nos anos que seguiram 1700, o milho se difundiu pelo leste e oeste da Europa, Anatólia, Egito, Japão e daqui para o norte da China. Em 1800 foi reintroduzido da América do Norte para o norte da Europa, enquanto isso da costa da África o milho foi migrando para o interior do continente. A suposição é de que o milho entrou na Nigéria por meio de Portugal

que tinha colônias no sudoeste do país. Mas se formos observar os nomes dados ao milho naquela região, vemos que derivam do árabe e por isso surge a hipótese de que o milho entrou na região pelo Egito (GENERATION CHALLENGE PROGRAMME, 2006).

O milho (*Zeamays* L.) é o terceiro cereal mais cultivado no mundo, perdendo apenas para o trigo e o arroz (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2008), tendo sua produção voltada, principalmente, à alimentação animal. Mas seu uso não está restrito apenas à indústria de alimentos. Nos Estados Unidos, por exemplo, o milho é utilizado para produção de etanol. O milho, também, é amplamente utilizado para consumo *in natura* e na forma de subprodutos como pães, farinha e massas (PINAZZA; ALIMANDRO, 1998 apud SILVA, 2009).

Para todos os fins, o milho precisa de alguma transformação, exceto para o consumo *in natura*, quando os grãos, ainda, estão em estado leitoso. Um dos métodos mais utilizados para o processamento do grão é a moagem seca e como produtos finais são obtidos o fubá, a quirela, óleos e farinha integral desengordurada, envolvendo escalas menores de produção e menor investimento. Pela moagem úmida é obtido o amido que, comercialmente, recebe a designação comercial de maizena. Tem-se aumentado a produção de milho, especificamente, destinado ao enlatamento. Milhos do tipo doce adaptados ao país estão sendo disponibilizados no mercado possibilitando o plantio destinado aos enlatados (CRUZ et al., 2008).

No Brasil, a produção de milho vem crescendo anualmente, a área plantada de milho primeira safra no período 2011/12, foi fixada em 7,52 milhões de hectares, representando um decréscimo de 1,5% em relação ao verificado no exercício anterior. A área plantada na segunda safra está estimada em 7,58 milhões de hectares, apresentando um incremento de 23% em relação à área plantada do exercício anterior. Como consequência dessa segunda safra, a

produção brasileira atingiu um recorde de 38,6 milhões de toneladas, apresentando um incremento recorde de 71,7% quando comparada à obtida em 2011. A soma das duas safras de milho totaliza 72,78 milhões de toneladas. Hoje o Brasil é o segundo maior exportador de milho, o cereal é o mais consumido no mundo e o destino dessas exportações é bastante diversificado, onde os países asiáticos têm destaque como importadores (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014). A produtividade estimada para a safra 2014 de cereais no Brasil é de 193,47 milhões de toneladas, superando em 2,6% à obtida em 2013 (188,2 milhões de toneladas), a área cultivada com leguminosas e oleaginosas teve um aumento de 6,1% saindo de 53,56 (2012/2013) para 56,85 milhões de hectares. Dos 193,47 milhões de toneladas, 78,55 são de milho (1ª safra 31,68 milhões de toneladas e 2ª safra 46,87 milhões de toneladas), cultivados em uma área de 15,83 milhões de hectares com produtividade média de 4.982 kg.ha⁻¹.

A importância do milho no Brasil é ampla, sua produção se faz tanto em pequenas propriedades, com finalidade de subsistência, quanto em grandes extensões de terras, sendo a produção destinada ao abastecimento do mercado. Sua importância nutricional o torna amplamente utilizado, não apenas na alimentação humana, mas, principalmente, em ração animal (PAVÃO; FERREIRA FILHO, 2011). Apesar de não ter uma participação muito grande no uso de milho em grão, a alimentação humana, com derivados de milho, constitui fator importante de uso desse cereal em regiões com baixa renda (CRUZ et al., 2006).

O milho é considerado um alimento energético na alimentação animal e humana em virtude de sua composição onde predominam carboidratos e lipídios. Existem milhos especiais que possuem valores de proteínas de grande qualidade, frutos do melhoramento genético resultado do gene mutante opaco-2. O milho comum possui uma boa quantidade de proteína, assim como o opaco-2, mas sua

proteína quando comparada com à outra é considerada inferior. O óleo do grão de milho possui, em sua composição, ácidos graxos que o definem como de grande importância para a dieta humana, prevenindo até mesmo doenças cardiovasculares e controle do colesterol sérico elevado (PAES, 2006).

Muitas famílias do nordeste brasileiro têm o milho como fonte de energia, no México o milho é ingrediente básico para muitas receitas típicas. Apesar de sua versatilidade no uso, o milho tem acompanhado, basicamente, o crescimento da produção de aves e suínos, tanto no Brasil quanto no restante do mundo (DUARTE, 2000).

Outra informação relevante, obtida em um estudo realizado pela EMBRAPA MILHO E SORGO é em relação ao tipo das cultivares. Para safra 2012/2013, em números arredondados, 61% das cultivares são híbridos simples, categoria, geneticamente, com maior potencial produtivo. Os híbridos triplos, que vêm logo em seguida em relação a potencial produtivo, somam 21,5%. Já, os híbridos duplos são 10% e as variedades chegam a 7%. Ou seja, mais de 90% das cultivares disponíveis no mercado brasileiro são híbridos e mais 82% estão em um nível tecnológico de produtividade considerado alto cujas sementes são mais caras (ARAÚJO, 2008).

2.2 Melhoramento do milho

Em 1909, George Harrison Shull sugeriu um método de melhoramento de milho visando à produção de milho híbrido e o aproveitamento da heterose, que apresentou uma notável contribuição para o avanço da agricultura mundial, dando suporte ao desenvolvimento de uma vigorosa e competitiva indústria de sementes (MIRANDA FILHO; VIÉGAS, 1978; PATERNIANI, 1993).

Até o início dos anos vinte do século 20, a produção de milho estava restrita às variedades. No início desta década, surgiram os primeiros híbridos

duplos e com isso, diversos estudos passaram a ser conduzidos, viabilizando a produção e a utilização comercial de sementes híbridas (SPRAGUE; DUDLEY, 1988; HALLAUER, 1990).

O termo heterose foi proposto a primeira vez por Shull, semanas antes do início da Primeira Guerra Mundial (BORÉM, 1997). Heterose, também, chamada de vigor de híbrido diz respeito à superioridade dos filhos em relação à média dos pais. Essa, teoricamente, será tão mais pronunciada quanto mais diferentes geneticamente forem os pais que entram na composição do híbrido.

Antes do advento do milho híbrido eram colhidos nos Estados Unidos cerca de 82 milhões de toneladas em 40 milhões de hectares, dando uma média de pouco mais de 2 toneladas por hectare. Após o milho híbrido, a partir de 1965, a produção de milho nos EUA já era maior do que 110 milhões de toneladas em uma área menor que 30 milhões de hectares. As produtividades das variedades de polinização aberta e de híbridos em 1935 eram de 4 a 5 toneladas por hectare, respectivamente, enquanto híbridos em 1975 produziram 8,5 toneladas por hectare (SPRAGUE, 1972; DUVIK, 1977 apud PATERNIANI; VIÉGAS, 1987).

As informações sobre o aumento da produtividade dos híbridos sobre as variedades de polinização livre variam, mas o híbrido produz em torno de 25 a 35% a mais (RUSSEL, 1974 apud PATERNIANI; VIÉGAS, 1987).

Em 1932, Krug e colaboradores iniciaram um programa de melhoramento de milho, no Instituto Agrônomo de Campinas, Estado de São Paulo, por meio de autofecundações de variedades locais, tais como Cateto (grãos duros de cor laranja), Cristal (grãos duros e brancos) e Amparo (grãos dentados e brancos) (PATERNIANI; VIÉGAS, 1987).

Em 1935, G. Drummon, A. Secundino e S. J. Araújo iniciaram um programa de melhoramento de milho em Viçosa, MG, autofecundando variedades locais, especialmente Cateto e milhos dentados amarelos. Seus

trabalhos tiveram sequência com a formação da Agroceres, companhia privada de produção de sementes de milho (PATERNIANI; VIÉGAS, 1987).

Em 1939 o primeiro híbrido duplo foi obtido no Instituto Agronômico de Campinas. Em 1945 a Agroceres foi a pioneira no lançamento do híbrido duplo de milho no Brasil (BORÉM, 1997). Em 1946 o híbrido duplo H-3531, obtido com base em quatro linhagens Cateto, foi produzido comercialmente. Este híbrido produziu cerca de 22% mais do que o Cateto. Em 1953, o híbrido duplo semidentado H-4624, obtido pelo Instituto Agronômico de Campinas, produziu cerca de 43% mais do que uma variedade dentada local Armour, representativa de Dente Paulista (PATERNIANI; VIÉGAS, 1987).

O IAC, trabalhando com linhagens derivadas de variedades locais, sintetizou alguns híbridos duplos (HD). Em 1956, surgiu o híbrido duplo H-6999-A superior às variedades locais mais plantadas, produzindo cerca de 50% a mais. Dois anos depois o novo HD H-6999-B produziu 9% a mais que o anterior. Em 1980 um novo híbrido, dessa vez intervarietal foi lançado com o nome de Phoenix-B. Em 1981 e 83 surgiram mais dois híbridos duplos, H-8218 e H-8222, respectivamente (PATERNIANI; VIÉGAS, 1987).

Paralelamente aos trabalhos do IAC, o departamento de genética da ESALQ iniciou um programa de melhoramento voltado para o desenvolvimento de variedades. Entre 1961 a 1972 desenvolveu algumas variedades tais como: América Central, Piramex, Piranão e outras. A variedade Piramex sintetizada baseada em germoplasmas Tuxpeño obteve, praticamente, mesma produtividade do híbrido duplo H-6999-B. Em 1972 iniciou um programa visando à formação de variedades de porte mais baixo, desse programa sai a variedade ESALQ-PB1, que produziu 14,3% a mais que a variedade Piranão (PATERNIANI; VIÉGAS, 1987).

Em 1974 tivemos a criação da EMBRAPA e do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, com isso uma nova fase se iniciou, com a introdução de novos germoplasmas (PATERNIANI; VIÉGAS, 1987).

Outros programas foram iniciados e hoje muitas empresas, nacionais e multinacionais participam do mercado de sementes de milho no Brasil.

Na obtenção do milho híbrido, há três etapas distintas: a obtenção das linhagens endogâmicas, o teste de capacidade de combinação das mesmas, identificando as melhores combinações e a comercialização das cultivares híbridas. Dentre as etapas citadas, a obtenção de linhagens é a mais demorada e, normalmente, de custo elevado. Isto porque, para atingir a homozigose, são necessárias de seis a oito gerações de endogamia (PATERNIANI; CAMPOS, 1999).

Com a utilização de linhagens endogâmicas, podem ser sintetizados híbridos simples, que são obtidos pelo cruzamento entre duas linhagens (AxB), simples modificados, obtidos pelo cruzamento de duas linhagens irmãs para compor a fêmea e uma terceira que será utilizada como macho $[(A1 \times A2) \times B]$, híbrido triplo sintetizado pelo cruzamento entre um híbrido simples para compor a fêmea e uma terceira linhagem servindo como macho $[(A \times B) \times C]$. Temos, também, o híbrido triplo modificado composto pelo cruzamento de duas linhagens aparentadas utilizadas como macho no cruzamento e um híbrido simples como fêmea. Ainda, é possível obter o híbrido duplo que consiste no cruzamento entre dois híbridos simples $[(A \times B) \times (C \times D)]$.

O sucesso para um programa de melhoramento depende do desenvolvimento de linhagens elites para a produção dos híbridos. Para isto, vários métodos podem ser utilizados (MIRANDA FILHO; VIÉGAS, 1978).

Os mais variados tipos de populações são utilizados nos diversos programas de melhoramento das espécies cultivadas. Alguns melhoristas preferem as populações originadas de cruzamentos simples, enquanto outros

preferem cruzamentos complexos, em que a genealogia da população inclui diversas linhagens e variedades, envolvendo desde cruzamentos simples até retrocruzamentos (BORÉM, 1997).

A principal metodologia, conhecida como padrão, é a utilização de sucessivas autofecundações da população ou da variedade original. Em cada ciclo, os descendentes de todas as plantas, denominadas famílias, são semeados em linhas. As melhores famílias são selecionadas, então, os melhores indivíduos dentro de cada família são novamente autofecundados, repetindo-se o processo por várias vezes até que a homozigose completa seja atingida, o que, em geral, consegue-se no sétimo ciclo (S_7 ou F_8), quando as linhagens chegam a, aproximadamente, 99,22% de homozigose (BARBOSA, 2009).

Outros métodos são utilizados para a obtenção de linhagens, dentre eles podemos citar o método de seleção massal que é realizado por meio da seleção fenotípica dos melhores indivíduos com base na geração F_2 tendo continuidade nas gerações seguintes. Na F_2 são escolhidos os melhores indivíduos para o caráter em questão. Estes são colhidos, misturados e semeados para dar origem à geração F_3 . Esse processo se repete até a geração F_5 onde as sementes serão misturadas pela última vez e semeadas, pois na próxima geração serão selecionados os melhores indivíduos para serem avaliados em ensaios de competição com repetição (autógamas) ou levadas para serem cruzadas e gerarem híbridos para serem avaliados (alógamas).

Outro método utilizado é do Bulk que se inicia na F_2 , as plantas semeadas são colhidas juntas e uma amostra dessas sementes é retirada para compor a população que dará origem à próxima geração. Esse processo se repete até a F_5 ou F_6 , aqui temos a abertura do bulk, que consiste na seleção de indivíduos que darão origem à geração $F_{5:6}$ ou $F_{6:7}$ e essas serão avaliadas em ensaios com repetição (autógamas) ou para geração de híbridos e posterior avaliação em ensaios com repetição (alógamas).

O método do descendente de uma semente (SSD) é muito importante em regiões de clima temperado, pois possibilita o avanço de gerações em condições de casas de vegetação por necessitarem de menor espaço. O método consiste na colheita de uma única semente do indivíduo selecionado na F_2 e esse processo é realizado nas outras gerações até que a maioria dos locos esteja em homozigose. Em seguida, os indivíduos obtidos são avaliados em ensaios com repetição (autógamas), no caso de plantas alógamas os indivíduos são cruzados e seus híbridos avaliados em ensaios com repetição.

Dentre todos os métodos o mais popular entre os melhoristas, principalmente, os de milho, é o método genealógico. A primeira descrição completa e detalhada do método genealógico foi apresentada por Love em 1927, que priorizou nos vários programas de melhoramento que coordenava na Universidade de Cornell. Conforme descreveu esse autor, a geração F_2 deve ser conduzida em condições representativas de cultivo, utilizando um espaçamento ligeiramente maior, para possibilitar a avaliação individual de plantas (BORÉM, 1997). Esse método já foi considerado o mais utilizado em plantas autógamas em todo o mundo, há relatos de sua utilização em diversas culturas. A condução inicia-se com as plantas F_2 com a seleção visual de indivíduos superiores, cada indivíduo será semeado em uma linha na geração seguinte dando origem às progênies $F_{2:3}$, são escolhidas as melhores progênies $F_{2:3}$ e dentro delas são selecionadas os melhores indivíduos que darão origem às progênies $F_{3:4}$, esse processo será repetido até $F_{4:5}$ ou $F_{5:6}$. Em plantas autógamas, os melhores indivíduos selecionados serão colhidos e semeados em ensaios para serem avaliados. Em plantas alógamas as melhores linhagens obtidas são dirigidas para serem cruzadas e seus híbridos avaliados em ensaios com repetição.

2.3 Obtenção de duplo-haploides em milho e suas aplicações potenciais

Em função da demora e do alto custo para a obtenção das linhagens, os melhoristas, há muito tempo, têm procurado alternativas que agilizem e reduzam o custo para o processo de obtenção de linhagens. Uma delas é o emprego da tecnologia de duplo-haploides (PIERRE et al., 2011), a qual foi proposta pela primeira vez para o milho por Chase em 1952. Essa tecnologia vem sendo utilizada em algumas espécies como aveia, trigo, sorgo e milho (BARBOSA, 2009).

Para obter indivíduos duplo-haploides, é necessário, inicialmente, levar o indivíduo à condição haploide e, assim, após a duplicação cromossômica realizada pelos agentes antimitóticos, restaurar a condição diploide do indivíduo.

Indivíduos haploides são portadores de uma única cópia de cada cromossomo característico de cada espécie e apresentam no tecido somático o número n de cromossomos típicos de gametas do organismo (BORÉM, 1997).

Os primeiros trabalhos relatando a ocorrência natural de haploides são da década de 1920 (BORÉM; FRITSCHÉ-NETO, 2013). Haploides naturais em plantas foram descritos em, aproximadamente, 100 espécies de angiospermas. No entanto, a ocorrência de haploidia natural é considerada rara (VASIL, 1996). Em milho, a ocorrência é de menos uma planta para cada mil indivíduos (CHASE, 1963) e a primeira planta haploide de milho foi descrita em 1929 (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

Haploides de espécies diploides, como o milho, são conhecidos como monohaploides, pois possuem apenas um conjunto de cromossomos, sendo assim considerados os verdadeiros haploides, mas também existem os haploides de culturas poliploides, como trigo e batata, denominados de polihaploides, e que são considerados haploides em relação à cultura de que foram obtidos, por

exemplo, a batata cultivada é um tetraploide ($2n=4x=48$) seus respectivos haploides serão na realidade diploides ($2n=2x=24$) (CANHOTO, 2010).

Existem diversos métodos para obtenção de haploides, e a eficiência de cada um varia de acordo com as espécies.

Os principais processos para a produção de haploides são utilizados *in vitro*: cultura de anteras, cultura de micrósporos, cultura de ovários e resgate de embriões, e *in vivo* por cruzamentos divergentes ou usando linhagens indutoras de haploidia. A cultura de anteras e os cruzamentos interespecíficos são considerados os mais importantes (BORÉM, 1997). Entretanto, o método da cultura de anteras é, relativamente, eficiente em cevada, trigo, brássicas e outras espécies, mas, ainda, não apresenta potencial para soja, feijão e aveia (BORÉM, 1997). O método de cruzamentos divergentes tem sido utilizado com sucesso em algumas culturas como trigo, cevada, batata e outras. Atualmente, as empresas de melhoramento utilizam mais o método *in vivo* por apresentar-se mais promissor (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2013).

A cultura de anteras, micrósporos e ovários baseia-se na capacidade que as células têm de se regenerar e dar origem a um novo indivíduo, fenômeno conhecido por totipotência, teorizado em meados do século XIX (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2013). Para os três métodos, a inoculação deve ser feita em meio de cultura apropriado, onde conterão as substâncias necessárias para o desenvolvimento de um novo indivíduo. Após a inoculação, o meio de cultura favorecerá o desenvolvimento de calos ou embrioides (embriogênese gamética indireta) e, após estímulos adequados, podem se regenerar em plantas haploides (PIERRE et al., 2011).

Os cruzamentos divergentes podem ser os interespecíficos e intergenéricos. Um cruzamento interespecífico aplicado com sucesso é entre trigo (*Triticumaestivum* ou *Triticumdurum*) ou cevada (*Hordeumvulgare*) e plantas de *Hordeumbulbosum*, estas sendo utilizadas como progenitores

masculinos e as plantas das quais se pretende tirar os haploides funcionam como progenitores femininos (CANHOTO, 2010).

Para explicar o método dos cruzamentos divergentes, será tomado como exemplo o trigo. O plantio, de preferência em ambiente controlado. As espigas do trigo são emasculadas, ou seja, suas anteras são retiradas com o pólen ainda imaturo. Mais ou menos três dias depois da emasculação é feita a polinização, utilizando como doador de pólen o milho (cruzamento intergenéricos), repetindo essa operação duas vezes para melhorar a eficiência do cruzamento. Quando a semente, ainda, estiver imatura, 16 a 18 dias após a fertilização, é feito o resgate do embrião o qual é transferido para o meio de cultivo *in vitro* que irá substituir as funções do endosperma. Caso o genoma dos indivíduos cruzados seja pouco incompatível, híbridos diploides podem ser formados ou o genoma de um pode ser total ou parcialmente eliminado, se for o genoma masculino eliminado um embrião haploide é formado em processo similar ao da partenogênese (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2013).

O processo *in vivo* se baseia no método que utiliza linhagens indutoras e que podem gerar haploides maternos (gimnogenéticos) e paternos (androgenéticos), dependendo do tipo de linhagem empregada. É uma metodologia de baixo custo por não necessitar de reagentes ou equipamentos caros (BELICUAS, 2004).

Inicialmente duas linhagens indutoras de haploidia se destacaram Stock 6 (gimnogenético) e Wisconsin 23 (androgenético). O desenvolvimento da linhagem denominada Stock 6 por Coe em 1959, que autofecundada produzia frequência de haploides de 3,2%, abriu possibilidades do uso de polinizadores seletivos para aumentar a frequência de haploides (SARKAR; PANKE; SACHAN, 1972).

A linhagem indutora Stock 6 gera haploides de origem materna ou gimnogenéticos, utilizada como genitor masculino nos campos de indução. O

mecanismo de indução de haploidia dessa linhagem não é bem conhecido (ROTARENCO; GEORGETA; MARIANA, 2009). Porém, há indícios de que, para a formação de linhagens haploides, dois núcleos espermáticos são desenvolvidos com diferentes velocidades. Como resultado, um dos núcleos espermáticos atinge o estágio pronto para a fertilização, enquanto o outro não. A existência de somente um núcleo espermático normal no grão de pólen pode ser a razão para a quebra da dupla fertilização e o desenvolvimento de sementes com embriões haploides na espiga da planta que recebeu o pólen de um indutor gimnogenético (SILVA et al., 2009).

A outra linhagem, conhecida como Wisconsin 23 (W23), gera haploides androgenético, utilizada nos campos de indução como progenitor feminino. A taxa de indução é relativamente menor, variando de 1 a 3% (KERMICLE, 1969).

O controle genético do sistema androgenético tem sido estudado. Um gene (*ig*), denominado gametófito indeterminado, é responsável pelo caráter. O alelo recessivo desse gene induz a produção de haploides com base no gameta masculino (KERMICLE, 1969).

O gene *ig1* está localizado no braço longo do cromossomo três do milho (KERMICLE; DEMOPULOS-RODRIGUES, 1980). Segundo Evans (2007), o gene *ig1* é amplamente expresso em uma variedade de tecidos em milho, como folhas, primórdios foliares, espigas imaturas, pendão imaturo, cabelo e palha jovem. O gene *ig1* apresenta baixa expressão no endosperma, em raízes e grãos de pólen maduros e se expressa em varias partes florais, nos diferentes estágios de desenvolvimento.

Foi observado que a presença do alelo *ig1* em caráter recessivo permite a ocorrência de um número variável de divisões mitóticas, resultando em um saco embrionário com 16 núcleos ou mais, em vez dos oitos observados normalmente. Como resultado das divisões adicionais, o indivíduo mutante que

apresenta o alelo *igl* exibe heterofertilização, poliembrionia, e variação no nível de ploidia do endosperma depois da fertilização (LIN, 1981).

De acordo com Lin (1981), os sacos embrionários com oosferas degeneradas, provavelmente, favorecem o desenvolvimento de um núcleo reprodutivo de grão de pólen sem a ocorrência de fertilização, dando origem a um embrião androgenético haploide.

Até recentemente a utilização de haploides em programas de melhoramento não tinha sido considerado pelos melhoristas por falta de técnicas para produzi-los em grande número e de forma previsível (BORÉM, 1997). Um dos motivos era a baixa taxa de indução das linhagens indutoras. Por isso, varias iniciativas foram realizadas no intuito de aumentar as frequências de indução de haploides das linhagens Stock 6 e W23. Em condições temperadas, com base nessas duas linhagens, foram geradas inúmeras outras. Lashermes e Beckert (1988) obtiveram a linhagem WS14, com taxa de indução de 3 a 5%, essa linhagem foi obtida pelo cruzamento entre a Stock6 e W23. As linhagens indutoras ZMS e KMS, também, foram derivadas do cruzamento da Stock6 com a WS14 e o cruzamento da ZMS com KMS deu origem à linhagem MHI, que induz, em média, 6,5% de haploides (EDER; CHALYK, 2002). A linhagem indutora RWS, obtida pelo cruzamento entre WS14 e KEMS, mostrou de 8 a 10% de haploides gimnogenéticos (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

Geiger, Spatz e Bershadsky (2009) relatam sobre um indutor de nome RWK-76 que, quando cruzado, produzia, aproximadamente, 90 haploides em 1000 sementes. O cruzamento RWK-76 x RWS apresentou uma taxa de indução de 90 a 100 haploides em 1000 sementes, sendo preferido por apresentar mais vigor e mais pólen quando comparado com as linhas puras.

Rotarenco et al. (2010) cruzaram as linhagens indutoras gimnogenéticas Stock 6 e MHI, a fim de obter indutores superiores, tanto na taxa de indução quanto nas características agronômicas. Obtiveram desse cruzamento nove

linhagens indutoras, pelo fenótipo e outras características foram separadas em quatro grupos. As novas linhagens induziram taxas entre 10,7 e 16,8%, enquanto a Stock 6 variou de 0,7 a 2,1% e a MHI de 5,5 a 9,1%.

Entre as linhagens indutoras androgenéticas e gimnogenéticas, há uma preferência na utilização das gimnogenéticas pelas empresas. Isso por causa das altas taxas de indução encontradas nessas linhagens, quando comparadas com as androgenéticas, outro fator é a praticidade oferecida. É comum as linhagens indutoras serem mais precoce do que as populações tropicais. Silva (2009), utilizando a linhagem indutora androgenética Wisconsin-23 (W23), portadora do alelo *ig1*, observou que esta era de 25 a 30 dias mais precoce quando comparada com as famílias F₃ avaliadas. Belicuas (2004) encontrou resultados semelhantes, sendo a linhagem indutora W23 25 dias mais precoce que um híbrido simples comercial em condições tropicais. Rabel (2008) relatou diferença de 14 dias entre a W23 e um híbrido simples comercial nas condições tropicais. Em um campo de indução, onde se utiliza um indutor gimnogenético, o manejo é facilitado, pois se pode fazer o campo isolado em polinização aberta e induzir diferentes matérias ao mesmo tempo. O indutor será utilizado como macho e os materiais a serem induzidos como fêmeas. Antes do florescimento, as plantas dos materiais que serão induzidos são despendoadas e a polinização ocorre naturalmente (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2013).

Após a indução, há a necessidade de identificar os putativos haploides. Com esse objetivo, Lashermes e Beckert (1988) utilizaram marcadores fenotípicos, genes de ausência de lígula e glossy (*lg1*, *lg2* e *gl1*). Verificaram variação na frequência de indução dependendo do genótipo, podendo variar entre 0,4 e 2,4%.

Bordes et al. (1997) propuseram o uso de alelos recessivos do marcador *glossy1*, para a detecção de haploides, após a indução de haploidia, pelo indutor

FIGH1. Com esta técnica os autores conseguiram produzir haploides em uma taxa de 0,64%.

Chase e Nanda (1965) descreveram um sistema de marcador fenotípico, baseado na pigmentação por antocianina, determinado pelo gene dominante *R-nava* (*Rj-nj*), para identificação precoce dos haploides gerados por meio de linhagens indutoras. O alelo dominante promove a pigmentação com antocianina no endosperma e no embrião das sementes diploides e as sementes haploides apresentam pigmentação somente no endosperma ficando com o embrião branco.

Rotareno (2010), para conseguir novos indutores, cruzou a linhagem MHI, para obter boas características agrônômicas, com a Stock 6, como fonte dos genes *B1* e *P11* que não dependem de luz para expressar a pigmentação por antocianina. Esses genes marcam as raízes, ajudando na seleção na fase de *seedlings*, as raízes não coradas indicam os prováveis haploides.

A expressão desse gene é bastante influenciada pelo background genético e pelo processo de maturação da semente, além da existência de genes dominantes (*C1-l*, *C2-l^{df}* e *Iⁿ¹-ID*) que inibem a síntese de antocianina (COE, 1994). Tais fatores dificultam a identificação precoce de genótipos haploides, limitando a ampla aplicação dessa metodologia em programas de melhoramento (BELICUAS et al., 2007).

Outras técnicas como contagem cromossômica são simples de serem realizadas, exigindo uma habilidade na confecção das lâminas além de ser trabalhosa e demorada. Raízes de sementes recém germinadas são as melhores fontes contendo meristemas com alto índice mitótico. Um pré-tratamento com agentes antimitóticos é feito para acumular metáfases. Um dos mais utilizados é a colchicina. Para melhorar a visualização, é necessário separar os cromossomos do restante da célula e para isso é utilizado o método de *Feulgen*, no qual o DNA reage com uma solução de ácido clorídrico que retira as bases púricas e

forma agrupamentos aldeídos na desoxirribose. Então, na presença de fucsina básica descorada pelo anidrido sulfuroso (Schiff), esse elemento combina com os radicais aldeídos, formando um composto vermelho insolúvel (FRITSCHENETO; BORÉM, 2013).

Um método de identificação que busca melhorar a acurácia na identificação dos indivíduos haploides é a citometria de fluxo. Esse método é baseado no processo de divisão celular dos eucariotos que se divide em fase G1, S e G2. Durante o G1 ocorre o crescimento celular, onde cada célula apresenta duas cópias de cada cromossomo (2C). Na fase S ocorre a duplicação do material genético e na fase G2 há um novo crescimento celular em que o conteúdo de DNA é 4C (FRITSCHENETO; BORÉM, 2013). A quantificação do nível de ploidia por esse método 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 à quantidade de DNA dos núcleos na fase G1 do ciclo celular. A estimativa do nível de ploidia é feita comparando-se os picos G1 do histograma de uma amostra com o pico de uma planta-padrão com ploidia conhecida (DOLEZEL, 1997).

Os indivíduos haploides obtidos pelos diferentes métodos não apresentam aplicação direta na agricultura, como cultivares, pois de modo geral apresentam plantas de baixo vigor quando comparadas com diploides, além de serem mais sensíveis às variações ambientais e ao ataque de doenças e pragas. No melhoramento os haploides, também, não são úteis, mas podem integrar programas de desenvolvimento de cultivares se tiverem seus cromossomos duplicados, dando origem aos duplo-haploides (FRITSCHENETO; BORÉM, 2013).

A duplicação cromossômica costuma ser uma restrição na produção de linhagens duplo-haploides em escala comercial em razão da baixa eficiência dos protocolos de duplicação (BELICUAS, 2012).

Como a duplicação espontânea ocorre, inconsistentemente, é comum o desenvolvimento de protocolos de indução de duplicação, utilizando agentes antimitóticos. Diversos agentes têm sido empregados: colchicina (o mais utilizado, inclusive, para o milho) e herbicidas (amiprofosfo-metil, orizalina e trifluralina). Todos esses compostos inibem a formação do fuso mitótico, por se ligarem à tubulina, resultando na não segregação das cromátides irmãs e, conseqüentemente, na duplicação cromossômica (CASTILLO et al., 2009). Segundo Chase (1963), a taxa de duplicação espontânea é de 0 a 10% em haploides induzidos *in vivo*.

Trabalhos relacionados à indução de duplicação cromossômica, em milho, são escassos na literatura e os protocolos relatados, ao serem testados, não possibilitam alcançar os resultados esperados (PIERRE et al., 2011).

Gayen et al. (1994) deram um salto no método de duplicação, quando cortaram a ponta do coleótilo das plantas haploides de milho quando tinham, aproximadamente, 3 a 4 dias de germinação. Após, deixaram as plântulas imersas em DMSO 0,5% e colchicina 0,06 por 12 horas e 18°C, conseguindo uma taxa de duplicação de 18,05%.

Deimling, Röber e Geiger (1997) melhoraram o método sugerido por Gayen et al. (1994), realizando um corte nas raízes, deixando-as com vinte a trinta milímetros de comprimento, colocando as plântulas imersas na solução contendo 0,06% de colchicina e 0,5% de DMSO (dimetilsulfóxido) por dose horas no escuro. Em seguida, as plântulas foram lavadas em água corrente e mantidas no escuro por dois dias. Zabirowa et al. (1996) sugeriram um método de duplicação para o milho, em que, na fase de terceira ou quarta folha, uma solução de colchicina de 0,125%

Chalik (1999) comparou os métodos de Gayen, Deimling e Zabirowa avaliando o percentual de plantas duplo-haploides, considerando o pendão fértil. Para indução *in vivo*, Tang et al. (2006), aplicaram no ápice de cada planta

haploide, 2 μ L de solução contendo colchicina (0,1%) e dimetilsulfoxide (DMSO) a 2%. De acordo com Castillo et al. (2009), a indução *in vivo*, é dificultada pela inacessibilidade ao meristema. Além disso, a aplicação de bloqueadores mitóticos em plântulas é desvantajosa, uma vez que é necessário utilizar altas concentrações e volumes do agente antimitótico. Por isso, ocorre alta taxa de mortalidade, e a produção de plantas mixoploides e quiméricas é frequente (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

Algumas empresas produtoras de sementes de milho dominam essa tecnologia e conseguem percentuais de duplicação satisfatórios, mas os protocolos das metodologias empregadas não estão disponíveis à comunidade acadêmica.

Um programa de melhoramento, baseado em duplo-haploide inicia-se, à semelhança dos métodos convencionais, com a seleção de progenitores para os cruzamentos. Após a realização dos cruzamentos, plantas F₁ são cultivadas e utilizadas como fonte de variabilidade. Dependendo do método de produção de duplo-haploides, as plantas F₁ são cruzadas com indivíduos de outras espécies ou de outros gêneros da mesma família, como o método dos cruzamentos interespecíficos. Essas plantas podem, também, ser utilizadas como fonte de óvulos, anteras ou micrósporos, para, por meio da cultura de tecidos, produzir haploides. Como os indivíduos F₁ são, geneticamente, uniformes, não existe oportunidade de o melhorista selecionar gametas superiores. Duplo-haploides podem ser extraídos (após duplicação) de gerações mais avançadas, mas os gametas da geração F₁ constituem uma amostra da variabilidade genética que se expressaria na geração F₂. O número necessário de duplo-haploides para constituir uma amostra representativa de determinado cruzamento é menor que o utilizado pelo método genealógico ou da população, porque os gametas F₁ são amostrados em vez dos indivíduos F₂. O número de gametas de plantas F₁ necessário para constituir uma amostra pode ser estimado pela raiz quadrada do

tamanho da população que, normalmente, seria requerida. Por exemplo, uma população com 40.000 indivíduos F_2 pode ser representada por 200 duplo-haploides (BORÉM, 1997).

Um processo normal de autofecundação em espécies diploides, considerando apenas dois pares de locos independentes segregando entre os genitores (AA bb) e (aaBB), o genótipo recessivo aabb tem uma probabilidade de ser encontrado na proporção 1/16 em uma população F_2 . Entretanto, na indução de haploidia, o mesmo genótipo terá a probabilidade de ocorrência de $\frac{1}{4}$ na população. Isso ocorre em função da ausência dos heterozigotos, prevalecendo apenas os quatro genótipos homozigotos (AABB, AA bb , aaBB e aabb). Com a obtenção de linhas homozigotas, a variância aditiva é maximizada, os efeitos de dominância são neutralizados e as vantagens na seleção de características quantitativas podem ser superiores, uma vez que é realizada somente com base na aditividade, não havendo interferência dos efeitos de dominância e epistasia (SILVA et al., 2009).

Além da vantagem da eliminação dos indivíduos heterozigotos, outras vantagens são vistas nos duplo-haploides. Na teoria, os duplo-haploides podem aumentar a eficiência no melhoramento do milho (PIERRE et al., 2011).

A grande vantagem desse método consiste na diminuição do tempo para obtenção das linhagens homozigotas, após o cruzamento de um híbrido com um indutor de haploidia. Pode-se aumentar a velocidade de obtenção de linhagens homozigotas em até três vezes em relação aos métodos tradicionais (STRAHWALD; GEIGER, 1988 apud BORDES et al., 2006). Utilizando os métodos de condução de população convencionais, são necessários de 10 a 12 anos desde a obtenção da população base até o lançamento do híbrido, com os duplo-haploides esse tempo pode ser reduzido para 6 a 8 anos (FRITSCHENETO; BORÉM, 2013). Além de permitir que o melhorista realize o test-cross com linhagens homozigotas em vez de fazê-lo utilizando-se de material que

ainda apresenta segregação utilizando de testes precoces com linhagens $F_{3:4}$ ou $F_{4:5}$ (BARBOSA, 2009). Esse fato vem a ser uma vantagem relacionada à precisão experimental (PIERRE et al., 2011).

Melchinger et al. (2005) citam que duplo-haploides (DHs) são considerados uma alternativa atrativa para seleção recorrente em alógamas, como no caso o milho. Em trabalho realizado na Universidade de Hohenheim, Alemanha, os autores testaram o cruzamento de DHs com um testador e populações de F_1 , F_2 e F_3 cruzadas com testador. Em três anos de testes, os duplo-haploides obtiveram um ganho de seleção de 27% superior se comparado às populações F_1 , F_2 e F_3 .

No processo de obtenção de linhagens pelos métodos tradicionais, há um aumento na recombinação de genes ligados provocado pelas sucessivas autofecundações. Dessa forma é difícil se manter ligações favoráveis encontradas nos genitores do híbrido. Nos duplo-haploides derivados de F_1 , ocorre apenas uma recombinação na meiose que deu origem aos gametas responsáveis pela formação dos haploides. Assim, boa parte dos genes ligados não são recombinados, aumentando as chances de manter ligações favoráveis encontradas nas linhagens parentais (PIERRE et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Experimento

A pesquisa foi realizada nas dependências da fazenda experimental da Helix Sementes Ltda, localizada próxima à margem direita da rodovia BR-365, Km 429, sentido Uberlândia, Minas Gerais – Patos de Minas, Minas Gerais (coordenadas geográficas S 18° 45'0,7" e W 46° 37' 18,3"). Empresa do ramo de sementes do grupo Agrocere, com as marcas Biomatrix e Santa Helena, com sede em Rio Claro, São Paulo. As atividades foram realizadas entre os períodos de março de 2013 a março de 2014.

3.2 Material Botânico

Para esse trabalho foram utilizadas três híbridos desenvolvidos no programa de melhoramento genético de milho da Helix Sementes, obtidos pelo cruzamento aos pares de seis linhagens homozigotas do programa, sendo cruzadas duas linhagens classificadas como grãos duros tropicais para obter o híbrido A (Tropical Flint), duas classificadas como grãos dentados para formar o híbrido B (Tuxpeño) e duas classificadas como tropical temperada para formar o híbrido C (StiffStalk). Neste trabalho, os híbridos A, B, e C foram designados Pop. A, Pop. B e Pop. C, respectivamente. A linhagem indutora utilizada foi obtida na Universidade de Hohenheim, Alemanha. Trata-se de uma linha indutora gimnogenética, sendo utilizada como linhagem polinizadora (macho) nos campos de indução.

3.3 Condução

Os três híbridos foram semeados em um campo de indução de haploidia com polinização manual e com irrigação por aspersão. Para cada híbrido foram utilizadas 200 sementes, tratadas com inseticida, para compor quatro linhas de cinco metros, com densidade de plantio de cinco sementes plantadas, por metro e espaçamento de 0,7 metros, sendo colocadas duas sementes por cova e no vigésimo dia foi realizado o desbaste, deixando apenas uma planta por cova. Foram utilizados 500 kg do formulado 08-28-16 na adubação de base e na cobertura 120 kg de N da formulação 20-00-20, aplicado na superfície em duas épocas, a primeira em V3-V4 e a segunda em V6-V8. O restante do manejo foi conforme o recomendado para a cultura do milho.

A polinização foi realizada manualmente, isolando os pendões do indutor no período da tarde do dia anterior e a polinização realizada sempre no período da manhã do dia seguinte. As fileiras do campo de indução com a linhagem indutora foram plantas 10, 15, 20 e 25 dias depois que os híbridos a serem induzidos, com intuito de melhorar a coincidência entre o pendão da indutora e o estilo estigma dos híbridos que receberam o pólen; a linhagem indutora apresenta-se muito precoce em relação à maioria dos genótipos induzidos, anteriormente, na empresa, florescendo com 35 a 40 dias após o plantio.

As atividades referentes à identificação dos haploides putativos foram realizadas na Unidade de Pesquisa de Ipiacu, estado de Minas Gerais, na Fazenda Jumari III. As sementes foram separadas, visualmente, com base na coloração do embrião e do endosperma condicionada pelo marcador morfológico R-navajo (CHASE; NANDA, 1965). As sementes que apresentaram embriões sem coloração e endospermas pigmentados foram selecionadas como haploides. Os grãos separados por meio do marcador

morfológico R1-nj foram utilizados em análises estatísticas para determinar a taxa de indução da linha indutora. No caso de diferença significativa entre tratamentos apontados pelo teste de “F” foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para a comparação das médias.

Procedeu-se à estimativa do peso dos grãos, já corrigidos a 13% de umidade, por meio de pesagem de três amostras de cem sementes, utilizando balança digital com precisão de duas casas decimais, para verificar a utilização desse parâmetro na seleção de putativos haploides. Foi aplicado o teste de “F”, e em caso de diferença entre os tratamentos foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho todas as espigas apresentaram o marcador morfológico R1-nj, mas sua expressão variou nos diferentes genótipos. No tratamento Pop. A, o marcador se expressou melhor no embrião (Figura 1A e 1B). Ainda assim, foram, também, observadas variações dentro desse cruzamento quanto à expressão. Em alguns embriões, o marcador foi, facilmente, identificado, enquanto em algumas sementes havia um sinal pouco nítido no embrião, dificultando a seleção visual. Com base nessas observações, pode-se inferir que o gene R1-nj apresentou expressividade variável e penetrância incompleta. A expressividade variável refere-se à existência de grande variação fenotípica entre indivíduos com o mesmo genótipo, nessa avaliação a pigmentação das sementes haploides selecionadas nos três germoplasmas variaram na forma e no tamanho. A penetrância incompleta refere-se à situação em que, num grupo de indivíduos com o mesmo genótipo, alguns indivíduos não expressam o fenótipo que deveriam. Assim, algumas sementes haploides podem não ter sido selecionadas por causa da ausência do marcador morfológico no endosperma, afetando a taxa de indução. Tanto a expressividade variável, quanto a penetrância incompleta podem ser afetadas por condições ambientais que inibem a expressão do fenótipo e pelo background genético. Belicuas (2007) comentou que o marcador R-navajo não é muito confiável por apresentar penetrância incompleta e expressividade variável, fazendo com que falsos haploides sejam selecionados. Essa observação mostra que a análise morfológica, com base no marcador R1-nj, utilizada nesse estudo não é totalmente confiável para a certificação dos haploides, sendo recomendável associar com outras características, tais como: contagens cromossômicas, quantificação de DNA, citometria de fluxo, marcadores moleculares e/ou outros genes morfológicos (B1, P/1, *lg1*, *lg2* e *lg3*).

Fritsche-Neto e Borém (2013) citaram que, para identificar ploidia em milho, pode-se utilizar a presença ou ausência da lígula por meio dos genes *lg1*, *lg2* e *lg3* e a ausência dessa indica as plantas haploides. Rotarencó et al. (2010), para conseguir novos indutores, cruzou a linhagem MHI, para obter boas características agrônomicas, com a Stock 6, como fonte dos genes *B1* e *P1* que não dependem de luz para expressar a pigmentação por antocianina. Esses genes marcam as raízes, ajudando na seleção na fase de *seedlings*, as raízes não coradas indicam os prováveis haploides.

Nos outros dois tratamentos (Pop.B e Pop.C), o marcador morfológico estava mais visível no endosperma das sementes (Figura 1 C, D, E e F) e com menor intensidade no embrião. A Pop.B apresentou a coloração causada por antocianina mais visível no endosperma e a Pop.A no embrião (Figura 1 C; D e A;B, respectivamente).

Coe (1994) comentou que a expressão do marcador R1-nj é fortemente influenciada pela presença de alguns genes presentes na planta que será induzida. São genes de caráter dominante (*C1-1*, *C2-1^{df}* e *1^{ml}-1D*) que inibem a síntese de antocianina. Esses genes estão presentes, principalmente, em genótipos de grãos duros.

Eder e Chalyk (2002) encontraram resultados semelhantes. Segundo os autores, a visualização do marcador R1-nj, responsável pela pigmentação por antocianina no embrião, é mais nítida em genótipos de grão duro, quando comparada com tipos dentados e *flint x dentados*. Röber, Gordillo e Geiger (2005) comentam que, em geral, os marcadores de antocianina se expressam melhor em genótipos do tipo dentado, concordando com as observações apresentadas no presente trabalho.

Silva (2009), trabalhando com a linhagem indutora W23, também, encontrou variação na expressão do marcador R1-nj, inclusive, dentro de famílias, acreditando que essas variações foram causadas em virtude das

condições ambientais. Após a debulha das espigas, o autor verificou que algumas sementes apresentavam coloração mais forte no endosperma e mais fraca no embrião.

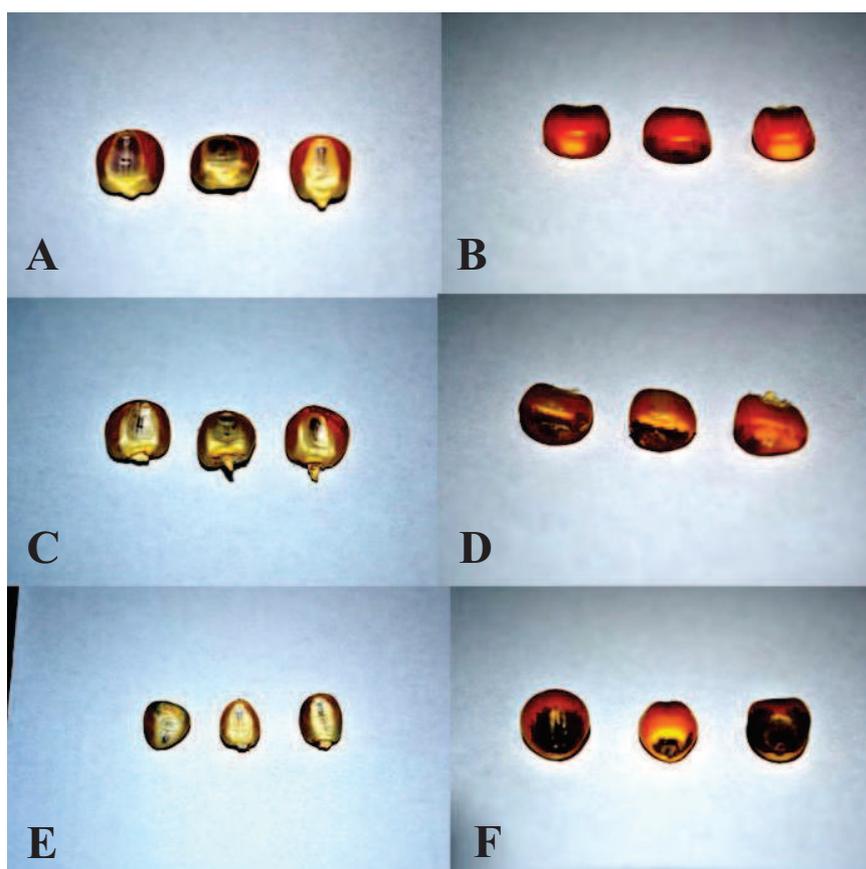


Figura 1 Expressão do marcador morfológico R-navajo (R1-nj) nos diferentes germoplasmas avaliados; A e B. Germoplasma Tropical Flint; C e D. Germoplasma Tuxpeño; E e F. Germoplasma StiffStalk

Alguns fatores podem explicar a grande quantidade de sementes obtidas nos cruzamentos entre os híbridos de diferentes germoplasmas e a linhagem indutora. Um deles é o fato de que a linhagem indutora é gimnogenética, sendo

utilizada como genitor masculino não exigindo que a linhagem complete o ciclo de vida, conseguindo manter a linhagem com boa sanidade até o florescimento é o suficiente. No caso de linhagens androgenéticas, essas devem completar seu ciclo de vida, pois são utilizadas como parentais femininos (receptores de pólen) dependendo diretamente de sua sobrevivência à quantidade de sementes obtidas no cruzamento. O método de polinização controlada, também, pode ter contribuído para a boa produtividade dos tratamentos. Outro fato importante é a adaptação dos híbridos induzidos e a heterose obtida pelo cruzamento que deu origem aos híbridos. O tratamento Pop. A apresentou o maior número de sementes (11564 sementes, Tabela 1), provavelmente, por causa da maior adaptação do germoplasma Tropical Flint às condições tropicais a que foi submetida nessa avaliação, pois o manejo foi o mesmo para todos os tratamentos testados.

Shatskaya et al. apud Batistelli (2012) comentam que a boa quantidade de sementes, obtida em seu trabalho, deve-se à utilização da linhagem KEMS (gimnogenética) como genitor masculino e às linhas utilizadas como receptoras de pólen que eram adaptadas às condições tropicais.

A linhagem indutora, utilizada nesse estudo, mesmo sendo de clima temperado, mostrou-se uma boa polinizadora. As espigas por ela polinizadas produziram um grande número de sementes. Rotarenco et al. (2010) citaram que, quando há problemas com adaptação da linha indutora, podem-se fazer cruzamentos com genótipos mais adaptados e utilizar esse F_1 como indutor, pois isso melhoraria as características agrônômicas da planta indutora. Entretanto, essa prática pode diminuir a taxa de indução e a expressão do gene marcador R1-nj. Prigge et al. (2011) realizaram cruzamentos entre linhagens indutoras temperadas e germoplasmas tropical e não obtiveram diferença nas taxas de indução quando compararam os ambientes temperado e tropical. Esses autores

concluíram que os indutores temperados podem ser utilizados em ambientes tropicais.

Tabela 1 Quantidade de sementes totais e selecionadas como haploides, utilizando o marcador R1-nj nas populações A-Tropical Flint; População B – Tuxpeño e População C – StiffStalk

Populações	Total de sementes	Sementes selecionadas pelo marcador R1-nj	% de indução
Pop.A	11564	995	8,60
Pop.B	3111	411	13,21
Pop.C	4553	417	9,16
Média			10,32

As taxas de indução obtidas neste trabalho, utilizando o marcador R1-nj para selecionar as sementes haploides, foram de 8,60; 9,16 e 13,21% para os híbridos derivados de germoplasma Tropical Flint, Tuxpeño e StiffStalk, respectivamente. A taxa média foi de 10,32% (Tabela 1).

O tratamento Pop. A, mesmo mostrando a menor taxa de indução, torna-se uma escolha interessante para a obtenção de haploides em maior escala, pois apresentou a maior produção de sementes entre os germoplasmas avaliados, conseqüentemente, tendo o maior número de haploides selecionados pelo marcador morfológico.

Battistelli (2012), trabalhando com a linhagem indutora androgenética Wisconsin-23, obteve taxas de indução que variaram de 0 a 10%, utilizando o marcador R1-nj para selecionar os prováveis haploides. No mesmo trabalho, utilizando a linhagem KEMS, o autor obteve média de 7,1% de indução, usando o mesmo gene para selecionar as sementes haploides. Rabel (2008), utilizando

seis famílias de indutores derivados da W23, obteve taxas de indução de 0 a 82% com base na pigmentação por antocianina. Segundo o autor, a alta porcentagem de possíveis haploides encontradas em algumas espigas não corresponde à realidade. Couto et al. (2013) relataram taxas de indução de haploides selecionados pelo gene R1-nj que variaram de 3,7 a 19,7%, utilizando a linhagem indutora gimnogenética KEMS, sendo a média de indução de 9,16%.

Rotarenco et al. (2010) obtiveram quatro grupos de linhagens denominadas PHI (Procera HaploidInducer), tendo como parentais iniciais as linhagens indutoras MHI e Stock 6, ambas gimnogenéticas. Esses novos indutores foram cruzados com duas linhas puras, seu respectivo híbrido e uma população sintética, onde as taxas médias de indução ficaram entre 12,1 e 14,5%, enquanto os parentais iniciais MHI e Stock 6 apresentaram taxas de 7,2 e 1,2%, respectivamente.

Neste estudo, o número de sementes induzidas selecionadas pelo R1-nj variou, significativamente, entre os germoplasmas testados (Tabela 2). A população derivada de germoplasmas Tuxpeño (Pop. B), que possui grãos dentados, apresentou a maior média, 137 sementes induzidas, diferindo pelo teste de Tukey em relação aos demais germoplasmas testados. O híbrido derivado do germoplasma StiffStalk diferiu, significativamente, da derivada do germoplama Tropical Flint (Tabela 3).

Tabela 2 Resumo da ANOVA da taxa de indução pelo marcador R1-nj.

FV	GL	Fcalc.
Tratamento	2	79,2659**
Resíduo	15	

** Diferenças significativas com probabilidade de 0,01%

Tabela 3 Média do número de sementes haploides identificadas por meio do marcador morfológico R-navajo, pelo Teste de Tukey a 0,05% de probabilidade

Germoplasmas	Média de sementes haploides
Pop.B	137 a
Pop.C	104,25 b
Pop.A	90,45 c

Battistelli (2012) obteve resultados semelhantes aos do presente trabalho induzindo à haploidia 06 híbridos, utilizando como indutor a linhagem KEMS (gimnogenética). O híbrido que apresentou maior taxa de indução (11,6%) foi o GNZ 2004 da empresa Geneze Sementes, híbrido comercial com foco em silagem, sendo classificado pela empresa como dentado. Barbosa (2009), induzindo grupos de diferentes texturas de grãos (dentados tropicais, tropicais/temperados e duros tropicais), encontrou diferenças significativas entre os germoplasmas, sendo o de maior média o grupo dentado tropical, seguido do tropical/temperado e, por último, o duro tropical.

Segundo Rotareno et al. (2009), taxas de indução são influenciadas por fatores como época de polinização e método de polinização (manual ou aberta), sendo encontrados melhores resultados na polinização manual quando comparada com a aberta.

Assim como neste trabalho Rabel (2008) encontrou boas taxas de indução, quando utilizou o marcador R-navajo, mas quando fez uso de outras ferramentas, para confirmar as sementes selecionadas, observou um alto índice de falsos haploides.

Silva (2009) salientou que, apesar do marcador morfológico R1-nj ser ineficiente, sua incorporação às linhagens indutoras tropicalizadas faz-se necessária, pois permite uma pré-seleção de possíveis sementes haploides excluindo grande número de sementes diploides.

Battistelli (2012) sugeriu que outros métodos como vigor de plântulas, coloração do coleóptilo, quantidade de óleo no embrião e características fenotípicas das plantas sejam avaliadas a fim de identificar falsos haploides selecionados pelo marcador morfológico R1-nj.

Rotarengo et al. (2010) criaram novos indutores e utilizaram os genes B1 e P1, usando como doadora a linhagem Stock 6, a fim de descartar falsos haploides na fase de *seedlings* por meio da coloração das raízes. Fritsche-Neto e Borém (2013) sugerem utilização dos genes *lg1*, *lg2* e *lg3* que conferem arquitetura mais ereta às plantas. As plantas que apresentarem ausência de lígula são selecionadas como haploide.

O peso de cem sementes haploides (Tabela 4) não diferiu, significativamente, do peso das cem sementes não haploides (Tabela 5) e as médias foram, praticamente, idênticas. O grão de milho é formado por, aproximadamente, 82% de endosperma, 11% de gérmen (plúmula, esculeto e radícula), 5% pericarpo e 2% da ponta, sendo, provavelmente, pequena a participação da falta de uma das fitas de DNA na composição do peso do grão.

Tabela 4 Peso de cem grãos (PG) dos tratamentos nas populações A-Tropical Flint; População B – Tuxpeño e População C – StiffStalk, expressos em gramas (g)

Populações	PG Haploides (g)	PG não Haploides (g)	Média PG Haploides (g)	Média PG não Haploides (g)	PG médio total (g)
Pop.A	46	47	45,33	45,66	45,5
	45	44			
	45	46			
Pop.B	38	39	39,33	40,33	40
	40	41			
	40	41			

“Tabela 4, conclusão”

Populações	PG Haploides (g)	PG não Haploides (g)	Média PG Haploides (g)	Média PG não Haploides (g)	PG médio total (g)
Pop.C	36	38	36,66	37,33	37
	38	37			
	36	37			

Tabela 5 Resumo da ANOVA do peso dos grãos

Híbridos	FV	GL	Fcalc.
Pop.A	Tratamento	1	0,1250 ^{ns}
	Resíduo	4	
Pop.B	Tratamento	1	0,3637 ^{ns}
	Resíduo	4	
Pop.C	Tratamento	1	0,1428 ^{ns}
	Resíduo	4	

ns – não significativo.

Com base nestes resultados, o peso das sementes não é um dado confiável para a seleção dos putativos haploides. Fatores ambientais podem influenciar no peso dos grãos, o que pode tornar esse parâmetro, ainda, menos confiável. Fatores como densidade de plantio, número de grãos por espiga, estresse hídrico e outros, têm grande influência sobre o caráter peso de grãos. Couto et. al. (2013), avaliando características morfológicas (peso, comprimento, espessura e largura) de sementes haploides, comentam que tais dados não são confiáveis, para uma seleção visual de putativos haploides, além disso os valores médios para as características morfológicas foram muito próximos, confirmando o fato de que tais dados não são confiáveis para a seleção de haploides. O peso das sementes do tratamento Pop. A foi maior quando comparado com o restante

dos tratamentos, esse fato pode ser explicado pela composição vítrea do endosperma desse tratamento, que é mais denso.

5 CONCLUSÃO

Há diferenças nas taxas de indução de haploides entre os diferentes germoplasmas, utilizados neste trabalho, sendo a média da linhagem 10%.

A Linhagem indutora de clima temperado, utilizada neste trabalho, pode ser utilizada nas condições de cultivo avaliadas.

O híbrido Tropical Flint mostrou ser melhor para se obter um grande número de sementes putativos haploides.

O peso das sementes não é um dado confiável para se selecionar haploides.

O marcador R1-nj foi mais visível na população Tuxpeño.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C. Próxima safra de milho: escolher bem a semente é fundamental. **Revista Grão em Grão**, Sete Lagoas, v. 2, n. 10, 2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/grao/10_edicao/grao_em_grao_materia_01.htm>. Acesso em: 10 abr. 2013.
- BARBOSA, M. P. M. **Avaliação do desequilíbrio de ligação e da origem genética em duplo-haploides de milho**. 2009. 62 p. Tese (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.
- BATTISTELLI, G. M. **Estratégias para obtenção e identificação de duplo haploides em milho tropical**. 2012. 61 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BELICUAS, P. R. **Estudo da herança dos caracteres stay-green, produção e seus componentes em milho utilizando delineamento III e mapeamento QTL**. 2012. 97 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiraz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- BELICUAS, P. R. et al. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 156, n. 1-2, p. 95-102, July 2007.
- BELICUAS, P. R. **Obtenção, identificação e caracterização de haploides androgenéticos em milho**. 2004. 52 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica/Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- BORDES, J. et al. Haplodiploidization of maize (*Zea mays* L) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. **Agronomie**, Paris, v. 17, n. 5, p. 291-297, June 1997.
- BORDES, J. et al. Doubled haploid vesus S₁ family recurrent selection for testcross performance in a maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 6, p. 1063-1072, Apr. 2006.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Editora da UFV, 1997.
- BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotechnology aplicada ao melhoramento de plantas**. Viçosa: Editora da UFV, 1997.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas**. Lavras: Editora da UFLA, 2001.

CANHOTO, J. M. **Biotecnologia vegetal da clonagem de plantas à transformação genética**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2010.

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

CHALIK, S. T. Creating new haploid-inducing lines of maize. **Maize Genetics Cooperation**, Urbana, v. 73, p. 53-54, 1999.

CHASE, S. S. Androgenesis, its use for transfer of maize cytoplasm. **Journal of Heredity**, Edinburgh, v. 54, n. 4, p. 152-158, 1963.

CHASE, S. S. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, n. 5, p. 263-267, May 1952.

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

COE, E. H. Anthocyanin genetics. In: FREELING, M.; WALBOT, V. (Ed.). **The maize handbook**. New York: Springer-Verlag, 1994. p. 279-281.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 22 mar. 2014.

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

CRUZ, J. C. et al. **A cultura do milho**. Brasília: Embrapa Milho e Sorgo, 2008.

CRUZ, J. C. et al. **Produção de milho orgânico na agricultura familiar**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006.

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

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

DUARTE, J. de O. Introdução e importância econômica do milho. In: CRUZ, J. C.; VERSIANI, R. P.; FERREIRA, M. T. R. (Ed.). **Cultivo do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2000. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm>>. Acesso em: 25 ago. 2014.

DUNWELL, J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 377-424, May 2010.

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

EVANS, M. M. S. The indeterminate gametophyte 1 gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo sac and leaf development. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 1, p. 46-62, Jan. 2007.

FANCELLI, A. L.; LIMA, U. A. **Produção, pré-processamento e transformação agroindustrial**. São Paulo: Secretaria da Ciência e Tecnologia, 1983.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The state of food and agriculture**. Rome: FAO, 2008.

FORSTER, B. P. et al. The resurgence of haploids in higher plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 368-375, Aug. 2007.

FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos**. Viçosa: Editora da UFV, 2013.

GAUT, B. S. Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 13, p. 7008-7015, June 2000.

GAYEN, P. et al. Chromosome doubling in haploids through colchicine. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 68, 1994. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/68/101gayen.html>>. Acesso em: 17 ago. 2014.

GEIGER, B.; SPATZ, J. P.; BERSHADSKY, A. D. Environmental sensing through focal adhesions. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 21-33, Jan. 2009.

GENERATION CHALLENGE PROGRAMME. México: Embrapa, 2006. Disponível em: <[http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br /busca?b=ad&biblioteca=vazio&busca=autoria:"GENERATION CHALLENGE PROGRAMME."](http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/busca?b=ad&biblioteca=vazio&busca=autoria:)>. Acesso em: 14 maio 2013.

GUHA, S.; MAHESHWARI, S. C. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. **Nature**, Paris, v. 212, p. 97-98, Oct. 1966.

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

HECKENBERGER, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A. E. Identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines: i. simple sequence repeat data from maize inbreds. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 3, p. 1120-1131, May 2005.

HENSHAW, G. G.; O'HARA, J. F.; WEBB, K. J. Morphogenetic studies in plant tissue cultures. **Symposi Britanic Society Biological**, Boston, v. 4, p. 231-251, 1982.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 13 ago. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 28 set. 2009.

JAIN, S. M.; SOPORY, S. K.; VEILLEUX, R. E. **In vitro haploid production in higher plants: a dedication**. Virgínia: Scientific, 2011.

JEFFREYS, J. Melhoramento do milho. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. **Melhoramento e produção de milho no Brasil**: volume 1. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 429-485.

KERMICLE, J. L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. **Science**, Washington, v. 166, n. 3911, p. 1422-1424, Dec. 1969.

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

KRUG, C. A.; VIÉGAS, G. P. **O milho híbrido**. São Paulo: Melhoramentos, 1962.

KRUG, C. A.; VIÉGAS, G. P. **O trigo no Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1938.

LASHERMES, P.; BECKERT, M. A genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 76, n. 3, p. 405-410, Sept. 1988.

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.

MANGELSDORF, P. C. **Corn: its origin evolution and improvement**. Cambridge:Harvard University Press, 1974.

MELCHINGER, A. E. et al. Hybrid maize breeding with doubled haploid lines: In: SYMPOSIUM QUANTITATIVE GENETIC AND SELECTION THEORY FOR OPTIMUM ALLOCATION OF RESOURCES. OF THE ILLINOIS CORN BREEDERS' SCHOOL, 41., 2005, Illinois. **Proceedings...** Illinois: University of Illinois at Urbana-Champaign, 2005. p. 8-21.

MIRANDA FILHO, J. B.; VIÉGAS, G. P. Milho híbrido. In: PATERNIANI, E. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1978. p. 257-309.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. et al. Haplodiploidização: genética e melhoramento. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas: volume 2**. Brasília: Embrapa, 1999. p. 569-612.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006.

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

PATERNIANI, E. Métodos tradicionais de melhoramento de milho. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. (Ed.). **Cultura do milho**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 22-43.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora da UFV, 1999. p. 491-552.

PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.

PATRÍCIA, P. M. O. Duplo-haploides: estratégias para obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 10, n. 1, p.1-16, 2011.

PAVÃO, A. R.; FERREIRA FILHO, J. B. D. S. Impactos econômicos da introdução do milho Bt11 no Brasil: uma abordagem de equilíbrio geral inter-regional. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, v. 49, n. 1, p. 81-108, jan./mar. 2011.

PIERRE, K. et al. (Ed.). **In vitro haploid production in higher plants**. Dordrecht: Kluwer, 1996.

PIERRE, P. M. O. et al. Duplo-haploides: estratégias para a obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2011.

PINTO, R. J. B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá: EDUEM, 1995.

PRIGGE, V. et al. Doubled haploids in tropical maize: effects of inducers and source germoplasm on in vivo haploid induction rates. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 1, p. 1498-1506, July/Aug. 2011.

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

RIERA-LIZARAZU, O.; MUJEEB-KAZI, A. Polyhaploid production in the Triticeae: wheat x *Tripsacum* crosses. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 5, p. 973-976, Sept./Oct. 1993.

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

ROTARENCO, V. A. The comparative characteristic of the correlation between the raits of maize diploids and haploids. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 74, n. 1, p. 14-15, 2000. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/74/47rotarenco.html>>. Acesso em: 01 jul. 2014.

ROTARENCO, V. et al. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 84, p. 01-07, 2010.

ROTARENCO, V.; GEORGETA, D.; MARIANA, S. Induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 83, n. 1, p. 1-9, 2009.

SARKAR K. R.; PANKE, S.; SACHAN, J. K. S. Development of maternal-haploid inducer lines in maize. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 42, n. 2, p. 781-186, 1972.

SAUER, H. F. G. Evolução do milho. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 310-340.

SILVA, A. P. N. et al. Dinâmica espaço-temporal da vegetação no semi-árido de Pernambuco. **Revista Caatinga**, Natal, v. 22, n. 4, p. 195-205, out./dez. 2009.

SILVA, G. J. **Desenvolvimento de marcadores moleculares para a caracterização do gene *gametófito indeterminado (ig1)* emgenótipos de milho**. 2009. 48 p. Dissertação (Mestrando em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SPRAGUE. G. F.; DUDLEY, J. W. (Ed.). **Corn and corn improvement**. Madson: American Society of Agronomy, 1988.

TANG, J. et al. A critical role for calponin 2 in vascular development. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, n. 10, p. 6664-6672, Mar. 2006.

VASIL, I. K. Phosphinothricin-resistant crops. In: DUKE, S. O. (Ed.). **Herbicide-resistant crops**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 85-91.

VIÉGAS, G. P.; MIRANDA FILHO, J. B. Milho híbrido. In: PATERNIANI, E. (Coord.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 257-298.

WAN, Y. et al. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled-haploid plants from anther derived maize callus. **Theoretical Applied and Genetics**, Berlin, v. 81, n. 2, p. 205-211, Feb. 1991.

WEDZONY, M. et al. Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, 2009. Cap. 1, p. 1-18.

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