



**EVELLYN GISELLY DE OLIVEIRA COUTO**

**INDUÇÃO DE HAPLOIDES E DUPLICAÇÃO  
CROMOSSÔMICA EM MILHO**

**LAVRAS - MG  
2013**

**EVELLYN GISELLY DE OLIVEIRA COUTO**

**INDUÇÃO DE HAPLOIDES E DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM  
MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora  
Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

**LAVRAS – MG  
2013**

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

Couto, Evellyn Giselly de Oliveira.

Indução de haploides e duplicação cromossômica em milho /  
Evellyn Giselly de Oliveira Couto. – Lavras : UFLA, 2013.  
104 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.  
Orientador: Édila Vilela de Resende Von Pinho.  
Bibliografia.

1. Duplo-haploides. 2. R-navajo. 3. Colchicina. 4. *Zea mays*. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.53

**EVELLYN GISELLY DE OLIVEIRA COUTO**

**INDUÇÃO DE HAPLOIDES E DUPLICAÇÃO CROMOSSÔMICA EM  
MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de julho de 2013.

Dr. Renzo Garcia Von Pinho                      UFLA

Dr. Adriano Delly Veiga                        UFLA

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

Orientadora

**LAVRAS – MG  
2013**

*A Nossa Senhora Aparecida, por toda proteção,*  
**OFEREÇO**

*Aos meus pais, Amâncio e Roselane, e aos meus irmãos, John e Erick, pelo amor  
incondicional,*

## DEDICO

### AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de vida, por ter me proporcionado saúde para chegar até aqui, por sempre me guiar, e me fazer acreditar que quando a gente quer, a gente vai longe!

A Nossa Senhora Aparecida, minha padroeira, por toda proteção, por sempre ouvir minhas preces e me dar forças nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Amâncio e Roselane, meus maiores amores, pela presença constante, por todo apoio, torcida e amor. Sem vocês eu não chegaria até aqui!

Aos meus irmãos, John e Erick, minhas paixões, por serem grandes amigos, por todas as risadas e vibrações, por todos os momentos de conversas longas e preocupações.

À Vó Laurinda, pelo amor incondicional e orações.

À UFLA, por permitir mais um aprendizado e por toda oportunidade de crescimento tanto pessoal quanto profissional.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudos.

À Édila e ao Renzo, pessoas adoráveis nas quais eu me espelho, por toda confiança, competência, amizade, e pela maravilhosa orientação.

Ao Adriano Delly, por toda paciência, inteligência e determinação, agradeço pela imensa ajuda e crescimento profissional proporcionado.

À Fernanda Bustamante, presente em mais uma etapa, pela amizade e simplicidade, e por toda ajuda na condução do experimento.

Às estagiárias, Marcela e Micaela, pelas histórias sempre cheias de risadas, pela ajuda incansável em cada etapa, pelas idas e vindas a Ijaci.

Ao Grupo do Milho, exemplo de união, de trabalho em equipe e amizade. Muito obrigada por todo o crescimento agrônomo, pela ajuda na

condução dos experimentos em campo e laboratório e pelas festas sempre animadas.

Aos amigos de Lavras, pelo apoio, incentivo em momentos difíceis e maravilhosos momentos de descontração.

À Vivi e Cinthia, por toda a ajuda em Ijaci e por serem grandes amigas que levarei sempre no coração.

Ao Kaio, meu namorado, pelo amor, carinho, paciência, apoio e ajuda nas análises estatísticas. Obrigada por tornar meus dias mais felizes!

Aos amigos e familiares de Samonte por toda torcida.

Aos amigos do programa de Biotecnologia Vegetal, por todo aprendizado compartilhado nos grupos de estudos, pelas festas sempre alegres e por toda amizade.

Aos professores do Departamento de Biologia, Lisete, Giovanna e José Airton, por todas as dúvidas esclarecidas e por todas as contribuições na realização deste trabalho.

À Dona Elza, Elenir e Walbert pelo maravilhoso convívio no Laboratório de Sementes.

À Livia Davide e Patrícia Pierre, minhas primeiras coorientadoras, pela oportunidade de trabalhar com duplo-haploides, pela torcida mesmo de longe, por todos os conselhos e amizade.

Aos amigos dos laboratórios de Análise de Sementes e Genética Molecular, pelos conhecimentos compartilhados.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho;

**MUITO OBRIGADA!**

“A coisa mais perfeita que podemos experimentar é o misterioso. É a fonte de toda arte e de toda ciência verdadeira.”

Albert Einstein

## RESUMO

A tecnologia de obtenção de linhagens duplo-haploides é uma forma de reduzir tempo e espaço na obtenção de linhagens endogâmicas nos programas de melhoramento de milho. Métodos de duplicação cromossômica têm sido testados e publicados, entretanto, muitos protocolos utilizados no setor privado não são publicados. Nos experimentos com haploides duplicados em milho, diversas metodologias têm sido utilizadas na avaliação e identificação da duplicação cromossômica, dentre elas destacam-se a citometria de fluxo, marcadores de DNA e viabilidade polínica. Objetivou-se neste trabalho analisar a capacidade do indutor de haploidia gimnogenético KEMS em clima tropical; verificar se a origem do germoplasma interfere na taxa de indução e duplicação de haploides; avaliar dois protocolos e verificar a eficiência de duplicação cromossômica; aferir a capacidade das técnicas de citometria de fluxo e marcadores moleculares SSR na verificação da duplicação cromossômica, e avaliar a viabilidade polínica dos duplo-haploides obtidos. A linhagem indutora de haploidia KEMS foi utilizada como parental masculino e cruzada com quatro híbridos (GNS3225, GNS3032, GNS3264 e DKB393). As sementes provenientes desse cruzamento foram selecionadas por meio do marcador R-navajo. Dois protocolos distintos foram utilizados. No primeiro, plântulas foram imersas em solução de colchicina 0,04% e de DMSO 0,5% por 12 horas, e no segundo, raízes foram imersas em solução de colchicina 0,1%, DMSO 0,5% e Tween 20 0,1%, por 6 horas. As plântulas duplicadas foram levadas para casa de vegetação. Após 14 dias de duplicação, amostras das plantas foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo, e posteriormente, transplantadas para o campo. No campo foram coletadas amostras para análises de marcadores microssatélites e viabilidade polínica. Os protocolos utilizados apresentaram diferenças significativas na duplicação cromossômica, sendo o protocolo 2 mais eficiente. A linhagem indutora KEMS pode ser utilizada em clima tropical, uma vez que induziu haploides em porcentagem superior ao que se observa para essa indutora. Os híbridos utilizados interferiram na taxa de indução de haploides. Outros marcadores, além do R-navajo devem ser utilizados na identificação de haploides. As técnicas de citometria de fluxo, marcadores microssatélites e viabilidade polínica permitiram identificar e caracterizar as plantas duplicadas. Neste trabalho foram obtidas 25 linhagens duplo-haploides.

Palavras-chave: Duplo-haploides. Linhagens indutoras de haploidia. Colchicina. Marcador R-navajo. *Zea mays*.

## ABSTRACT

The technology for obtaining double haploid lines is one way of reducing time and space in maize breeding programs. Methods of chromosome doubling have been tested and published, however, many protocols used in the private sector are not published. In experiments with double haploids in maize, various methodologies have been used in the evaluation and identification of chromosome duplication. Among them stand out flow cytometry, DNA markers and pollen viability. The aim of this study was to analyze the ability of the gimnogenetic haploidy inducer KEMS in tropical conditions; verify whether the source of germplasm interfere in the rate of induction of haploid and duplication; evaluate two protocols and verify the efficiency of chromosome doubling, assess the capacity of flow cytometry and SSR markers on checking chromosome doubling and evaluating the pollen viability of double-haploids. The haploid inducer KEMS was used as male parent and crossed with four hybrids (GNS 3225, GNS 3032, GNS 3264 and DKB 393). The seeds from this cross were selected by the marker system of R-Navajo. Two different protocols were used. In the former, seedlings were immersed in 0.04% colchicine and 0.5% DMSO solution for 12 hours, and in the second roots were immersed in a solution with 0.1% colchicine, 0.5 % DMSO and Tween 20 0.1%, for 6 hours. The duplicated seedlings were taken to the greenhouse. After 14 days, samples of the plants were assessed by flow cytometry and subsequently transplanted to the field. In the field samples were collected for the microsatellite markers analysis and pollen viability. The protocols showed significant differences in chromosome doubling, being the protocol 2 the most efficient. The inducer KEMS can be used in tropical conditions since haploid induction percentage was higher than rates already observed. The hybrids used interfered the haploid induction rate. Other markers in addition to the R-Navajo must be used in the identification of haploids. The techniques of flow cytometry, pollen viability and microsatellite markers allowed the identification and characterization of plants duplicate. In this work 25 double haploid lines were obtained.

Keywords: Double-haploid. Inducer line. Colchicines. R-navajo. *Zea mays*.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	13
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b>Obtenção de linhagens na cultura do milho</b> .....	15
<b>2.2</b>	<b>Linhagens indutoras de haploidia</b> .....	17
<b>2.3</b>	<b>Identificação de haploides</b> .....	21
<b>2.4</b>	<b>Duplicação cromossômica em haploides de milho</b> .....	23
<b>2.5</b>	<b>Citometria de fluxo na identificação de plantas duplicadas</b> .....	25
<b>2.6</b>	<b>Marcadores moleculares microssatélites na identificação de duplo-haploides</b> .....	27
<b>2.7</b>	<b>Análise da viabilidade polínica em haploides duplicados</b> .....	28
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	30
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	39
	<b>Duplicação cromossômica em linhagens haploides de milho</b> .....	39
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	43
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
<b>2.1</b>	<b>Área experimental e genótipos avaliados</b> .....	45
<b>2.2</b>	<b>Identificação de haploides por meio do marcador R-navajo</b> .....	45
<b>2.3</b>	<b>Duplicação cromossômica artificial</b> .....	46
<b>2.4</b>	<b>Citometria de fluxo</b> .....	48
<b>2.5</b>	<b>Avaliações de autofecundação e quantidades de sementes obtidas de plantas duplicadas</b> .....	49
<b>2.6</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	50
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>3.1</b>	<b>Haploides obtidos por meio do marcador R-navajo</b> .....	52
<b>3.2</b>	<b>Avaliação de haploides pela técnica de citometria de fluxo</b> .....	55
<b>3.3</b>	<b>Duplicação cromossômica de linhagens haploides</b> .....	59
<b>3.4</b>	<b>Porcentagens de plantas duplicadas autofecundadas</b> .....	64
<b>3.5</b>	<b>Quantidades de sementes obtidas de plantas duplicadas</b> .....	68
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73
	<b>CAPÍTULO 3</b> .....	77
	<b>Identificação e caracterização de haploides duplicados por meio das técnicas de citometria de fluxo, marcadores moleculares SSR e viabilidade polínica</b> .....	77
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	80
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	82
<b>2.1</b>	<b>Germoplasmas avaliados</b> .....	82

2.2	Duplicação cromossômica .....	82
2.3	Sobrevivência de plantas .....	83
2.4	Citometria de fluxo .....	83
2.5	Marcadores Microssatélites .....	84
2.6	Análise de viabilidade polínica .....	85
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	87
3.1	Sobrevivência de plantas após duplicação cromossômica .....	87
3.2	Citometria de fluxo na identificação e caracterização de plantas duplicadas .....	91
3.3	Marcador molecular SSR na caracterização de haploide duplicado .....	95
3.4	Viabilidade polínica .....	97
4	<b>CONCLUSÕES</b> .....	101
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	102

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

Na obtenção do milho híbrido há três etapas distintas: a obtenção das linhagens endogâmicas, o teste de capacidade de combinação das mesmas e a produção e comercialização das cultivares híbridas. Dentre as etapas citadas, a obtenção de linhagens é a mais demorada e, normalmente, de custo elevado, isso porque, para atingir a homozigose, são necessárias de seis a oito gerações de endogamia (PATERNIANI; CAMPOS, 1999). Em função da demora e do custo para obtenção das linhagens, os melhoristas tem procurado alternativas que viabilizem esse processo com menor custo. Uma delas é o emprego da tecnologia de duplo-haploides (DH).

A tecnologia de obtenção de linhagens duplo-haploides é uma forma de reduzir tempo, mão de obra, e espaço na obtenção de linhagens endogâmicas nos programas de melhoramento de milho. Além disso, a tecnologia permite que o melhorista realize cruzamentos com o testador, com linhagens homozigotas, em vez de fazê-lo utilizando material que ainda apresenta segregação.

A implementação desse método exige a utilização de linhagens indutoras que podem gerar haploides paternos ou maternos. Em geral, essas linhagens indutoras têm origem temperada, dificultando o manejo e o desenvolvimento dessas em condições tropicais.

Diversas metodologias têm sido utilizadas na avaliação e detecção de haploides duplicados. A citometria de fluxo, por exemplo, está sendo amplamente utilizada, devido à facilidade e rapidez na preparação das amostras e na obtenção dos resultados (LOUREIRO; SANTOS, 2004). Outra ferramenta que tem sido utilizada na identificação de haploides são os marcadores moleculares microssatélites SSR. Esses marcadores, por serem estáveis e

codominantes, possibilitam a separação dos indivíduos homozigotos dos heterozigotos (BELICUAS et al., 2007; COUTO et al., 2013).

A produção de linhagens duplo-haploides tem sido utilizada por diversas empresas de melhoramento de milho. Dentre essas, várias já possuem uma metodologia estabelecida, tendo inclusive híbridos lançados no mercado. No entanto, no setor público e nas empresas nacionais de sementes, o uso dessa tecnologia é mais recente, e as informações referentes à obtenção e eficiência na produção de linhagens duplo-haploides ainda são escassas.

Assim, é determinante e estratégico o acesso da comunidade científica e das empresas nacionais a inovações tecnológicas como essa, com o estabelecimento de protocolos e domínio da técnica de obtenção de linhagens duplo-haploides, propiciando mais competitividade no mercado e redução de custos.

Diante do exposto, o trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: a) analisar a capacidade do indutor de haploidia gimnogenético KEMS em clima tropical; b) verificar se a origem do germoplasma interfere na taxa de indução e duplicação de haploides; c) avaliar dois protocolos e verificar a eficiência de duplicação cromossômica; d) verificar a capacidade das técnicas de citometria de fluxo e marcadores moleculares SSR na confirmação de duplo-haploides; e e) avaliar a viabilidade polínica de plantas duplicadas.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Obtenção de linhagens na cultura do milho**

O Brasil ocupa o terceiro lugar na produção mundial de milho, atrás dos Estados Unidos, que detêm 40% da produção mundial, seguidos pela China. A área cultivada com milho nessa safra foi de 15,81 milhões de hectares. Desse total, acima de 90% das sementes utilizadas para plantio são de milho híbrido (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013).

A busca por genótipos com maior produtividade e qualidade física e nutricional, e que necessitem de menos investimentos em tratos culturais, aplicações de fungicidas e de inseticidas, constituem desafios para os melhoristas de plantas. Na cultura do milho tem sido explorada a superioridade dos genótipos heterozigotos em função do maior vigor híbrido.

Segundo Paterniani e Campos (1999), a produção de híbridos com alto desempenho necessita do cruzamento entre linhagens elites. O desenvolvimento dessas linhagens envolve a obtenção de linhagens e posteriormente, o cruzamento dessas com um testador, para identificar aquelas que possuem melhor capacidade de combinação. O processo tradicional utilizado para obter linhagens elites implica na autofecundação de várias plantas da população. Os descendentes S1 são semeados em linha e os melhores são selecionados e novamente autofecundados. O procedimento é repetido por seis a oito autofecundações, quando as linhagens chegam aproximadamente a 99,22% de homozigose.

Uma alternativa disponível na cultura do milho para acelerar a obtenção de linhagens consiste na produção de linhagens homozigotas pelo uso de

haploides duplicados, também conhecidos como duplo-haploides ou di-haploides (CHASE, 1952).

No processo normal de autofecundação em espécies diploides, considerando apenas dois pares de locos independentes segregando entre os genitores (AAbb) e (aaBB) o genótipo recessivo aabb tem a probabilidade de ser encontrado na proporção de 1/16 em uma população F<sub>2</sub>. Na indução de haploidia, o mesmo genótipo terá a probabilidade de ocorrência de 1/4 na população. Isso ocorre devido à ausência dos heterozigotos, prevalecendo apenas quatro genótipos homozigotos (AABB, AAbb, aaBB e aabb). Com a obtenção de linhas homozigotas, a variância aditiva é maximizada, os efeitos de dominância são neutralizados e as vantagens na seleção de características quantitativas podem ser superiores, uma vez que é realizada somente com base na aditividade, não havendo interferência dos efeitos de dominância e epistasia (BORDES et al., 2006).

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

A principal vantagem desse processo está na redução significativa do tempo para a obtenção de linhagens. Outra vantagem, que é pouco explorada, é que, com as autofecundações sucessivas no método tradicional, há um aumento da ocorrência de recombinações entre os genes ligados. Dessa forma, a possibilidade de manter combinações favoráveis existentes nas linhagens genitoras é pequena, ou seja, na geração F<sub>∞</sub>, todas as linhagens resultantes serão

virtualmente recombinantes, inclusive nos genes ligados. Com os duplo-haploides, a recombinação de genes ligados ocorre somente em uma meiose, ou seja, naquela que originou o gameta responsável pela formação da planta DH. Desse modo, grande parte dos locos ligados não será recombinada. Portanto, a chance de manter combinações existentes em linhagens parentais aumenta (PIERRE et al., 2011). Bernardo (2009) realça esse fato ao realizar uma simulação experimental, com o objetivo de avaliar a resposta dos ciclos de seleção de plantas duplo-haploides derivadas de gerações F1 e F2, o autor constatou que os duplo-haploides provenientes da geração F2 foram 4 a 6% mais eficientes que a geração F1 devido a maior recombinação.

Entretanto, o método de produção de DH ainda é limitado, devido à baixa taxa de indução de haploides por meio da linhagem indutora, e devido aos sistemas de marcador morfológico que nem sempre são precisos e eficientes na detecção das sementes haploides.

## **2.2 Linhagens indutoras de haploidia**

Em milho, de acordo com Randolph (1932), os primeiros haploides foram relatados por L. J. Stadler em 1929. No entanto, os haploides naturais ocorrem em uma taxa extremamente baixa (CHASE, 1963).

A fertilização normal de um óvulo ocorre quando um dos núcleos espermáticos fertiliza a oosfera, formando o embrião, enquanto o outro núcleo se funde com os núcleos polares do óvulo, formando o endosperma triploide. Uma linhagem indutora é assim caracterizada como uma planta capaz de quebrar/bloquear a dupla fertilização e eventualmente, produzir sementes haploides (DANG et al., 2010).

Os mecanismos envolvidos na indução e formação do embrião haploide ainda permanecem desconhecidos. Na literatura há duas hipóteses para esses

possíveis mecanismos: (i) perda da fertilização da oosfera e subsequente desenvolvimento paternogênico da oosfera reduzida em embrião haploide (CHALYK et al., 2003; SARKAR; COE, 1966), e (ii) fertilização normal seguida de eliminação cromossômica (FISCHER, 2004; ZHANG et al., 2008).

De acordo com Geiger e Gordillo (2009), existem duas hipóteses dos mecanismos concebíveis que podem explicar a ocorrência de haploides de origem maternal. A primeira hipótese propõe que um dos dois núcleos reprodutivos do grão de pólen do indutor tenha uma alteração, mas ainda seja capaz de se fundir com a oosfera e, durante as divisões celulares subsequentes, os cromossomos do indutor se degeneram e são gradualmente eliminados das células primordiais. O outro núcleo reprodutivo se funde com os núcleos polares, formando o endosperma triploide. A segunda hipótese sugere que um dos núcleos reprodutivos do grão de pólen não é capaz de se fundir com a oosfera, mas pode provocar a embriogênese haploide, e o segundo núcleo reprodutivo se une com os núcleos polares, formando o endosperma, como na primeira hipótese.

Dois linhagens indutoras de haploidia se destacaram inicialmente. A primeira delas foi desenvolvida a partir de uma variedade denominada Stock6 (COE, 1959), que quando autofecundada produz uma frequência de haploides gimnogenéticos em torno de 3,2%. Haploides de origem materna resultam de uma falha na fertilização, causada por uma condição anormal, induzida ou herdada, em gameta masculino ou feminino e subsequente desenvolvimento do óvulo em embrião (SARKAR; COE, 1966). A segunda linhagem é conhecida como Wisconsin 23 (W23), capaz de gerar haploides androgenéticos a uma taxa que varia de 1 a 3% (KERMICLE, 1969, 1973). Nesse caso, o haploide androgenético se forma a partir do desenvolvimento do núcleo reprodutivo do grão de pólen, que após o cruzamento, se desenvolve em embrião.

Nas últimas décadas, linhagens indutoras têm sido estudadas intensamente, o que gerou o desenvolvimento de indutores com maiores taxas de indução. Em condições temperadas, a partir das linhagens Stock6 e W23, foram geradas inúmeras outras linhagens indutoras com maiores taxas de indução de haploidia. Lashermes e Beckert (1988) cruzaram a linhagem W23 com a linhagem Stock6 e obtiveram a linhagem indutora WS14, com uma taxa de indução de 3 a 5%. Sarkar et al. (1994) conseguiram uma taxa de indução de 6% nos cruzamentos realizados. As linhagens indutoras ZMS e KMS também foram derivadas da Stock6 e o cruzamento delas deu origem à linhagem MHI que induz em média 6,5% de haploides (CHALYK, 1999). A linhagem indutora RWS, que induz em média 8 a 10% de descendentes haploides, foi recentemente desenvolvida e caracterizada por Röber, gordillo e Geiger (2005). Essa surgiu a partir do cruzamento entre as linhagens indutoras WS14 (LASHERMES; GAILLARD; BECKERT, 1988) e KEMS (SHATSKAYA et al., 1994), que é uma linhagem sintética Russa.

Rotarencó et al. (2010) desenvolveram novos indutores modernos com altas taxas de indução de haploidia, boa expressão dos genes marcadores e melhores características agronômicas. Os autores partiram do cruzamento da linhagem MHI como fonte de características de planta favoráveis e boa taxa de indução, com a linhagem Stock 6, fonte dos genes marcadores B1 e P11, os quais permitem que os haploides sejam identificados pela falta de antocianina em plântulas. Como resultado foram obtidos indutores PHI com taxa de indução média variando entre 12 e 14,5% em diferentes genótipos doadores e boa produção de pólen.

Indutores desenvolvidos recentemente possuem taxas de indução de haploidia relativamente alta, e um sistema de genes marcadores que permitem identificar haploides em diferentes estágios: grãos secos, plântulas e plantas desenvolvidas (ROTARENCO et al., 2010). Entretanto, o genótipo utilizado

como doador tem significativa influencia na indução de haploides (PRIGGE et al., 2011). A identificação dos haploides na etapa de grão pode ser complicada ou mesmo impossível, quando os doadores são homozigotos para os genes R1 e C1 (BELICUAS et al., 2007; GEIGER, 2009). Além disso, é verificada esterilidade masculina parcial em alguns indutores, o que influencia negativamente a produção de pólen. Uma formação de poucas sementes prejudica a manutenção do indutor e reduz a produção de haploides em cruzamentos com os doadores (ROTARENCO; DICU, 2012).

Indutores adaptados às condições tropicais foram desenvolvidos por meio da parceria entre CIMMYT (*International Maize and Wheat Improvement Center*) e a Universidade de Hohenheim, na Alemanha. Esses indutores apresentaram taxas de indução entre 8 a 10% e melhores performances agrônomicas quando comparadas com os indutores temperados (PRASANNA; CHAIKAM; MAHUKU, 2012).

Prigge et al. (2011) ao verificarem taxas de indução de haploides em condições tropicais, encontraram diferenças altamente significativas entre indutores e fonte de germoplasma. Além disso, as taxas de indução de haploidia detectadas pelos autores foram semelhantes às taxas relatadas para induções em condições temperadas. Esses resultados indicam que indutores temperados podem ser empregados em programas de melhoramento, para obtenção de duplo-haploides em milho nos trópicos. No entanto, é necessário desenvolver indutores tropicais bem adaptados.

Estudos em populações segregantes (LASHERMES; BECKERT, 1988) e análises de QTLs (RÖBER, 1999) demonstraram que a indução de haploides *in vivo* é uma característica quantitativa controlada por um grande número de locos desconhecidos. Ponto-chave na aplicação da técnica de indução de haploides *in vivo* é um sistema de seleção para separação de grãos com embriões haploides daqueles com embrião regular diploide.

### 2.3 Identificação de haploides

Para a identificação precoce dos haploides gerados por meio do uso de linhagens indutoras, Chase e Nanda (1965) descreveram um sistema marcador fenotípico baseado na pigmentação por antocianina, determinado pelo gene R-navajo (R1-nj). Esse alelo dominante promove a pigmentação com antocianina no endosperma e no embrião das sementes diploides, sendo que as sementes haploides apresentam pigmentação somente no endosperma, ficando com o embrião branco.

O endosperma é formado por um tecido triploide, sendo um conjunto haploide do parental masculino e dois do parental feminino. Já o embrião é formado por um tecido diploide. Como o marcador morfológico R-navajo é dominante em um cruzamento, esse será expresso no endosperma. No caso de um embrião haploide, o marcador não será expresso, pois o embrião não contém o genoma da linhagem indutora que carrega o alelo marcador. O alelo marcador R1-nj tem penetrância incompleta e expressividade variável, não fornecendo uma indicação precisa das sementes haploides (BELICUAS et al., 2007). Além disso, é recomendável analisar e separar sementes haploides após a colheita, uma vez que a etapa de secagem gera uma coloração mais escura no embrião, contribuindo para uma seleção errada de haploides (PRIGGE et al., 2011).

Em conjunto com o gene R1-nj, foi verificada a existência de outros genes de cores adicionais (B1, PL1), que condicionam a pigmentação do coleóptilo e da raiz das plântulas, favorecendo a separação de indivíduos haploides de diploides. Após a germinação das sementes, as plântulas que apresentarem pigmentação no coleóptilo ou nas radículas são identificadas como diploides e a ausência de pigmentação indica plântulas haploides (ROTARENCO; DICU; SARMANIUC, 2009).

Segundo Rabel (2008), o gene marcador R1-nj não se expressa em todos os genótipos, indicando que sua expressão é influenciada pela constituição gênica do parental masculino na obtenção de haploides androgenéticos. O mesmo autor constatou que os marcadores morfológicos R-navajo e a coloração verde do coleótilo não foram eficientes na identificação de indivíduos haploides. Rotarencu, Dicu e Sarmaniu (2009) em seu trabalho observaram que algumas sementes não expressaram a coloração arroxeadada no endosperma, possivelmente porque o indutor utilizado por ele não era homozigoto R1 ou o doador que ele utilizou era homozigoto do alelo dominante Cl, responsável por inibir a expressão de antocianina no endosperma. Esse gene Cl ocorre frequentemente em materiais *flint* europeus ou tropicais (BELICUAS et al., 2007).

Em cruzamentos do híbrido Chuandan13 com pólen da linhagem indutora Stock6, foram obtidas 13399 sementes. Dessas, foram identificadas 303 prováveis haploides, com base no marcador R-navajo. Após a análise citológica, verificaram que, das 253 sementes que germinaram somente 71 apresentavam  $n=10$  cromossomos (TANG et al., 2009 citado por PIERRE et al., 2009). Couto et al. (2013), em cruzamentos com o híbrido P30F90 e a linhagem indutora W23 verificaram que de um total de 1429 sementes, 397 foram selecionadas como possíveis haploides pelo sistema morfológico do gene R1-nj. Porém, desse número somente quatro plantas foram identificadas como haploides por meio de citometria de fluxo e marcadores de DNA.

Eder e Chalyk (2002) observaram significativa influência do genótipo doador na taxa de indução de haploides e na expressão dos genes marcadores. A taxa de indução variou de 2,7 a 8%, sendo que a expressão do gene R1-nj nos embriões de genótipos de milho duro foi maior quando comparado ao milho dentado ou no híbrido duro x dentado. A dificuldade para isolar haploides de genótipos de milho duro quando usados como doadores estão relacionados com

a existência de genes dominantes C1-I, C2-Idf e In1-D, os quais inibem a síntese de antocianina usada como marcador para seleção de haploides (COE, 1994). Röber, Gordillo e Geiger (2005) verificaram que a taxa de erro na classificação dos haploides por meio do sistema do gene R1-nj foi aceitável para o genótipo de milho dentado, mas alcançou valores altos para muitos dos genótipos de milho duro.

Marcadores morfológicos como a coloração do caule adicionado ao marcador no embrião torna possível a remoção de plantas F<sub>1</sub> da fração dos possíveis haploides em estádios iniciais em casa de vegetação e no campo. Em estádios adultos, ainda é possível diferenciar haploides de plantas diploides por meio de sua distinta morfologia e vigor (RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005). Ambos os métodos adicionais para a seleção podem ser empregados após o procedimento de duplicação cromossômica artificial.

#### **2.4 Duplicação cromossômica em haploides de milho**

A duplicação cromossômica era considerada uma restrição na produção de linhagens duplo-haploides em escala comercial. Inicialmente devido ao fato da duplicação espontânea ocorrer em baixa frequência (CHASE, 1969; DEIMLING; ROBER; GEIGER, 1997) e somente em poucos germoplasmas e, posteriormente, em função dos protocolos de duplicação artificial ser pouco eficientes. Em haploides induzidos *in vivo*, por exemplo, a taxa da duplicação cromossômica espontânea é de 0 a 10% (CHASE, 1969). Chalyk (1994), avaliando plantas haploides obtidas em cruzamentos com o indutor ZMK, verificou taxas de diploidização espontânea entre 3,3 e 3,6%.

A colchicina é um dos bloqueadores mitóticos mais utilizados nos protocolos de duplicação cromossômica (PRASANNA; CHAIKAM; MAHUKU, 2012). Esse agente se liga à tubulina e inibe a polimerização dos

microtubulos que compõem as fibras dos fusos, não havendo, assim, a migração dos cromossomos para os polos das células. Dessa forma, as células que anteriormente eram  $x$  (haploides) passam a ser  $2x$  (diploides) (BELICUAS et al., 2007). Segundo Castillo et al. (2009) três fatores principais influenciam na duplicação cromossômica por meio de colchicina: tempo, concentração e genótipo.

Muitos métodos de duplicação cromossômica têm sido publicados. Um importante avanço no método foi realizado por Gayen et al. (1994), que cortaram o coleóptilo das plântulas haploides e colocaram-nas em solução contendo 0,06% de colchicina e 0,5% de DMSO (dimetilsulfóxido) por 12 horas a 18° C. Deimling, Rober e Geiger (1997), aumentaram a eficiência do método ao reduzir as raízes das plântulas para 20 a 30 mm e colocarem as plântulas imersas em solução de duplicação no escuro. Outro método utilizado para duplicação foi proposto por Zabirova et al. (1996), em que no estágio de 3-4 folhas, a solução de colchicina era injetada cerca de 3 a 5 mm acima do ápice. Após a injeção, as plântulas eram mantidas no escuro a 18°C, por dois dias, para serem, em seguida, transplantadas para o campo.

Chalyk (2000), utilizando haploides maternos de milho, comparou a eficiência dos métodos citados, avaliando a porcentagem de linhagens duplo-haploides com pendão fértil. Além dos métodos conhecidos, os pesquisadores fizeram outros dois tratamentos com variações de temperatura e concentração de colchicina no método proposto por Deimling, Rober e Geiger (1997). O método de Deimling, Rober e Geiger (1997) permitiu a obtenção de 28,8% e 31,8% de haploides com pólen fértil, nas temperaturas de 18 °C e 26 °C, após o tratamento.

Batistelli (2012) realizou cruzamentos entre a linhagem indutora KEMS, doadora de pólen, com híbridos tropicais. As sementes obtidas foram selecionadas de acordo com o gene R-navajo e submetidas ao protocolo de

duplicação cromossômica, proposto por Deimling, Rober e Geiger (1997). O autor obteve taxas de duplicação que variaram de 59,1% a 80%.

## **2.5 Citometria de fluxo na identificação de plantas duplicadas**

A principal característica da citometria de fluxo é a análise de parâmetros ópticos de partículas coradas em suspensão (DOLEZEL, 1997). Esse método apresenta várias aplicações, permitindo entre outras, a análise do conteúdo de DNA e o estudo de níveis de ploidia das células. É possível também caracterizar híbridos somáticos e verificar o conteúdo de DNA de cada cromossomo do complemento de uma espécie, além de ser possível a realização de comparações intra e interespecíficas do tamanho nuclear (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2001).

O crescimento e a divisão celular são processos cíclicos nos eucariontes, onde o tempo entre cada mitose encontra-se dividido em três fases: G1, S e G2. Durante o período de crescimento celular, conhecido como fase G1, uma célula diploide apresenta um conteúdo 2C (sendo que C é conteúdo de um conjunto haploide de cromossomos), possuindo assim duas cópias de cada gene. Na fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear e, na fase seguinte - G2 ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo de DNA nuclear é mantido no nível 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 (HOWARD; PELC, 1986). Dessa maneira, os histogramas obtidos em citômetros de fluxo, em uma análise de ploidia, apresentam, em média, picos de maior intensidade no canal referente à fase G1 do ciclo celular do que os picos referentes à G2.

Para estimar o conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo, suspensões de núcleos e/ou células permeáveis são coradas com fluorocromos específicos para DNA, sendo que a quantidade de luz emitida é quantificada. A posição do pico G1 no histograma do espécime analisado deve ser comparada com a posição do pico G1 da planta padrão, cujo conteúdo de DNA é conhecido (DOLEZEL; BARTOS, 2005). Esse procedimento permite mensurar o tamanho do genoma nuclear em picogramas (pg) de DNA e/ou em pares de bases (Mbp); sendo que 1 pg de DNA corresponde a 978 Mpb (DOLEZEL et al., 2003). Em experimentos realizados em milho haploide e até mesmo em plantas haploides duplicadas, a citometria tem sido uma técnica muito utilizada, evidenciando sua importância. Dang et al. (2012) utilizaram citometria de fluxo para detecção de falsos positivos em *bulks* de sementes de milho. Após o cruzamento e avaliação de três linhagens indutoras gimnogenéticas de haploidia, RWS, RWK76, RWK76RWS, doadoras de pólen, com híbridos heterozigotos chineses, os autores concluíram que o uso do híbrido heterozigoto como doador maternal foi significativo na variação de indução de haploides, e que a linhagem RWS induziu maior taxa de sementes haploides. Couto et al. (2013) realizaram cruzamentos entre a linhagem indutora de haploidia W23 e o híbrido P30F90 e após selecionar os prováveis haploides, detectaram por meio de citometria de fluxo, quatro haploides androgenéticos em milho. Battistelli (2012) após duplicar artificialmente plântulas de milho, identificou por citometria de fluxo, plantas com vários níveis de ploidia, tais como haploides, haploides/diploides, diploides e diploides/tetraploides.

Assim, a técnica de citometria de fluxo tem sido utilizada na identificação de indivíduos haploides de milho devido sua rapidez e confiabilidade. Em experimentos com duplo-haploides, a citometria de fluxo permite que plântulas vigorosas e detectadas como diploides nos histogramas sejam descartadas antes da etapa de campo, diminuindo tempo e espaço. Esse

descarte facilita as próximas etapas, maximizando os cuidados no campo com as plântulas haploides que foram duplicadas. Além disso, a citometria de fluxo permite a análise da eficiência do protocolo de duplicação cromossômica, uma vez que é possível confirmar se a resposta das plântulas à duplicação foi positiva (BATTISTELLI, 2012; COUTO et al., 2013; DANG et al., 2012).

## **2.6 Marcadores moleculares microssatélites na identificação de duplo-haploides**

Os marcadores SSR, ou mais comumente denominado microssatélites, são regiões de DNA compostas de unidades que se repetem em tandem. Ele tem sido preferido a outros tipos de marcadores, pois utilizam a agilidade da técnica de PCR, são codominantes e estão espalhados ao acaso no genoma com uma frequência relativamente alta, inclusive intragênicos (AKKAYA; BHAGWAT; CREGAN, 1992).

Devido à característica de codominância, os marcadores SSR permitem que o homozigoto seja distinguido do heterozigoto. Mesmo em genótipos de milho que possuem base genética estreita, os marcadores SSR podem detectar alto número de alelos por loco (RABEL, 2008). Dentre as maiores vantagens dos SSR está a alta estabilidade das sequências amplificadas que se tornam ideais para o uso de PCR. Ao longo de todo o genoma, os SSR possibilitam que um ou mais locos sejam identificados próximos ou mesmo dentro de genes de interesse, constituindo-se em um marcador ideal (LEITE, 2010).

Em vários trabalhos tem sido descrita a aplicação desses marcadores na caracterização, confirmação e análise de introgressão gênica em haploides de milho. Rabel (2008) obteve sucesso no emprego dos marcadores SSR ao detectar plantas haploides provenientes do cruzamento entre a linhagem L512388 e seis famílias na geração F<sub>3</sub>, cujos genitores provinham do cruzamento entre a

linhagem W23 e o híbrido BRS1010. Couto et al. (2013) confirmaram a herança androgenética de haploides provenientes do cruzamento de um híbrido com a linhagem W23. Battistelli (2012) verificou que duplo – haploides detectados em citometria de fluxo puderam ser identificados por meio dos marcadores SSR.

## **2.7 Análise da viabilidade polínica em haploides duplicados**

Existem várias técnicas para estimar a viabilidade do grão de pólen. Dentre essas técnicas, destacam-se testes com corantes químicos, germinação *in vitro* e germinação *in vivo*. A determinação da viabilidade polínica utilizando corantes é uma prática comum em experimentos de citogenética (FERREIRA et al., 2007). Constituindo um procedimento bastante simples e barato, fornecendo resultados rápidos (NINOV; TECHIO; GAUER, 2004). Vários são os corantes empregados para essa finalidade: carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio, cloreto de trifeniltetrazólio (TCC), tetrazólio vermelho (STANLEY; LINSKENS, 1974) e verde malaquita com fucsina ácida (ALEXANDER, 1980).

Georgieva e Kruleva (1994) testaram reações baseadas na alteração da coloração dos tecidos, em presença de solução de tetrazólio. A solução salina de 2,3,5 – trifenil cloreto de tetrazólio, ao ser reduzida pelas enzimas dos tecidos vivos resulta num composto de coloração vermelha carmim. Desse modo, os tecidos mortos não são corados, e é possível classificar os grãos de pólen corados como viáveis e os incolores como inviáveis (VIEIRA et al., 1998).

Na literatura, não há descrição de um teste de viabilidade universal com a utilização de um corante específico. Na maioria dos trabalhos relata-se o uso dos corantes nucleares, sobretudo carmim acético, para vários grupos de plantas (ALVIM, 2008).

Os dados de viabilidade polínica permitem correlacionar com os de anormalidades meióticas e auxiliar na seleção de materiais genéticos, tornando-se uma ferramenta adicional na condução de experimentos nas áreas agrícola e biotecnológica (NINOV; TECHIO; GAUER, 2004).

A viabilidade polínica tem sido utilizada em vários trabalhos, envolvendo o milho, em estudos de caracterização morfológica e armazenamento de pólen (ALMEIDA et al., 2011; ALVIM et al., 2012; DAVIDE et al., 2009; FERREIRA et al., 2007). Alvim et al. (2012) selecionou o melhor meio de cultura e temperatura de incubação para germinação dos grãos de pólen de milho, com o objetivo de determinar o horário de coleta e a metodologia de secagem desses. Para isso, utilizaram o corante 'Alexander' para avaliar a viabilidade polínica. Davide et al. (2009), também utilizaram o corante 'Alexander' em seus experimentos, mas com o objetivo de verificar a viabilidade polínica de pólen armazenado.

Até o momento, são escassas as informações a cerca de viabilidade polínica envolvendo haploides duplicados em milho. O que se tem encontrado na literatura são experimentos nos quais foi verificada a eficiência de haploides duplicados em produzir pendão fértil no campo (BATTISTELLI, 2012; CHALYK, 2000; EDER; CHALYK, 2002). Eder e Chalyk (2002), por exemplo, avaliaram as porcentagens de plantas haploides duplicadas por dois métodos de duplicação cromossômica, por meio de dados de plantas haploides que produziram pólen fértil, que foram autofecundadas e formaram sementes.

O sucesso da duplicação cromossômica artificial em haploides deve ser avaliado também no campo. Haploides duplicados que liberarem pólen fértil serão responsáveis pela formação das sementes duplo-haploides, e desse modo, é importante avaliar sua viabilidade polínica.

### **3 CONCLUSÕES**

A obtenção de linhagens duplo-haploides tem sido estudada com o objetivo principal de reduzir tempo e espaço na obtenção de linhagens endogâmicas nos programas de melhoramento de milho. Alguns indutores de haploidia têm sido utilizados com variações entre os genótipos. Protocolos de duplicação cromossômica em milho têm sido propostos com variações nas taxas. Normalmente as taxas de duplicação são baixas, havendo a necessidade de se testar novos protocolos. Diferentes metodologias para a confirmação da duplicação cromossômica têm sido também propostas. Testar diferentes metodologias para esse fim é importante para a obtenção de resultados mais seguros.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 13-18, July 1980.

ALMEIDA, C., AMARAL, A. L., NETO, J. F. B., SERENO, M. J. C. M. Conservação e germinação *in vitro* de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 493-497, out./dez. 2011.

ALVIM, P. O. **Viabilidade e conservação de grãos de pólen de milho**. 2008. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

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

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., GUIMARÃES, C. T., PAIVA, L. V., DUARTE, J. M., MALUF, W. R., PAIVA, E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 156, n. 1/2, p. 95-102, July 2007.

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

BORDES, J., CHARMET, G., DUMAS DE VALUX, R., POLLACSEK, M., BECKERT, M., GALLAIS, A. Doubled haploid versus family recurrent selection for testcross performance in a maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 3, p. 1063-1072, Apr. 2006.

CASTILLO, A. M., CISTUÉ, L., VALLÉS, M. P., SORIANO, M. Chromosome doubling in monocots. Advances in Haploid Production in Higher Plants. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer Science, 2009. p. 329-338.

CHALYK S.T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. **Euphytica**, Wageningen v. 79, n. 1-2, p. 13-18, 1994.

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

CHALYK, S. T., BAUMANN, A., DANIEL, G., EDER, J. Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize. **The Maize Genetics Cooperation**, Urbana, v. 77, p. 29-30, Jan. 2003.

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

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

CHASE, S. S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.). **Botanical Review**, Bronx, v. 35, n. 1, p. 117-167, 1969.

CHASE, S. S.; NANDA, D. K. Comparison of variability in inbred lines and monoploid-derived lines of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 5, n. 4, p. 275-276, Sept./Oct. 1965.

CHASE, S. S. Production of momozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, n. 3, p. 263-267, Mar. 1952.

COE, E. H. A line of maize with high haploid frequency. **American Naturalist**, Chicago, v. 93, n. 870, p. 381-382, June 1959.

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. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos** - Nono levantamento, safra 2012/2013. Brasília, 2013.

COUTO, E. G. O., DAVIDE, L. M. C., BUSTAMANTE, F.O., VON PINHO, R. G., SILVA, T. N. 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.

DANG, N. C. MUNSCH, M., AULINGER, I., RENLAI, W., STAMP, P. Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 183, n. 2, p. 153-160, Jan. 2012.

DANG, N. C. **Improvement of protein quality in waxy maize (*Zea mays* L.) by double haploid and marker assisted selection techniques**. 2010. 15 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - University of Thai Nguyen, Zürich, 2010.

DAVIDE, L. M. C., PEREIRA, R. C., ABREU, G. B., SOUZA, J. C., VON PINHO, E. V. R. Viabilidade de pólen de milho em diferentes períodos de armazenamento em baixa temperatura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 8, n. 2, p. 199-206, 2009.

DEIMLING, S.; ROBER, F.; GEIGER, H. H. Methodik und genetik der in-vivo-Haploideninduktion bei mais. **Vorträge für Pflanzenzüchtung**, Quedlinburg, v. 38, p. 203-224, 1997.

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

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.

DOLEZEL, J. BARTOS, J. VOGLMAYR, H. GREILHUBER, J. Nuclear DNA and genome size of trout and human. **Cytometry**, Malden, v. 51, n. 2, p.127-128, Feb. 2003.

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

FERREIRA, C. A., VON PINHO, E. V. R., ALVIM, P.O, ANDRADE, V., SILVA, T. T. A., CARDOSO, D. L. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, n. 2, p. 159-173, 2007.

FISCHER, E. **Molecular genetic studies on the occurrence of paternal DNA transmission during in vivo haploid induction in maize (Zea mays)**. 2004. Thesis (PhD) - University of Hohenheim, Stuttgart , 2004.

GAYEN, P., MADAN, J. K., KUMAR, R., SARKAR, K. R. Chromosome doubling in haploids through colchicine. **Maize Genetics Cooperation NewsLetter**, Columbia, v. 68, n. 1, p. 65, 1994.

GEIGER, H. H. Doubled haploids. In: BENNETZEN, J. L.; HAKE, S. **Handbook of maize: genetics and genomics**. New York: Springer, 2009.

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

GEORGIEVA, I. D.; KRULEVA, M. M. Cytochemical investigation of long-term stored maize pollen. **Euphytica**, Wageningen, v. 72, n. 1/2, p. 87-94, Feb. 1994.

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

HOWARD, A.; PELC, S. R. Synthesis of deoxyribonucleic-acid in normal and irradiated-cells and its relation to chromosome breakage. **International Journal of Radiation Biology**, Toronto, v. 49, n. 2. p. 207-218, 1986.

KERMICLE, J. L. Androgenesis and the indeterminate gametophyte(ig) mutation: influence of pollen parent on androgenese frequency. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 47, n. 45, p. 207-208, 1973.

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

LASHERMES, P.; BECKERT, M. A genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 76, n. 1, p. 405-410, July 1988.

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, n. 1, p. 570-572, July 1988.

LEITE, M. E. Seleção natural em populações de feijoeiro, conduzidas em diferentes níveis de nitrogênio, utilizando a produtividade de grãos e alelos

**de microssatélites**. 2010. 146 p. Dissertação ( Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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.

NINOV, K.; TECHIO, V. H.; GAUER, E. Viabilidade de pólen em espécies de Passiflora. **Acta Ambiental Catarinense**, Chapecó, v. 3, n. 1, p. 7-12, 2004.

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

PIERRE, P. M.O., DAVIDE, L. M. C., COUTO, E. G. O., SILVA, T. N., RAMANHO, M. A. P., SANTOS, J. B. 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.

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

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

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

RÖBER, F. K. **Fortpflanzungsbiologische und genetische Untersuchungen mit RFLP-Markern zur in-vivo-Haploideninduktion bei mais**. 1999. Dissertation (PhD) - University of Hohenheim, Stuttgart, 1999.

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

ROTARENCO, V. A.; DICU, G. Improvements of in vivo haploid induction in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 86, 2012 . Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/86/pdf/19rotarenco.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2013.

ROTARENCO, V. A.; DICU, G.; SARMANIUC, M. Induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 83, 2009. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/83/46rotarenco.htm>>. Acesso em: 22 mar. 2013.

ROTARENCO, V. A., DICU, G., STATE, D., FUIA, S. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 84, 2010. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/84/PDF/15rotarenco.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

SARKAR, K. R.; COE E. H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize, **Genetics**, Colorado, v. 54, n. 2, p. 453-464, Aug. 1966.

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

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

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307 p.

TANG, Q. L., FENG, Y-C., HAN, X-L., ZHENG, M-M., RONG, T-Z. Study on haploidy inducing and its meiotic abnormality in maize. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v. 8, n. 1, p. 1159-1165, 2009.

VIEIRA, M. G. G. C. et al. **Testes rápidos para determinação da viabilidade e da incidência de danos mecânicos em sementes de cafeeiro**. Lavras: UFLA, 1998. 34 p. (Boletim Agropecuário, 26).

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

ZHANG, Z. L., QIU, F., LIU, Y., MA, K., LI, Z., XU, S. Chromosome elimination and in vivo haploid induction by stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Report**, Heidelberg, v. 27, n. 12, p.1851-1860, Mar. 2008.

## **CAPÍTULO 2**

### **Duplicação cromossômica em linhagens haploides de milho**

## RESUMO

Dentre as etapas mais importantes na obtenção de duplo-haploides em milho, destaca-se a duplicação cromossômica artificial. Na literatura há várias metodologias de duplicação cromossômica, no entanto ainda não foi proposto um método que permita repetibilidade de resultados. Objetivou-se neste trabalho avaliar a capacidade de indução da linhagem indutora KEMS em clima tropical; testar a eficiência do marcador morfológico R- navajo; comparar dois protocolos de duplicação cromossômica e avaliar a influencia dos genótipos utilizados como fêmeas na resposta à duplicação. Para isso, quatro híbridos simples e suas gerações F2 foram cruzados com a linhagem indutora KEMS, utilizada como doadora de pólen. As sementes obtidas foram selecionadas de acordo com o marcador R-navajo e submetidas a dois diferentes protocolos de duplicação cromossômica. As plantas que sobreviveram aos protocolos de duplicação cromossômica foram aclimatizadas em casa de vegetação por 20 dias para serem posteriormente transplantadas para o campo. Para confirmar a duplicação cromossômica, amostras de folhas das plantas duplicadas foram analisadas em citometria de fluxo. Após a citometria de fluxo, foi possível fazer o rastreamento das ploidias no campo e assim, coletar informações a respeito das plantas autofecundadas. Além disso, foram analisadas as quantidades de sementes obtidas após as autofecundações e as quantidades de sementes duplo-haploides. As análises estatísticas foram realizadas usando-se a abordagem de modelos lineares generalizados mistos, sendo que após verificar as diferenças significativas por meio de análise de “deviance”, foi realizado agrupamento com base na distância de *Mahalanobis*. Foi observado que os híbridos utilizados

influenciam na indução de haploides, entretanto não influenciam na taxa de duplicação cromossômica dos protocolos testados. O protocolo 2 foi mais eficiente na duplicação cromossômica de haploides, na porcentagem de plantas duplicadas que foram autofecundadas, e na obtenção de linhagens duplo-haploides. Além disso, a linhagem indutora de haploidia KEMS pode induzir haploides em clima tropical. Outros marcadores além do sistema do R-navajo devem ser utilizados na seleção de sementes haploides.

Palavras-chave: R-navajo. Colchicina. Indutores de haploidia. *Zea mays*.

## ABSTRACT

Among the most important steps in getting double haploids in maize, is artificial chromosome doubling. In the literature there are several methods of chromosome doubling, however there has not been proposed an effective method that allows repeatability of results. The aim of this study was to evaluate the ability of inducing of KEMS in tropical conditions, test the efficiency of the morphological marker R-Navajo; compare two protocols chromosome duplication and to evaluate the influence of genotypes used as females in response to duplication. For the purpose, four hybrids and their F2 generations were crossed with an inducer KEMS used as pollen donor. Seeds obtained were selected according to the marker R-Navajo and submitted to two different chromosome doubling protocols. The plants that survived the protocols were acclimatized in a greenhouse for 20 days to be later transplanted to the field. Leaf samples were analyzed in flow cytometer to confirm the protocols efficiency. After of the flow cytometry, it was possible to trace the ploidies in the field and thus collect information about selfed plants. Furthermore, seeds obtained after self pollination and seed quantities from the double haploids were verified. Statistical analyzes were performed using the approach of generalized linear mixed models, and after checking for significant differences by analysis of "deviance" was held clustering based on Mahalanobis distance. It was observed that the the hybrids used influenced the haploid induction, though not influence the rate of chromosome doubling. Protocol 2 was more efficient in chromosome doubling of haploid, in the percentage of duplicated plants that were selfed, and achieving double-haploid lines. Furthermore, the inducer haploidy line KEMS can be used in a tropical climate. Other markers in addition to the R-Navajo system should be used in selecting haploid seed.

Keywords: R-navajo. Colchicines. Haploid induction. *Zea mays*.

## 1 INTRODUÇÃO

A tecnologia duplo-haploides (DH) tem sido utilizada em programas de melhoramento por várias décadas e em várias espécies (LI et al., 2013). Diversas empresas produzem linhagens duplo-haploides para a obtenção de milho híbrido, entretanto ainda é escassa a existência de informações referentes à eficiência da técnica em instituições públicas.

A implementação do método duplo-haploide em milho exige a utilização de linhagens indutoras que podem gerar haploides paternos ou maternos. Em geral, essas linhagens indutoras têm origem temperada, dificultando o manejo e o desenvolvimento dessas em condições tropicais. Algumas linhagens indutoras já foram desenvolvidas e possuem taxas de indução relativamente alta (CHALYK, 1999; DANG et al., 2012; RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005; ROTARENCO et al., 2010). No entanto, existem alguns fatores limitantes na técnica de indução da haploidia, sendo que a frequência de haploides pode ter influência do genótipo utilizado como doador (PRIGGE et al., 2011).

Haploides induzidos pelas linhagens indutoras de haploidia são selecionados precocemente por meio de marcadores morfológicos baseados na pigmentação por antocianina no endosperma das sementes, determinado pelo gene R-navajo (CHASE; NANDA, 1965). Atualmente, novos marcadores morfológicos permitem que os haploides sejam identificados em diferentes estágios, tais como grãos secos, plântulas e plantas desenvolvidas (ROTARENCO et al., 2010).

Dentre as etapas mais importantes na obtenção de duplo-haploides destaca-se a duplicação cromossômica artificial. Muitos métodos de duplicação cromossômica têm sido testados e publicados (CHALYK 2000; DEIMLING; ROBER; GEIGER, 1997; GAYEN et al., 1994; ZABIROVA et al., 1996).

Apesar de existirem várias metodologias de duplicação cromossômica na literatura, ainda não foi proposto um método que permita repetibilidade de resultados e, além disso, ainda são escassas informações a cerca do comportamento e eficiência na produção de linhagens duplo-haploides. Isso se deve principalmente aos fatores tempo, genótipo e concentração, que influenciam na duplicação cromossômica por meio do uso de colchicina (CASTILLO et al., 2009).

Dentre as vantagens dos duplo-haploides em milho, Pierre et al. (2011) destacam a menor recombinação dos genes ligados, quando se compara a tecnologia com linhagens convencionais, obtidas de autofecundações sucessivas. Em autofecundações sucessivas, há um aumento da ocorrência de recombinações entre genes ligados. Nos duplo-haploides, no entanto, a recombinação de genes ligados ocorre somente na meiose que originou o gameta responsável pela planta. Dessa maneira parte dos locos ligados não será recombinada. Bernardo (2009) avaliou, em simulação experimental, a melhor geração (F1 e F2) na obtenção de duplo-haploides. O autor constatou que duplo-haploides provenientes de gerações F2 foram mais eficientes devido a maior recombinação.

Nesse contexto, os objetivos neste trabalho foram: a) avaliar a capacidade de indução da linhagem indutora KEMS em clima tropical; b) testar a eficiência do marcador morfológico R- navajo por meio de citometria de fluxo; c) avaliar dois protocolos de duplicação cromossômica e verificar a influencia dos híbridos utilizados como fêmeas; e d) analisar o desenvolvimento dos haploides duplicados no campo.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Área experimental e genótipos avaliados**

Foram utilizados quatro híbridos simples (DKB393, GNS 3225, GNS 364, GNS 3032) e suas gerações F<sub>2</sub>, os quais foram cruzados com o indutor de haploidia KEMS. A linhagem indutora de haploidia KEMS (SHATSKAYA et al., 1994), que é gimnogenética, foi utilizada como parental masculino. Para favorecer a sincronia de florescimento, as sementes dos híbridos foram semeadas dez e quatorze dias antes da semeadura da linhagem indutora devido ao fato de possuir origem temperada e ser mais precoce.

O campo de cruzamento ocorreu em Cravinhos, SP, na safrinha de 2011. Os indutores foram semeados em 20 linhas de 5 m, a fim de garantir a quantidade mínima de plantas para a realização dos cruzamentos. As sementes dos híbridos simples (F1) e suas gerações F2 foram semeadas em duas linhas de 5 m. Duas sementes por cova foram distribuídas em linhas espaçadas de 80 cm, com 20 cm entre plantas. Aproximadamente 15 dias após a emergência das plantas, foi realizado o desbaste, deixando-se cinco plantas por metro linear. A adubação de semeadura foi de 500 Kg.ha<sup>-1</sup> do formulado 10-30-10 e, em cobertura, foram aplicados 500 Kg.ha<sup>-1</sup> de 20-0-20, após o desbaste. Os demais tratamentos culturais foram realizados conforme recomendação para a cultura do milho.

### **2.2 Identificação de haploides por meio do marcador R-navajo**

As atividades experimentais foram realizadas na Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, MG.

As sementes obtidas dos cruzamentos citados anteriormente foram separadas visualmente pela coloração do endosperma e embrião (CHASE; NANDA, 1965). Grãos com endosperma roxo e embrião branco foram considerados haploides e selecionados. As quantidades de sementes dos prováveis haploides foram posteriormente divididas, a fim de serem submetidas a dois diferentes protocolos de duplicação cromossômica.

As quantidades de sementes selecionadas como haploides por meio do marcador R-navajo foram utilizadas em análises estatísticas para cálculos de indução de haploidia da linhagem KEMS.

### **2.3 Duplicação cromossômica artificial**

As duplicações foram realizadas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da UFLA.

No primeiro protocolo de duplicação, as sementes selecionadas pelo marcador R-navajo foram desinfestadas com hipoclorito 2% e colocadas para germinar, por 72 horas, em papel de germinação umedecido com temperatura controlada de 25° C. Após a germinação, para eliminar os falsos haploides, plântulas com vigor, caracterizado por plântulas de 3 cm na parte aérea e 4 cm de raiz, foram classificadas como diploides e foram descartadas (Figura 1).

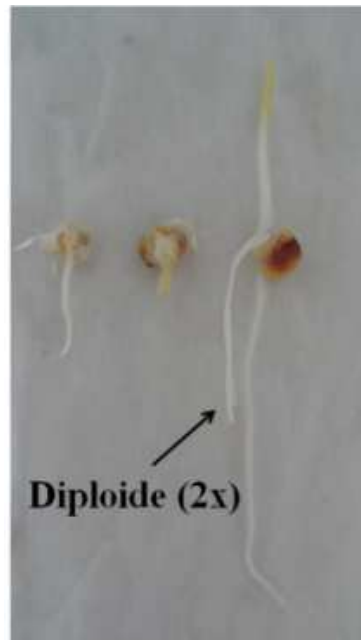


Figura 1 Classificação de plântulas pelo vigor, após germinação das sementes identificadas como haploides pelo marcador R-navajo

Após essa etapa, as plântulas identificadas como possíveis haploides foram submetidas ao tratamento com solução de 0,04% de colchicina e 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), por 12 horas, e mantidas no escuro a 20°C, de acordo com Prasanna, Chaikam e Mahuku (2012).

No segundo protocolo as sementes selecionadas também foram desinfestadas com hipoclorito 2 % e logo após, semeadas em bandejas contendo areia e vermiculita (na proporção de 1:1). Após 10 dias, as plantas mais vigorosas, que possuíam mais folhas ou eram maiores que as outras, foram selecionadas como diploides e descartadas. As plantas haploides foram então retiradas das bandejas e suas raízes foram lavadas em água para retirada da areia

e vermiculita e para serem submetidas ao protocolo de duplicação. As raízes das plantas consideradas haploides foram imersas em solução de colchicina 0,1%, dimetilsulfóxido 0,1% (DMSO) e Tween 20 a 0,1%, e mantidas por 6 horas na presença de luz em temperatura ambiente, média 22°C, de acordo com Paul Newell (dados não publicados).

Os protocolos utilizados neste trabalho serão posteriormente designados de protocolo 1, para o primeiro testado e protocolo 2, para o segundo.

Após o tratamento com colchicina as plântulas submetidas em ambos os protocolos de duplicação cromossômica foram lavadas por 40 minutos em água corrente, e transferidas para copos plásticos com substrato vegetal. As plântulas foram aclimatadas em casa de vegetação e permaneceram em ambiente controlado por 20 dias.

#### **2.4 Citometria de fluxo**

Quatorze dias após a duplicação cromossômica, amostras foram coletadas em casa de vegetação e submetidas à citometria de fluxo para a identificação das plantas duplicadas e avaliação dos protocolos de duplicação cromossômica utilizados.

A estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo foi obtida a partir de tecido foliar dos genitores e dos descendentes provenientes desse cruzamento, que sobreviveram à duplicação cromossômica. Ou seja, todas as plantas que estavam em casa de vegetação e sobreviveram à duplicação cromossômica de ambos os protocolos, foram analisadas. Para cada amostra, utilizou-se, aproximadamente, 20-30 mg de folhas jovens do indivíduo avaliado. A espécie *Vicia faba* (quantidade de DNA de 26,9 pg/2C) foi utilizada como padrão externo de referência. As amostras foram trituradas em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a obtenção da suspensão nuclear

(DOLEZEL, 1997), a qual foi adicionada 2,5 $\mu$ L de RNase e corada com 25  $\mu$ L de iodeto de propídeo (1 mg mL<sup>-1</sup>). Para cada amostra foram analisados no mínimo 10 mil núcleos. Os histogramas foram obtidos no citômetro de fluxo *FacsCalibur* (Becton Dickinson) com o programa *Cell Quest* (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) e analisados pelos softwares WinMDI 2.8 (2009).

## **2.5 Avaliações de autofecundação e quantidades de sementes obtidas de plantas duplicadas**

Após 20 dias de aclimação pós-duplicação cromossômica, e após avaliação em citometria de fluxo, as plantas oriundas de ambos os protocolos de duplicação cromossômica foram transplantadas para ambiente protegido, com cobertura de lona plástica transparente nas dependências da empresa HortiAgro, localizada no município de Ijaci, MG. Todas as plantas foram identificadas para que houvesse o rastreamento e a possibilidade de confrontar os resultados de citometria de fluxo com os dados de fertilidade do pendão e quantidade de sementes obtidas das plantas autofecundadas. A adubação na semeadura foi de 450 kg do formulado 8-28-16, com espaçamento de 0,4 m entre linhas e 0,25 m entre plantas. A adubação de cobertura e os tratos culturais foram realizados conforme o recomendado para a cultura na região. Nas primeiras semanas após transplante foi realizada aplicação foliar com produto à base de fósforo e potássio, para ajudar no enraizamento das plantas.

O desenvolvimento das plantas no campo foi analisado e as características dos indivíduos haploides, tais como desenvolvimento da planta, vigor, coloração das folhas, anormalidades nos pendões e estilo-estigma, foram avaliadas e comparadas com dos indivíduos diploides.

As espigas foram protegidas com sacos plásticos antes da emissão do estilo-estigma das plantas para que a autofecundação pudesse ser realizada. Todas as plantas que produziram pólen e que possuíam estilo-estigma em sincronismo foram autofecundadas para a manutenção e multiplicação de sementes.

Foram coletadas informações a respeito das plantas autofecundadas e feito o rastreamento das ploidias detectadas na citometria de fluxo. Assim, foi possível analisar quantas plantas foram autofecundadas e quais ploidias elas apresentavam. Além disso, foram analisadas as quantidades de sementes obtidas após as autofecundações e as quantidades de sementes dos duplo-haploides. Por meio desses dados foi possível comparar os protocolos de duplicação cromossômica e analisar a eficiência de ambos na obtenção de linhagens duplo-haploides.

## 2.6 Análises estatísticas

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

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

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

Onde:

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

$\mu$ : intercepto;

$p_i$ : efeito fixo do protocolo  $i$ ;

$h_j$ : efeito fixo do híbrido  $j$ ;

$g_k$ : efeito fixo da geração  $k$ ;

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

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

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

A significância dos efeitos do modelo foi verificada via análise de “deviance”, com aplicação do teste estatístico de  $\chi^2$  (qui-quadrado), a 5% de probabilidade (CORDEIRO; DEMÉTRIO, 2007). Nos efeitos em que se evidenciaram diferenças significativas, realizou-se agrupamento com base na distância de *Mahalanobis*, pelo método do vizinho mais próximo e estabelecido o ponto de corte usando o método de reamostragem *bootstrap* (MOURÃO JÚNIOR, 2001).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Haploides obtidos por meio do marcador R-navajo

As quantidades de sementes obtidas do cruzamento entre a linhagem indutora de haploidia KEMS e os híbridos simples GNS 3032, GNS 3225, GNS 364 e DKB 393, e suas gerações F2 são representadas na Tabela 1.

Tabela 1 Quantidades de sementes totais e classificadas como haploides, selecionadas pelo marcador morfológico R-navajo, e indução de haploidia

Híbrido	Geração	Total	Total de sementes selecionadas pelo R-navajo	Indução de haploides (%)
GNS3225	F1	2236	126	5,6
	F2	2284	145	6,3
GNS3264	F1	2523	241	9,5
	F2	1450	135	9,3
GNS3032	F1	1193	177	14,8
	F2	238	47	19,7
DKB393	F1	3486	130	3,7
	F2	1904	85	4,4

A partir dessas sementes foram selecionados os prováveis haploides, de acordo com o marcador do sistema R-navajo (CHASE; NANDA, 1965).

Por meio das análises de “deviance” observa-se que os híbridos influenciam na taxa de indução de haploides, quando se considera o marcador morfológico R- navajo (Tabela 2). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas na taxa de indução de haploides entre as gerações dos híbridos utilizados. Esses resultados corroboram com os observados por Battistelli (2012), quando do cruzamento da linhagem indutora KEMS, utilizada como

doadora de pólen, com híbridos tropicais. Os resultados obtidos pelo autor demonstraram que mesmo com uma geração de endogamia, não há interferência na indução de haploides.

Tabela 2 Resumo da análise de “deviance” para taxa de indução de haploides identificados pelo marcador R-navajo dos quatro híbridos cruzados com o indutor KEMS

FV	GL	“DEVIANCE”
Híbridos	3	258,08*
Geração	1	2,80

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

Mesmo sendo uma linhagem temperada, o indutor KEMS foi eficiente na produção de sementes em clima tropical. Prigge et al. (2011) realizaram cruzamentos entre indutores temperados e germoplasma tropical e não encontraram diferenças entre a taxa de indução de haploides nas condições tropicais e temperadas. Os autores concluíram que os indutores temperados podem ser utilizados em programas de melhoramento tropical, porém, é necessário desenvolver indutores tropicais para que se tornem mais adaptados.

As taxas de indução dos haploides selecionados pelo marcador R-navajo variaram de 3,7% a 19,7%. A média na taxa de indução dos haploides selecionados pelo marcador R-navajo foi de 9,16%. Battistelli (2012), utilizando a mesma linhagem obteve taxas de indução média de 7,1%. Shatskaya et al. (1994) obtiveram valores de porcentagens variando de 6,3% a 8%. Provavelmente, os altos valores de porcentagens encontradas neste trabalho se devem ao número reduzido de sementes obtidas dos cruzamentos dos quatro híbridos com a linhagem KEMS, que superestimaram os resultados.

Na Tabela 3 são representadas as médias calculadas das taxas de indução de haploides nos quatro híbridos. O agrupamento foi realizado por meio

da distância de *Mahalanobis*. Foram observadas para o híbrido GNS 3032 maiores taxas de indução de haploides e menores para o híbrido DKB 393.

Tabela 3 Médias ajustadas das taxas de indução de haploides identificados pelo marcador morfológico R-navajo, oriundos dos cruzamentos dos quatro híbridos com o indutor KEMS

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

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

Diferenças entre genótipos nas taxas de indução de haploides em milho já foram relatadas por diversos autores (BARBOSA, 2009; BATTISTELLI, 2012; EDER; CHALYK, 2002; RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005).

De acordo com Rotarencu, Adicu e Sarmaniu (2009) taxas de indução podem depender do método utilizado nos cruzamentos e do período de polinização. Melhores resultados foram obtidos quando os autores utilizaram polinização manual, três dias após a emissão de estilo-estigma, em comparação com a polinização aberta. No entanto, Geiger e Gordillo (2010) citam que melhoristas experientes conseguem obter altas taxas de indução de haploides em polinizações não controladas.

Considerando ainda as épocas de polinização, Kebed et al. (2011), cruzaram 45 híbridos simples com as linhagens indutoras RWS e UH400, em ambiente tropical, sendo um cruzamento no inverno e outro no verão. As médias das taxas de indução de haploides variaram de 2,90% a 9,66%, sendo a taxa de indução de haploides maior no inverno (7,37%) que no verão (6,11%). Os

autores evidenciam a importância das condições ambientais na indução de haploides. No estudo, a principal diferença entre as estações avaliadas foi a temperatura, entretanto, os autores enfatizam que fatores como precipitação e umidade relativa do ar não devem ser desconsideradas.

### **3.2 Avaliação de haploides pela técnica de citometria de fluxo**

Os haploides selecionados pelo marcador R-navajo foram submetidos aos protocolos de duplicação cromossômica e após 14 dias, analisados em citometria de fluxo para a detecção dos haploides. Os haploides foram classificados como aqueles indivíduos que apresentaram o pico característico da ploidia  $x$  nos histogramas, independente das amostras terem sofrido duplicação ou não. Por meio dessa análise foi possível verificar a eficiência do marcador R-navajo na seleção dos haploides.

Na análise de “deviance” foi encontrada diferença significativa entre os híbridos. No agrupamento com base na distância de *Mahalanobis*, entretanto, as médias foram iguais, ou seja, a 5% de probabilidade, os híbridos não se diferiram na taxa de haploides reais. As médias obtidas variaram de 1,58% no genótipo DKB 393 a 4,12% no genótipo GNS 3032 (Tabela 4).

Considerando as taxas de indução observadas nesta pesquisa, infere-se que a indução de haploides é um fator limitante em regiões tropicais. Observando o híbrido DKB 393, por exemplo, é possível perceber que a porcentagem de indução por meio do marcador R-navajo foi de 3,84%, enquanto a taxa real de indução de haploides foi de 1,58%.

Tabela 4 Médias ajustadas das taxas de indução de haploides identificados por citometria de fluxo, oriundos do cruzamento dos quatro híbridos com a linhagem KEMS

Híbridos	Taxa de indução (%)
GNS 3032	4,12 a
GNS 3225	2,42 a
GNS 3264	3,29 a
DKB393	1,58 a
Média	2,85

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

Por meio dos resultados obtidos foi possível verificar que além do marcador morfológico R-navajo, outros marcadores precisam ser utilizados. Isso é observado quando se compara as médias de indução de haploides identificados pelo marcador R-navajo e pela técnica de citometria de fluxo. É possível perceber uma taxa de erro de 5, 65%, uma vez que a média dos haploides identificados pelo R-navajo foi 8,50% enquanto a média dos haploides identificados pela citometria de fluxo foi 2,85%. Neste trabalho, plântulas que apresentaram coloração arroxeadada nas raízes e maior vigor foram selecionadas antes da duplicação cromossômica, em ambos os protocolos, entretanto, ainda assim, falsos haploides foram selecionados e duplicados.

Como o gene R- navajo apresenta expressividade variável e penetrância incompleta (BELICUAS et al., 2007), o marcador não fornece uma indicação precisa das sementes, e isso faz com que falsos haploides sejam selecionados. Para evitar esse erro, é recomendável analisar e separar as sementes haploides após a colheita, uma vez que a etapa de secagem gera uma coloração mais escura no embrião, contribuindo para uma seleção errada de haploides (PRIGGE et al., 2011).

Couto et al. (2013) avaliando a identificação de haploides por meio de citometria de fluxo e marcadores de DNA verificaram que de um total de 1429 sementes colhidas, 397 foram selecionadas como possíveis haploides pelo sistema morfológico do gene R1-nj. Porém, deste número somente quatro plantas foram identificadas como verdadeiros haploides pela citometria de fluxo. Em cruzamentos do híbrido Chuandan13 com a linhagem indutora Stock6, foram identificados 303 prováveis haploides (com base no marcador R-navajo). Após a análise citológica, verificaram que, das 253 sementes que germinaram somente 71 apresentavam  $n=10$  cromossomos (TANG et al., 2009, citado por PIERRE et al., 2009).

Os haploides também foram identificados no campo. Plantas haploides apresentaram características tais como, desenvolvimento atrasado em relação as outras plantas, baixo vigor, folhas verdes mais claras, pendão de menor tamanho quando comparado com plantas diploides e infertilidade. Além disso, foi observado que alguns indivíduos haploides apresentaram pendão fértil, entretanto, não havia sincronismo com o desenvolvimento do estilo-estigma, ou ainda, o estilo-estigma não desenvolveu (Figura 3). Couto et al. (2012) também observaram que plantas haploides, detectadas em citometria de fluxo, apresentaram porte menor, quando comparados com indivíduos diploides.



Figura 3 Planta haploide no campo (identificado)

Marcadores morfológicos, como por exemplo, coloração do caule, torna possível a remoção de plantas  $F_1$  da fração dos possíveis haploides em estádios iniciais em casa de vegetação e campo. A presença e ausência de lígula também é um marcador que pode ser utilizado, já que haploides são caracterizados por não terem lígula nem aurícula, além de possuírem folhas verticais envolvendo o caule (PRIGGE et al., 2012). Essas características, entretanto dependem do germoplasma que foi utilizado como fêmea para ocorrerem e se expressarem, e possibilitarem a remoção dos haploides. Neste trabalho, os híbridos utilizados como fêmea não possuíam os genes para essas características, impossibilitando essa remoção.

Em estádios adultos, ainda é possível diferenciar haploides de plantas diploides por meio da morfologia e vigor (RÖBER; GORDILLO; GEIGER,

2005). Ambos os métodos adicionais para seleção de haploides podem ser empregados após o procedimento de duplicação cromossômica artificial.

### 3.3 Duplicação cromossômica de linhagens haploides

Nesta análise foram considerados os totais de plantas duplicadas submetidas aos protocolos 1 e 2, e que sobreviveram à etapa de duplicação cromossômica e ainda, que foram analisadas por meio da técnica de citometria de fluxo. Dessa forma, considerou-se, nessa análise de plantas duplicadas, plantas de diferentes ploidias, que vão desde os indivíduos haploides duplicados, até os diploides duplicados.

Assim, a análise de duplicação cromossômica permitiu comparar a eficiência dos protocolos na duplicação de plântulas, como também a eficiência dos mesmos na duplicação dos indivíduos haploides, na obtenção dos duplo-haploides.

Na análise de “deviance” da taxa do total de plantas duplicadas, os protocolos diferiram significativamente entre si, como também as gerações (Tabela 5).

Tabela 5 Resumo da análise de “deviance” da taxa do total de plantas duplicadas nos protocolos 1 e 2 pelo total de plantas em que foi realizada a citometria de fluxo

FV	GL	“DEVIANCE”
Híbridos	3	3,06
Geração	1	10,52*
Protocolo	1	19,31*
Prot:Hibr	3	2,19

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

As médias ajustadas obtidas pela análise de “deviance” da taxa de duplicação cromossômica nas gerações foram de 51,32% na geração F1 e 65,67% na geração F2. Quanto à análise de duplicação cromossômica nos protocolos, para o protocolo 2, foram observadas as maiores taxas de plantas duplicadas quando comparadas às observadas no protocolo 1, sendo para o protocolo 2 de 69,33%, e no protocolo 1 de 51,32%.

Como pode-se perceber, os valores de duplicação cromossômica foram altos. É necessário enfatizar que o valor alto nesta análise, ocorreu, pois uma seleção de plantas já havia sido realizada antes, por meio da citometria de fluxo. Assim, as análises foram realizadas considerando o total de plantas que sobreviveram à etapa de duplicação, e que foram analisadas em citometria de fluxo, e não considerando o total de plantas iniciais que foram submetidas aos protocolos de duplicação. Ou seja, as análises foram realizadas em um total de sementes menor que o total de sementes que iniciamos o trabalho. Dessa maneira os resultados foram superestimados devido às poucas sementes.

Os híbridos não diferiram significativamente entre si quanto à taxa de plantas duplicadas. As médias variaram de 45,70% para o genótipo GNS 3264 a 55,64% para o genótipo GNS 3225 (Tabela 7).

Tabela 7 Médias ajustadas do total de plantas duplicadas pelo total de plantas em que foi realizada citometria de fluxo, dos quatro híbridos cruzados com a linhagem KEMS

Híbridos	Média
3032	51,32 a
3225	55,64 a
3264	45,70 a
DKB393	51,86 a

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

Dang et al. (2012) observaram taxas de 28% a 54% de plantas duplicadas. Battistelli (2012), por sua vez, obteve maiores porcentagens de plantas duplicadas, de 59,1% a 80%. Choe et al. (2012) duplicaram sementes de milho haploide selecionadas pelo marcador R-navajo (CHASE; NANDA, 1965). O protocolo de duplicação utilizado por esses autores foi o mesmo de Eder e Chalyk (2002) e as porcentagens de plantas duplicadas variaram de 5% a 57,1% nos genótipos avaliados.

Vanous (2011), estudando duplicação cromossômica em diferentes genótipos e utilizando diferentes soluções antimitóticas, obteve 46,71% de duplicação quando submeteu plântulas com coleótilos cortados à colchicina. Utilizando apenas água, e cortando as radículas das plântulas, o mesmo autor obteve 55,31%. Valores menores de duplicação, tais como de 0% a 28,57%, foram obtidos quando o autor utilizou herbicidas na duplicação cromossômica.

Neste trabalho, os coleótilos das plântulas não foram cortados, antes de serem submetidos ao protocolo 1, e o que se observou foi um valor superior (51,32%) ao encontrado por Vanous (2011).

Os protocolos utilizados, por serem bem divergentes, possibilitaram que fossem realizadas inúmeras comparações. O protocolo 1 possui uma metodologia mais prática, e é parecido com o de Deimiling, Rober e Geiger (1997), diferindo apenas na concentração de colchicina. Nesse protocolo, as plântulas após a germinação, são submetidas à solução de duplicação, e então, lavadas, plantadas em substrato e levadas para casa de vegetação. O protocolo 2, por sua vez, possui uma metodologia mais trabalhosa, uma vez que são necessários sete dias, até que a planta cresça o suficiente para que as suas raízes sejam submetidas à solução de duplicação. Além disso, após atingir o tamanho ideal, as plantas precisam ser retiradas das bandejas e lavadas com água, para a retirada da areia e vermiculita que ficam agarradas nas raízes. Essa etapa é trabalhosa e exige cautela do pesquisador para que as raízes não sejam

destruídas antes da etapa de duplicação. É importante também limpar bem as raízes, uma vez que a areia e vermiculita, que ficam agarradas nas raízes, dificultam a entrada da colchicina nas plantas.

Os protocolos utilizados foram eficientes na duplicação cromossômica das plantas, entretanto, o objetivo principal nesta pesquisa foi obter haploides duplicados, com o objetivo de obter linhagens duplo-haploides. Desse modo, foram realizadas análises estatísticas em plantas haploides que foram duplicadas. Na análise do número de haploides duplicados, dentro do total de haploides identificados pela citometria de fluxo, houve diferenças significativas nos protocolos e também nas gerações (Tabela 8). As médias ajustadas obtidas pela análise de “deviance” da taxa de haploides duplicados, pelo total de haploides identificados na citometria de fluxo, foram de 50,96% na geração F1 e 64,61% na geração F2.

Tabela 8 Resumo da análise de “deviance” da taxa de duplo-haploides pelo total de haploides, identificados por citometria de fluxo

FV	GL	“DEVIANCE”
Híbridos	3	2,24
Geração	1	5,46*
Protocolo	1	6,60*
Prot:Hibr	3	1,45

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

O protocolo 2, também nesta análise de duplicação, foi melhor que o protocolo 1. Na taxa de duplicação de haploides o protocolo 2 apresentou média de 65,94%, valor superior ao encontrado no protocolo 1, cuja média foi de 50,97%. Isso indica que apesar de possuir metodologia mais trabalhosa, o protocolo 2 é mais eficiente na duplicação de haploides e obtenção de linhagens duplo-haploides.

Os híbridos utilizados não apresentaram diferenças significativas quanto à duplicação de haploides, variando de 44,70% no híbrido DKB 393 a 56,33% no híbrido GNS 3225 (Tabela 9).

Tabela 9 Porcentagens médias ajustadas de haploides duplicados, analisados em citometria de fluxo, dos quatro híbridos cruzados com a linhagem KEMS

Híbridos	Média
GNS 3032	50,96 a
GNS 3225	56,33 a
GNS 3264	50,09 a
DKB 393	44,70 a

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

Battistelli (2012) ao avaliar a taxa de duplo-haploides obtidos pelo total de haploides detectados em citometria de fluxo obteve diferenças significativas entre as gerações F1 e F2 dos híbridos 30F53, L3/DENT e GNS 2004 cruzados com a linhagem KEMS. As taxas de duplicação dos híbridos avaliados pelo autor variaram de 59,1% a 80%, sendo maiores que as observadas neste trabalho. Nos híbridos 30F53 e GNS 2004, por exemplo, as taxas de duplicação foram maiores na geração F1, enquanto no híbrido L3/DENT, foi observada uma taxa maior de duplicação na geração F2. Esses resultados obtidos pelo autor indicam a influência do genótipo sobre a taxa de duplicação.

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

### 3.4 Porcentagens de plantas duplicadas autofecundadas

A eficiência da duplicação cromossômica pode ser confirmada no campo por meio de análises relacionadas à porcentagem de plantas autofecundadas e principalmente à quantidade de sementes produzidas. O que as empresas buscam em seus programas de melhoramento é a obtenção das sementes duplo-haploides. Dessa forma, foram verificadas as quantidades de sementes colhidas em cada protocolo e a quantidade de sementes duplo-haploides.

Pela análise de “deviance” houve diferenças significativas em relação ao total de plantas duplicadas que foram autofecundadas para híbridos e protocolos (Tabela 10).

Tabela 10 Resumo da análise de “deviance” do total de plantas duplicadas que foram autofecundadas no campo

FV	GL	“DEVIANCE”
Híbridos	3	13,30*
Geração	1	0,3903
Protocolo	1	53,43*
Prot:Hibr	3	4,83

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

Para o protocolo 2, observou-se média de 65,19% do total de plantas autofecundadas, enquanto no protocolo 1, obteve-se média de 30,89%. É possível verificar que a eficiência da duplicação vai muito além da resposta dos híbridos à colchicina, como também das análises realizadas pela citometria de fluxo. Para o protocolo 1, com média de 51,32% em relação as plantas duplicadas, analisadas em citometria de fluxo, verifica-se no campo média de apenas 30,89% de plantas autofecundadas. Assim como Battistelli (2012) é importante

ênfatizar que os resultados de duplicação cromossômica, pela técnica de citometria de fluxo, são avaliados apenas nas células somáticas das folhas. Desse modo, uma planta detectada como duplicada na citometria de fluxo, não irá obrigatoriamente produzir pólen fértil e sementes. No campo foi observado menor vigor e atraso no desenvolvimento de plantas haploides duplicadas, quando comparados com as plantas que não foram duplicadas (Figura 4).



Figura 4 Atraso de desenvolvimento de planta duplo-haploide. A seta indica o indivíduo duplo-haploide. O retângulo evidencia o desenvolvimento de pendão de um indivíduo diploide

Pelo teste de “deviance” foram observadas diferenças significativas quanto aos híbridos utilizados. No entanto, no agrupamento com base na distância de *Mahalanobis*, os híbridos não se diferiram quanto às suas médias (Tabela 11). Apesar disso, há uma diferença considerável entre o híbrido GNS 3225, cuja média foi de 32,16% e o híbrido GNS 3264 cuja média foi de 16,06%.

Tabela 11 Porcentagens médias ajustadas do total de plantas que foram autofecundadas no campo

Híbridos	Média
GNS 3032	30,89 a
GNS 3225	32,16 a
GNS 3264	16,06 a
DKB 393	23,04 a

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

Esses valores, mesmo pertencendo ao mesmo agrupamento, com base na distância de *Mahalanobis*, apresentaram diferenças práticas, na condução do experimento em campo. Plantas do híbrido GNS 3264, por exemplo, apresentaram menor vigor e desenvolvimento, como também atraso na formação de pendão e liberação do estilo-estigma, quando comparado com os outros híbridos.

Eder e Chalyk (2002), ao compararem os protocolos de duplicação propostos por Deimling, Rober e Geiger (1997) e Zabirova et al. (1996), obtiveram 39% e 30,5% de plantas haploides que foram autofecundadas. Dessas plantas autofecundadas, 27,3% dos haploides produziram sementes quando submetidos ao protocolo de Deimling, Rober e Geiger (1997) e 11,9% das plantas apresentaram atrasos na formação de estilo-estigma, não possibilitando a autofecundação.

Para realizar a autofecundação de plantas com pólen fértil foram feitos cortes nas espigas que ainda possuíam o estilo-estigma protegidos dentro das bonecas. O corte das espigas possibilitou a emissão de estilo-estigmas e a autofecundação das plantas. É importante enfatizar que a maioria das plantas que produziu muito pólen não possuía estilo-estigma receptivo, ou apresentavam desenvolvimento tardio de espigas. É importante salientar que isso foi verificado principalmente no protocolo 1.

As análises em citometria de fluxo permitiram que fosse realizado o rastreamento das plantas haploides duplicadas no campo, e assim foi possível analisar quais tiveram pendões férteis e foram autofecundadas. Pela análise de “deviance” observa-se diferenças significativas entre as gerações dos híbridos utilizados (Tabela 12).

Tabela 12 Resumo da análise de “deviance” do total de haploides duplicados que foram autofecundados no campo

FV	GL	“DEVIANCE”
Híbridos	3	6,68
Geração	1	4,39*
Protocolo	1	2,97
Prot:Hibr	3	3,96

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

As médias ajustadas obtidas pela análise de “deviance” da taxa de duplo-haploides autofecundados foram de 16,04% na geração F1 e 9,72% na geração F2.

Das plantas que estavam no campo, foi observado que plantas haploides, não duplicadas, detectadas pela citometria de fluxo, produziram pólen e foram autofecundadas. Do total de plantas no campo, considerando os quatro híbridos avaliados neste trabalho os haploides que produziram pólen corresponderam a

3,91%, considerando os dois protocolos. Foi verificado que no protocolo 1 foram autofecundadas mais plantas haploides que no protocolo 2. Entretanto, da porcentagem total de haploides autofecundados, foram colhidas duas espigas no protocolo 2 enquanto no protocolo 1 não foram colhidas sementes. Battistelli (2012) observou 10% de plantas haploides com pólen férteis. Algumas possibilidades podem explicar esse fato, tais como o tecido da planta do qual foi retirada a amostra para a realização da análise de citometria de fluxo que apresentava apenas células haploides, porém, as células precursoras dos gametas foram duplicadas ou, então, são plantas haploides macho-férteis (CHASE, 1974; GEIGER; SCHÖNLEBEN, 2011).

Geiger e Schönleben (2011), avaliando plantas haploides de diferentes fontes de germoplasma, constataram a ocorrência de várias plantas produzindo pólen viável. Dessa forma, concluíram que, a longo prazo, os melhoristas poderão aperfeiçoar a capacidade de plantas haploides de produzirem pendões férteis, permitindo eliminar o processo de duplicação artificial de cromossomos utilizando colchicina.

### **3.5 Quantidades de sementes obtidas de plantas duplicadas**

Como dito anteriormente, a etapa de autofecundação das plantas duplicadas, e posteriormente, a quantidade de sementes colhidas, são importantes em experimentos que visam obtenção de duplo-haploides. Assim, análises das quantidades de sementes colhidas são necessárias.

No resumo da análise de “deviance” da quantidade de sementes colhidas de plantas duplicadas autofecundadas, não foram observadas diferenças significativas entre as fontes de variação avaliadas (Tabela 13).

Tabela 13 Resumo da análise de “deviance” da quantidade de sementes colhidas de plantas duplicadas autofecundadas

FV	GL	DEVIANCE
Híbridos	3	0,05
Geração	1	2,31
Protocolo	1	0,94
Prot:Hibr	3	1,37

Mesmo sem diferenças significativas, as porcentagens médias das quantidades de sementes colhidas de plantas duplicadas autofecundadas, variaram de 50,47% no híbrido GNS 3032 a 60,30% no híbrido GNS 3264 (Tabela 14).

Tabela 14 Porcentagens médias ajustadas das quantidades de sementes colhidas de plantas duplicadas autofecundadas

Híbridos	Média
GNS 3032	50,47 a
GNS 3225	59,29 a
GNS 3264	60,30 a
DKB 393	60,02 a

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

Neste trabalho, todas as sementes produzidas foram colhidas, independente das espigas serem provenientes de plantas confirmadas como diploides ou diploides duplicados na citometria de fluxo. Por meio dessas sementes, que inicialmente não são de interesse neste trabalho, será possível verificar em etapas posteriores à eficiência dos protocolos de duplicação cromossômica testados. A eficiência será analisada através do desenvolvimento dessas plantas e verificação de anormalidades.

As quantidades de espigas colhidas neste experimento podem ser visualizadas na Tabela 15. É possível perceber que no protocolo 2 foram colhidas mais sementes que no protocolo 1. Esse dado já era esperado, uma vez que nas análises estatísticas de autofecundação de plantas duplicadas, apresentadas anteriormente, o protocolo 2 foi superior ao protocolo 1.

Tabela 15 Quantidades de espigas colhidas no campo, após autofecundação das plantas duplicadas

Híbridos	Quantidades de espigas colhidas	
	Protocolo 1	Protocolo 2
GNS 3225	4	21
GNS 3032	4	14
GNS 3264	3	18
DKB 393	7	11
Total	18	64

É interessante notar como a tecnologia duplo-haploide, apesar de vantajosa, oferece um saldo final de sementes colhidas bem menores que a quantidade de sementes que foram usadas no início deste trabalho. Do cruzamento dos quatro híbridos com a linhagem KEMS, foram colhidas 15314 sementes das quais apenas 1086 foram selecionadas pelo marcador R-navajo. Desse total de sementes selecionadas que foram duplicadas, apenas 537 sobreviveram no campo, e então, na etapa final, foram colhidas 82 espigas.

As quantidades de espigas colhidas, apresentadas na tabela 15 são provenientes de plantas duplicadas de ploidias variadas. Assim, como o objetivo principal da tecnologia duplo-haploide e obter sementes duplo-haploides, foram analisadas as quantidades de espigas de plantas duplo-haploides colhidas. Do total de 82 espigas colhidas, 25 são de linhagens duplo-haploides (Tabela 16). O protocolo 2, mais uma vez, foi superior ao protocolo 1 nessa análise,

apresentando maior número de espigas duplo-haploides colhidas. Os híbridos variaram nas quantidades de espigas colhidas.

Tabela 16 Quantidades de espigas colhidas de plantas duplo-haploides, submetidas anteriormente a dois protocolos de duplicação

Híbridos	Quantidades de espigas de duplo-haploides	
	Protocolo 1	Protocolo 2
GNS 3225	1	6
GNS 3032	2	5
GNS 3264	1	2
DKB 393	6	2
Total	10	15

São escassas informações a cerca da quantidade de sementes colhidas em experimentos envolvendo a tecnologia duplo-haploides, e as empresas privadas optam por não publicar essas informações. As linhagens obtidas serão utilizadas em experimentos posteriores para serem avaliadas e estudadas quanto ao desenvolvimento e vigor.

#### 4 CONCLUSÕES

A linhagem indutora de haploidia KEMS pode induzir haploides em clima tropical.

Há influência dos híbridos na taxa de indução de haploides, entretanto não há influência na taxa de duplicação cromossômica dos protocolos testados.

Outros marcadores além do sistema do R-navajo devem ser utilizados na seleção de sementes haploides, uma vez que houve taxa de 5,65% de erro do marcador, quando se considera os haploides detectados na citometria de fluxo.

O protocolo 2 foi mais eficiente na duplicação cromossômica de haploides, na porcentagem de plantas duplicadas que foram autofecundadas, e na obtenção de linhagens duplo-haploides.

Os haploides duplicados formaram pólenes viáveis e sementes.

## REFERÊNCIAS

- BATES, D.; MAECHLER, M.; BOLKER, B. **Lme4**: linear mixed-effects models using S4 classes. Version 0.999375-42. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=lme4>>. Acesso em: 21 jun. 2013.
- BATTISTELLI, G. M. **Estratégias para obtenção e identificação de duplo-haploides em milho tropical**. 2012. 61p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BELICUAS, P. R., GUIMARÃES, C. T., PAIVA, L. V., DUARTE, J. M., MALUF, W. R., PAIVA, E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 156, n. 1/2, p. 95-102, July 2007.
- BERNARDO, R. Should maize doubled haploids be induced among F1 or F2 plants? **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 119, n.2, p. 255–262, Apr. 2009.
- CASTILLO, A. M., CISTUÉ, L., VALLÉS, M. P., SORIANO, M. Chromosome doubling in monocots. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer Science, 2009. p. 329-338.
- CHALYK, S. T. Creating new haploid-inducing lines of maize. **Maize Genetics Cooperation**, Urbana, v. 73, p. 53-54, 1999.
- CHALYK, S. T. Obtaining fertile pollen in maize maternal haploids. **Maize Genetics Cooperation**, Urbana, v. 74, n. 1, p. 17-18, 2000.

- CHASE, S. S.; NANDA, D. K. Comparison of variability in inbred lines and monoploid-derived lines of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 5, n. 4, p. 275-276, Sept./Oct. 1965.
- CHASE, S. S. Utilization of haploids in plant breeding: breeding diploid species. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HAPLOIDS IN HIGHER PLANTS, 1., 1974, Ontario. **Proceedings...** Ontario: University of Guelph, 1974. p. 211-230.
- CORDEIRO, G. M.; DEMÉTRIO, C. G. B. **Modelos lineares generalizados**. Santa Maria: UFSM, 2007. v. 1, 165 p.
- COUTO, E. G. O., DAVIDE, L. M. C., BUSTAMANTE, F.O., VON PINHO, R. G., SILVA, T. N. 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.
- DANG, N. C. MUNSCH, M., AULINGER, I., RENLAI, W., STAMP, P. Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 183, n. 2, p. 153-160, Jan. 2012.
- DEIMLING, S.; ROBER, F.; GEIGER, H. H. "Methodik und genetik der in-vivo-Haploideninduktion bei mais." **Vorträge für Pflanzenzüchtung**, Quedlinburg, v. 38, p. 203-224, 1997.
- EDER, J.; CHALYK, S. In vivo haploid induction in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 4, p. 703-708, Feb. 2002.
- GAYEN, P., MADAN, J. K., KUMAR, R., SARKAR, K. R. Chromosome doubling in haploids through colchicine. **Maize Genetics Cooperation NewsLetter**, Columbia, v. 68, p. 66, 1994.
- GEIGER, H. H.; SCHÖNLEBEN, M. Incidence of male fertility in haploid elite dent maize germplasm. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v. 85, n. 22, p. 1-10, 2011.

KEBED, A. Z., DHILLON, B. S., SCHIPPRACK, W., ARAUS, J. L., BANZIGER, M., SEMAGN, K., ALVARADO, G., MELCHINGER, A. E. . Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 180, n. 1, p. 219–226, Feb. 2011.

LI, H., SINGH, R. P., BRAUN, H-J., PFEIFFER, W. H., WANG, J. Doubled haploids versus conventional breeding in CIMMYT wheat breeding programs. **Crop Science**, Madison, v. 53, n. 1, p. 74- 83, Jan. 2013.

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

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

PIERRE, P. M.O., DAVIDE, L. M. C., COUTO, E. G. O., SILVA, T. N., RAMANHO, M. A. P., SANTOS, J. B. 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.

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

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

PRIGGE, V., SÁNCHEZ, C.; DHILLON, B. S.; SCHIPPRACK, W.; ARAUS, J. L.; BANZIGER, M.; MELCHINGER, E. A. Doubled haploids in tropical

maize: effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 1, p. 1498-1506, July/Aug. 2011.  
RÖBER, F. K.; GORDILLO, G. A.; GEIGER, H. H. In vivo haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. **Maydica**, Bergamo, v. 50, n. 3/4, p. 275-283, Feb. 2005.

ROTARENCO, V. A.; DICU, G.; SARMANIUC, M. Induction of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 83, 2009. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/83/46rotarenco.htm>>. Acesso em: 22 mar. 2013.

ROTARENCO, V. A., DICU, G., STATE, D., FUIA, S. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 84, 2010. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/84/PDF/15rotarenco.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

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

VANOUS, A. E. **Optimization of doubled haploid production in maize (*Zea mays* L.)**. 2011. 115 p. Dissertation (Master of Science) - Iowa State University, Iowa, 2011.

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

### **CAPÍTULO 3**

**Identificação e caracterização de haploides duplicados por meio das técnicas de citometria de fluxo, marcadores moleculares SSR e viabilidade polínica**

## RESUMO

A tecnologia duplo-haploides tem sido utilizada por diversas empresas, entretanto, as informações a cerca das metodologias de duplicação cromossômica e principalmente informações a respeito de técnicas que confirmem a duplicação das células não são detalhadas. Assim, objetivou-se neste trabalho identificar e caracterizar haploides duplicados por meio das técnicas de citometria de fluxo, marcadores moleculares microssatélites e viabilidade polínica. Foram realizados cruzamentos entre os híbridos (GNS 3225, GNS 3032, GNS 3264 e DKB 393) e a linhagem indutora KEMS, utilizada como doadora de pólen. As sementes que possuíam embrião branco e escutelo arroxeadado, consideradas como haploides, foram selecionadas e submetidas a dois protocolos de duplicação cromossômica. Após 14 dias da etapa de duplicação, amostras das plantas foram coletadas para serem analisadas em citometria de fluxo. Posteriormente, as plantas foram transplantadas para o campo, e então, foram coletadas amostras de folhas para análises de DNA utilizando marcadores microssatélites. Para as análises de viabilidade polínica, os pendões foram coletados na antese. Foi observado que os protocolos de duplicação cromossômica interferem na sobrevivência das plantas. Por meio de citometria de fluxo foram detectadas sete diferentes ploidias: haploides, haploides/diploides, haploides/tetraploides, haploides/octoploides, diploides, diploides/tetraploides e diploides/octoploides. Desse modo, a citometria de fluxo pode ser utilizada para se obter mais informações nas pesquisas, uma vez que permitiu que haploides duplicados fossem identificados. Os marcadores microssatélites foram eficientes na confirmação da herança gimnogenética da linhagem KEMS, como também na identificação das plantas duplo-haploides. A viabilidade polínica é uma técnica complementar à citometria de fluxo, que permite analisar pólenes viáveis.

Palavras-chave: Duplo-haploides. *Zea Mays*. Duplicação cromossômica. Citometria de fluxo.

### ABSTRACT

The double haploid technology has been used by many companies, however the information about the methods of chromosome doubling and especially the information regarding techniques to confirm the duplication of cells are not detailed. Thus, the aim of this study was to identify and characterize haploid duplicated by the techniques of flow cytometry, microsatellite markers and pollen viability. Crosses between hybrids (GNS 3225, GNS 3032, GNS 3264 DKB and 393) and the inducer line KEMS used as pollen donor were performed. The seeds with white embryo and pericarp purplish, considered haploid, were selected and were subjected to two protocols of chromosome doubling. After 14 days of the duplication, samples of the plants were collected for analysis in flow cytometry. Subsequently, the plants were transplanted to the field, and then collected leaf samples for DNA analysis through by microsatellite markers. For the analysis of pollen viability, the tassels were collected at anthesis. It was observed that the protocols of chromosome doubling interfere in the plant survival. By means of flow cytometry was detected seven different Ploidies: haploid, haploid / diploid, haploid / tetraploid, haploid / octoploides, diploid, diploid / tetraploid and diploid / octoploides. Thereby flow cytometry can be used to obtain more information on research as it allowed duplicated haploids to be identified. Microsatellite markers were efficient in confirming the inheritance of KEMS lineage, as well as the identification of double-haploid plants. Pollen viability is a complementary technique to flow cytometry, which allows analyzing pollen viable.

Keywords: Double-haploids. *Zea Mays*. Chromosome doubling. Flow citometry.

## 1 INTRODUÇÃO

O sucesso de um programa de melhoramento na produção de híbridos comerciais de milho envolve a obtenção de linhagens endogâmicas. Para obter milho híbrido é necessário inicialmente o cruzamento de duas ou mais linhagens homozigotas. Com essa finalidade, várias tecnologias de obtenção de linhagens elites têm sido empregadas, tais como autofecundações sucessivas, seleção recorrente, retrocruzamento e mais recentemente, a tecnologia de haploides duplicados, ou duplo-haploides.

Na obtenção de linhagens duplo-haploides em milho é necessária inicialmente a obtenção de sementes haploides. Essas sementes são induzidas por linhagens indutoras de haploidia (COE, 1959; KERMICLE, 1973; RÖBER; GORDILLO; GEIGER, 2005; ROTARENCO et al., 2010).

Vários autores têm utilizado a duplicação cromossômica em sementes haploides de milho, tendo obtido porcentagens variáveis de sementes duplicadas (CHALYK 2000; DEIMLING; ROBER; GEIGER, 1997; GAYEN et al., 1994; ZABIROVA et al., 1996). No entanto, informações seguras a respeito de técnicas laboratoriais que confirmem e identifiquem a duplicação cromossômica são ainda escassas. Na tecnologia dos duplo-haploides a citometria de fluxo é uma metodologia que tem se destacado devido à facilidade e rapidez na preparação das amostras e obtenção dos resultados (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

Pelo fato de avaliar o conteúdo de DNA e conseqüentemente, o nível de ploidia, a técnica possibilita análises de indução de haploides, como também de duplicação cromossômica (COUTO et al., 2013; DANG et al., 2012).

Outra ferramenta utilizada na identificação de haploides e duplo-haploides são os marcadores moleculares microssatélites. Por possuírem a

característica de codominância e estabilidade, possibilitam a separação dos indivíduos homocigotos dos heterocigotos, possibilitando estudos de herança genética e introgressão de genes (BELICUAS et al., 2007; COUTO et al., 2013; LI et al., 2009).

Estudos de viabilidade polínica também são importantes em pesquisas que envolvem haploides duplicados, uma vez que após a duplicação cromossômica são realizadas autofecundações em campo.

Considerando o exposto, objetivou-se neste trabalho identificar e caracterizar haploides duplicados por meio das técnicas de citometria de fluxo, marcadores moleculares microssatélites e viabilidade polínica.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Germoplasmas avaliados**

Os experimentos foram realizados no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, MG. Quatro híbridos (DKB393, GNS 3225, GNS 364, GNS 3032) foram cruzados com o indutor de haploidia KEMS (SHATSKAYA et al., 1994). A linhagem indutora KEMS, que carrega alelos do sistema R-navajo (R1-nj), foi utilizada como doadora de pólen. As sementes que possuíam embrião branco e endosperma roxo foram selecionadas e classificadas como prováveis haploides (CHASE; NANDA, 1965).

### **2.2 Duplicação cromossômica**

As sementes cujo embrião era branco e o endosperma era roxo foram submetidas a dois diferentes protocolos de duplicação cromossômica. No primeiro protocolo, proposto por Prasanna, Chaikam e Mahuku (2012), as plântulas foram submetidas à solução com 0,04% de colchicina e 0,5% de DMSO, por 12 horas, no escuro, a 20°C. No segundo protocolo, raízes foram imersas em solução de colchicina 0,1%, dimetilsulfóxido 0,1% (DMSO) e Tween 20 a 0,1%, e mantidas por 6 horas em presença de luz em temperatura ambiente, média de 22°C, de acordo com Paul Newell (dados não publicados). Após o tratamento com colchicina, as plântulas provenientes de ambos os protocolos de duplicação foram transferidas para a casa de vegetação e permaneceram em ambiente controlado por 20 dias.

Os protocolos utilizados neste trabalho serão posteriormente designados de protocolo 1, para o primeiro testado e protocolo 2, para o segundo.

### **2.3 Sobrevivência de plantas**

As porcentagens de plantas sobreviventes após as etapas de duplicação e casa de vegetação foram calculadas e apresentadas aqui como uma observação. As porcentagens foram calculadas para os dois protocolos. Após a etapa de duplicação cromossômica foi verificada a morte de algumas plantas em casa de vegetação. Após a etapa de casa de vegetação, as plantas foram transplantadas para ambiente protegido, com cobertura de lona plástica transparente nas dependências da empresa HortiAgro, localizada no município de Ijaci, MG. No campo, após 15 dias, verificou-se que muitas plantas não resistiram à modificação do ambiente, e morreram.

### **2.4 Citometria de fluxo**

As plântulas submetidas aos protocolos de duplicação cromossômica foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo 14 dias após o tratamento com colchicina.

A estimativa da quantidade de DNA foi obtida a partir de tecido foliar dos genitores e dos descendentes provenientes desse cruzamento, que sobreviveram à duplicação cromossômica. Assim, todas as plantas que sobreviveram à duplicação cromossômica de ambos os protocolos, foram analisadas, a fim de avaliar e identificar as ploidias provenientes das duplicações.

Para cada amostra, utilizou-se, aproximadamente, 20-30 mg de folhas jovens do indivíduo avaliado. A espécie *Vicia faba* (quantidade de DNA de 26,9 pg/2C) foi utilizada como padrão externo de referência. As amostras foram

trituras em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a obtenção da suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997), a qual foram adicionados 2,5µL de RNase e corada com 25 µL de iodeto de propídeo (1 mg mL<sup>-1</sup>). Para cada amostra foram analisados no mínimo 10 mil núcleos. Os histogramas foram obtidos no citômetro de fluxo *FacsCalibur* (*Becton Dickinson*) com o programa *Cell Quest* (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) e analisados pelos softwares WinMDI 2.8 (2009).

## 2.5 Marcadores Microsatélites

Após aclimação em casa de vegetação, pós-duplicação cromossômica e após análises em citometria de fluxo, as plantas oriundas de ambos os protocolos de duplicação cromossômica foram transplantadas para ambiente protegido, com cobertura de lona plástica transparente nas dependências da empresa HortiAgro, localizada no município de Ijaci, MG. Todas as plantas foram identificadas para que houvesse o rastreamento dos indivíduos por meio dos resultados obtidos anteriormente na técnica de citometria de fluxo.

Para as análises utilizando-se de SSR foram coletadas amostras foliares de indivíduos haploides, duplo-haploides e diploides no campo, como também amostras dos genitores (a linhagem indutora KEMS e dos quatro híbridos - DKB393, GNS3225, GNS364 e GNS3032). A extração foi realizada de acordo com Doyle e Doyle (1997). Após o precipitado ser secado, foi diluído com 50µL de água ultrapura com 2 µL de RNase (10mg mL<sup>-1</sup>), mantendo-se a temperatura de 37 °C por 1 hora. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro GE Nanovue.

Para este estudo, foram utilizados 80 pares de *primer* SSR aleatórios já utilizados em trabalhos com a cultura do milho. Para a revelação dos géis utilizou-se o método de coloração com nitrato de prata. Após a verificação do

polimorfismo nos genitores, dois *primers* considerados polimórficos (BNLG238 e 1233) foram usados para detectar os haploides gimnogenéticos e caracterizar os duplo-haploides detectados na citometria de fluxo.

As reações de PCR consistiram de 20 ng de DNA, 0,5  $\mu\text{M}$  de cada *primer*, 100  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,6), 50 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  e 1 U da enzima Taq polimerase, em um volume total de 25  $\mu\text{L}$ . As ampliações utilizadas foram realizadas de acordo com a programação: uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida por dez ciclos a 94 °C por 20 segundos, 65 °C por 30 segundos e 72 °C por 20 segundos, com a redução da temperatura de anelamento a 1 °C a cada ciclo até atingir 56 °C, seguidos por mais 20 ciclos com a temperatura de anelamento a 56 °C e uma etapa final a 72 °C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de acrilamida 10% por eletroforese a 110 V por 90 minutos.

## 2.6 Análise de viabilidade polínica

No campo, foram coletadas amostras para análise de viabilidade polínica. A viabilidade polínica foi realizada para verificar a fertilidade dos grãos de pólen das ploidias haploides, haploides duplicados ou duplo-haploides, diploides e diploides duplicados ou tetraploides, detectados anteriormente pela técnica de citometria de fluxo. É importante ressaltar que apenas o protocolo 1 foi avaliado nessa análise.

A coleta dos grãos de pólen foi realizada durante a antese, às 9 horas da manhã. Ainda no campo, os grãos de pólen foram fixados em solução *Carnoy* (3 partes de álcool etílico 99% : 1 parte de ácido acético glacial) e mantidos a uma temperatura de -20 °C, até a confecção das lâminas.

A análise da viabilidade dos grãos de pólen foi estimada pela coloração dos mesmos por dois testes colorimétricos, usando o corante carmim propiônico e Alexander. Ao utilizar o carmim propiônico foram considerados viáveis os grãos de pólen que apresentaram coloração vermelha e inviáveis aqueles que não apresentaram coloração. O corante de Alexander, à base de verde malaquita e fucsina ácida, cora de verde os grãos de pólen inviáveis (grãos abortados) e de vermelho, os viáveis (grãos não abortados).

Foram avaliadas 10 lâminas por ploidia e 100 grãos de pólen por lâmina, em cada corante utilizado. As fotomicrografias dos grãos de pólen foram feitas em microscópio Nikon por meio de captura de imagens com câmera FDX 35 ligada a um microcomputador.

Com os dados de viabilidade polínica foi realizada análise de variância seguida de teste de Scott e Knott ( $p < 0,05$ ), com duas abordagens: considerando as variações entre genótipos e entre corantes dentro dos genótipos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Sobrevivência de plantas após duplicação cromossômica

As porcentagens de sobrevivência das plantas após a duplicação cromossômica estão representadas na Tabela 1.

O híbrido DKB 393 apresentou a maior porcentagem de sobrevivência entre os quatro híbridos, tanto no primeiro protocolo como no segundo. As menores porcentagens de sobrevivência foram observadas para o híbrido GNS3264.

Considerando todas as sementes dos quatro híbridos submetidos aos dois protocolos, observou-se uma média de 85,5% de sobrevivência de plantas após a etapa de duplicação cromossômica. Esse valor é superior ao encontrado por Battistelli (2012), que obteve 62% de sobrevivência de plantas e também ao encontrado por Dang et al. (2012), que obtiverem 65,7% de sobrevivência quando utilizaram haploides duplicados de milho ceroso e opaco.

Tabela 1 Porcentagens de sobrevivência de plantas submetidas à duplicação cromossômica artificial

Sobrevivência de plantas após duplicação (%)		
Híbridos	Protocolo 1	Protocolo 2
GNS3225	86,5	84,9
GNS3264	82,6	84,8
GNS3032	82,8	85,1
DKB393	92,0	85,3
Média Total		85,5

No campo, as maiores porcentagens de sobrevivência foram observadas no híbrido DKB 393, no protocolo 1, e no híbrido GNS 3032 no protocolo 2

(Tabela 2). Observa-se que, no geral, para o protocolo 1, foram observadas as maiores porcentagens de sobrevivência de plantas no campo que as observadas no protocolo 2. A média geral de porcentagem de sobrevivência no campo foi de 72,1%, sendo menor que a observada para a porcentagem de sobrevivência após duplicação cromossômica. As plantas que não sobreviveram no campo, não suportaram as diferenças entre os ambientes, quando foram transplantadas, já que antes estavam em casa de vegetação. Além disso, a colchicina influencia a sobrevivência das plantas, sendo que plantas menos adaptadas, morrem nas etapas do processo de duplicação e obtenção de linhagens duplo-haploides.

Tabela 2 Porcentagens de sobrevivência de plantas no campo após duplicação cromossômica artificial

Sobrevivência de plantas no campo após duplicação		
Híbridos	Protocolo 1	Protocolo 2
GNS3225	79,8	66,9
GNS3264	76	57,1
GNS3032	75	74,3
DKB393	86,6	60,9
Média		72,1

As plantas que sobreviveram à duplicação cromossômica apresentaram crescimento retardado nos primeiros dias após a duplicação. Além disso, era notável a atuação da colchicina, pois as plantas que responderam ao antimitótico apresentaram folhas retorcidas e algumas folhas mais claras (Figura 1).



Figura 1 Folhas retorcidas após duplicação cromossômica, evidenciando atuação da colchicina

Dang et al. (2012) observaram as mesmas características nas plantas que sobreviveram à duplicação cromossômica. Os autores verificaram plantas anãs entre as sobreviventes, como também crescimento retardado no primeiro estágio de desenvolvimento e folhas retorcidas.

No campo as plantas de milho submetidas aos protocolos de duplicação cromossômica não apresentaram desenvolvimento sincronizado. Os indivíduos haploides, identificados pela técnica de citometria de fluxo, apresentaram crescimento lento e desenvolvimento atrasado quando comparado com os outros indivíduos. No entanto, muitas plantas diploides apresentaram tamanho e desenvolvimento semelhantes aos indivíduos haploides.

Além disso, foram observadas anormalidades em algumas plantas, tais como desenvolvimento de estilo-estigma no pendão (Figura 2) e até mesmo mutação, tal como manchas amarelas em todas as folhas da planta. Essas

manchas foram observadas em apenas duas plantas, de todas aquelas que foram submetidas aos protocolos de duplicação. Estas características que surgem devido a atuação da colchicina nas plantas permitem que seja realizada uma seleção visual no campo, descartando as anormais dos experimentos. Esta seleção facilitada indica ao pesquisador quais plantas devem ser autofecundadas, e ainda, quais poderão formar sementes.



Figura 2 Formação de estilo-estigma no pendão

Esses resultados corroboram com os obtidos por outros autores. Couto et al. (2012) observaram que plantas haploides, detectadas em citometria de fluxo, apresentaram porte pequeno, folhas frágeis e quebradiças no campo, além de disposição diferente das folhas, quando comparados com as plantas diploides. Battistelli (2012) observou que plantas haploides e haploides/diploides possuíam menor vigor e ausência de pigmentação de antocianina no campo. Diferenças no vigor das plantas também foram relatadas por Rotarenco (2000), que constatou

que plantas haploides têm menor vigor, quando comparadas com plantas diploides.

### 3.2 Citometria de fluxo na identificação e caracterização de plantas duplicadas

Por meio das análises realizadas pela técnica de citometria de fluxo foi possível verificar no primeiro protocolo plantas haploide, haploide/diploide, diploide e diploide/tetraploide e diploide/octoploide. Já no segundo protocolo, foram verificadas plantas haploide, haploide/diploide, haploide/tetraploide, haploide/octoploide, diploide, diploide/tetraploide, diploide/octoploide (Tabela 3 e Figura 3). Os histogramas característicos de haploides e diploides correspondem às plantas que não foram duplicadas. As plantas que apresentaram mais de uma ploidia nos histogramas (mais de um pico G1) são aquelas que foram duplicadas pela colchicina. Os duplo-haploides obtidos são aquelas plantas que apresentaram ploídias do tipo haploide/diploide.

Tabela 3 Ploidias detectadas nas plantas submetidas aos dois protocolos de duplicação cromossômica e porcentagens de plantas

Ploidias detectadas	Porcentagens de plantas	
	Protocolo 1	Protocolo 2
Haploides	33,64	12,06
Haploides/Diploides	41,97	20,63
Haploides/Tetraploides	0	5,39
Haploides/Octoploides	0	1,58
Diploides	10,49	13,65
Diploides/Tetraploides	13,58	6,66
Diploides/Octoploides	0,3	8,57

No protocolo 2 observa-se que foram detectadas ploidias que não foram observadas no protocolo 1. Na Tabela 3 é possível verificar que ambos os protocolos foram eficientes na duplicação cromossômica, porém, com o protocolo 1 foram obtidas 41,97% de plantas duplo-haploides (haploide/diploide), enquanto no protocolo 2 foram obtidos apenas 20,63%. É importante discutir aqui as porcentagens de plantas haploides e duplo-haploides nos protocolos 1 e 2. O maior valor observado de haploides e duplo-haploides no protocolo 1 é devido principalmente à amostragem das sementes selecionadas inicialmente por meio do marcador R-navajo. Como as sementes foram divididas para serem submetidas aos protocolos de duplicação cromossômica, e essa divisão é apenas visual, o protocolo 1 apresentou mais sementes haploides que o protocolo 2, apresentando dessa forma maior porcentagem de plantas haploides e duplo-haploides. Todas as ploidias detectadas, em ambos os protocolos, foram caracterizadas por meio da comparação, nos histogramas, dos picos das plantas duplicadas com os picos dos híbridos genitores, diploides, (GNS 3032, GNS 3225, GNS 3264 e DKB 393) que não foram duplicados, e também pelo pico do padrão externo utilizado, *Vicia faba* (Figura 3A).

A técnica de citometria de fluxo tem sido utilizada em diversas pesquisas com indução de haploides, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, como também em experimentos envolvendo duplicação cromossômica artificial. Couto et al. (2012) identificaram haploides androgenéticos por meio de citômetro de fluxo. Por meio do cruzamento da linhagem W23 e o híbrido P30F90, os autores selecionaram 397 sementes haploides por meio do marcador R-navajo, e detectaram apenas quatro plantas haploides. Os histogramas desses indivíduos haploides possuíam apenas um pico G1 seguido do pico G2, conforme detectado neste trabalho (Figura 3B). Battistelli (2012) utilizou a citometria de fluxo para detectar haploides duplicados pelo protocolo de Deimling, Rober e Geiger (1997), e detectou níveis de ploidias tais como haploides, haploides/diploides,

diploides e diploides/tetraploides. Neste trabalho os protocolos de duplicação cromossômica utilizados interferiram mais nos níveis de ploidia das células que o protocolo proposto por Deimling, Rober e Geiger (1997).

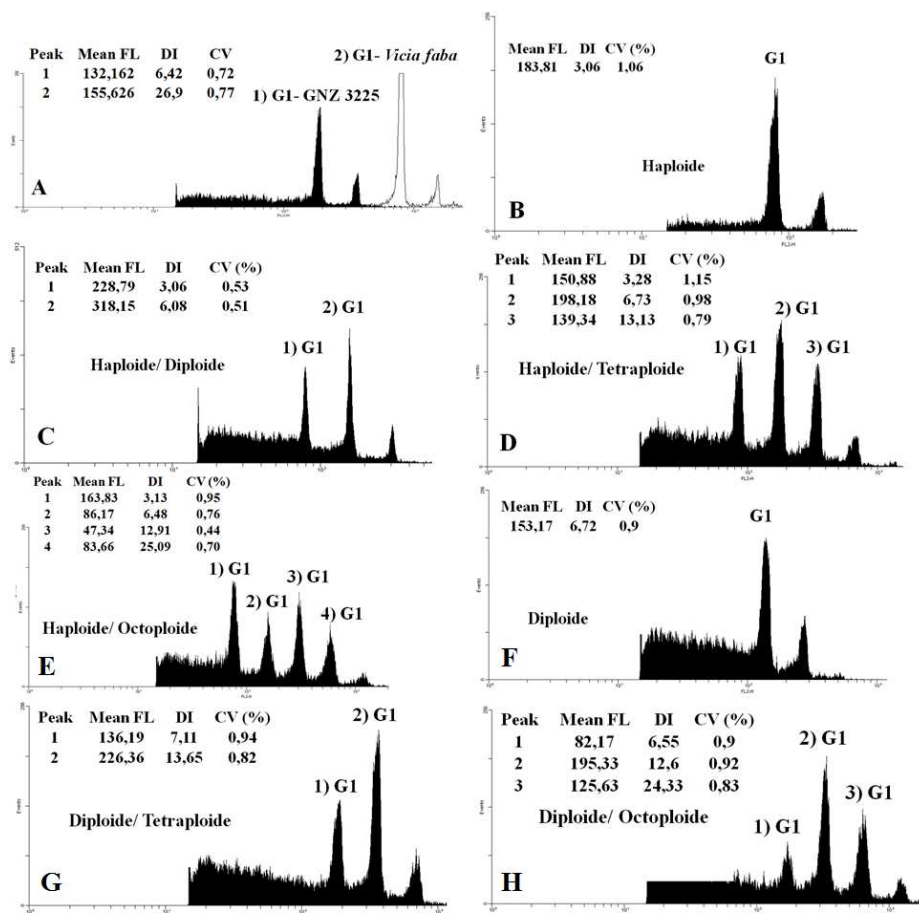


Figura 3 Histogramas das ploidias detectadas em citometria de fluxo em plantas de milho submetidas aos protocolos de duplicação cromossômica. A) Histograma do genitor GNS 3225 com o padrão externo *Vicia faba*. B) Planta haploide não duplicada. C) Planta haploide/diploide. D) Planta haploide/tetraploide. E) Planta haploide/octoploide. F) Planta diploide não duplicada. G) Planta

diploide/tetraploide. H) Planta diploide/octoploide. Eixo vertical = número de núcleos lidos; eixo horizontal = intensidade de fluorescência relativa

Dang et al. (2012) também utilizaram a citometria de fluxo para detectarem falsos haploides em *bulks* de sementes haploides selecionadas, conforme o marcador R-navajo. Foram encontradas sementes haploides numa taxa que variou de 2,8 a 5,5%. Choe et al. (2012) analisaram taxas de falsos positivos por meio de citômetro de fluxo em sementes haploides de milho e obtiveram valores de 89,3% a 22,2% nos híbridos cruzados com a linhagem indutora UH400. Como se pode perceber, a citometria de fluxo tem sido utilizada em muitos trabalhos, e isso se deve à facilidade e rapidez da técnica em obter resultados. Além disso, outra vantagem é que a amostra não é degradada, uma vez que apenas um pedaço da folha é suficiente para as análises (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

Neste trabalho a técnica de citometria de fluxo permitiu analisar as plantas duplicadas em menos de uma semana. Isso se deve a pouca quantidade de amostra exigida pela técnica e também pela rapidez em que o citômetro captura os resultados. Os histogramas obtidos no citômetro de fluxo mostraram que no protocolo 2 foram encontradas ploidias que não foram observadas no protocolo 1. As ploidias do protocolo 2 produziram mais pólen no campo e além disso, também foram colhidas mais sementes que as ploidias observadas no protocolo 1. Provavelmente, as ploidias que foram detectadas apenas no protocolo 2 foram responsáveis pelo sucesso do protocolo na duplicação cromossômica, no desenvolvimento das plantas no campo e também na produção de sementes.

### 3.3 Marcador molecular SSR na caracterização de haploide duplicado

Os indivíduos haploides, haploides/diploides ou duplo-haploides e diploides, identificados anteriormente por meio de citometria de fluxo, foram submetidos a análises moleculares com marcadores microssatélites. Dois *primers* polimórficos, BNLG238 e BNLG 1233, foram usados nas progênes para detectar os haploides gimnogenéticos e confirmar os duplo-haploides detectados na citometria de fluxo.

Os *primers* polimórficos permitiram distinguir os indivíduos haploides, homocigotos, dos diploides, heterocigotos, como também os haploides/diploides (Figuras 4 e 5). Por meio das análises moleculares foi possível confirmar a herança gimnogenética da linhagem KEMS, já que os haploides, por serem homocigotos, apresentaram apenas uma banda no gel, que é proveniente do genitor híbrido. Os duplo-haploides, por terem também herança gimnogenética, apresentaram apenas uma banda no gel. Esse resultado confirma as análises realizadas em citometria de fluxo, entretanto, somente em uma próxima etapa esses resultados serão de fato confirmados. Para isso, as sementes duplo-haploides obtidas neste trabalho serão semeadas em campo e após desenvolvimento dos mesmos, serão analisadas as segregações das linhagens, e então será realizada uma nova seleção.

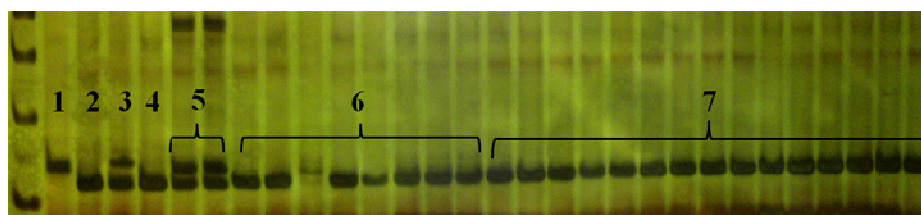


Figura 4 Padrão eletroforético dos produtos de amplificação do *primer* polimórfico BNLG 238. 1) Genitor KEMS. 2) Genitor GNS 3032. 3 e 5) Diploides não duplicados. 4 e 6) Haploides não duplicados. 7) Haploides/diploides, ou duplo-haploides

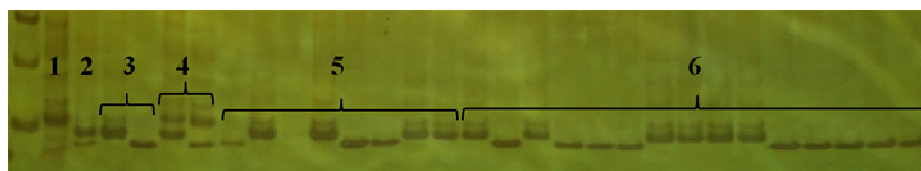


Figura 5 Padrão eletroforético dos produtos de amplificação do *primer* polimórfico BNLG 1233. 1) Genitor KEMS. 2) Genitor GNS 3032. 3 e 5) Haploides não duplicados. 4) Diploides não duplicados. 6) Haploides/diploides, ou duplo-haploides

Os *primers* utilizados possibilitaram distinguir as plantas diploides das plantas haploides. Os híbridos diploides apresentaram duas bandas nos géis, sendo uma proveniente da linhagem KEMS e a outra proveniente do híbrido GNS 3032. Já as plantas haploides apresentaram apenas uma banda, proveniente do híbrido GNS 3032. É possível verificar na Figura 5 que algumas plantas haploide/diploides possuem bandas mais claras, que levam o analista a classificá-las como plantas diploides. Entretanto, mesmo assim ambos os *primers* foram utilizados na genotipagem, e de acordo com a amplificação das bandas dos diferentes genótipos, o *primer* BNLG 238 pode ser selecionado para ser usado em outros trabalhos. Essas mesmas plantas haploide/diploides, na Figura 4, apresentaram bandas fortes no gel, confirmando a ploidia detectada na citometria de fluxo.

Os resultados obtidos são coerentes com os observados por Couto et al. (2012), que utilizaram marcadores microssatélites para comprovar a herança androgenética de haploides provenientes do cruzamento de um híbrido tropical com a linhagem W23. Outros autores têm utilizado os marcadores microssatélites em pesquisas com plantas duplicadas de diferentes espécies, além do milho (BATTISTELLI, 2012; LI et al., 2009; PERERA et al., 2008; RABEL, 2008).

Belicuas et al. (2007) utilizaram marcadores microssatélites para detectar haploides androgenéticos em milho, provenientes do cruzamento do híbrido BRS1010 com a linhagem W23. Por meio da técnica utilizada, identificaram quatro haploides entre 462 plantas identificadas, utilizando-se dos *primers* mmc0022 e mmc0081, que foram polimórficos para os genitores. Battistelli (2012) utilizou os marcadores moleculares SSR com o objetivo de confirmar se as plantas que apresentaram picos de células haploides nos histogramas gerados pela citometria de fluxo eram realmente haploides. Os indivíduos haploides identificados pelo autor na citometria de fluxo apresentaram bandas apenas dos híbridos doadores nos géis, confirmando a ploidia haploide.

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

### **3.4 Viabilidade polínica**

As ploidias avaliadas apresentaram diferenças significativas para as taxas de viabilidade polínica para os corantes Alexander e carmim propiônico (Tabela 4 e Figura 6). Os indivíduos tetraploides apresentaram as maiores taxas de viabilidade, seguidos dos indivíduos haploides. Os indivíduos diploides e duplo-haploides apresentaram as menores taxas. Não houve diferenças significativas entre os dois corantes utilizados, indicando boa precisão nas avaliações de viabilidade e maior confiabilidade dos resultados. Na literatura ainda não há relatos de um corante específico para testes de viabilidade universal. Além disso, muitos autores têm destacado deficiência nas análises de viabilidade polínica devido aos corantes utilizados. Andres, Rodriguez e Duran

(1999), por exemplo, utilizaram carmim acético em estudos de germinação *in vitro*, para avaliar crescimento de tubo polínico, e verificaram que os resultados foram superestimados com a utilização desses corantes. Neste trabalho, como não foram observadas diferenças significativas entre os corantes, as análises são confiáveis, indicando que os corantes utilizados podem ser utilizados em outras análises envolvendo ploidias em milho duplicado.

Tabela 4 Viabilidade polínica utilizando testes colorimétricos em ploidias de milho submetido à duplicação cromossômica

Ploidias	Carmim Propiônico	Corante de Alexander
Haploide	8,42Ab	4,02Ab
Duplo-haploide	0,62Ac	0,4Ac
Diploide	0,55Ac	0,51Ac
Tetraploide	86,45Aa	84,07Aa

Letras minúsculas distintas na coluna: diferença significativa pelo teste de Scott e Knott ( $p < 0,05$ ).

Letras maiúsculas distintas na linha: diferença significativa pelo teste de Scott e Knott ( $p < 0,05$ ).

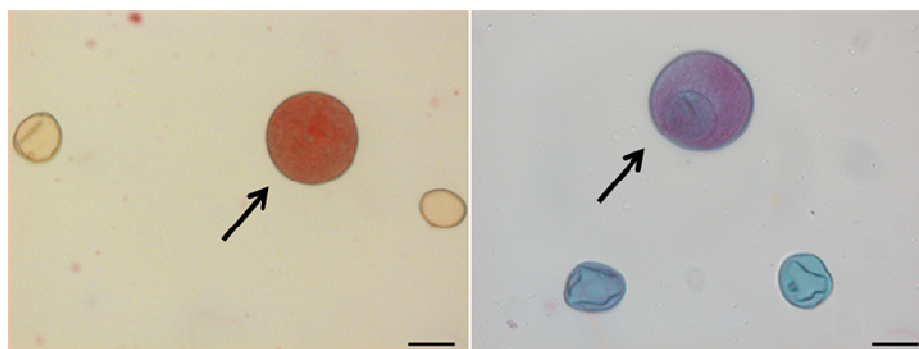


Figura 6 Grãos de pólen de plantas de milho submetidos à duplicação cromossômica, corados com corante de Alexander (A) e carmim propiônico (B). A seta indica grãos de pólen viáveis. Barra = 5  $\mu$ M

É interessante ressaltar que, mesmo padronizando as coletas dos pendões e das plantas no campo, os duplo-haploides, considerados aqui como

haploides duplicados, apresentaram taxas de viabilidade menores que os haploides que não foram duplicados. Além disso, os indivíduos diploides, que esperava-se que apresentassem altas taxas de viabilidade, apresentaram taxas menores que os haploides. Segundo Techio et al. (2006), as diferenças encontradas podem ser explicadas devido à perda de viabilidade do pólen, que pode variar consideravelmente entre indivíduos de uma espécie e entre amostras de um mesmo indivíduo.

As maiores taxas de viabilidade observadas nos indivíduos haploides, quando comparadas com os indivíduos diploides e duplo-haploides pode ser explicada devido às plantas em que se retirou a amostra para as análises de viabilidade. Neste trabalho as coletas das amostras foram realizadas buscando-se padronizar as plantas de onde foram retiradas as anteras. No entanto, a padronização das coletas foi apenas visual e o que pode ter ocorrido, é que as plantas que a citometria de fluxo identificou como haploides, e foram coletadas para análises de viabilidade polínica, tiveram suas células precursoras dos gametas duplicados, após as análises de quantidade de DNA. Desse modo, elas produziram pólen fértil. Além disso, na literatura, vários autores destacam que plantas haploides podem produzir pendão fértil. Assim, também pode ter ocorrido esse fato, e as plantas haploides coletadas para as análises e viabilidade polínica eram plantas macho-férteis (CHASE, 1974; GEIGER; SCHÖNLEBEN, 2011), produzindo também pólen fértil. Geiger e Schönleben (2011), ao estudarem diferentes fontes de germoplasma, encontraram plantas haploides produzindo pólen viável. Os autores destacam a importância disso para os melhoristas, uma vez que em longo prazo, essas plantas haploides podem ser aperfeiçoadas para produzirem pólen férteis, permitindo eliminar a duplicação cromossômica artificial em laboratório. Como discutido anteriormente, o uso de corantes é uma técnica simples que apresenta resultados rápidos. Entretanto, Stanley e Linskens (1974) questionaram a validade desse método uma vez que

podem ocorrer erros nos resultados, devido à coloração de grãos de pólen inviáveis ou grãos de pólen imaturos abortados.

Vários são os trabalhos envolvendo viabilidade polínica em milho, porém até o momento não foram relatados experimentos a cerca de viabilidade em plantas submetidas à duplicação cromossômica artificial. Davide et al. (2009), ao verificarem viabilidade de pólen armazenado, por meio de testes *in vivo* e *in vitro*, obtiveram valores superiores a 95% de viabilidade polínica quando utilizado o corante Alexander. Esse valor foi independente do material genético utilizado, da taxa de germinação *in vitro* e da produção de sementes por espigas. Em outros trabalhos de viabilidade polínica em milho, autores discutem a perda de viabilidade polínica à medida que os grãos de pólen são dessecados (ALMEIDA et al., 2011; FERREIRA et al., 2007; ALVIM, 2012).

As taxas de viabilidade entre as ploidias estudadas possuem um potencial para a fertilização, e isso foi observado principalmente nos indivíduos tetraploides.

#### **4 CONCLUSÕES**

A citometria de fluxo pode ser utilizada para se obter mais informações nas pesquisas, uma vez que permitiu que haploides duplicados fossem identificados.

Os marcadores moleculares SSR podem ser utilizados na comprovação da herança gimnogenética da linhagem KEMS e também na identificação das plantas duplo-haploides de milho.

A viabilidade polínica é uma técnica complementar à citometria de fluxo, que permite analisar pólenes viáveis.

**REFERÊNCIAS**

- ALMEIDA, C., AMARAL, A. L., NETO, J. F. B., SERENO, M. J. C. M. Conservação e germinação *in vitro* de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 493-497, out./dez. 2011
- ALVIM, P. O., VON PINHO, R. G., VON PINHO, E. V. R., VEIGA, A. D., OLIVEIRA, K. C., DINIZ, R. P. Meios de cultura para germinação de grãos de pólen de milho. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 5, n. 17, p. 206-211, 2012
- ANDRES, M. V.; RODRIGUEZ, J.; DURAN, J. M. Viabilidade del pólen del albaricoqueiro (*Prunus armeniaca* L.). **Investigación Agraria**, serie Producción y Protección Vegetales, Madrid, v. 14, p. 25-32, 1999.
- BATTISTELLI, G. M. **Estratégias para obtenção e identificação de duplo-haploides em milho tropical**. 2012. 61p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BELICUAS, P. R., GUIMARÃES, C. T., PAIVA, L. V., DUARTE, J. M., MALUF, W. R., PAIVA, E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 156, n. 1/2, p. 95-102, July 2007.
- CHALYK, S. T. Obtaining fertile pollen in maize maternal haploids. **Maize Genetics Cooperation**, Urbana, v. 74, n. 1, p. 17-18, 2000.
- CHASE, S. S.; NANDA, D. K. Comparison of variability in inbred lines and monoplod-derived lines of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 5, n. 4, p. 275-276, Sept./Oct. 1965.

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

CHOE, E. H., CARBONERO, C H., MULVANEY, K., RAYBURN, A. L., MUMM, R. H. Improving in vivo maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives. **Plant Breeding**, Bonn, n. 3, v. 131, p. 399-401, 2012.

COE, E. H. A line of maize with high haploid frequency. **American Naturalist**, Chicago, v. 93, n. 870, p. 381-382, June 1959.

COUTO, E. G. O., DAVIDE, L. M. C., BUSTAMANTE, F.O., VON PINHO, R. G., SILVA, T. N. 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.

DANG, N. C. MUNSCH, M., AULINGER, I., RENLAI, W., STAMP, P. Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays*. L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 183, n. 2, p. 153-160, Jan. 2012.

DAVIDE, L. M. C., PEREIRA, R. C., ABREU, G. B., SOUZA, J. C., VON PINHO, E. V. R. Viabilidade de pólen de milho em diferentes períodos de armazenamento em baixa temperatura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 8, n. 2, p. 199-206, 2009.

DEIMLING, S.; ROBER, F.; GEIGER, H. H. Methodik und genetik der in-vivo-Haploideninduktion bei mais. **Vorträge für Pflanzenzüchtung**, Quedlinburg, v. 38, p. 203-224, 1997.

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

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v. 19, p. 11-15, 1987.

FERREIRA, C. A., VON PINHO, E. V. R., ALVIM, P.O, ANDRADE, V., SILVA, T. T. A., CARDOSO, D. L. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, n. 2, p. 159-173, 2007.

GAYEN, P., MADAN, J. K., KUMAR, R., SARKAR, K. R. Chromosome doubling in haploids through colchicine. **Maize Genetics Cooperation NewsLetter**, Columbia, v. 68, n. 1, p. 65, 1994.

GEIGER, H. H. Doubled haploids. In: BENNETZEN, J. L.; HAKE, S. **Handbook of maize: genetics and genomics**. New York: Springer, 2009. p. 641-657.

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

KERMICLE, J. L. Androgenesis and the indeterminate gametophyte(ig) mutation: influence of pollen parent on androgenese frequency. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 47, n. 45, p. 207-208, 1973.

LI, L., XU, X., JIN, W., CHEN, S. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. **Planta**, Beijing, v. 230, n. 2, p. 367-376, May 2009.

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

PERERA, P. I. P., PERERA, L., HOCHER, V., VERDEIL, J. L., YAKANDAWALA, D. M., WEERAKOON, L. K. Use of SSR markers to determine the anther-derived homozygous lines in coconut. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 1697-1703, 2008.

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

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

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

ROTARENCO, V. A., DICU, G., STATE, D., FUIA, S. New inducers of maternal haploids in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Urbana, v. 84, 2010. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/mnl/84/PDF/15rotarenco.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

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: 23 jan. 2013.

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

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307 p.

TECHIO, V. H., DAVIDE, L. C., PEDROZO, C. A., PEREIRA, A. V.  
Viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos  
interespecíficos (capim-elefante x milho). **Revista Acta Scientia Biologica**,  
Maringá, v. 28, n. 1, p. 7-12, jan./mar. 2006.

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